



**FAKULTA
STROJNÍ
ČVUT V PRAZE**

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VERIFIKACE VYBRANÝCH IN VITRO ENZYMATICKÝCH PROSTŘEDÍ S IN VIVO PODMÍNKAMI

Vopálková Marika

Praha 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Vopálková** Jméno: **Marika** Osobní číslo: **491523**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávací katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**
Studijní obor: **bez oboru**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Verifikace vybraných in vitro enzymatických prostředí s in vivo podmínkami

Název bakalářské práce anglicky:

Verification of selected in vitro enzymatic environments with in vivo conditions

Pokyny pro vypracování:

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

Seznam doporučené literatury:

1. Suchý T, et al. 2018 J. Mater. Sci. Mater. Med. 29:20. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6024-2>
2. Suchý T, et al. 2021 Materials 14:4388. <https://doi.org/10.3390/ma14164388>
3. Yilmaz B, et al. 2020 Microchem. J. 155:104713. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104713>
4. Zhang Z, et al. 2012 Acta Biomater. 8:13-19. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.020>

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

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

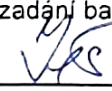
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:


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


Datum zadání bakalářské práce: **12.04.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **14.08.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: _____


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



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


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

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

27. 4. 2022
Datum převzetí zadání


Podpis studentky

ANOTAČNÍ LIST

- Autor:** Vopálková Marika
- Téma:** Verifikace vybraných *in vitro* enzymatických prostředí s *in vivo* podmínkami
- Rozsah:** *Počet stran: 117*
Počet obrázků: 31
Počet zdrojů: 55
Počet tabulek: 3
Počet příloh: 2
- Akademický rok:** 2021/2022
- Ústav:** 12105, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
- Studijní program:** B2342, Teoretický základ strojího inženýrství
- Obor studia:** 2301R000 Studijní program je bezoborový
- Vedoucí:** doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
- Druhý vedoucí nebo konzultant:**
Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
- Abstrakt:** Cílem této práce je porovnat procesy degradace kolagenních scaffoldů (typ I, telecí kůže) vystavených enzymatickému prostředí *in vitro* s podmínkami *in vivo*. Prostředí *in vitro* se běžně používají pro simulaci procesů v organismu a představují užitečné přiblížení tělnímu prostředí při navrhování biomateriálů. Testy *in vitro* jsou však pouze aproximací přirozeného tělního prostředí. Nejsou totiž schopny komplexně napodobit všechny tělesné procesy. Jinými slovy, extrapolace výsledků *in vitro* na situaci *in vivo*, je velmi komplikovaná a může vést k nepřesným výsledkům.
- Klíčová slova:** *in vivo, in vitro, kolagen, scaffold, kolagenáza*

ANNOTATION

- Author:** Vopálková Marika
- Topic:** Verification of selected *in vitro* enzymatic environments with *in vivo* conditions
- Summary:** Number of pages: 117
Number of figures: 31
Number of sources: 55
Number of tables: 3
Number of attachments: 2
- Academic year:** 2021/2022
- Department:** 12105, Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics
- Study programme:** B2342, Theoretical Basis of Mechanical Engineering
- Field of study:** 2301R000 Study programme has no fields of study
- Supervisor:** doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
- Second supervisor or consultant:** Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
- Abstract:** This work aims to compare the degradation processes in collagen (type I, calf skin) scaffolds exposed to the *in vitro* enzymatic environment and to the *in vivo* conditions. *In vitro* environments are commonly used for the simulation of the body environment and represents a useful approach in the design of a biomaterial. However, *in vitro* tests are only an approximation to the native body environment because they are not able to comprehensively mimic all body processes. In other words, the extrapolation of *in vitro* results to *in vivo* situation is very complicated and may lead to inaccurate results.
- Keywords:** *in vivo*, *in vitro*, collagen, scaffold, collagenase

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Tomáši Suchému, Ph.D. za pomoc při zpracovávání této práce, obdivuhodnou ochotu a trpělivost, za odborné vedení a přínosná doporučení, připomínky a rady. Taktéž bych chtěla poděkovat Ing. Radku Sedláčkovi, Ph.D. za odborné vedení při realizaci experimentu, za věcné rady a připomínky a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat i Ing. Lucii Vištejnové, Ph.D. a Ing. Pavlu Kleinovi, Ph.D. za pomoc při realizaci *in vivo* experimentu.

Obsah

1. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	10
2. ÚVOD.....	12
3. CÍLE A HYPOTÉZY	13
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
4.1. KOSTNÍ DEFEKTY A JEJICH LÉČBA.....	14
4.2. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	16
4.3. SCAFFOLDY	17
4.3.1. VLASTNOSTI.....	18
4.3.2. MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU SCAFFOLDŮ.....	22
4.4. KOLAGEN.....	24
4.4.1. VNITŘNÍ STRUKTURA.....	24
4.4.2. FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI KOLAGENU.....	24
4.4.3. IZOLACE KOLAGENU	26
4.4.4. POUŽITÍ KOLAGENU.....	27
4.5. VYŠETŘOVÁNÍ DEGRADACE	27
4.5.1. VÝZNAM POPISU DEGRADACE	27
4.5.2. DEGRADAČNÍ PROSTŘEDÍ.....	28
4.5.3. ENZYMATICKÁ DEGRADACE	28
4.5.4. METODY POPISU DEGRADACE.....	29
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
5.1. MATERIÁLY VZORKŮ A JEJICH VÝROBA.....	31
5.1.1. POSTUP VÝROBY VZORKŮ	31
5.2. PRŮBĚH EXPERIMENTU	32
5.2.1. <i>IN VIVO</i>	32
5.2.2. <i>IN VITRO</i>	33
5.3. ZNAČENÍ A POČTY VZORKŮ.....	34
5.4. MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	35

5.4.1. ZKUŠEBNÍ VZOREK.....	36
5.4.2. PROVEDENÍ ZKOUŠKY.....	36
5.4.3. VYHODNOCENÍ ZKOUŠKY	38
5.4.4. VYŘAZENÁ DATA.....	42
5.5. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY	43
5.6. DALŠÍ VYHODNOCOVANÁ DATA	43
5.7. STATISTICKÁ ANALÝZA	44
5.7.1. STATISTICKÁ ANALÝZA NAMĚŘENÝCH DