

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta strojního inženýrství

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



**Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovláknenných
vrstev v simulovaných tělních podmínkách**

**Mechanical and structural properties of collagen nanofibrous layers
under simulated body conditions**

Diplomová práce

Studijní program: Strojní inženýrství

Studijní obor: Biomechanika a lékařské přístroje

Autor práce: Bc. Jitka Říhová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Suchý, Ph.D., Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Říhová** Jméno: **Jitka** Osobní číslo: **406087**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Strojní inženýrství**
Studijní obor: **Biomechanika a lékařské přístroje**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách

Název diplomové práce anglicky:

Mechanical and structural properties of collagen nanofibrous layers under simulated body conditions

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma nanovláknenných vrstev pro tkáňové inženýrství se zaměřením na přírodní polymery, jejich přípravu a změny jejich vlastností vlivem tělních podmínek včetně kontaktu s kostními buňkami a buňkami vaziva.
2. Navrhněte a realizujte experimentální analýzu mechanických vlastností nanovláknenných vrstev za různých podmínek simulujících tělní prostředí a při kontaktu s kostními buňkami a buňkami vaziva.
3. Analyzujte vliv simulovaného prostředí a vliv kultivace kostních buněk a buněk vaziva na mechanické a strukturní vlastnosti vrstev.
4. Interpretujte výsledky s ohledem na simulované procesy a potenciální přestavbu vrstev vlivem buněčné aktivity.

Seznam doporučené literatury:

1. FRATZL, Peter. Collagen, structure and mechanics. New York: Springer, 2008.
2. Rýglová Š, Braun M, Suchý T. Collagen and Its Modifications? Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. Macromolecular Materials and Engineering. 2017, 302(6), 16004600.
3. Beachley V and Wen X: Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. Prog Polym Sci. 2010; 35(7): 868-892.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

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

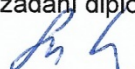
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:


Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D., Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova


Datum zadání diplomové práce: **18.04.2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **17.08.2018**

Platnost zadání diplomové práce: _____


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



prof. Ing. Milan Růžička, CSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

18.04.2018
Datum převzetí zadání


Podpis studentky

Název diplomové práce: Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách

Abstrakt:

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na sledování změn mechanických a strukturních vlastností kolagenových nanovrstev vlivem činnosti buněk. Tyto změny byly sledovány během a po expozici v samotném kultivačním médiu a v přítomnosti dermálních fibroblastů a osteoblastů, které byly na vzorcích kultivovány po dobu tří týdnů.

Úspěšnost kultivace byla hodnocena pomocí fluorescenční mikroskopie a pomocí hodnocení metabolické aktivity kultivovaných buněk. Změny mechanických vlastností byly měřeny jednoosou tahovou zkouškou, u které se vyhodnocoval počáteční modul pružnosti v prvním a posledním zatěžovacím cyklu a mez pevnosti kolagenové vrstvy. Strukturní změny byly sledovány pomocí infračervené spektroskopie a elektronové mikroskopie.

Kultivace byla hodnocena jako úspěšná. Změny počátečního modulu pružnosti byly pozorovány nejvíce u prvního zatěžovacího cyklu, kde byly u vzorků s fibroblasty i osteoblasty zaznamenány statisticky významné rozdíly hodnot mezi 1. a 21. prvním dnem kultivace. U posledního zatěžovacího cyklu byly statisticky významné změny mezi 1. a 21. dnem kultivace pozorovány pouze u vzorků s osteoblasty. Naopak, mez pevnosti rostla jak v médiu bez buněk, tak v přítomnosti obou typů buněk, a tuto změnu tedy nelze přičíst pouze působení buněk. Infračervená spektroskopie ukázala změny v helikální struktuře vzorků kultivovaných s osteoblasty. Na snímcích z elektronové mikroskopie, ze kterých byly měřeny průměry vláken, změny pozorovány nebyly.

Fibroblasty i osteoblasty mohou svojí činností ovlivňovat mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovrstev. Popis buněčných mechanismů odpovědných za tyto změny bude součástí dalšího výzkumu, který bude zaměřen především na analýzu enzymových a jiných remodelačních aktivit fibroblastů a osteoblastů.

Klíčová slova: kolagen, strukturní vlastnosti, mechanické vlastnosti, biodegradace, fibroblasty, osteoblasty

Diploma Thesis title: Mechanical and structural properties of collagen nanofibrous layers under simulated body conditions

Abstract:

In my thesis I focused on changes in mechanical and structural properties of collagen nanolayers due to cellular activity. These changes were monitored during and after exposure in the culture medium itself and in the presence of dermal fibroblasts and osteoblasts which were cultured on collagen nanolayers for three weeks.

The cell culture on collagen nanolayers was assessed by fluorescence microscopy and metabolic activity. Changes in mechanical properties were measured by a unilateral tensile test in which the initial modulus of elasticity in the first and last load cycle and the ultimate tensile strength of the collagen layer was evaluated. Structural changes were monitored by infrared spectroscopy and electron microscopy.

Fibroblasts and osteoblasts were successfully plated and cultured on collagen nanolayers. Changes in the initial modulus of elasticity were observed most in the first load cycle, where both the fibroblast and the osteoblast samples showed statistically significant differences between the 1st and 21st day of the cultivation. For the last load cycle, statistically significant changes between 1st and 21st day of cultivation were observed only in samples with osteoblasts. On the other hand, ultimate tensile strength increased in both cell culture media as well as in layers with cultured cells, thus the changes in ultimate tensile strength cannot be addressed only to cell activity. The infrared spectroscopy revealed the changes in helical structure of collagen nanolayers only in osteoblast specimens. Fiber diameters changes which were measured from images from electron microscopy were not observed.

Fibroblasts and osteoblasts can influence mechanical and structural properties of collagen nanoparticles. Identification of cellular mechanisms responsible for the mechanical changes will be the aim of following research focused on the analysis of enzymatic activity and remodeling procedures of dermal fibroblasts and osteoblasts.

Key words: collagen, structural properties, mechanical properties, biodegradation, fibroblasts, osteoblasts

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucím své práce Ing. Tomáši Suchému a Ph.D., Ing. Lucii Vištejnové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování diplomové práce. Mé poděkování patří též doc. Ing. Lukáši Hornému, Ph.D. za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „*Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovlákných vrstev v simulovaných tělních podmínkách*“ vypracovala samostatně a použila jsem k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto 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 22.8.2018

Bc. Jitka Říhová

Obsah

SEZNAM FYZIKÁLNÍCH VELIČIN A MATEMATICKÝCH SYMBOLŮ	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
1 ÚVOD	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	12
2.1.1 <i>Hlavní oblast využití tkáňového inženýrství – pojivové tkáně</i>	14
2.2 MATERIÁLY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	17
2.2.1 <i>Přírodní polymery</i>	17
2.2.2 <i>Kompozity</i>	19
2.3 VLASTNOSTI MATERIÁLŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	22
2.3.1 <i>Mechanické vlastnosti</i>	23
2.4 INTERAKCE BUŇKA–MATERIÁL.....	26
2.4.1 <i>Mechanismus adheze</i>	26
2.5 VLIV TĚLNÍCH PODMÍNEK NA MATERIÁL.....	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ	28
3.2 KULTIVACE MATERIÁLŮ S BUŇKAMI	30
3.3 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ KULTIVACE.....	32
3.3.1 <i>Fluorescenční mikroskopie</i>	32
3.3.2 <i>Metabolická aktivita</i>	32
3.4 ANALÝZA MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ	32
3.5 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE.....	34
3.6 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	35
3.7 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	35
4 VÝSLEDKY	36
4.3 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ KULTIVACE.....	36
4.3.1 <i>Fluorescenční mikroskopie</i>	36
4.3.2 <i>Metabolická aktivita</i>	38
4.4 ANALÝZA MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ	39
4.5 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE.....	44
4.6 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	46
5 DISKUZE	50
6 ZÁVĚR	52

REFERENCE	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	56
SEZNAM TABULEK.....	59
SEZNAM PŘÍLOH.....	60

Seznam fyzikálních veličin a matematických symbolů

A	tažnost [%]
F	průměr sil naměřených silovými snímači [N]
l_0	počáteční délka vzorku [mm]
Δl	prodloužení vzorku [mm]
R_a	aritmetická střední hodnota drsnosti [nm]
R_m	mez pevnosti [MPa]
R_e	mez kluzu [MPa]
R_e	mez pružnosti [MPa]
R_u	mez úměrnosti [MPa]
S	plocha průřezu vzorku [mm ²]
Z	kontrakce [%]
ε	poměrné prodloužení [-]
σ	smluvní napětí [MPa]

Seznam použitých zkratek

Ala	alanin
ALP	alkalická fosfatáza
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
COL	kolagenový materiál
DGEA	aminokyselinová sekvence Asp-Gly-Glu-Ala
F	vzorky s fibroblasty
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
HA	kyselina hyaluronová
M	vzorky exponované v médiu
MMP	matrixmetaloproteináza
PA	polyamid
PCL	polykaprolakton
PDO	polydioxanon
PE	polyetylen
PEEK	poly(eter eter keton)
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny polyglykolové a polymléčné
POE	polyortoester
PP	polypropylen
PS	polystyren
PTFE	polytetrafluoretylen
P3HA	poly3 hydroxyalkanát
RGD	aminokyselinová sekvence Arg-Gly-Asp
S	vzorky s osteoblasty
SEM	rastrová elektronová mikroskopie

1 Úvod

Tkáňové inženýrství je jeden ze zavedených přístupů v náhradě tkání a opravě jejich funkcí. Součástí tohoto oboru je zkoumání a vyvíjení nových materiálů, které by bylo možné využít v biomedicíně. Jedním ze směrů je vývoj biokompatibilních nanovlákných vrstev, které je možné připravovat například z polymerů. Tyto nanovrstvy jsou díky svým jedinečným vlastnostem schopné poskytnout buňkám dočasnou mechanickou a strukturní podporu, a napomoci tak obnově poškozených tkání. Současný výzkum v oblasti nanovlákných materiálů se soustředí i do oblasti vláken z přírodních polymerů. Jedná se převážně o materiály, které jsou v lidském těle časem zcela resorbovatelné, a jsou svými vlastnostmi schopné napodobit funkci původní tkáně. Mezi tyto materiály patří například kolagen.

Cílem této práce sledovat změnu mechanických a strukturních vlastností kolagenové nanovrstvy v podmínkách, ve kterých budou následně osazovány buňkami a později implantovány do organismu. V této práci jsou mechanické a strukturní vlastnosti pozorovány v hydratovaném stavu, a to v závislosti na typu kultivovaných buněk a na délce kultivace. Pro splnění cíle práce bylo nutné nejprve zhodnotit úspěšnost kultivace buněk na kolagenové nanovrstvě, k tomu byla využita fluorescenční mikroskopie a hodnocení buněčné metabolické aktivity pomocí metody Alamar Blue assay. Ke stanovení změn mechanických vlastností byla využita jednoosá tahová zkouška, která byla doplněna metodami pro vyhodnocení změny struktury kolagenové nanovrstvy. Jako metoda pro vyhodnocení změny vnitřní struktury nanovrstvy byla použita infračervená spektroskopie umožňující stanovení poměru helikální a denaturované struktury kolagenu, a dále elektronová mikroskopie, ze které je možné zhodnotit změnu průměru vláken.

Práce je rozdělena do 5 kapitol. První kapitola se vztahuje k současnému stavu dané problematiky, popisuje současný pohled na tkáňové inženýrství, na materiály, které se nyní využívají, a na požadavky na tyto materiály. Ve druhé kapitole jsou popsány materiály a metodika testů využitých při testech *in vitro*. Ve třetí kapitole jsou shrnuty výsledky. Čtvrtá kapitola obsahuje diskuzi nad dosaženými výsledky. Poslední kapitola je celkovým shrnutím práce.

2 Teoretická část

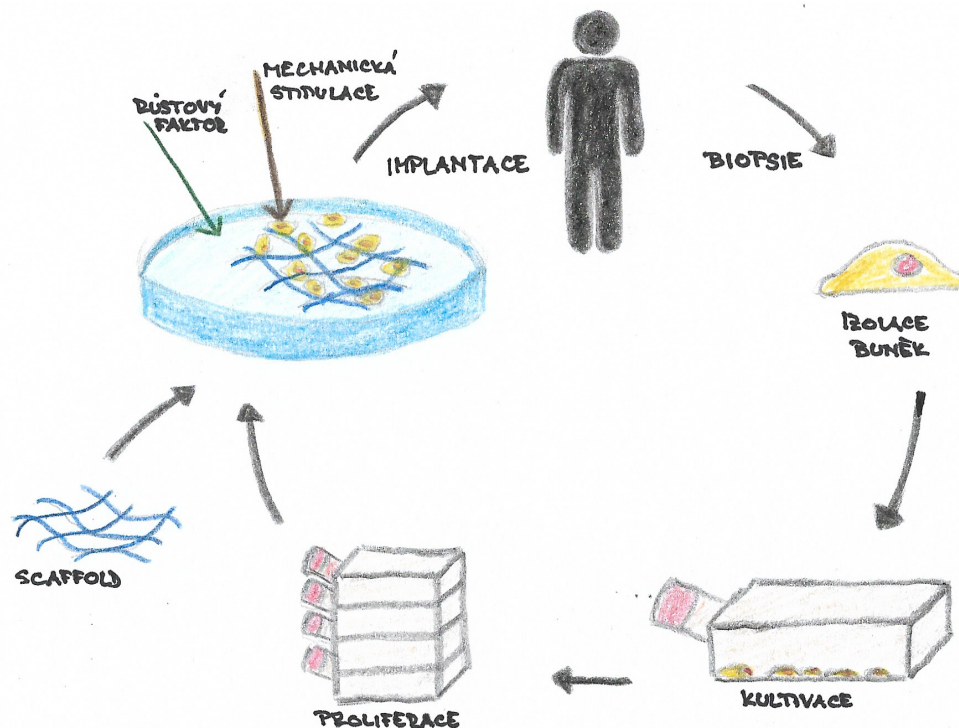
2.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, který spojuje biologii, chemii, fyziku, medicínu a technické obory. Principy těchto oborů využívá pro vývoj biologických náhrad, které obnoví, zachovají či zlepší funkci tkáně či celého orgánu [1].

Typy léčby můžeme v tkáňovém inženýrství rozdělit na:

- a. buněčnou terapii,
- b. tkáňové nosiče (scaffoldy),
- c. kombinaci buněk a scaffoldů.

Buněčná terapie využívá pouze buněk, které jsou transplantovány přímo na místo poškození. Výhodou buněčné terapie je jednoduchá aplikace, většinou injekčně přímo na místo poškození. Nevýhodou je možnost migrace buněk z místa defektu a tím snížení jejich účinnosti. Buněčná terapie se využívá například při nervových onemocněních nebo k léčbě cukrovky. **Tkáňové nosiče (scaffoldy)** jsou struktury připomínající lešení, které slouží k dočasné mechanické podpoře pro buňky, a zároveň jim poskytuje vhodné prostředí pro adhezi, růst a proliferaci. Scaffoldy bez začleněných buněk se využívají z důvodu jednoduché přípravy, neboť odpadá proces přípravy buněk. Scaffoldy se využívají zejména jako výplně v zubním lékařství nebo v případě, že má poškozená tkáň velkou schopnost regenerace, kdy dojde k migraci buněk z okolní tkáně do scaffoldu, který poté slouží jako dočasná výplň defektu. Tato léčba nemusí být dostatečně efektivní, jelikož nejsou společně se scaffoldem implantovány i buňky, které mají schopnost tvorby mezibuněčné hmoty a sebeobnovy. Proto je nejvýhodnější využívání kombinace **buněčné terapie společně se scaffoldy**, která výše popsané nevýhody eliminuje (Obr.1) [1].



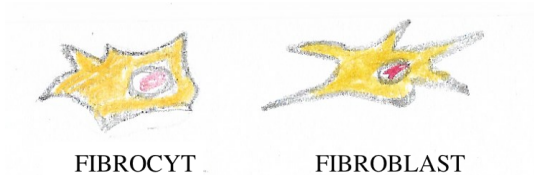
Obr. 1: Princip tkáňového inženýrství využívající kombinaci buněk a scaffoldu.

Tkáňové inženýrství rozlišuje tři základní prvky, které tvoří lidskou tkáň – mezibuněčná hmota, buňky a biologicky aktivní látky. **Mezibuněčná hmota** poskytuje mechanickou oporu pro buňky a slouží jako zdroj signálů regulující proliferaci a diferenciaci buněk. Z hlediska tkáňového inženýrství se jedná o přirozený scaffold. Mezibuněčná hmota je produkována buňkami a je složena z amorfnní a vláknité složky. Amorfnní složka je tvořena glykosaminoglykany, glykoproteiny a proteoglykany, je tuhá a dobře odolává tlaku. Vláknitá složka je tvořena kolagenem a elastinem a dodává mezibuněčné hmotě mechanické vlastnosti jako je odolnost v tahu, elasticita, ap. **Buňky** vykonávají funkce specifické pro danou tkáň, tj. produkují mezibuněčnou hmotu, bioaktivní látky a podílejí se na udržení celkové funkce tkáně. Pro účely tkáňového inženýrství jsou buňky ze zdravých tkání izolovány, *in vitro* kultivovány za fyziologických podmínek (pH, teplota, tlak, živiny) a buď vpraveny do poškozené tkáně samostatně, anebo jako součást scaffoldu, ve kterém byly namnoženy. **Bioaktivní látky** jsou látky biologického původu, které buňky potřebují pro správnou funkci. Patří sem růstové faktory, hormony, ale i mezibuněčná hmota [1].

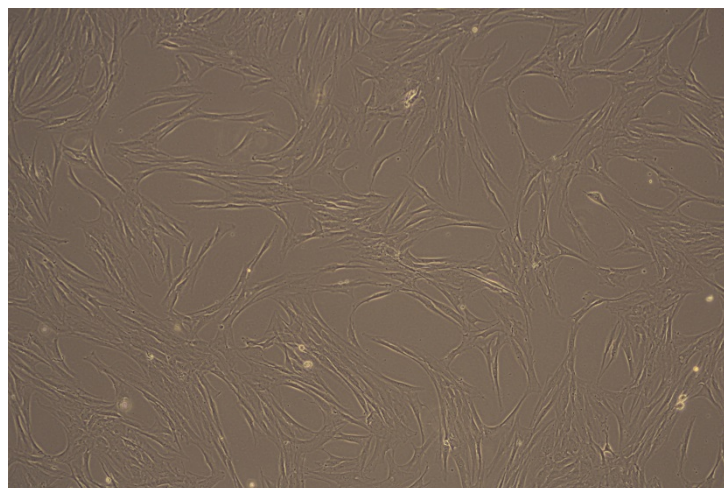
2.1.1 Hlavní oblast využití tkáňového inženýrství – pojivové tkáně

Pojivové tkáně mají v lidském těle mnoho funkcí. Zajišťují mechanickou oporu, látkovou výměnu a slouží jako energetická rezerva organismus. Všechna pojiva se skládají z buněk a mezibuněčné hmoty, která má amorfnní a vláknitou složku. Dle typu zastoupení jednotlivých buněk a charakteru mezibuněčné hmoty můžeme pojiva rozdělit na tři hlavní typy – tkáň vazivovou, chrupavčitou a kostní [2, 3].

Vazivová tkáň je nejrozšířenějším pojivem v lidském těle. Podílí se na stavbě tukové tkáně, šlach, vazů, obalů orgánů, kostní dřene, lymfatické tkáně aj. Je tvořena vazivovými buňkami – fibroblasty a fibrocyty (Obr. 2) a mezibuněčnou hmotou [2, 3]. **Fibroblasty** jsou protáhlé, větvenovité či hvězdicovité buňky, které přiléhají k vazivovým vláknům. **Fibrocyty** jsou větvenovité buňky menší než fibroblasty. Zatímco fibroblasty jsou metabolicky aktivní buňky, které produkují mezibuněčnou hmotu, tj. tropokolagen, proteoglykany a molekuly elastinu. Syntetická i mitotická aktivita fibrocytů je minimální a tvoří pouze stavební oporu vaziva [2, 3].



Obr. 2: Vazivové buňky – fibrocyty a fibroblasty.



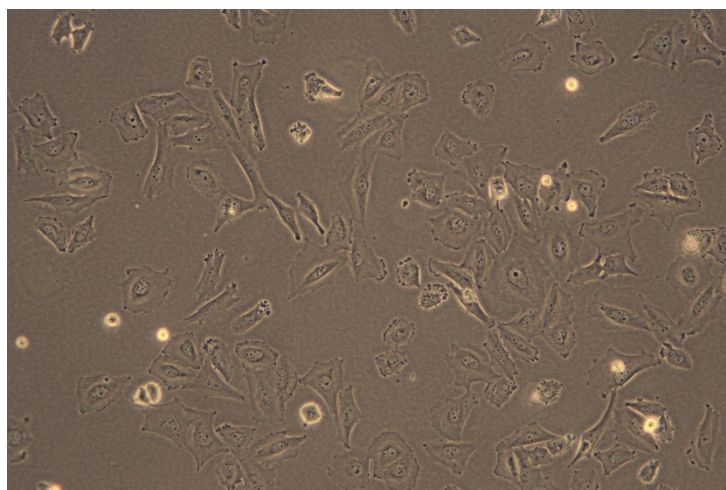
Obr. 3: Dermální fibroblasty použité v této práci. Dermální fibroblasty jsou kultivovány na běžném polystyrenovém povrchu. Zvětšení 10x.

Mezibuněčná hmota vaziva je tvořena kolagenními, elastickými, retikulárními vlákny a amorfní mezibuněčnou hmotou. Kolagenní vlákna dodávají vazivu pevnost v tahu, lze je ovšem protáhnout pouze o 8–10 %. Vlákna elastická nejsou pevná, ale mohou se protáhnout až na 100–150 %. Retikulární vlákna jsou jemná, tenká a rozvětvená vlákna, která tvoří prostorové sítě pro lymfatické systémy a vytváří kostru, která slouží pro uložení lymfocytů. Amorfní mezibuněčná hmota slouží jako výplň mezi vláknitou a buněčnou složkou vaziva. Je tvořena převážně glykosaminoglykany, proteoglykany a multiadhesivními proteiny a velkým množstvím vody [2–4].

Kost je tvrdá tkáň, která má podpůrnou a ochrannou funkci, slouží také jako zásobník minerálů a energie, a podílí se na krvetvorbě. Jako všechna pojiva, se i kostní tkáň skládá z buněk – osteoblastů, osteocytů a osteoklastů (Obr. 4, 5), a z mezibuněčné hmoty. Z uvedených pojiv je kostní tkáň nejtvrďší. To je způsobeno prostupem mezibuněčné hmoty anorganickými solemi (fosforečnan vápenatý a uhličitán vápenatý), které však nejsou v kosti uloženy trvale, ale neustále se vyměňují [3]. **Osteoblasty** jsou buňky kubického tvaru s četnými výběžky, které slouží pro kontakt mezi jednotlivými osteoblasty. Díky těmto kontaktům je realizována látková výměna kosti. Osteoblasty jsou v kosti přítomny v místech, kde dochází k novotvorbě, či přestavbě kosti. Jedná se o aktivní kostní buňky, které produkují kolagenní vlákna a amorfní mezibuněčnou hmotu. Dále produkují enzymy, které se podílejí na mineralizaci kostní tkáně. **Osteocyty** tvoří většinu tkáně dospělé kosti. Vznikají usídlováním osteoblastů v mezibuněčné hmotě. Tento typ buněk se účastní uvolňování minerálů z kostní tkáně. Díky této funkci se zapojují do regulačních mechanismů zajišťujících hladinu vápníku v tělních tekutinách. **Osteoklasty** jsou velké buňky, které jsou přítomny v místech přestavby kosti. Přestavba kosti je doprovázena resorpcí kostní tkáně, kterou zajišťují právě osteoklasty. Osteoklasty produkují enzymy, které jsou schopné uvolnit kostní minerály a rozrušit strukturu základní hmoty. Dalo by se říci, že osteoklasty uvolňují prostor pro nově vytvořenou kostní tkáň a napomáhají její remodelaci [2].



Obr. 4: Kostní buňky – osteoblasty, osteocyty a osteoklasty.



Obr. 5: Kostní buňky lidská linie SAOS-2 použité v této práci. SAOS-2 jsou kultivovány na běžném polystyrenovém povrchu, zvětšení 10x.

Mezibuněčná hmota kosti má stejný charakter jako u ostatních druhů pojiv. Skládá se z ústrojné složky (=ossein), kterou lze rozdělit na složku vláknitou a amorfni. U kostní tkáně je navíc mezibuněčná hmota prostoupena anorganickými solemi. Vláknitá složka je tvořena převážně kolagenovými vlákny typu I. Amorfni mezibuněčná hmota vyplňuje prostory mezi buňkami a vlákny. Amorfni složku tvoří proteoglykany, které slouží ke stmelení jednotlivých kolagenních vláken a kostních buněk. Patří mezi ně proteoglykany obsahující chondroitinsulfát a keratansulfát, strukturální glykoproteiny (osteonektin, sialoprotein, osteokalcin). Anorganická složka mezibuněčné hmoty tvoří až 60 % hmotnosti kosti. Váže se na kolagen ve formě krystalů vápenatých solí, kalcium fosfátu, chemicky a strukturně podobnému fosforečnanu vápenatému – $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ a hydroxyapatitu – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ a obsahujícímu ještě další chemické prvky, jako například hořčík a sodík. Krystaly se vážou v místech mezer mezi jednotlivými tropokolagenovými vlákny a důsledkem tohoto spojení jsou specifické mechanické vlastnosti kostí. Zatímco anorganická složka mezibuněčné hmoty je nositelem tvrdosti a pevnosti kosti, organická složka je nositelkou pružnosti. Kombinací obou složek vznikají mechanické vlastnosti, které z kostní tkáně tvoří odolnou, tvrdou a částečně pružnou tkáň [3-5].

2.2 Materiály pro tkáňové inženýrství

Materiály, které se v současné době využívají v tkáňovém inženýrství nebo jsou pro něj vyvíjeny lze obecně rozdělit do několika skupin [6, 7]:

- a. syntetické polymery,
- b. přírodní polymery,
- c. kompozity.

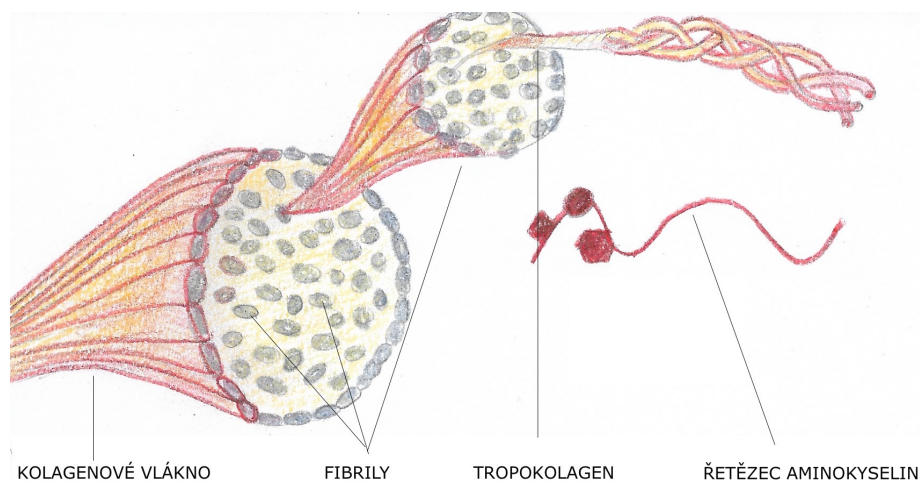
Příklady materiálů z jednotlivých skupin a srovnání výhod a nevýhod jejich aplikace je souhrnně uvedeno v Tab. 1. Vzhledem k tématu práce se tato kapitola zaměřuje pouze na kolagen, který patří mezi přírodní polymery a využívá se také pro přípravu kompozitů.

2.2.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery mají většinou velmi dobrou biokompatibilitu, jelikož jsou pro lidský organismus přirozené a měly by tak minimálně vyvolávat nežádoucí imunitní reakce. Na rozdíl od syntetických polymerů jsou velmi špatně zpracovatelné a chemicky modifikovatelné, vyznačují se malou pevností a dají se jen těžko reprodukovat vinou různorodosti přírodních zdrojů potřebných pro jejich izolaci. Mezi přírodní polymery pro medicínské aplikace patří vedle kolagenu také například elastin a hyaluronan [8].

Kolagen

Kolagen je extracelulární, ve vodě nerozpustný protein. Patří mezi nejrozšířenější bílkovinu v lidském těle, kde představuje přibližně 25–30 % všech bílkovin. Vyskytuje se v mezibuněčné hmotě pojivových tkání v podobě kolagenových vláken (Obr. 6). V současné době je známo 28 různých typů kolagenů. Jednotlivé druhy kolagenů se od sebe liší především strukturou a aminokyselinovým složením. Nejrozšířenějším typem kolagenu v lidském organismu je typ I [9].



Obr. 6: Struktura kolagenových vláken.

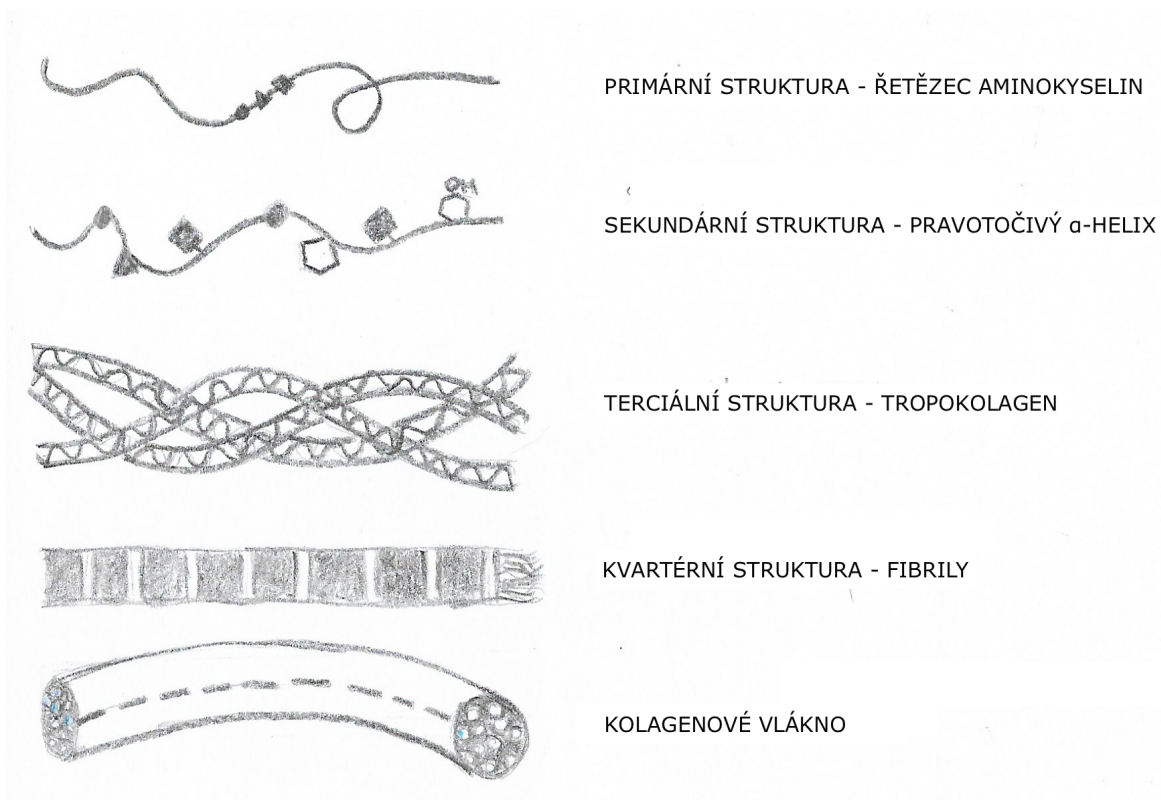
Struktura a vlastnosti kolagenu

Kolagen je organická makromolekulární látka tvořená aminokyselinami spojenými peptidovými vazbami. Struktura bílkovin je velmi důležitá pro jejich správnou funkci. Je popisována na čtyřech úrovních (Obr. 7):

- a. primární struktura – uspořádání jednotlivých aminokyselin v řetězci,
- b. sekundární struktura – prostorové uspořádání aminokyselin v řetězci,
- c. terciální struktura – vzájemné uspořádání prvků sekundární struktury,
- d. kvartérní struktura – vzájemné prostorové uspořádání polypeptidových řetězců [10].

Molekula kolagenu je tvořena převážně glycinen, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylysinem. **Primární struktura** kolagenu je dána sekvencemi aminokyselin v peptidovém řetězci a popisuje peptidové vazby a charakter vedlejších vazeb. **Sekundární struktura** udává prostorové uspořádání, které je dáno sekvencemi aminokyselin. Struktura kolagenu je pravotočivý α -helix. Základní stavební jednotkou sekundární struktury kolagenu je tedy levotočivá šroubovice polypeptidů, která je svinutá do pravotočivé šroubovice. **Terciální struktura** je tvořena třemi levotočivými řetězci tvořícími pravotočivou trojšroubovici. Takto vzniklý útvar se nazývá tropokolagen a tvoří základní stavební kámen kolagenu. Jeho soudržnost je dána vodíkovými můstky, které vznikají pouze těsným přiblížením řetězců. Toto přiblížení je zajištěno glycinen. **Kvartérní struktura** stanovuje vláknitou povahu kolagenu. Vlákna kolagenu jsou měkká, ohebná a pevná v tahu, ale vyznačují se malou pružností. Ve tkáních mohou být fibrily uspořádány do svazků, jako je tomu například u šlach a vazů [10, 11].

V biomedicínských aplikacích se kolagen využívá na výrobu chirurgického šicího materiálu, ve formě fibril v kostní a čelistní chirurgii, ve formě vláken spletených do sítě na náhradu pokožky, náhradu cév nebo krytí ran, a také v denaturovaných formách jako želatina, klíh, hydrolyzáty kolagenu, dále jako pojiva tablet, kapsule, emulgátory nebo zahušťovadla [8].



Obr. 7: Struktura kolagenu

V důsledku primárního složení a uspořádání kolagenu jsou kolagenní fibrily mimořádně přizpůsobené k tomu, aby vydržely napětí v tahu. Vzniklé trhliny v kolagenních vláknech se nemohou rozšiřovat tak snadno, jako by tomu bylo, kdyby byl kolagen uspořádán jako jednolitá hmota. V důsledku příčných vazeb mezi molekulami dochází ke zvýšení pevnosti kolagenních vláken. Stabilita těchto vazeb však závisí na vlastnostech proteoglykanů obsažených v mezibuněčné hmotě. Výslednou pevnost a pružnost ovlivňuje uspořádání molekul tropokolagenu. Molekuly se vzájemně překrývají a nachází se mezi nimi mezery, které umožňují jejich vzájemný posun. S věkem a v důsledku onemocnění klesá mez pevnosti v tahu a snižuje se hodnota maximálního protažení [9, 12, 13].

2.2.2 Kompozity

Kompozity jsou kombinované materiály tvořené ze dvou a více fází rozdílných vlastností, které dávají výslednému materiálu vlastnosti nové. Kompozitní materiály jsou tvořeny z nosné části (výztuže) a matrice. Matrice má funkci pojiv a dává kompozitu vnější tvar, nosná část funguje jako výztuž. Kompozity můžeme rozdělit například podle typu výztuže na vláknové (s výztuží tvořenou dlouhými nebo krátkými vlákny), částicové, nebo hybridní

kombinující vlákna i částice. Dále můžeme kompozity rozdělit dle materiálu výztuže, kterou mohou být kovová vlákna a jejich slitiny, nekovové materiály, mezi které řadíme anorganické materiály (keramika, skla) a syntetické materiály (polymery – kevlar, nylon atp.). Kompozity lze dělit také dle materiálu matrice, kterými mohou být, stejně jako materiál výztuže, kovové, či jiné anorganické materiály (keramika, skla, uhlík) a syntetické materiály (polyestery, polyamidy atd.). Materiál vláken a materiál matrice je možné různě kombinovat, aby bylo dosaženo požadovaných vlastností. V medicíně se využívá například kompozitů typu polymer-keramika polymer-kov, kov-keramika [6, 14-16].

V tkáňovém inženýrství se využívá především kombinací syntetických polymerů a nanovláken nebo nanočástic. Tyto materiály jsou využívány také k řízenému uvolňování léčiv. Pro tkáňové inženýrství kostí jsou nejvíce využívány kompozitní materiály polymer-biokeramika [1].

Tab 1: Přehled materiálů potenciálně využívaných v tkáňovém inženýrství [1]

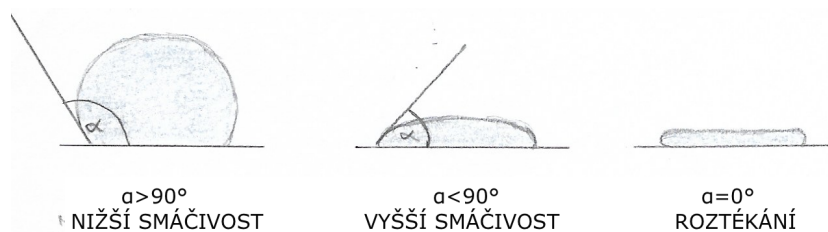
MATERIÁL	PŘÍKLADY	VYUŽITÍ	VÝHODY	NEVÝHODY	
POLYMERY	PGA (kyselina polyglykolová)	Porézní 3D scaffolds	<p>Odolné, snadno zpracovatelné, degradovatelné, vysoká viabilita buněk, dobré mechanické vlastnosti, biokompatibilní</p> <p>Málo pevné, časem deformovatelné, degradovatelné</p>		
	PLA (kyseliny polymlečná)	Nosiče pro cílený transport léčiv			
	SYNTECKÉ POLYMERY	PLGA (kopolymer kyseliny glykolové a mléčné)			Nosiče pro cílený transport léčiv, membrány pro řízenou regeneraci tkání
		PCL (polykaprolakton)			Nosiče léčiv pro dlouhodobé uvolňování
		POE (polyoester)			Tlumení postoperační bolesti, léčba nemocí očí
		P3HA (poly3 hydroxyalkanát)			Matrice pro nosiče léčiv, výztuže pro stimulaci léčby kostí
	PŘÍRODNÍ POLYMERY	Kolagen			Scaffolds
		Elastin			Scaffolds pro TE cév a vazů,
		Chitosan			Rekonstrukce klůže
		Celulóza			Ochranné koloidy, homeostatikum
	HA (kyselina hyaluronová)	Scaffold na regeneraci chrupavek a kostních děteků			
POLYMERNÍ NANOKOMPOZITY	kompozity typu polymer-keramika, anorganické biodegradabilní polymery s uhlíkovými nanotrubičkami	Imobilizace biomolekul, scaffolds pro regeneraci kostí	Pevné, možnost snadno ovlivnit vlastnosti	Těžce vyrobitelné	

2.3 Vlastnosti materiálů pro tkáňové inženýrství

Materiály by měly splňovat několik základních vlastností, jako biokompatibilitu, vhodnou míru degradace, mechanické vlastnosti, porozitu, smáčivost a drsnost povrchu [6].

Biokompatibilita je schopnost vzájemné snášenlivosti hostitele s umělým orgánem. Pro biokompatibilní materiál je důležité, aby nevyvolával cytotoxické a zánětlivé reakce a aby neuvolňoval toxické látky do organismu. **Degradace** je proces, který vede k nevratné změně struktury a vlastností vlivem času (stárnutí), teploty, světelného záření, chemických látek (kyseliny, soli), biologických činitelů, mechanického namáhání. Degradace se projevuje rozkladem na menší části a je doprovázena ztrátou mechanických vlastností materiálu [1, 8, 17, 18].

Mezi povrchové vlastnosti materiálu patří polarita, smáčivost, povrchová drsnost, porozita a topografie. Jedná se o vlastnosti materiálu, které mají zásadní vliv na adhezi, růst a diferenciaci buněk na daném materiálu. **Polarita** povrchu má za následek vznik povrchové energie, kterou vyjadřujeme pomocí povrchového napětí. S rostoucí hodnotou povrchového napětí roste polarita povrchu. Polarita je velmi důležitý ukazatel adheze buněk k biomateriálu, proto je u řady polymerů nutná modifikace, která vede ke zvýšení jejich povrchového napětí a tím zlepšení adhezních mechanismů. **Smáčivost povrchu** je dalším důležitým parametrem pro adhezi buněk. Tato vlastnost se nejčastěji měří pomocí kontaktního úhlu polární a nepolární kapaliny na povrchu materiálu (Obr.8) [8, 16, 19].



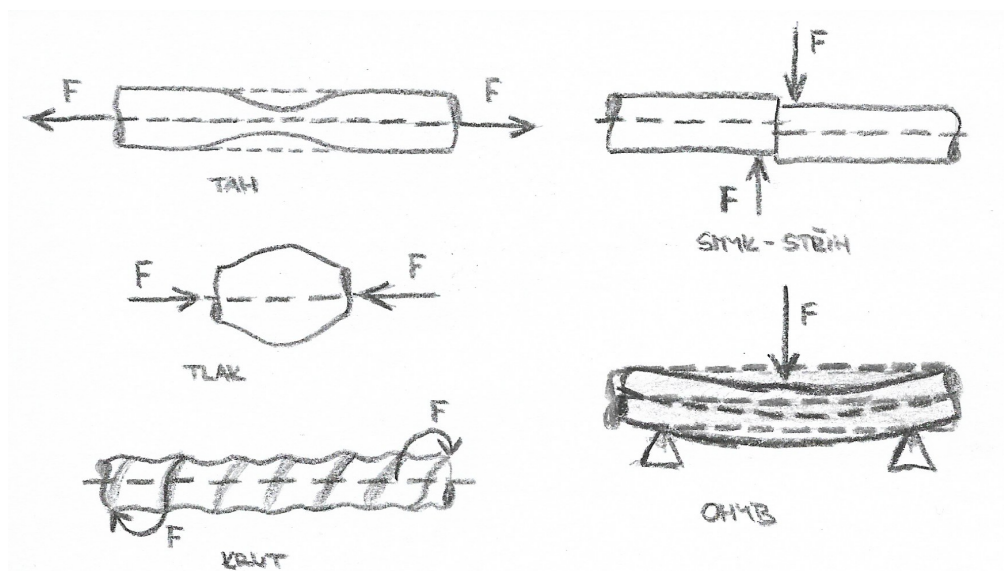
Obr. 8: Smáčivost povrchu. Kontaktní úhel větší než 90° mají hydrofobní povrchy. Úhel 0° mají hydrofilní povrchy.

Drsnost je nerovnost povrchu, která vzniká při výrobě. Drsnost materiálu lze rozlišovat dle míry nepravidelností na **makrodrsnost**, která zlepšuje upevnění implantátu v přirozené tkáni a obvykle ani negativně neovlivňuje adhezi a rozprostření buněk. Naopak u **mikrodrsnosti** je pozorována snížená adheze buněk na mikrodrsném povrchu, to může být způsobeno topografií povrchu, která způsobuje limitaci adhezní plochy. Buňky jsou na těchto površích nuceny vyhýbat se nerovnostem, což omezuje jejich kontakt s materiálem. Povrch s **nanodrsností** podporuje adhezi a následnou diferenciaci buněk, převážně

osteoblastů. Je to důsledek podobné struktury těchto povrchů s extracelulární matrix kosti. Pro interakci mezi materiálem a buňkou jsou mimo rozměrů nerovností povrchu důležité také tvar, rozložení a hustota těchto nerovností na povrchu materiálu. Například oblé nerovnosti s velkými mezerami mezi sebou spíše podporují adhezi buněk než hustě rozložené ostré a špičaté nerovnosti. Většina studií však porovnává pouze velikosti povrchových nerovností, popisované parametrem R_a (aritmetická střední hodnota drsnosti), který je definován jako průměrná odchylka profilu drsnosti od střední linie. **Porozita** je vlastnost pevných materiálů s obsahem drobných rovnoměrně rozložených otvorů. Je definována jako procento volného objemu v pevném materiálu. Porézní strukturou jsou charakterizovány kostní náhrady. Porozita kostních náhrad umožňuje rychlejší vrůstání tkáně do náhrady a tím vytvářet pevnou fixaci v těle. Hlavním faktorem ovlivňující tuto schopnost je velikost pórů [20-23].

2.3.1 Mechanické vlastnosti

Scaffolds mohou být při aplikaci vystaveny různému druhu namáhání – tah, tlak, krut, střih, ohyb. Tato namáhání mohou působit jednotlivě, ale nejčastěji je materiál zatěžován jejich kombinací. Aby materiál mohl odolávat takovému působení sil, musí mít určité vlastnosti, jako pevnost, tvrdost, houževnatost nebo odolnost vůči únavě materiálu.



Obr. 9: Typy namáhání materiálu

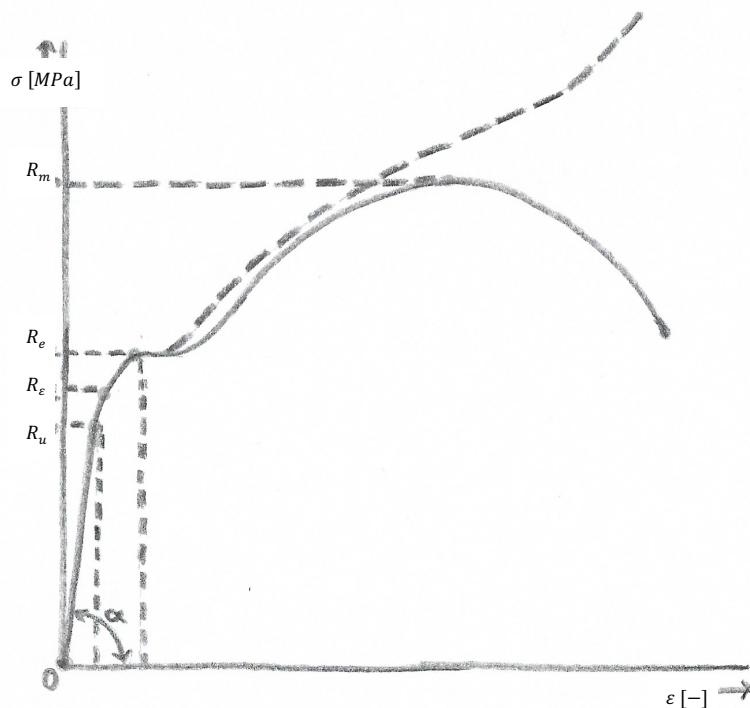
Pevnost

Pevnost je schopnost materiálu odolávat vnějšímu silovému působení, které se snaží porušit celistvost materiálu. Podle způsobu namáhání rozdělujeme pevnost v tahu, tlaku, ohybu, krutu a stříhu.

Tato práce se zaměřuje na pevnost v tahu a tuhost, proto se omezíme pouze na jejich popis. Pevnost v tahu se zjišťuje pomocí tahové zkoušky. Ta se provádí na trhacím stroji, který umožňuje rovnoměrné zatěžování vzorku až po jeho destrukci. Následně se stanovují napěťové a deformační charakteristiky (Obr. 10). Mezi tyto vlastnosti patří:

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| a. mez pevnosti | R_m [MPa], |
| b. mez kluzu | R_e [MPa], |
| c. mez pružnosti | R_ε [MPa] |
| d. mez úměrnosti | R_u [MPa] |
| e. poměrné prodloužení | ε [-], |
| f. tažnost | A [%], |
| g. kontrakce | Z [%]. |

Mez pevnosti je smluvní napětí, které odpovídá největšímu zatížení, které předchází přetržení vzorku. Mez kluzu je napětí, které způsobuje výrazné plastické deformace. Tažnost je poměrná trvalá deformace a kontrakce je trvalé zmenšení průřezu vzorku v místě lomu. Tyto vlastnosti lze zobrazit na smluvním (závislost smluvního napětí na poměrném prodloužení) či skutečném (závislost skutečného napětí na poměrném prodloužení) diagramu [8, 24].



Obr. 10: Smluvní (plně) a skutečný (čárkovaně) diagram tahové zkoušky.

Tuhost

Tuhost materiálu je schopnost daného materiálu odolávat deformacím, popisuje vztah mezi napětím a deformací. Závisí na daném materiálu a geometrii tělesa. Tuhost je reprezentována modulem pružnosti, který je v pracovním diagramu tahové zkoušky (Obr. 10) dán jako směrnice lineární části grafu. Na rozdíl od pevnosti je tuhost u daného materiálu prakticky neměnná [24].

Tvrдость

Tvrдость povrchu je schopnost materiálu odolávat lokálním plastickým deformacím. Tvrдость materiálu je důležitou vlastností, pokud předpokládáme kontakt mezi dvěma rozdílnými materiály [8].

Únava materiálu

Jedná se o poškození materiálu, které je způsobené opakovaným zatěžováním, kvůli kterému vznikají plastické deformace v místech koncentrace napětí. Proces únavy lze rozdělit do čtyř stádií:

- a. změna mechanických vlastností v celém objemu materiálu,
- b. plastická deformace vedoucí k iniciaci únavové trhliny,
- c. šíření únavové trhliny,
- d. lom.

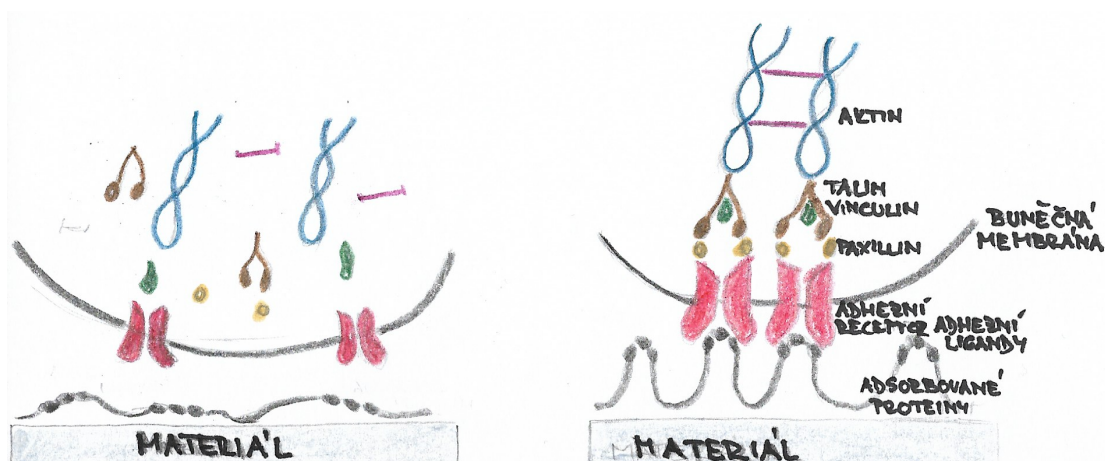
2.4 Interakce buňka–materiál

Buňka se k materiálům váže prostřednictvím proteinů mezibuněčné hmoty, které jsou adsorbovány k jejich povrchu. V podmínkách *in vivo* se tyto proteiny adsorbují prostřednictvím tělních tekutin, při studiu *in vitro* je nutné použít kultivačního média. Buňky se mohou na povrch materiálu adsorbovat i pomocí slabých chemických vazeb, tyto vazby však nejsou zprostředkovány adhezními receptory a nezaručují tedy životaschopnost, růst a diferenciaci buněk. Mezi významné proteiny zajišťující adhezi buňka-materiál patří kolagen, elastin, fibronectin, vitronectin a laminin. Tyto proteiny následně ovlivňují i důležité funkce, jako je metabolická aktivita, životaschopnost, diferenciaci a maturace [10, 25].

2.4.1 Mechanismus adheze

Adheze buněk na materiál může probíhat dvěma způsoby, které se mohou doplňovat – receptorová adheze (Obr. 11) a nereceptorová adheze.

Receptorová adheze funguje na principu vazby receptoru, který je na buňky, s proteiny, kterou se nacházejí na povrchu materiálu. Mezi nejznámější receptory adheze buňka-materiál patří integrinové receptory, které jsou přítomny na buněčné membráně. Integriny se vážou na specifická místa proteinů, například na RGD, což je aminokyselinová sekvence Arg-Gly-Asp. Sekvence RGD se vyskytuje ve fibrinonektinu a vitronektinu. Pro kolagen je typická sekvence DGEA – Asp-Gly-Glu-Ala. Receptory se na aminokyselinové sekvence také vážou slabými chemickými vazbami, avšak pro buňky to jsou důležité signály podporující jejich funkce. **Nereceptorová adheze** je název pro nespecifickou interakci mezi buňkou a materiálem, která je zajištěna slabými chemickými vazbami, mezi které patří Van der Waalsovy interakce, vodíkové můstky, nebo elektrostatické interakce. Tyto interakce jsou zajištěny buňkami buněčné membrány a buňkami na povrchu materiálu bez proteinů mezibuněčné hmoty. To má za následek, že nejsou do buněk přenášeny specifické signály, které podporují adhezi, životaschopnost, růst a diferenciaci buněk [25].



Obr. 11: Mechanismus adheze buňka-materiál. Vlevo adheze nereceptorová adheze, vpravo receptorová adheze.

2.5 Vliv tělních podmínek na materiál

Existuje mnoho degradačních mechanismů, které napomáhají resorpci materiálů v tkáňovém inženýrství. Degradace přírodních polymerů může probíhat prostřednictvím působení enzymů nebo produktů vylučovaných organismem. Důsledkem jsou strukturální, chemické, mechanické a funkční změny v materiálech.

Mezi enzymy, které mohou způsobit degradaci kolagenových materiálů, patří kolagenázy, které specificky štěpí peptidové řetězce kolagenu. Mezi kolagenázy řadíme například matrix metaloproteinázy (MMP). Zatímco některé z těchto enzymů (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13, MMP-14) mají schopnost hydrolyzovat kolagen typu I až III, jiné mají schopnost vázat se na molekulu kolagenu, ale nejsou schopné degradovat molekulu tropokolagenu. Pro přestavbu kolagenových materiálů je také důležitý enzym lysiloxidáza, která zajišťuje vznik příčných vazeb mezi vlákny kolagenu [26].

Dalším enzymem způsobující degradaci nejen kolagenových materiálů patří alkalická fosfatáza (ALP). Jedná se o membránově vázaný enzym, který katalyzuje hydrolytické štěpení při zásaditém pH. Kostní ALP je produkována osteoblasty a je markerem kostní novotvorby [27, 28].

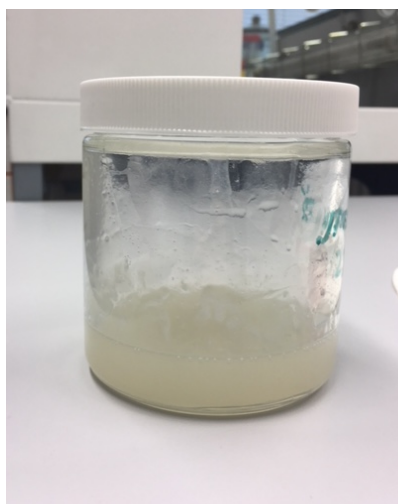
3 Experimentální část

3.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků pro *in vitro* kultivace s buňkami a v samotném kultivačním médiu se skládá z několika dílčích kroků.

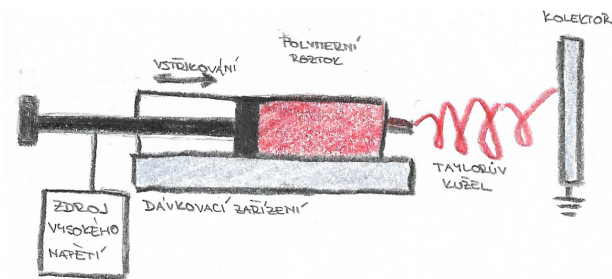
- a. příprava kolagenového roztoku,
- b. výroba nanovrstvy elektrostatickým zvlákňováním,
- c. zesíťování nanovrstvy.

Prvním krokem při přípravě dané nanovrstvy je smísení požadovaného množství kolagenu typu I (telecí kůže, VUP Brno) s polyetylen oxidem (Mw 900 000, Sigma-Aldrich, Německo), fosfátovým pufrem (Sigma-Aldrich, Německo). Tato směs je po dobu 2–3 dnů vystavena v inkubátoru teplotě 37°C. Po 2–3 dnech je nutné hydrolyzovaný kolagen homogenizovat (10 000 ot/min, T 25, Ultra-Turrax, IKA, Německo) a tím vytvořit disperzní roztok kolagenu, do kterého je dále přidán ethanol (Penta, Česká republika). Roztok pro elektrostatické zvlákňování (Obr. 12) je připravován jako 8%hm. kolagenu ve směsi fosfátového pufru a ethanolu (1:1 objemově). Podíl polyetylen oxidu, jako pomocného polymeru pro zvlákňování, který je po síťování nanovrstvy kompletně vymytý, činí 8%hm. na hmotnost kolagenu.

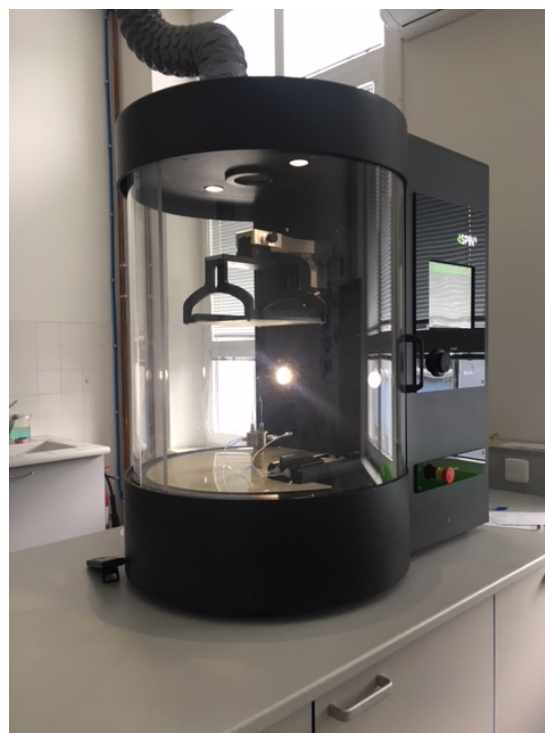


Obr. 12: Disperzní roztok kolagenu

Takto připravený roztok je následně elektrostaticky zvlákňován. V této práci byl využit přístroj 4SPIN[®] od české firmy CONTIPRO a.s (Obr. 14). Parametry pro elektrostatické zvlákňování jsou uvedeny v Tab 2.



Obr. 13: Schéma přístroje pro elektrostatické zvlákňování



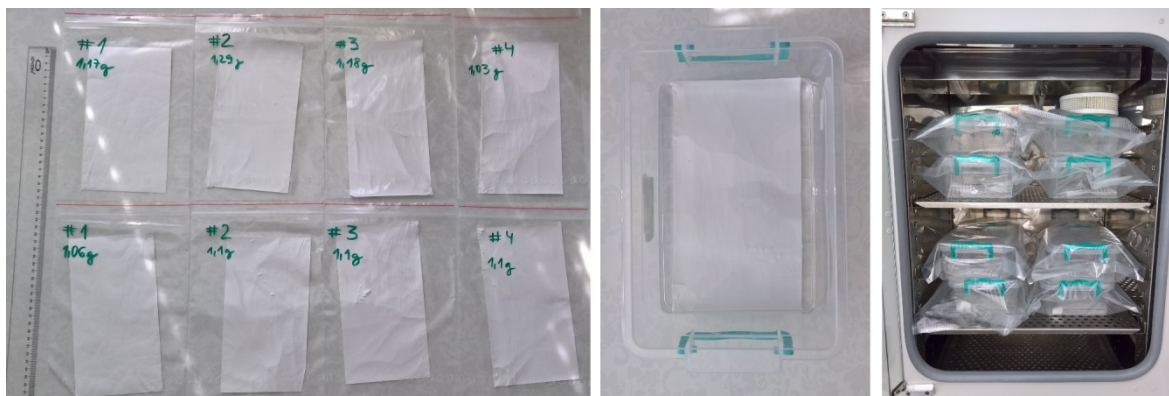
Obr. 14: Přístroj pro elektrostatické zvlákňování 4SPIN®

Tab. 2: Parametry použité při zvlákňování

Napětí	45 kV
Vzdálenost elektrod	18 cm
Dávkování	60 $\mu\text{l}/\text{min}$
Vlhkost vzduchu	29–33 %
Teplota	23 °C
Proudění vzduchu	10 l/min

Dalším krokem přípravy vzorků je zesíťování (Obr. 15), které napomáhá ke zvýšení její stability. Zesíťování se provádí chemicky roztokem N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodimidhydrochloridu (EDC, Sigma-Aldrich, Německo) a N-hydroxysukcinimidu (NHS, Sigma-Aldrich, Německo) v 95% ethanolu (Penta, ČR). Molární poměr EDC/NHS je 4:1. V tomto roztoku se nanovrstva máčí po dobu 24 hodin při teplotě 37°C. Nakonec se kolagenová nanovrstva proplachuje roztokem hydrogenfosforečnanu sodného (Penta, Česká republika). Tímto roztokem se daná nanovrstva proplachuje 3 x 20 minut. Následně se nanovrstva propláchně 2krát až 3krát v destilované vodě, což je důležité pro úplné

vymytí polyethylenoxidu. Takto připravená nanovrstva se nechá zmrazit (-30 °C) a vysuší v lyofilizátoru (VirTris Benchtop, USA).



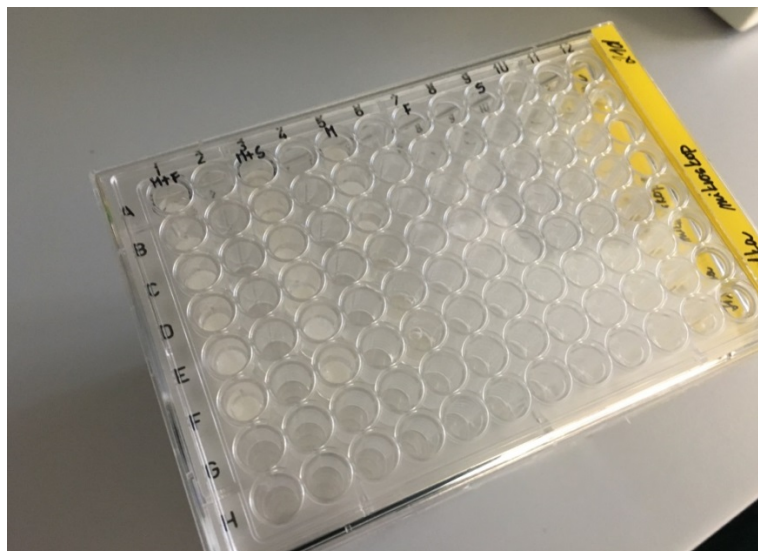
Obr. 15: Elektrostaticky zvlákněné kolagenové vrstvy (vlevo) byly při síťování uloženy v roztoku EDC/NHS po dobu 24 hodin v inkubátoru.

3.2 Kultivace materiálů s buňkami

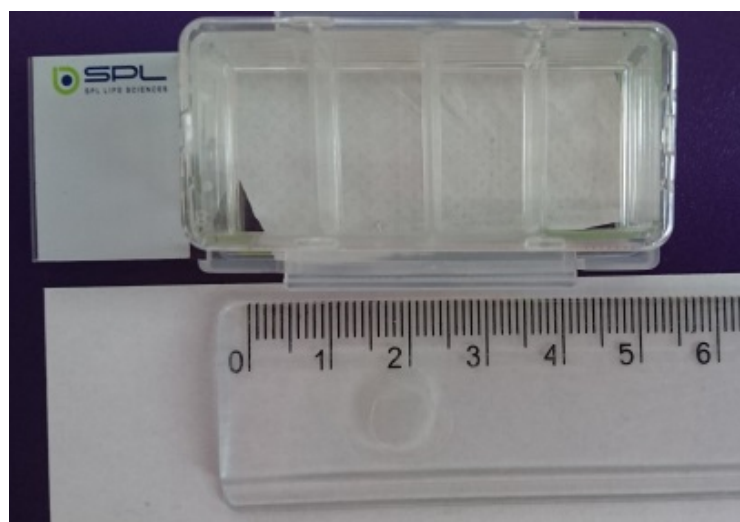
Pro expozici kolagenových nanovrstev simulovaným tělním podmínkám byly v této práci použity dermální fibroblasty a osteoblasty (lidská linie SAOS-2) kultivované na povrchu vrstev. Oba typy buněk byly nejprve kultivovány na 75cm² polystyrenových kultivačních lahvích (Techno Plastic Products) v kultivačním médiu. Kultivační médium obsahovalo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoFisher Scientific), 10 % fetálního bovinního séra (FBS, ThermoFisher Scientific), penicillin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml), L-glutamin (1 mM) a 1 % neesenciální aminokyseliny (Biosera). Kultivace probíhala ve 37 °C a 5 % CO₂. V den experimentu byly dermální fibroblasty zpřesazovány pomocí trypsinu/EDTA a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Pro fluorescenční mikroskopii a pro měření metabolické aktivity byly kolagenové nanovrstvy připraveny ve tvaru kolečka o ploše 0.3 cm², opláchnuty 20 min v 70 % etanolu a 10 min v PBS. Poté byly vzorky umístěny do 96 jamkového polystyrenového panelu (Techno Plastic Products) (Obr. 16) a ponořeny do 150 µl kultivačního média, dokud nebyly osazeny buňkami.

Pro mechanické testy byly vzorky ve tvaru proužků o velikosti 9 x 50 mm opláchnuty 20 min v 70 % etanolu a 10 min v PBS. Do kultivačních komůrek o rozměrech 20 x 50 mm (SPL Life Sciences) byly vloženy vždy po dvou kusech, a ponořeny do 4 ml kultivačního média, dokud nebyly osazeny buňkami (Obr. 17). Dermální fibroblasty byly naředěny do kultivačního média na koncentraci 30 000 buněk/ml a nasazeny na kolagenové nanovrstvy v nasazovací hustotě 15 000 buněk/cm² a objemu 150 µl. Osteoblasty byly naředěny do

kultivačního média na koncentraci 30 000 buněk/ml a nasazeny na kolagenové materiály v nasazovací hustotě 15 000 buněk/cm² a objemu 150 µl. Oba typy buněk byly kultivovány 21 dní, kdy měření probíhalo 1., 7., 14. a 21. den. Kultivační médium bylo měněno 3x týdně.



Obr. 16: 96 jamkový kultivační panel obsahující vzorky pro fluorescenční mikroskopii a hodnocení metabolické aktivity buněk



Obr. 17: Kultivační komůrka pro osazení kolagenových nanovrstev buňkami pro mechanické testy.

3.3 Biologické hodnocení kultivace

3.3.1 Fluorescenční mikroskopie

Nejprve byla hodnocena úspěšnost kultivace obou typů buněk. Dermální fibroblasty i osteoblasty byly barveny v časech 1, 7, 14 a 21 dní po zahájení experimentu. V každém sledovaném čase byly oba typy buněk kultivované na kolagenové nanovrstvě (COL) a na polystyrenu (PS) obarveny roztokem calceinu AM (ThermoFisher Scientific) o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v kultivačním médiu. Doba barvení byla 30 min při 37 °C a 5 % CO_2 . Po uplynutí doby barvení byly vzorky opláchnuty PBS a pomocí pinzety přeneseny na krycí sklo. Byly pořízeny přehledné fluorescenční snímky obou typů buněk kultivované na kolagenové nanovrstvě (COL) a na polystyrenu (PS) pomocí mikroskopu Olympus IX83 (Olympus) při excitaci 488 nm a emisi 528 nm. Snímky byly zpracovány pomocí softwaru ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA).

3.3.2 Metabolická aktivita

Metabolická aktivita dermálních fibroblastů a osteoblastů kultivovaných na kolagenové nanovrstvě (COL) a na polystyrenu (PS) byla měřena v čase 1, 7, 14 a 21 dní od zahájení experimentu pomocí metody Alamar Blue assay. Od každého vzorku bylo odsáto kultivační médium a bylo přidáno 150 μl nového kultivačního média obsahující 10x naředěnou látku Alamar Blue (ThermoFisher Scientific). Vzorky byly inkubovány 2 hod při teplotě 37 °C a 5 % CO_2 . Následně bylo od každého vzorku odpipetováno 100 μl kultivačního média do černého 96 jamkového panelu (NUNC) a byla změřena fluorescence roztoku při excitaci 530 nm a emisi 590 nm pomocí spektrofotometru Synergy HT (Biotek). Od naměřených hodnot byla odečtena hodnota fluorescence samotného kultivačního média a hodnoty byly vyjádřeny jako poměr fluorescence v 7., 14. a 21. dni vůči fluorescenci v dni 1. Hodnoty tedy vyjadřují změnu metabolické aktivity kultivovaných buněk na kolagenové nanovrstvě (COL) a na polystyrenu (PS) v čase. Experiment byl proveden v 6 opakováních.

3.4 Analýza mechanických vlastností

Tahová zkouška byla provedena v laboratoři biomechaniky na FS ČVUT v Praze. Měření bylo uskutečněno na víceosém zkušebním stroji (Zwick/Roell, Německo) se silovými snímači typu U9B od výrobce HBM s rozsahem $\pm 25 \text{ N}$ a $\pm 250 \text{ N}$, který je vybaven

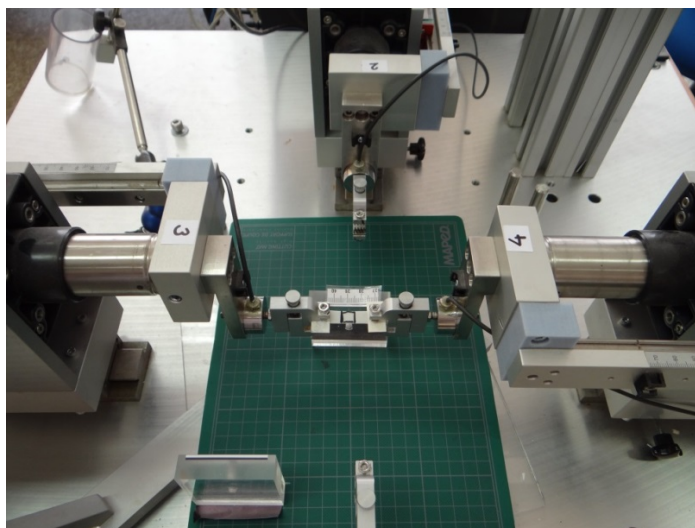
bezkontaktním optickým extenzometrem. Tento extenzometr pomocí kontrastních značek na vzorcích zaznamenává průběh deformace během zatěžování. Data byla zaznamenávána s frekvencí 20 Hz a ukládána do počítače. Měřená byla poloha značek, poloha upínacích čelistí a síla. Mechanické testy byly provedeny pro skupiny 8 vzorků v médiu, s osteoblasty a s fibroblasty pro každý časový interval.

Jelikož se jedná o viskoelastický materiál, u kterého vlastnosti záleží i na předchozí deformaci, je nutné, aby byl vzorek několikrát zatížen a odlehčen a až poté provést zkoušku na mezi pevnosti (Obr. 19). Vyhodnocení počátečního modulu pružnosti proběhlo jak pro první zatěžovací cyklus, díky kterému můžeme zjistit vliv dermálních fibroblastů a osteoblastů na povrchové vrstvy materiálu, tak pro poslední zatěžovací cyklus, ze kterého lze usuzovat vliv buněk na vnitřní strukturu materiálu.

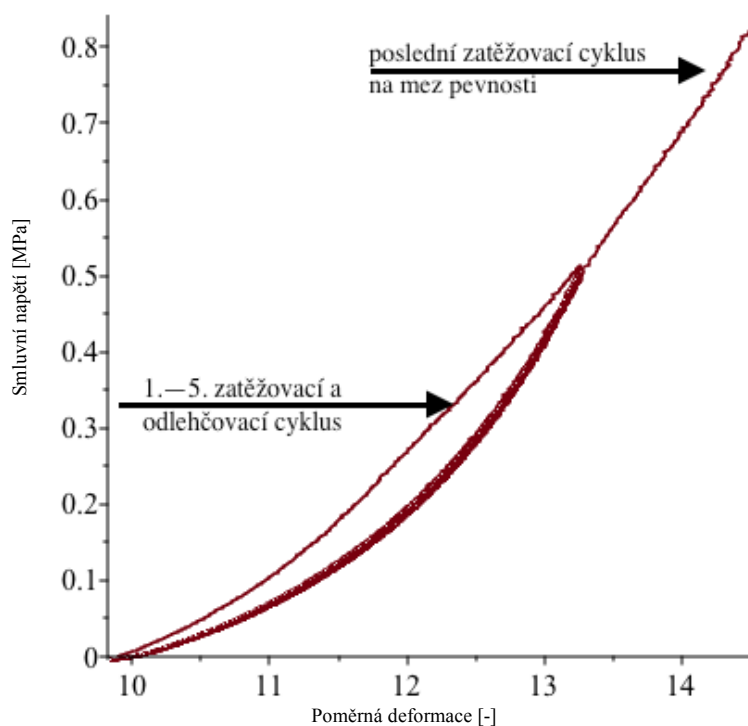
Z naměřených dat byly vytvořeny grafy závislosti smluvního napětí σ a poměrné deformace ε . Hodnoty pro tyto grafy byly spočítány ze vztahů:

$$\sigma = \frac{F}{S} \text{ [MPa]} \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \text{ [-]},$$

kde F je průměr sil naměřených silovými snímači [N], S je plocha průřezu nezatíženého vzorku [mm^2] (uvažujeme obdélníkový průřez), Δl je prodloužení vzorku určené ze změny polohy čelistí [mm] a l_0 je počáteční délka vzorku [mm].



Obr. 18: Upnutí vzorku pro tahovou zkoušku



Obr. 19: Diagram tahové zkoušky

3.5 Infračervená spektroskopie

Sekundární struktura kolagenových vrstev byla studována pomocí infračervené spektrometrie (FTIR), která umožňuje studovat její změny (denaturace) po různých procesech (izolace, síťování, sterilizace). Cílem této analýzy bylo ověření možného vlivu činnosti buněk a také expozice v kultivačním médiu na sekundární strukturu kolagenu. FTIR analýzu provedla Ing. Monika Šupová, Ph.D. (Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i.). Výsledky analýzy jsem použila pro interpretaci stanovených mechanických vlastností. Struktura kolagenových nanovrstev byla studována přístrojem Protégé 460 E.S.P. (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, USA) metodou zeslabené totální reflexe ATR (GladiATR, PIKE Technologies) s diamantovým krystalem. Výsledná spektra byla získána ze 128 skenů s rozlišením 4 cm^{-1} . Plochy pásů (integrální absorbance) byly stanoveny pomocí software OMNIC 7, který byl použit rovněž pro dekonvoluční proceduru pásů amidu I. Vstupní data pro separaci pásů (počet, pozice, pološířka, relativní intenzita a tvar) byly získány pomocí Fourier self-deconvolution procedury a dále upřesněny fitovací procedurou s použitím Gaussovy profilové funkce. Jednotlivé nanovrstvy byly proměřeny na 10 různých místech a hodnoty ploch pásů po dekonvoluci byly statisticky vyhodnoceny.

3.6 Elektronová mikroskopie

Pro základní posouzení povrchu kolagenových vrstev byla využita SEM analýza. Snímky byly pořízeny se zvětšením 500x a 25000x. Pro posouzení vlivu kultivace na povrch dané nanovrstvy byly obdobně jako u ostatních testů snímky pořizovány v časových intervalech 1. den, 7. den, 14. den a 21. den. Dalším cílem SEM analýzy bylo zjištění průměru vláken před a po zesíťování. Pro vyhodnocení těchto dat byl průměr vláken vyhodnocen manuálně měřením jejich průměru. Toto měření proběhlo pro snímky pořízené elektronovým mikroskopem při zvětšení 25000x. Pro určení střední hodnoty je nutné zvolit vlákna v popředí snímku, aby byla eliminována chyba naměřených vláken na vláknech v pozadí snímku. SEM snímky byly pořízeny na Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i.. Byl použit elektronový mikroskop Quanta 450 (FEI, USA). Všechny vzorky byly před nasnímáním pokryty tenkou vrstvou zlata (Emitech K550X, Quorum Technologies, UK).

3.7 Statistická analýza

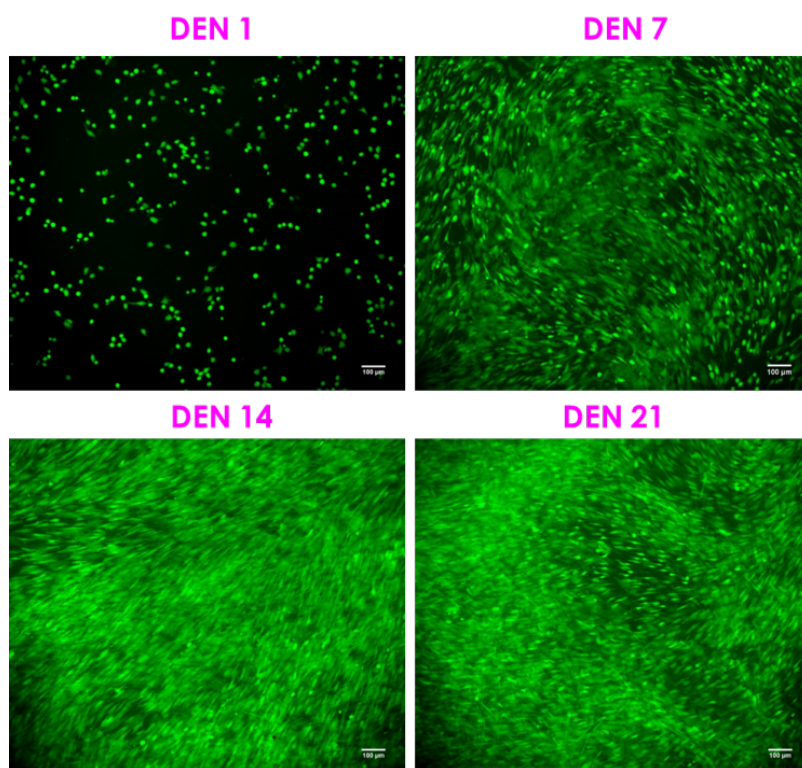
Statistické zpracování dat bylo u měření metabolické aktivity provedeno v softwaru Statistica v12 (Tibco). Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako poměr fluorescence v časových bodech 7, 14 a 21 dní vůči fluorescenci v 1. dni. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm standardní odchylka. Experiment byl proveden v 6 opakování. Normalita dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Signifikance rozdílů ($p < 0.05$) v metabolické aktivitě mezi buňkami kultivovanými na kolagenové nanovrstvě a buňkami kultivovanými na polystyrenu v každém časovém bodě byly ověřeny Studentovým t-testem pro závislé vzorky. Statistické zpracování u všech ostatních analýz bylo provedeno v softwaru STATGRAPHICS Centurion XVII (Statpoint, USA). Extrémní odchylky byly vyloučeny na základě použití Grubbsova a Dixonova testu nebo jako jakékoliv hodnoty ležící za trojnásobkem mezikvartilového rozpětí. Normalita jednotlivých souborů dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Shoda rozptylů byla ověřena pomocí Levenova testu. Vzhledem k porušení podmínky normality dat nebo shody rozptylů, byly pro statistické hodnocení použity neparametrické testy, jmenovitě Kruskal-Wallis test s Bonferroniho korekcí pro vícenásobné porovnání a Mann-Whitney test pro párové porovnání. Pro všechny statistické testy byla akceptována hladina spolehlivosti $p \leq 0,05$. Pro vykreslení krabicových grafů byl použit statistický program gretl (Gretl: Gnu Regression, Econometrics and Time-series Library, <http://gretl.sourceforge.net>).

4 Výsledky

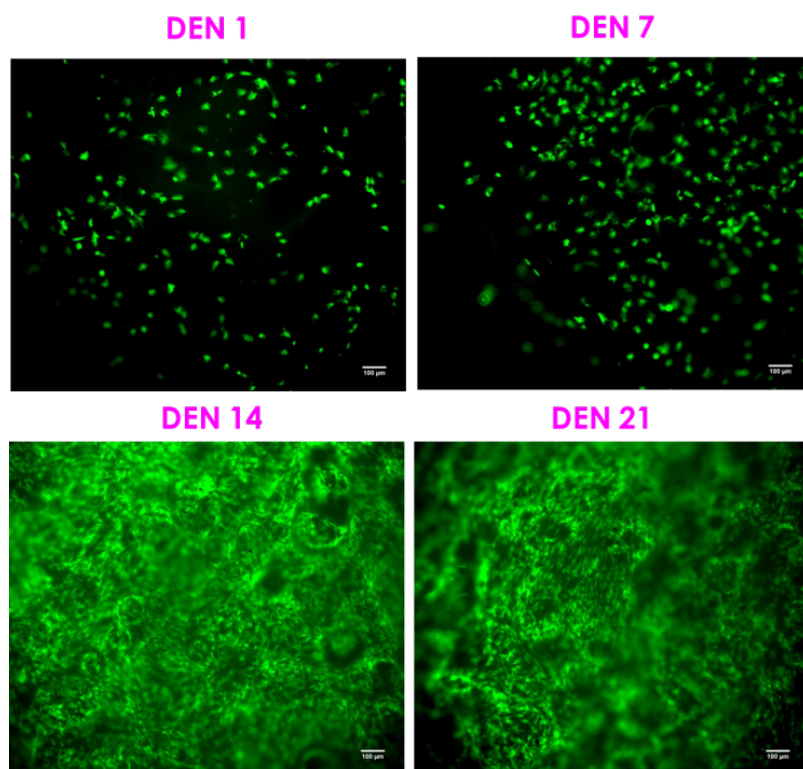
4.3 Biologické hodnocení kultivace

4.3.1 Fluorescenční mikroskopie

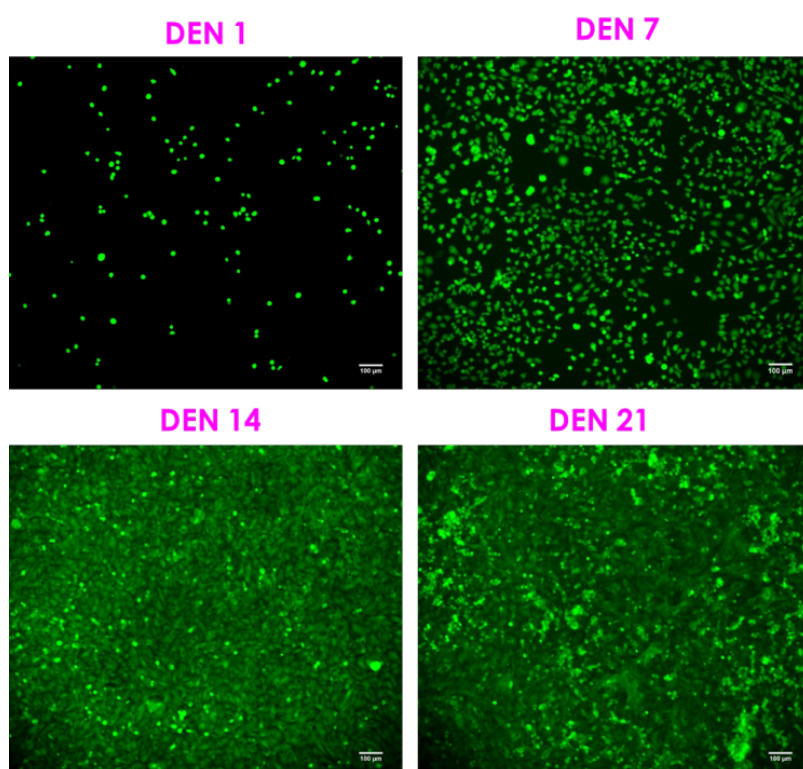
Po prvním kultivačním dni měly dermální fibroblasty i osteoblasty podobný zakulacený tvar buňky na polystyrenu (Obr. 20, Obr. 22) i na kolagenové nanovrstvě (Obr. 21, Obr. 23). V následujících dnech kultivace (7., 14., 21. den) dermální fibroblasty na polystyrenu vykazovaly pro ně typický protáhlý tvar buňky a pokrývaly většinu osazené plochy. Na většině plochy byly buňky orientované do stejného směru (Obr. 20). Naopak na kolagenové nanovrstvě dermální fibroblasty jednosměrně orientované uspořádání nevykazovaly. Buňky měly typický tvar s protáhlými výběžky do celého prostoru kolagenové nanovrstvy značící jejich fyziologický komfort (Obr. 21). V 7., 14. a 21. dnu kultivace osteoblasty na polystyrenu vykazovaly typický kvádrovitý tvar a pokrývaly většinu osazené plochy (Obr. 22). Na kolagenové nanovrstvě osteoblasty vykazovaly spíše tvar kulatý a buňky rostly na sobě ve více vrstvách (Obr. 23).



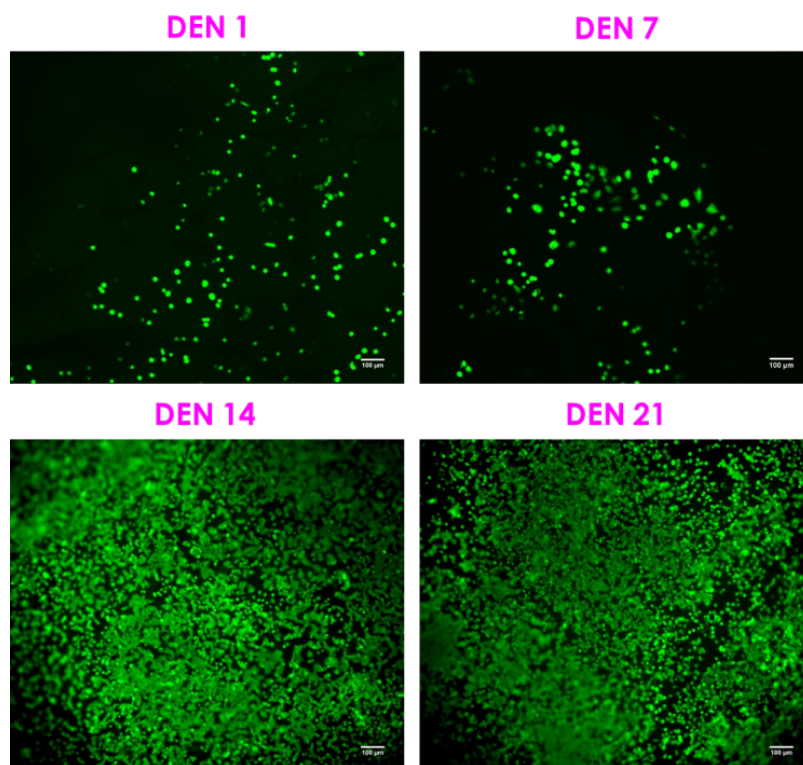
Obr. 20: Dermální fibroblasty kultivované na polystyrenu byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 µm).



Obr. 21: Dermální fibroblasty kultivované na kolagenové nanovrstvě byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 µm).



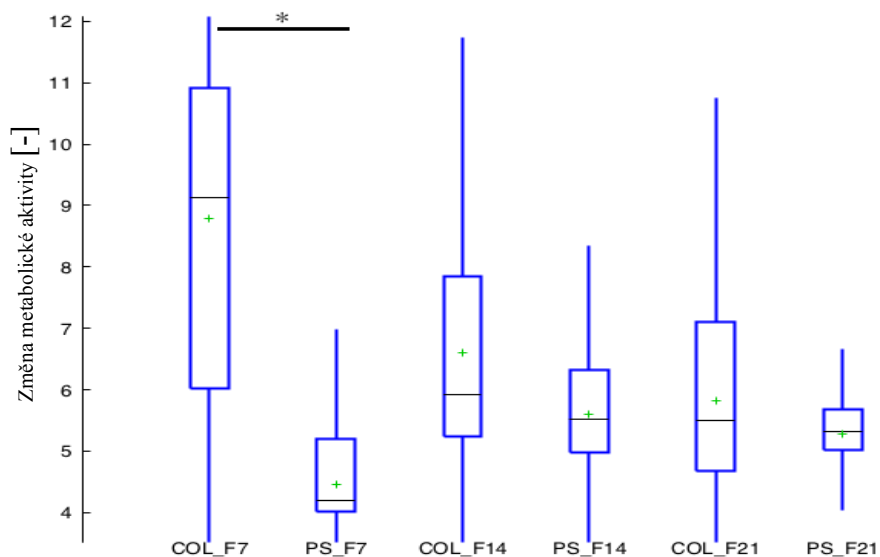
Obr. 22: Osteoblasty kultivované na polystyrenu byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 µm).



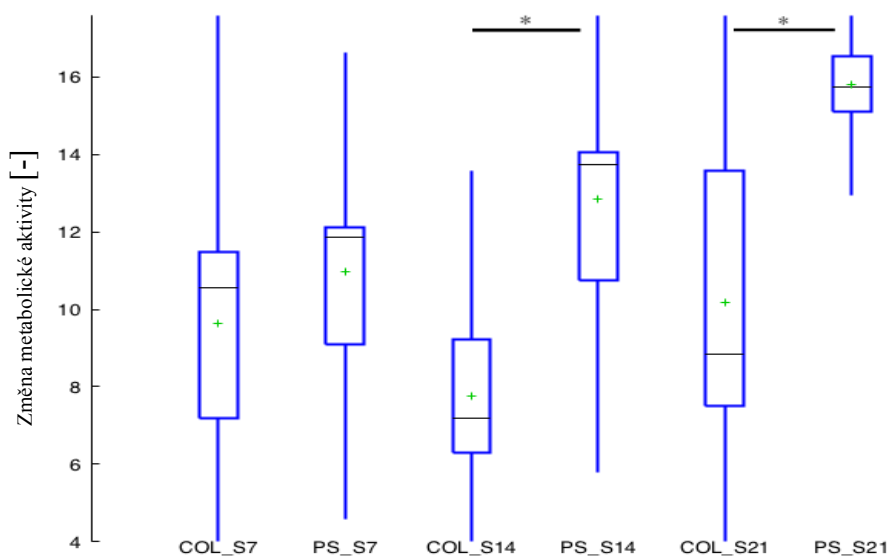
Obr. 23: Osteoblasty kultivované na kolagenové nanovrstvě byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 µm).

4.3.2 Metabolická aktivita

Oproti prvnímu dni byla metabolická aktivita dermálních fibroblastů na kolagenové nanovrstvě po 7 dnech kultivace 9x vyšší ($8,8 \pm 2,5$) a na polystyrenu 5x vyšší ($4,5 \pm 0,61$). Tento rozdíl mezi kolagenovou nanovrstvou a polystyrenem byl statisticky významný ($p < 0,05$). Po 14 a 21 dnech kultivace byla metabolická aktivita těchto buněk na kolagenové nanovrstvě 6x vyšší ($5,9 \pm 0,7$ a $5,9 \pm 1,4$). Na polystyrenu po 14 dnech 6x a po 21 dnech 5x vyšší ($5,6 \pm 0,7$ a $5,3 \pm 0,4$) oproti prvnímu dni. Tyto rozdíly mezi kolagenovou nanovrstvou a polystyrenem nebyly statisticky významné ($p < 0,05$) (Obr. 24). Metabolická aktivita osteoblastů byla na kolagenové nanovrstvě po 7 dnech kultivace 10x vyšší ($9,7 \pm 2,9$) a na polystyrenu 11x vyšší ($11,0 \pm 1,6$) oproti prvnímu dni. Tento rozdíl mezi kolagenovou nanovrstvou a polystyrenem nebyl statisticky významný ($p < 0,05$). Po 14 dnech kultivace byla metabolická aktivita osteoblastů na kolagenové nanovrstvě 7x vyšší ($7,3 \pm 0,5$) a na polystyrenu téměř 13x vyšší ($12,7 \pm 1,8$) oproti dni 1. Po 21 dnech byla jejich metabolická aktivita na kolagenové nanovrstvě 10x vyšší ($10,2 \pm 3,5$) a na polystyrenu téměř 16x vyšší ($15,8 \pm 0,9$). Rozdíly mezi kolagenovou nanovrstvou a polystyrenem byly statisticky významné ($p < 0,05$) v obou časových bodech (Obr. 25).



Obr. 24: Metabolická aktivita dermálních fibroblastů kultivovaných na kolagenové nanovrstvě (COL) a polystyrenu (PS), * značí statisticky významné rozdíly ($p=0,05$, t-test).

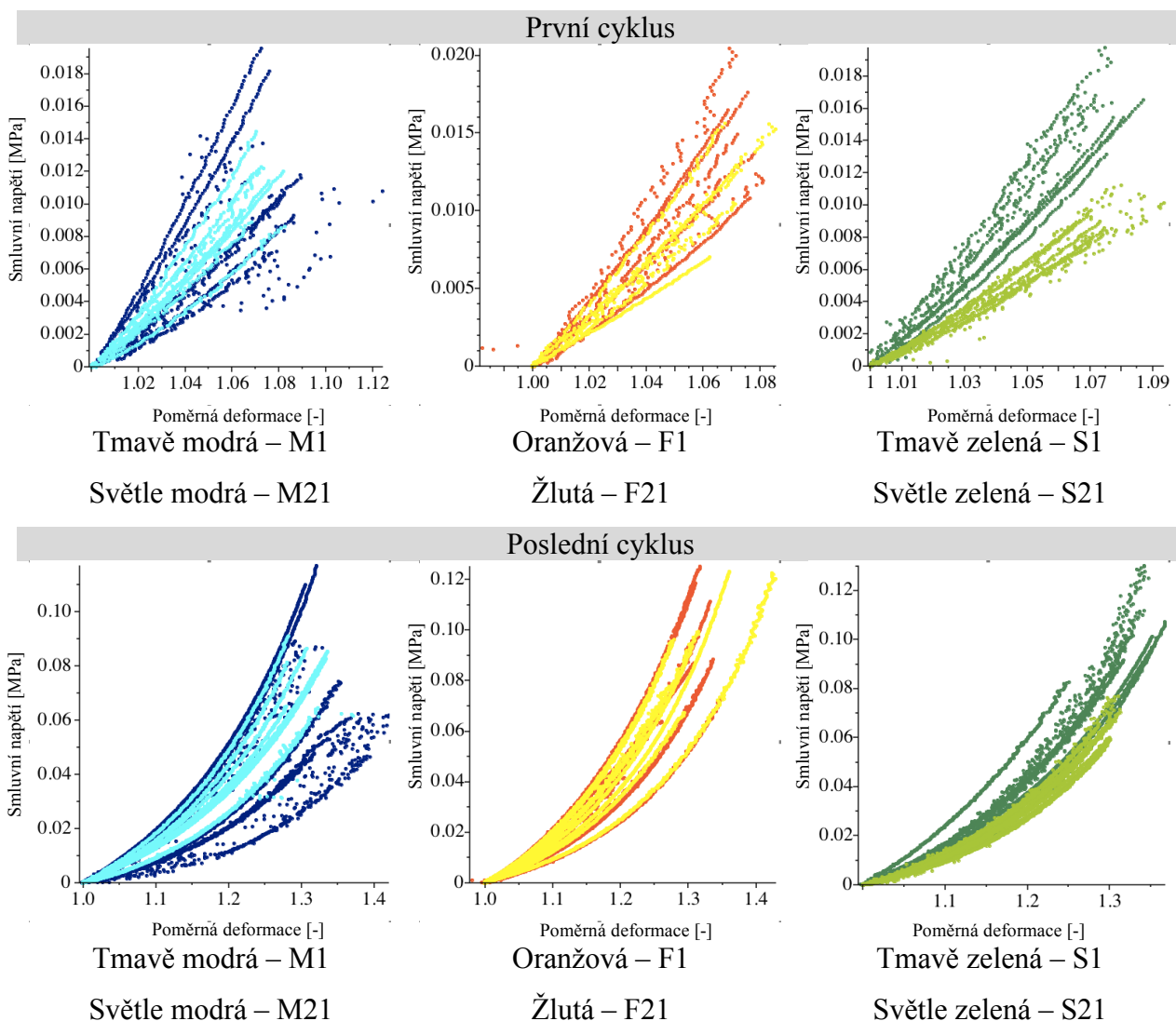


Obr. 25: Metabolická aktivita osteoblastů kultivovaných na kolagenové nanovrstvě (COL) a polystyrenu (PS), * značí statisticky významné rozdíly ($p=0,05$, t-test).

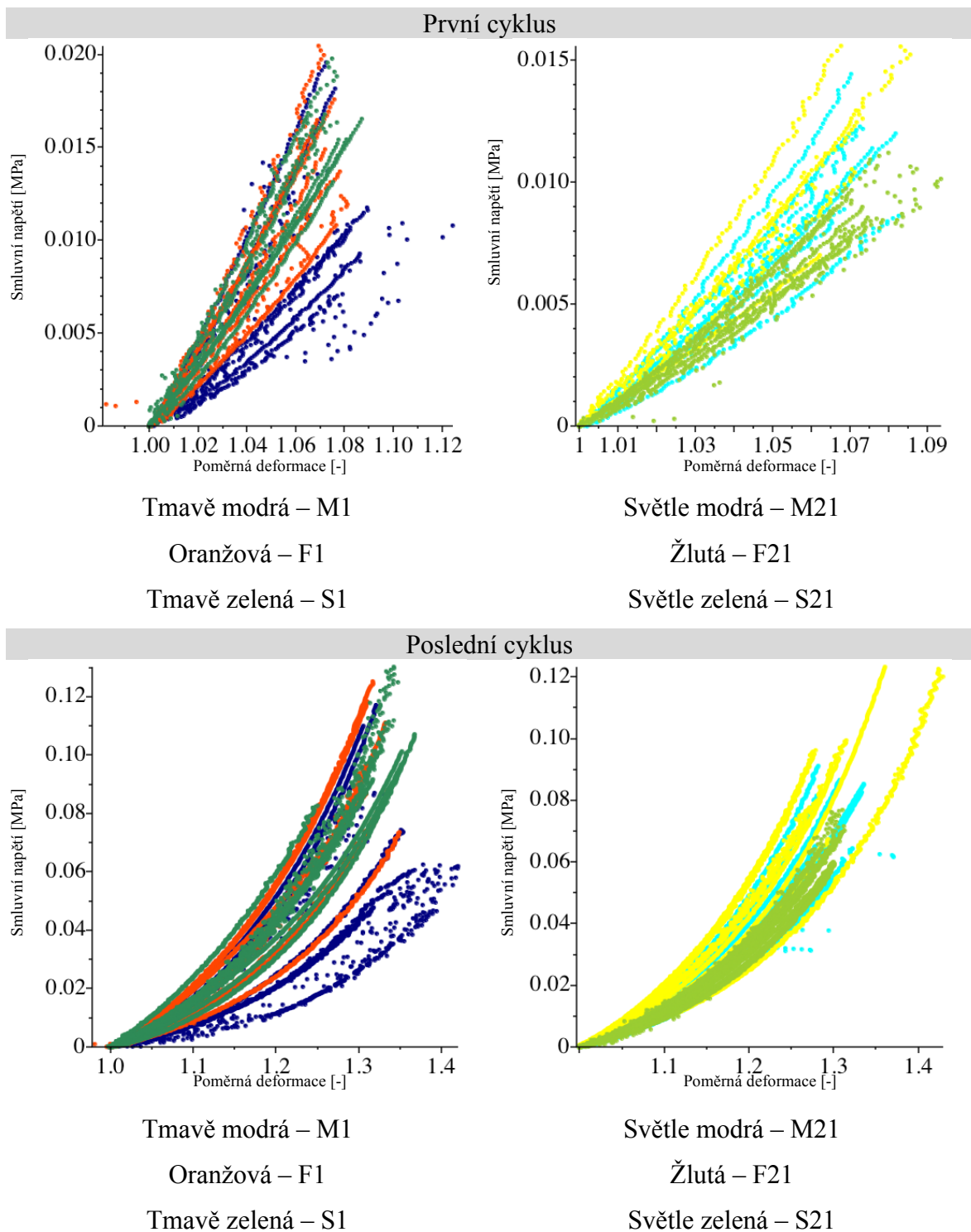
4.4 Analýza mechanických vlastností

Z naměřených dat na vzorcích ponořených pouze v médiu, nebo s fibroblasty, a s osteoblasty (vždy po 8 vzorcích) 1., 7., 14. a 21. dní byly vytvořeny grafy závislosti smluvního napětí σ a poměrné deformace ε (Obr. 26, Obr. 27). Z naměřených dat byla stanovena smluvní mez pevnosti (Příloha 4) jako maximální pozorovaná hodnota

smluvního napětí v průběhu zatěžování v prvním cyklu ku průřezu daného vzorku a počáteční modul pružnosti (Příloha 2, Příloha 3) získaný aproximací zatěžovacího diagramu pomocí lineární regrese v oblasti počátečního zatěžování. Vzorky byly značeny následovně – M pro vzorky exponované pouze v médiu, F pro vzorky s dermálními fibroblasty a S pro vzorky s osteoblasty.



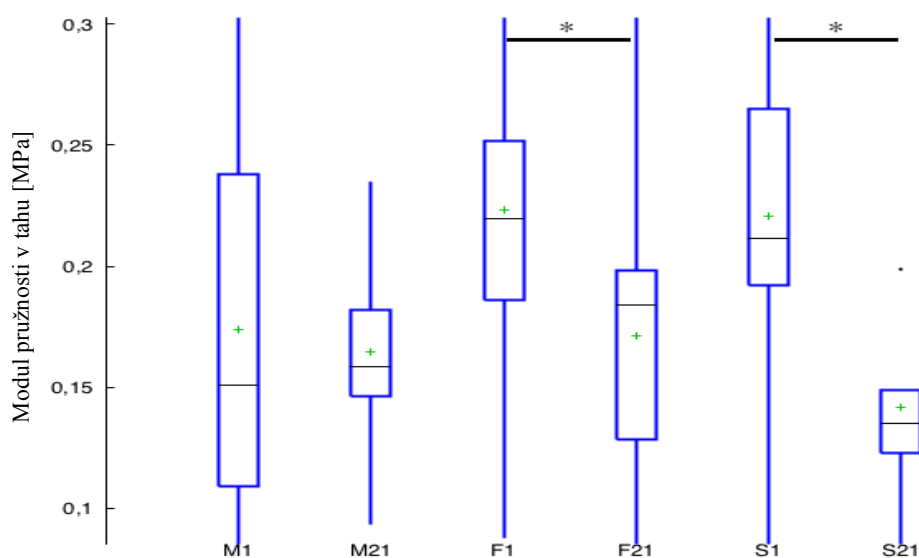
Obr. 26: Grafy závislosti smluvního napětí a poměrné deformace pro první a poslední zatěžovací cyklus. Pro vzorky exponované v médiu 1. (M1) a 21. (M21) den, vzorky s fibroblasty 1. (F1) a 21. den (F21) a vzorky s osteoblasty 1. (S1) a 21. den (S21).



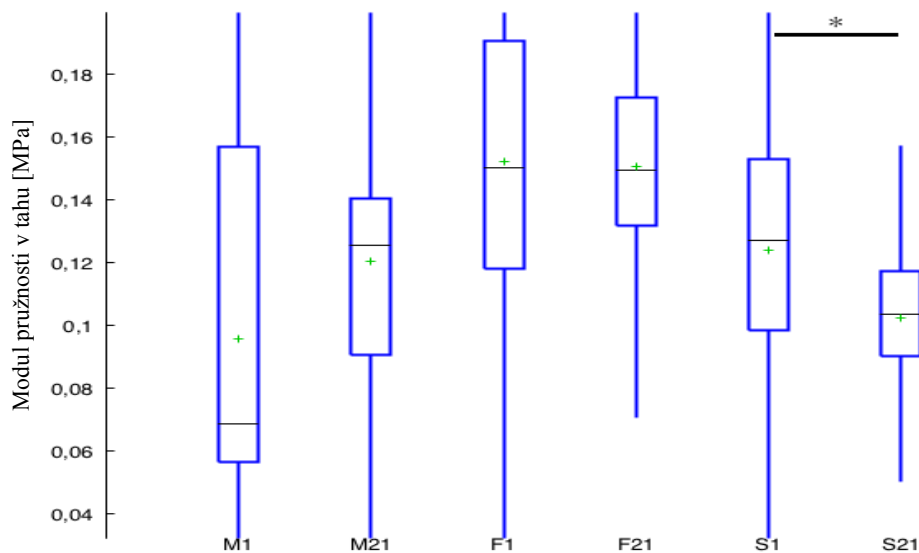
Obr. 27: Porovnání závislosti smluvního napětí a poměrné deformace pro první a poslední zatěžovací cyklus. Pro vzorky exponované v médiu 1. (M1) a 21. (M21) den, vzorky s fibroblasty 1. (F1) a 21. den (F21) a vzorky s osteoblasty 1. (S1) a 21. den (S21).

Hodnoty počátečních modulů pružnosti v prvním zatěžovacím cyklu se pro vzorky exponované v médiu 1. a 21. den neliší (Obr. 28). U dermálních fibroblastů (Obr. 28) i

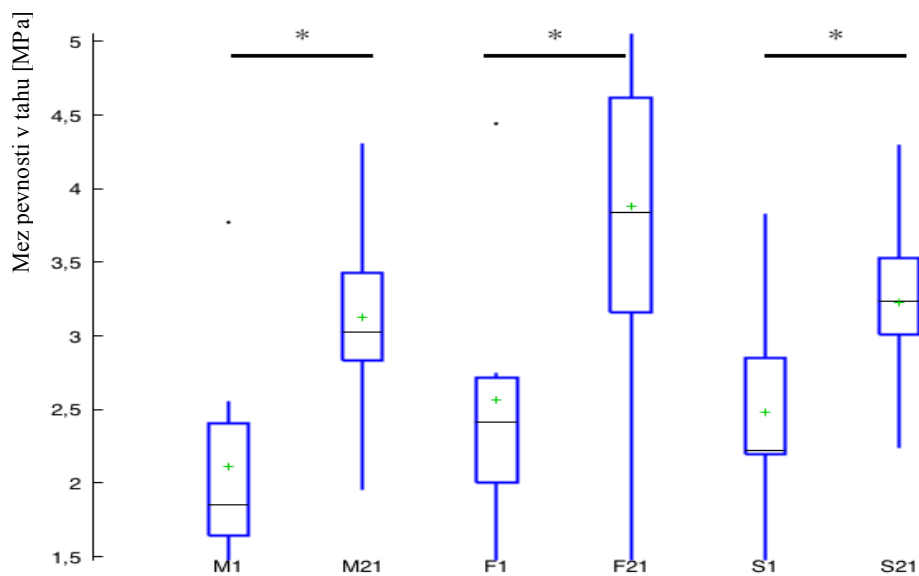
osteoblastů (Obr. 28) byl zaznamenán pokles hodnot počátečního modulu pružnosti v prvním zatěžovacím cyklu a to o 16 % a 36 %. Statisticky významný rozdíl hodnot u posledního zatěžovacího cyklu byl pozorován pouze u vzorků s osteoblasty (Obr. 29). U vzorků v médiu (Obr. 29) a vzorků s fibroblasty (Obr. 29) rozdíl hodnot nebyl statisticky významný. U vzorků exponovaných v médiu, u vzorků s fibroblasty i u vzorků s osteoblasty byl zaznamenán statisticky významný zvýšení hodnot meze pevnosti, a to o 12 % (Obr. 30).



Obr. 28: Krabicový graf porovnávající modul pružnosti prvního zatěžovacího cyklu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05)



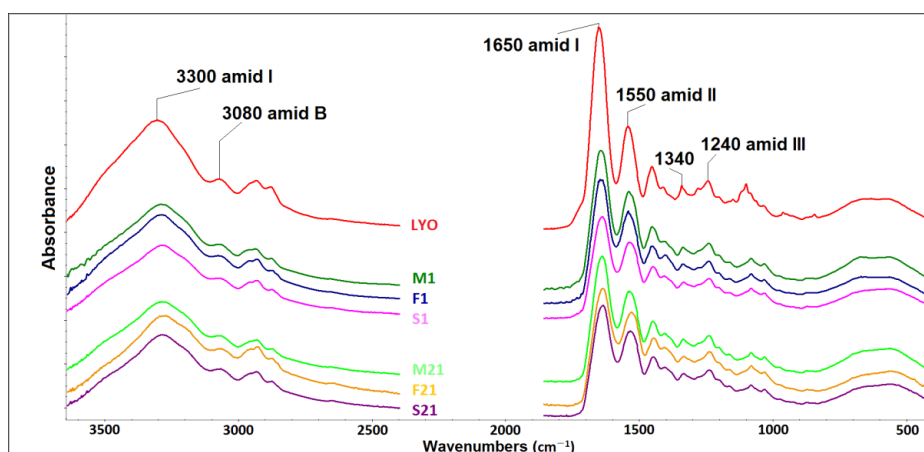
Obr. 29: Krabicový graf porovnávající modul pružnosti posledního zatěžovacího cyklu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05)



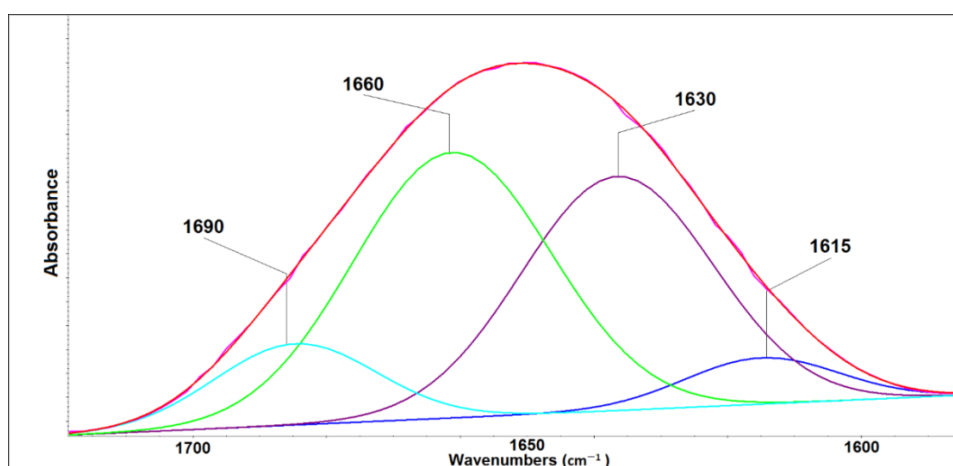
Obr. 30: Krabicový graf porovnávající mez pevnosti v tahu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05)

4.5 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra jednotlivých kolagenních materiálů jsou uvedena na Obr. 31. Kolagenní materiály jsou ze spektroskopického hlediska srovnatelné. Vyprofilovaný kvartet pásů ~ 1205 , 1240 , 1280 (amid III) a 1340 cm^{-1} je jasným důkazem existence helikální struktury, jinými slovy, přirozená struktura kolagenu byla během přípravy vrstev elektrostatickým zvláknováním zachována ve vhodné míře a současně během experimentu nedochází po dobu tří týdnů k jejímu zásadnímu porušení. Spektrální rozklad pásu amidu I (Obr. 32 a Tab. 3) umožnil stanovit poměr helikální části kolagenu reprezentovaná pásem 1660 cm^{-1} k denaturovaným strukturám na základě pásů 1630 a pásu ~ 1615 cm^{-1} .



Obr. 31: Infračervená spektra studovaných kolagenových vrstev. LYO označuje kolagen použitý pro přípravu roztoku pro elektrostatické zvláknování.

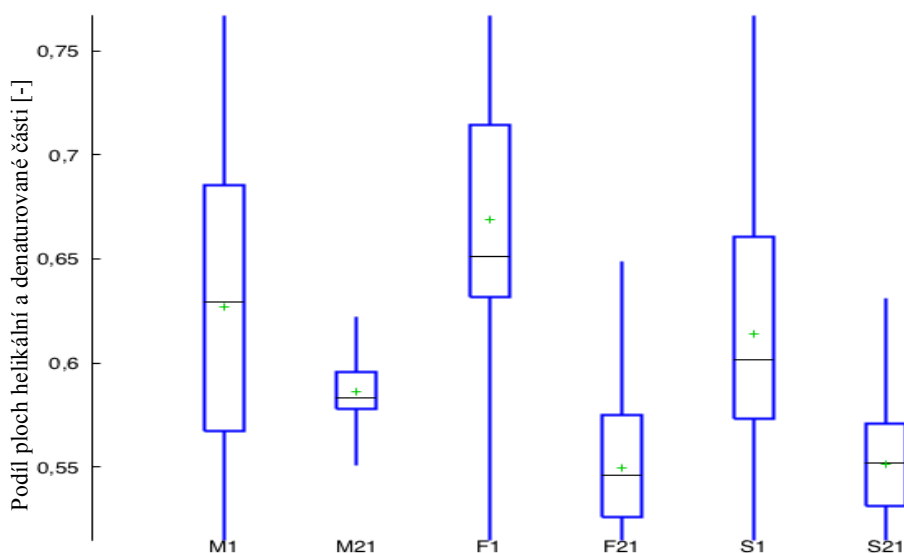


Obr. 32: Příklad spektrálního rozkladu pásu amidu I zdrojového materiálu (LYO)

Poměry 1660/(1630+1615) byly stanoveny z měření 10 různých míst kolagenních vrstev vystavených působení samotného kultivačního média (M1 a M21) a u vrstev vystavených působení buněk, a to fibroblastů (F1 a F21) a osteoblastů (S1 a S21). Získaná data byla statisticky vyhodnocena a porovnána (Obr. 33). Jak je patrné z Obr. 30 a Tab. 6, statisticky významný rozdíl vykazuje pouze dvojice S1 a S21.

Tab. 3: Spektrální charakteristiky materiálů (n=10), medián (horní a dolní kvartil) * značí statisticky významné rozdíly v jednotlivých skupinách M, F a S (Kruskal-Wallis test, Bonferroni korekce, 0,05).

Kolagenní nanovrstva	Podíl ploch helikální a denaturované části kolagenu 1660/(1630+1615) [-]
M1	0,65 (0,63 – 0,68)
M21	0,63 (0,59 – 0,66)
F1	0,70 (0,66 – 0,71)
F21	0,63 (0,55 – 0,68)
S1	0,69 (0,61 – 0,72) *
S21	0,96 (0,68 – 0,99) *

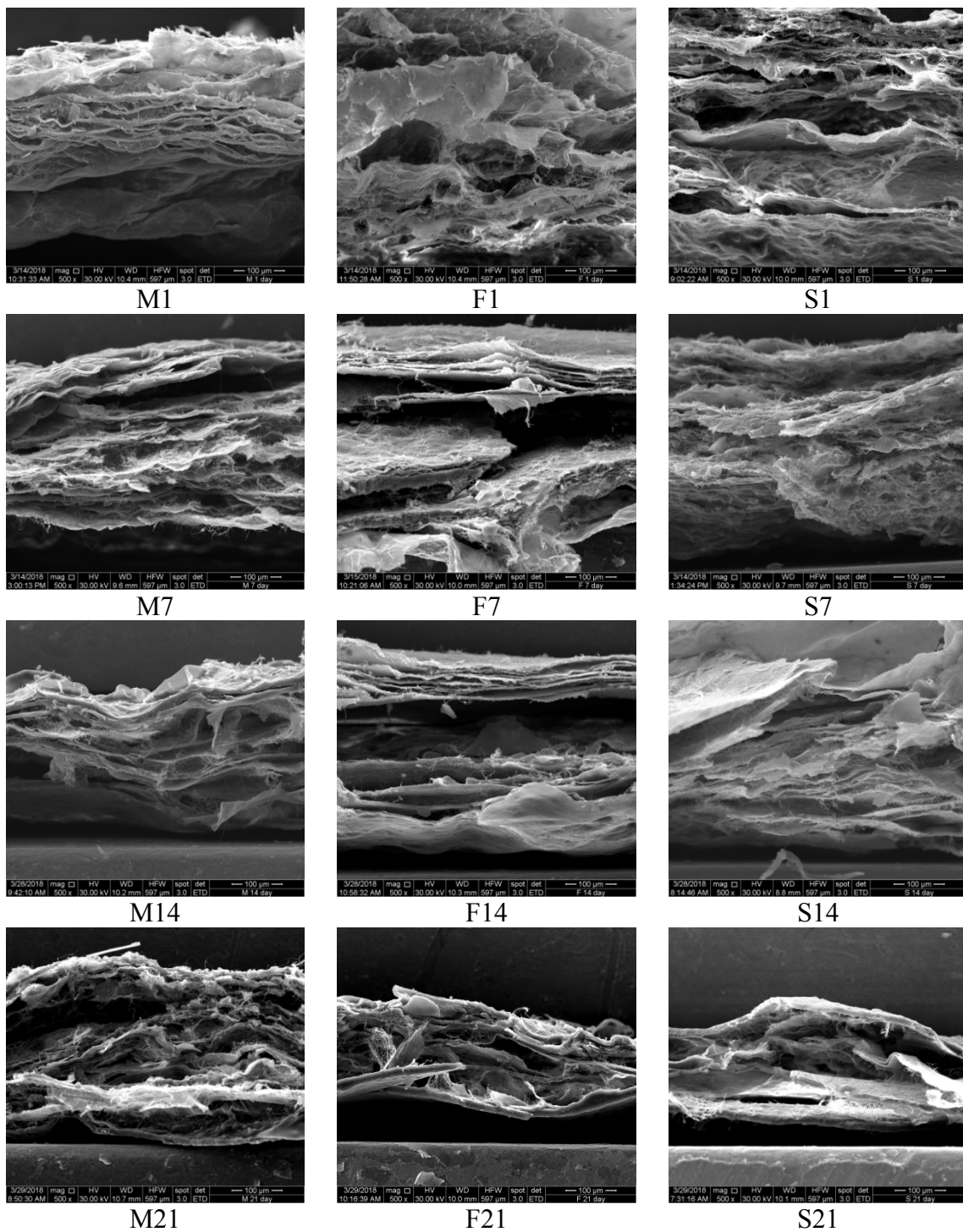


Obr. 33: Krabicový graf porovnávající poměr ploch helikální a denaturované části kolagenu (1660/(1630+1615))

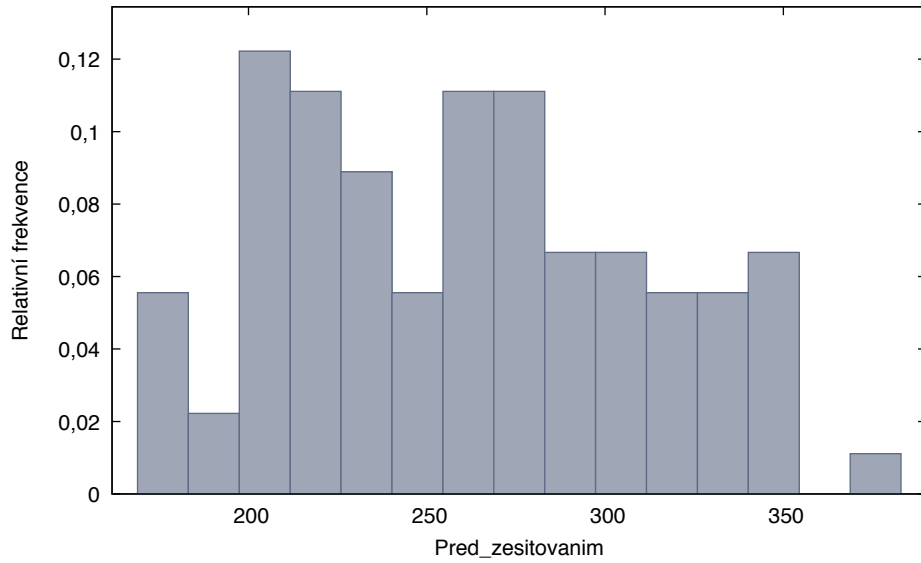
4.6 Elektronová mikroskopie

U snímků SEM analýzy je patrný trojrozměrný aspekt, proto pro určení střední hodnoty průměru vláken byla vybrána vlákna v popředí snímku, aby byla eliminována chyba naměřených průměrů, která by se mohla vyskytnout, pokud by byla měřena vlákna v popředí i v pozadí snímku. Střední hodnota byla vypočítána z vždy z 90 hodnot uvedených v příloze 2 a příloze 3, četnost těchto hodnot je znázorněna na Obr. 35 pro vzorky před zesíťováním a na Obr. 36 pro vzorky po zesíťování. Střední hodnota průměru vláken u vzorku před zesíťováním je 261 ± 49 nm. Střední hodnota průměru vláken u vzorku po síťování je 260 ± 35 nm. Jak je patrné z Obr. 37 hodnoty průměru vláken se v případě vzorků před a po zesíťování výrazně neliší.

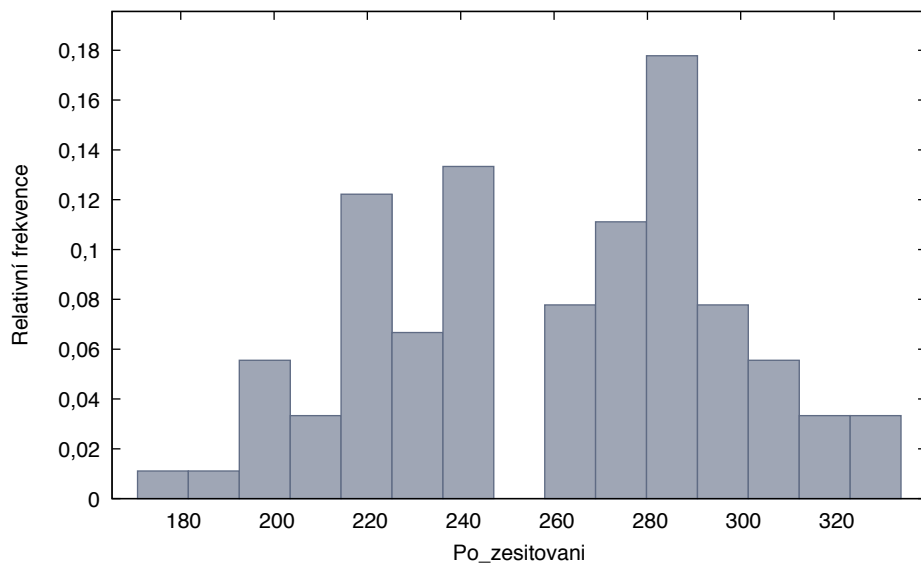
Vliv expozice na strukturu vláken byl hodnocen stejně jako vliv zesíťování. Střední hodnota průměru vláken u vzorku exponovaných v médiu je první den 202 ± 30 , poslední den 196 ± 26 nm. Pro vzorky s fibroblasty je střední hodnota průměru vláken u vzorku po síťování je první den 187 ± 33 nm, poslední den 184 ± 32 nm. Pro vzorky s fibroblasty je střední hodnota průměru vláken u vzorku po síťování je první den 198 ± 27 a poslední den 198 ± 25 . Z Obr. 38 je patrné, že hodnoty průměru vláken se v případě exponovaných vzorků statisticky významně neliší.



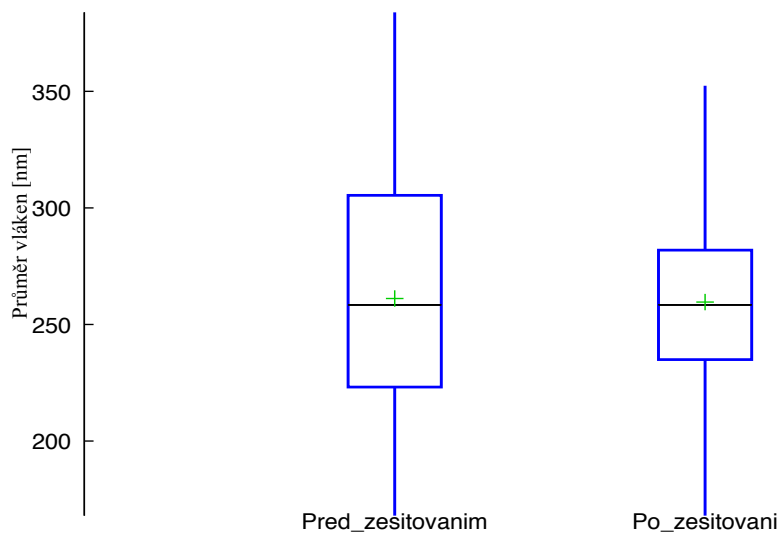
Obr. 34: SEM snímky se zvětšením 500x pro vzorky exponované v médiu (M), pro buňky s fibroblasty (F) a pro buňky s osteoblasty (S) v měřicích dnech 1, 7, 14 a 21



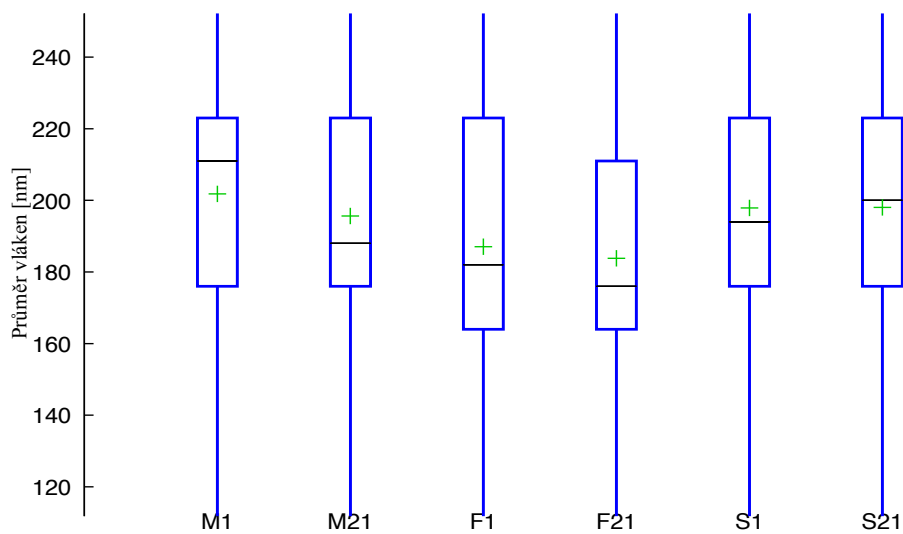
Obr. 35: Graf znázorňující zastoupení průměru vláken v kolagenové nanovrstvě před zesíťováním



Obr. 36: Graf znázorňující zastoupení průměru vláken v kolagenové nanovrstvě po zesíťování



Obr. 37: Krabicový graf porovnávající průměr vláken před a po zesítování. Mezi průměry vláken nejsou statisticky významné rozdíly.



Obr. 38: Krabicový graf porovnávající průměr vláken vzorků po 1. (M1) a 21. (M21) dni v médiu, po 1. (F1) a 21. (F21) dni kultivace s fibroblasty a 1. (S1) a 21. (S21) dni kultivace s osteoblasty. Mezi průměry vláken nejsou statisticky významné rozdíly.

5 Diskuze

Pro správnou funkci kolagenových nanovrstev je nutné sledovat jejich vlastnosti nejen v suchém stavu, ale také v podmínkách, ve kterých budou následně osazovány buňkami a implantovány do organismu. Proto je tato práce zaměřena na popis změn mechanických a strukturních vlastností těchto vrstev v hydratovaném stavu a kultivovaných v přítomnosti buněk (fibroblasty a osteoblasty) po dobu 21 dní.

Testy metabolické aktivity a přehledná fluorescenční mikroskopie ukázaly, že fibroblasty i osteoblasty kultivované na kolagenových nanovrstvách jsou viabilní. Jejich metabolická aktivita v čase statisticky významně nestoupala ani neklesala, kolagenové vrstvy tedy nebyly pro buňky toxické a ani nijak výrazně nestimulovaly základní metabolismus či proliferaci.

Analýza mechanických vlastností byla provedena za účelem popsat vliv dermálních fibroblastů a osteoblastů na počáteční modul pružnosti a na mez pevnosti daného materiálu a porovnat tyto vlivy jen s účinkem samotného kultivačního média. Jelikož je kolagen charakterizován viskoelastickými vlastnostmi, je při tahové zkoušce nutné každý vzorek nejprve několikrát zatížit a až následně provést zkoušku na mez pevnosti. Viskoelastické chování kolagenu je dáno postupným natahováním kolagenových vláken, které je způsobeno rotacemi peptidového řetězce kolem kovalentních vazeb. Počáteční modul pružnosti byl vyhodnocován 1. a 21. den kultivace pro první a poslední zatěžovací cyklus. Zatímco první zatěžovací cyklus ukázal vliv dermálních fibroblastů a osteoblastů na povrchové vrstvy materiálu, z hodnot posledního zatěžovacího cyklu lze usuzovat vliv buněk i na vnitřní strukturu materiálu. Hodnoty počátečních modulů pružnosti se pro vzorky exponované pouze kultivačnímu médiu 1. a 21. den neliší. U dermálních fibroblastů i osteoblastů byl zaznamenán pokles hodnot počátečního modulu pružnosti v prvním zatěžovacím cyklu a to o 16 %, resp. 36 %, z čehož lze usuzovat, že buňky svojí schopností produkovat kolagenázy narušují povrch kolagenové nanovrstvy. Statisticky významný rozdíl hodnot u posledního zatěžovacího cyklu nebyl pozorován u vzorků v médiu ani u vzorků s fibroblasty, což naznačuje, že dermální fibroblasty mají vliv pouze na povrchové vrstvy daného materiálu. Činnost osteoblastů lze pozorovat i v posledním zatěžovacím cyklu, kde je pozorován statisticky významný rozdíl hodnot mezi 1. a 21. dnem. Změny v povrchových vlastnostech dané vrstvy, které jsou patrné ze změny modulu pružnosti v prvním zatěžovacím cyklu u vzorků s fibroblasty a osteoblasty mohou být dány malou odolností vůči katabolickým reakcím probíhajících ve vláknech, mezi tyto reakce

řadíme enzymatické reakce, například tvorbu kolagenáz, které dokáží degradovat kolagenovou nanovrstvu. Pozorované změny meze pevnosti v posledním zatěžovacím cyklu a v hodnotách počátečního modulu pružnosti posledního zatěžovacího cyklu u vzorků s osteoblasty mohou být zapříčiněny produkcí alkalické fosfatázy, která napomáhá degradačním procesům kolagenových nanovrstev a je produkována právě osteoblasty. Na tyto zatím neověřené aspekty se bude nutné dále zaměřit. Nárůst hodnot meze pevnosti pro všechny vzorky první a poslední měřící den může být způsoben expozicí kolagenové nanovrstvy ve vodném prostředí, respektive hydratací, která u má u kolagenu a kolagenu podobných peptidů za následek změny v prostorovém uspořádání molekul, které se mohou projevit také ve změně mechanických vlastností. Zvýšení hodnot meze pevnosti u vzorků s fibroblasty a osteoblasty může být dále způsobena produkcí enzymu lysiloxidázy, která vytváří příčné vazby mezi vlákny kolagenu, čímž dochází k tunutí kolagenových nanovrstev. Dále může být zvýšení hodnot meze pevnosti způsobeno precipitací solí a proteinů z kultivačního média. Tento předpoklad, podobně jako stanovení alkalické fosfatázy, však nebyl v této práci ověřován. Analýzy enzymů souvisejících s činností buněk a možnou přestavbou kolagenu produkcí enzymů budou provedeny v navazujícím experimentu, který by mohl na tyto otázky odpovědět.

Vliv činnosti buněk na strukturu kolagenových nanovrstev byl dále studován pomocí infračervené spektroskopie. Výsledky této analýzy dokazují existenci helikální struktury ve vrstvách, což znamená, že přirozená struktura kolagenu byla během přípravy vrstev zachována a že během experimentu nedochází k jejímu porušení. Vrstvy exponované v samotném kultivačním médiu a také v přítomnosti buněk vykazovaly nárůst poměrů helikálních a denaturovaných struktur kolagenu mezi 1. a 21. dnem kultivace jen v případě osteoblastů, což zřejmě souvisí s jejich činností. Osteoblasty mohou kolagenové vrstvy metabolizovat a produkovat vlastní kolagen, jeho nárůst na povrchových vrstvách by se pak mohl odrážet v nárůstu tohoto poměru stanoveného infračervenou spektroskopií. SEM analýza neukázala významné rozdíly v průměru vláken vrstev kultivovaných v samotném kultivačním médiu a v přítomnosti buněk mezi 1. a 21. dnem, což značí, že vnitřní struktura kolagenové nanovrstvy se s časem expozice neliší. Možným důvodem odlišných výsledků je špatné proměření vláken či velký rozptyl hodnot průměru vláken, který je dán způsobem přípravy kolagenové nanovrstvy.

6 Závěr

V této diplomové práci byla zpracována studie vlivu činnosti buněk na mechanické a strukturální vlastnosti kolagenových vrstev připravených elektrostatickým zvlákňováním. Tyto změny byly sledovány během a po expozici v samotném kultivačním médiu a v přítomnosti dermálních fibroblastů nebo osteoblastů kultivovaných na vzorcích po dobu tří týdnů. Kultivace buněk byla hodnocena pomocí fluorescenční mikroskopie a sledováním jejich metabolické aktivity. Změny mechanických vlastností byly měřeny jednoosou tahovou zkouškou, u které se vyhodnocoval počáteční modul pružnosti v prvním a posledním zatěžovacím cyklu, a mez pevnosti v tahu. Změny v sekundární struktuře kolagenu byly sledovány pomocí infračervené spektroskopie. Součástí studie byla také obrazová analýza vnitřní struktury vrstev provedená pomocí elektronové mikroskopie. Během této práce bylo zjištěno, že fibroblasty i osteoblasty mohou svojí činností ovlivňovat mechanické a strukturální vlastnosti kolagenových nanovrstev. Činnost buněk se podařilo prokázat zejména v případě osteoblastů. V jejich přítomnosti docházelo ke snížení modulu pružnosti v tahu, které se projevilo jak v prvním, tak v posledním zatěžovacím cyklu. V případě fibroblastů byl tento jev pozorován pouze v prvním cyklu, tedy v situaci, kdy jsou mechanické vlastnosti více ovlivněné vlastnostmi povrchových vrstev. V případě zvýšení meze pevnosti v tahu po expozici trávající tři týdny se nepodařilo prokázat, že by bylo způsobené činností buněk, neboť vyšších pevností bylo dosaženo i vzorků exponovaných v samotném médiu bez buněk. Vyšší aktivita osteoblastů byla dále prokázána pomocí infračervené spektroskopie, kde se projevila zvýšením poměru helikální části kolagenu k denaturovaným strukturám. Přítomnost buněk neměla vliv na průměr vláken kolagenové nanovrstvy. Cíle diplomové práce byly splněny.

Reference

- [1] WOLFOVÁ, Lucie, Jurečková LUCIE, Lenka JUREČKOVÁ a Lucie JUREČKOVÁ. Úvod do tkáňového inženýrství. Česká Republika: MediaBros, 2015. ISBN 978-80-260-9720-4.
- [2] DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [3] LINC, Rudolf a Alena DOUBKOVÁ. Anatomie hybnosti. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-7184-993-6.
- [4] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O KELLEY. Základy histologie. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- [5] ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
- [6] BLACK, Jonathan a Garth HASTINGS. Handbook of biomaterial properties. 2. London: Springer, 2016. ISBN 978-0-412-60330-3.
- [7] KOUTSKÝ, Jaroslav. Biomateriály. Plzeň: Západočeská univerzita, 1997. ISBN 80-7082-370-4.
- [8] AGRAWAL, C. Mauli. Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications. New York: Cambridge University Press, 2014. Cambridge texts in biomedical engineering. ISBN 978-0-521-11690-9.
- [9] KONRÁDOVÁ, Václava. Funkční histologie. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
- [10] KLOUDA, Pavel. Základy biochemie. 3. vyd. Ostrava: Pavko, 2013. ISBN 978-80-86369-16-7.

- [11] ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [12] NAVRÁTIL, Leoš. Medicínská biofyzika. Praha: Grada, 2005. ISBN 978-80-247-1152-2.
- [13] OTTANI, V., M. RASPANTI a A. RUGGERI. Collagen structure and functional implications. Elsevier Science Ltd.[online]. 2001, roč. 32, s. 251-260 [cit. 2013-03-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432800000421>
- [14] ČERNOŠEK, J.: Úvod do problematiky kompozitních materiálů, VUT v Brně, Fakulta technologická, Zlín, 1992.
- [15] CHAWLA, Krishan Kumar. Composite materials science and engineering. 3rd ed. New York: Springer, 2012. ISBN 97-80-387-74365-3.
- [16] WILLIAMS, D. F. Essential biomaterials science. New York: Cambridge University Press, 2014. Cambridge texts in biomedical engineering. ISBN 978-0-521-89908-6.
- [17] http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpbk/kompendium/biomechanika/vlastnosti_obecne.php
- [18] ROSINA, Jozef. Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- [19] ABC lepidla: stránky firmy online. cit. 2018-3-6. Dostupný z WWW: <http://www.abclepidla.cz/pdfs/Zaklady_teorie_lepeni.pdf>
- [20] DOROZHKIN, Sergey. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. Materials. 2013, roč.. 6, č. 9, s. 3840-3942.

- [21] LOSSDORFER S, SCHWARTZ Z, WANG L, LOHMANN CH, TURNER JD, WIELAND M, COCHRAN DL, BOYAN BD: Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004; 70A: s 361-369.
- [22] SCHNEIDER GB, PERINPANAYAGAM H, CLEGG M, ZAHARIAS R, SEABOLD D, KELLER J, STANFORD C: Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research*, 2003; 82: s 372-376.
- [23] STEVENS MM., GEORGE JH: Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 2005; 310: s 1135-1138.
- [24] HLUCHÝ, Miroslav. *Strojírenská technologie 1 Nauka o materiálu*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1978. 360 s.
- [25] BAČÁKOVÁ, Lucie, Eva FILOVÁ, František RYPÁČEK, Václav ŠVORČÍK a STARÝ. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research* 53, 2004, 34-35.
- [26] Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2018-08-14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/lysyloxidaza>
- [27] BASTIOLI, Catia. *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005. ISBN 1-85957-389-4.
- [28] PAYNE K.J., VEIS A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the Amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 1988, vol. 27, pp. 1749– 1760.

Seznam obrázků

Obr. 1: Princip tkáňového inženýrství využívající kombinaci buněk a scaffoldu.	13
Obr. 2: Vazivové buňky – fibrocyty a fibroblasty.	14
Obr. 3: Dermální fibroblasty použité v této práci. Dermální fibroblasty jsou kultivovány na běžném polystyrenovém povrchu. Zvětšení 10x.	14
Obr. 4: Kostní buňky – osteoblasty, osteocyty a osteoklasty.	15
Obr. 5: Kostní buňky lidská linie SAOS-2 použité v této práci. SAOS-2 jsou kultivovány na běžném polystyrenovém povrchu, zvětšení 10x.	16
Obr. 6: Struktura kolagenových vláken.	17
Obr. 7: Struktura kolagenu.	19
Obr. 8: Smáčivost povrchu. Kontaktní úhel větší než 90° mají hydrofobní povrchy. Úhel 0° mají hydrofilní povrchy.	22
Obr. 9: Typy namáhání materiálu.	23
Obr. 10: Smluvní (plně) a skutečný (čárkovaně) diagram tahové zkoušky.	25
Obr. 11: Mechanismus adheze buňka-materiál. Vlevo adheze nereceptorová adheze, vpravo receptorová adheze.	27
Obr. 12: Disperzní roztok kolagenu.	28
Obr. 13: Schéma přístroje pro elektrostatické zvláknění.	29
Obr. 14: Přístroj pro elektrostatické zvláknění 4SPIN®.	29
Obr. 15: Elektrostaticky zvlákněné kolagenové vrstvy (vlevo) byly při síťování uloženy v roztoku EDC/NHS po dobu 24 hodin v inkubátoru.	30
Obr. 16: 96 jamkový kultivační panel obsahující vzorky pro fluorescenční mikroskopii a hodnocení metabolické aktivity buněk.	31
Obr. 17: Kultivační komůrka pro osazení kolagenových nanovrstev buňkami pro mechanické testy.	31
Obr. 18: Upnutí vzorku pro tahovou zkoušku.	33
Obr. 19: Diagram tahové zkoušky.	34
Obr. 20: Dermální fibroblasty kultivované na polystyrenu byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 μm).	36
Obr. 21: Dermální fibroblasty kultivované na kolagenové nanovrstvě byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 μm).	37

Obr. 22: Osteoblasty kultivované na polystyrenu byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 μm).....	37
Obr. 23: Osteoblasty kultivované na kolagenové nanovrstvě byly obarveny roztokem calceinu AM, zelená barva značí metabolicky aktivní buňky (měřítko 100 μm).....	38
Obr. 24: Metabolická aktivita dermálních fibroblastů kultivovaných na kolagenové nanovrstvě (COL) a polystyrenu (PS), * značí statisticky významné rozdíly ($p=0,05$, t-test).	39
Obr. 25: Metabolická aktivita osteoblastů kultivovaných na kolagenové nanovrstvě (COL) a polystyrenu (PS), * značí statisticky významné rozdíly ($p=0,05$, t-test).	39
Obr. 26: Grafy závislosti smluvního napětí a poměrné deformace pro první a poslední zatěžovací cyklus. Pro vzorky exponované v médiu 1. (M1) a 21. (M21) den, vzorky s fibroblasty 1. (F1) a 21. den (F21) a vzorky s osteoblasty 1. (S1) a 21. den (S21).	40
Obr. 27: Porovnání závislosti smluvního napětí a poměrné deformace pro první a poslední zatěžovací cyklus. Pro vzorky exponované v médiu 1. (M1) a 21. (M21) den, vzorky s fibroblasty 1. (F1) a 21. den (F21) a vzorky s osteoblasty 1. (S1) a 21. den (S21).	41
Obr. 28: Krabicový graf porovnávající modul pružnosti prvního zatěžovacího cyklu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05).....	42
Obr. 29: Krabicový graf porovnávající modul pružnosti posledního zatěžovacího cyklu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05).....	43
Obr. 30: Krabicový graf porovnávající mez pevnosti v tahu 1. (M1) a 21. (M21) den vzorků exponovaných v médiu, 1. (F1) a 21. den (F21) vzorků s fibroblasty, 1. (S1) a 21. den (S21) vzorků s osteoblasty, * značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney, 0,05)	43
Obr. 31: Infračervená spektra studovaných kolagenových vrstev. LYO označuje kolagen použitý pro přípravu roztoku pro elektrostatické zvlákňování.	44
Obr. 32: Příklad spektrálního rozkladu pásu amidu I zdrojového materiálu (LYO)	44
Obr. 33: Krabicový graf porovnávající poměr ploch helikální a denaturované části kolagenu ($1660/(1630+1615)$)	45
Obr. 34: SEM snímky se zvětšením 500x pro vzorky exponované v médiu (M), pro buňky s fibroblasty (F) a pro buňky s osteoblasty (S) v měřících dnech 1, 7, 14 a 21	47

Obr. 35: Graf znázorňující zastoupení průměru vláken v kolagenové nanovrstvě před zesíťováním.....	48
Obr. 36: Graf znázorňující zastoupení průměru vláken v kolagenové nanovrstvě po zesíťování.....	48
Obr. 37: Krabicový graf porovnávající průměr vláken před a po zesíťování. Mezi průměry vláken nejsou statisticky významné rozdíly.	49
Obr. 38: Krabicový graf porovnávající průměr vláken vzorků po 1. (M1) a 21. (M21) dni v médiu, po 1. (F1) a 21. (F21) dni kultivace s fibroblasty a 1. (S1) a 21. (S21) dni kultivace s osteoblasty. Mezi průměry vláken nejsou statisticky významné rozdíly.	49

Seznam tabulek

Tab 1: Přehled materiálů potenciálně využívaných v tkáňovém inženýrství [1].....	21
Tab. 2: Parametry použité při zvlákňování	29
Tab. 3: Spektrální charakteristiky materiálů (n=10), medián (horní a dolní kvartil) * značí statisticky významné rozdíly v jednotlivých skupinách M, F a S (Kruskal-Wallis test, Bonferroni korekce, 0,05).....	45

Seznam příloh

Příloha 1: Rozměry vzorků exponovaných v kultivačním médiu

Příloha 2: Počáteční modul pružnosti pro první zatěžovací cyklus vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

Příloha 3: Počáteční modul pružnosti pro poslední zatěžovací cyklus vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

Příloha 4: Mez pevnosti vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

Příloha 5: Průměr vláken před síťováním

Příloha 6: Průměr vláken po síťování

Příloha 7: Průměr vláken vrstev v médiu první den

Příloha 8: Průměr vláken vrstev v médiu poslední den

Příloha 9: Průměr vláken vrstev s fibroblasty první den

Příloha 10: Průměr vláken vrstev s fibroblasty poslední den

Příloha 11: Průměr vláken vrstev s osteoblasty první den

Příloha 12: Průměr vláken vrstev s osteoblasty poslední den

Příloha 1: Rozměry vzorků exponovaných v kultivačním médiu

	TLOUŠŤKA [μm]	DÉLKA [mm]
M1	0,879	790,9
M2	1,013	831,8
M3	0,959	791,6
M4	1,020	881,7
M5	0,965	796,1
M6	0,447	845,2
M7	0,730	793,9
M8	1,139	768,5
M9	0,537	788,7
F1	0,706	824,4
F2	0,591	836,3
F3	0,764	809,5
F4	0,745	879,5
F5	0,477	809,5
F6	0,618	843,8
F7	0,589	828,9
F8	0,638	772,3
F9	0,637	881,0
S1	0,928	854,2
S2	0,779	830,4
S3	0,808	838,5
S4	0,660	750,7
S5	0,475	840,8
S6	0,828	838,5
S7	0,755	805,0
S8	0,576	820,7
S9	0,771	863,1

Příloha 2: Počáteční modul pružnosti pro první zatěžovací cyklus vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

[MPa]	den 1	den 7	den 14	den 21
M1	0,244	0,087	0,156	0,159
M2	0,156	0,156	0,122	0,179
M3	0,102	0,165	0,199	0,143
M4	0,145	0,181	0,149	0,159
M5	0,103	0,148	0,125	0,115
M6	0,292	0,154	0,165	0,158
M7	0,221	0,180	0,147	0,224
M8	0,127	0,101	0,160	0,183
F1	0,229	0,165	0,185	0,093
F2	0,252	0,142	0,162	0,118
F3	0,173	0,150	0,163	0,181
F4	0,294	0,129	0,135	0,186
F5	0,252	0,171	0,171	0,202
F6	0,185	0,162	0,078	0,244
F7	0,191	0,196	0,214	0,159
F8	0,210	0,175	0,178	0,187
S1	0,190	0,193	0,241	0,119
S2	0,262	0,170	0,135	0,149
S3	0,199	0,222	0,164	0,123
S4	0,209	0,167	0,148	0,142
S5	0,214	0,203	0,125	0,149
S6	0,145	0,082	0,165	0,128
S7	0,266	0,356	0,139	0,123
S8	0,279	0,244	0,158	0,199

Příloha 3: Počáteční modul pružnosti pro poslední zatěžovací cyklus vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

[MPa]	den 1	den 7	den 14	den 21
M1	0,120	0,062	0,084	0,128
M2	0,073	0,080	0,082	0,141
M3	0,038	0,071	0,151	0,081
M4	0,061	0,089	0,089	0,123
M5	0,065	0,086	0,067	0,065
M6	0,183	0,087	0,129	0,120
M7	0,169	0,114	0,098	0,166
M8	0,055	0,101	0,107	0,138
F1	0,104	0,058	0,093	0,149
F2	0,156	0,088	0,102	0,129
F3	0,144	0,075	0,073	0,150
F4	0,193	0,080	0,089	0,140
F5	0,193	0,117	0,110	0,168
F6	0,185	0,091	0,074	0,185
F7	0,115	0,179	0,146	0,109
F8	0,128	0,101	0,137	0,174
S1	0,156	0,116	0,167	0,092
S2	0,161	0,170	0,119	0,119
S3	0,144	0,163	0,117	0,090
S4	0,118	0,114	0,102	0,121
S5	0,093	0,113	0,111	0,112
S6	0,068	0,095	0,115	0,103
S7	0,136	0,130	0,101	0,079
S8	0,115	0,123	0,111	0,104

Příloha 4: Mez pevnosti vzorků v médiu (M) nebo kultivovaných s fibroblasty (F) a osteoblasty (S)

[MPa]	den 1	den 7	den 14	den 21
M1	1,880	1,477	1,857	2,896
M2	1,632	2,249	2,686	2,818
M3	1,607	2,597	2,486	2,746
M4	1,677	2,708	3,033	3,685
M5	1,934	2,029	1,988	2,986
M6	3,769	1,825	3,919	3,068
M7	2,560	1,895	2,670	3,443
M8	1,828	2,214	3,011	3,378
F1	2,495	2,427	3,272	2,975
F2	2,632	2,841	2,856	3,138
F3	1,855	2,479	3,227	3,871
F4	2,063	2,332	2,048	3,223
F5	4,446	2,898	2,847	3,803
F6	1,985	2,316	2,349	4,463
F7	2,330	5,246	2,621	4,671
F8	2,746	2,695	2,126	4,919
S1	1,943	2,961	3,616	3,230
S2	2,219	2,629	4,256	3,142
S3	2,207	3,517	3,860	2,967
S4	2,886	2,650	2,680	2,495
S5	3,424	2,810	2,861	3,702
S6	2,188	3,084	3,794	3,523
S7	2,223	3,446	2,531	3,527
S8	2,739	2,121	2,565	3,232

Příloha 5: Průměr vláken před síťováním

vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]
CL1_009	1	341	CL2_009	1	247	CL2_009	1	247
	2	176		2	317		2	211
	3	247		3	329		3	282
	4	270		4	341		4	270
	5	294		5	305		5	329
	6	235		6	223		6	176
	7	317		7	235		7	270
	8	235		8	223		8	223
	9	258		9	305		9	235
	10	200		10	223		10	258
CL1_010	1	211	CL2_010	1	200	CL2_010	1	317
	2	176		2	223		2	352
	3	294		3	329		3	341
	4	223		4	294		4	211
	5	270		5	329		5	294
	6	211		6	258		6	211
	7	329		7	305		7	294
	8	305		8	235		8	200
	9	258		9	235		9	352
	10	305		10	188		10	294
CL1_011	1	258	CL2_011	1	317	CL2_011	1	223
	2	305		2	188		2	317
	3	223		3	176		3	211
	4	235		4	223		4	282
	5	258		5	235		5	352
	6	258		6	200		6	270
	7	211		7	176		7	282
	8	282		8	223		8	247
	9	258		9	258		9	258
	10	376		10	247		10	282

Příloha 6: Průměr vláken po síťování

vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]
CL1_ 009	1	329	CL2_ 009	1	282	CL2_ 009	1	247
	2	200		2	247		2	294
	3	247		3	270		3	270
	4	282		4	282		4	223
	5	294		5	294		5	329
	6	247		6	176		6	200
	7	305		7	282		7	270
	8	247		8	223		8	247
	9	258		9	247		9	305
	10	223		10	270		10	235
CL1_ 010	1	235	CL2_ 010	1	282	CL2_ 010	1	211
	2	200		2	329		2	223
	3	282		3	317		3	305
	4	211		4	223		4	294
	5	282		5	282		5	282
	6	223		6	235		6	247
	7	305		7	282		7	270
	8	282		8	223		8	235
	9	270		9	317		9	223
	10	294		10	294		10	200
CL1_ 011	1	270	CL2_ 011	1	282	CL2_ 011	1	305
	2	294		2	282		2	282
	3	235		3	247		3	188
	4	258		4	270		4	223
	5	258		5	258		5	235
	6	247		6	270		6	223
	7	211		7	282		7	200
	8	282		8	247		8	247
	9	258		9	258		9	258
	10	317		10	223		10	270

Příloha 7: Průměr vláken vrstev v médiu první den

vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]
M1_09	1	164	M1_12	1	141	M1_15	1	223
	2	211		2	211		2	176
	3	223		3	247		3	164
	4	235		4	176		4	247
	5	223		5	164		5	223
	6	247		6	247		6	164
	7	176		7	223		7	247
	8	176		8	164		8	176
	9	164		9	247		9	176
	10	211		10	176		10	223
M1_10	1	188	M1_13	1	176	M1_16	1	223
	2	235		2	223		2	235
	3	176		3	223		3	223
	4	223		4	235		4	247
	5	200		5	223		5	176
	6	176		6	247		6	176
	7	223		7	176		7	164
	8	247		8	176		8	176
	9	223		9	164		9	223
	10	176		10	211		10	247
M1_11	1	223	M1_14	1	188	M1_17	1	223
	2	164		2	235		2	176
	3	153		3	176		3	223
	4	176		4	223		4	164
	5	164		5	200		5	153
	6	223		6	176		6	176
	7	211		7	223		7	164
	8	200		8	247		8	223
	9	223		9	223		9	211
	10	188		10	176		10	200

Příloha 8: Průměr vláken vrstev s v médiu poslední den

vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlák no	průměr vlákna [nm]
M21_009	1	223	M21_012	1	176	M21_015	1	223
	2	200		2	176		2	176
	3	176		3	164		3	247
	4	176		4	211		4	176
	5	164		5	188		5	176
	6	223		6	235		6	164
	7	188		7	223		7	211
	8	235		8	176		8	188
	9	176		9	223		9	235
	10	223		10	164		10	176
M21_010	1	223	M21_013	1	153	M21_016	1	223
	2	176		2	176		2	200
	3	176		3	164		3	176
	4	223		4	223		4	176
	5	200		5	188		5	164
	6	164		6	235		6	223
	7	211		7	176		7	188
	8	188		8	176		8	211
	9	235		9	176		9	188
	10	223		10	164		10	235
M21_011	1	176	M21_014	1	211	M21_017	1	223
	2	223		2	188		2	176
	3	164		3	235		3	223
	4	153		4	176		4	164
	5	176		5	223		5	153
	6	164		6	176		6	176
	7	223		7	223		7	164
	8	188		8	247		8	223
	9	235		9	223		9	211
	10	188		10	176		10	200

Příloha 9: Průměr vláken vrstev s fibroblasty první den

vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]
F1_09	1	153	F1_012	1	141	F1_015	1	223
	2	153		2	211		2	247
	3	164		3	129		3	176
	4	176		4	188		4	129
	5	200		5	223		5	153
	6	235		6	247		6	176
	7	188		7	176		7	176
	8	235		8	129		8	223
	9	223		9	153		9	164
	10	176		10	176		10	188
F1_010	1	153	F1_013	1	176	F1_016	1	176
	2	141		2	223		2	223
	3	211		3	164		3	164
	4	223		4	188		4	188
	5	188		5	153		5	153
	6	211		6	176		6	176
	7	164		7	164		7	164
	8	235		8	247		8	247
	9	223		9	223		9	223
	10	211		10	164		10	176
F1_011	1	235	F1_014	1	247	F1_017	1	153
	2	223		2	117		2	141
	3	188		3	188		3	211
	4	176		4	176		4	223
	5	164		5	164		5	188
	6	176		6	200		6	176
	7	211		7	211		7	153
	8	153		8	200		8	141
	9	223		9	129		9	211
	10	188		10	188		10	223

Příloha 10: Průměr vláken vrstev s fibroblasty poslední den

vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]
F21_09	1	153	F21_012	1	141	F21_015	1	223
	2	176		2	211		2	176
	3	176		3	247		3	153
	4	223		4	176		4	141
	5	164		5	164		5	211
	6	188		6	247		6	223
	7	153		7	223		7	188
	8	176		8	164		8	176
	9	164		9	247		9	153
	10	247		10	176		10	141
F21_010	1	176	F21_013	1	176	F21_016	1	176
	2	164		2	223		2	164
	3	247		3	164		3	247
	4	223		4	188		4	176
	5	164		5	176		5	164
	6	247		6	223		6	247
	7	117		7	164		7	164
	8	188		8	188		8	188
	9	176		9	223		9	176
	10	153		10	164		10	223
F21_011	1	176	F21_014	1	176	F21_017	1	153
	2	176		2	153		2	141
	3	223		3	141		3	211
	4	164		4	211		4	223
	5	188		5	223		5	188
	6	176		6	188		6	176
	7	223		7	176		7	153
	8	164		8	153		8	141
	9	188		9	141		9	188
	10	153		10	188		10	117

Příloha 11: Průměr vláken vrstev s osteoblasty první den

vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]
S1_09	1	188	S1_012	1	164	S1_015	1	223
	2	235		2	211		2	176
	3	223		3	188		3	247
	4	176		4	235		4	176
	5	223		5	176		5	176
	6	176		6	223		6	164
	7	164		7	176		7	211
	8	211		8	176		8	188
	9	188		9	164		9	235
	10	200		10	223		10	176
S1_010	1	235	S1_013	1	223	S1_016	1	223
	2	188		2	176		2	200
	3	235		3	164		3	176
	4	223		4	211		4	176
	5	176		5	188		5	164
	6	153		6	200		6	223
	7	141		7	235		7	188
	8	211		8	188		8	211
	9	223		9	235		9	188
	10	188		10	223		10	235
S1_011	1	211	S1_014	1	176	S1_017	1	223
	2	164		2	153		2	176
	3	235		3	200		3	223
	4	223		4	176		4	164
	5	211		5	176		5	153
	6	235		6	164		6	176
	7	235		7	223		7	164
	8	223		8	188		8	223
	9	235		9	211		9	211
	10	188		10	176		10	200

Příloha 12: Průměr vláken vrstev s osteoblasty poslední den

vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]	vzorek	vlákno	průměr vlákna [nm]
S21_09	1	188	S21_12	1	164	S21_15	1	164
	2	235		2	211		2	211
	3	223		3	188		3	188
	4	176		4	176		4	200
	5	176		5	164		5	235
	6	211		6	223		6	188
	7	188		7	223		7	200
	8	200		8	176		8	176
	9	235		9	164		9	223
	10	188		10	211		10	164
S21_10	1	200	S21_13	1	188	S21_16	1	153
	2	176		2	200		2	176
	3	200		3	188		3	164
	4	235		4	235		4	223
	5	188		5	176		5	211
	6	235		6	223		6	200
	7	223		7	200		7	223
	8	176		8	176		8	247
	9	153		9	223		9	176
	10	200		10	247		10	176
S21_11	1	176	S21_14	1	247	S21_17	1	164
	2	176		2	176		2	211
	3	164		3	176		3	188
	4	223		4	164		4	235
	5	188		5	211		5	176
	6	211		6	188		6	176
	7	235		7	235		7	164
	8	223		8	176		8	223
	9	235		9	223		9	211
	10	188		10	200		10	200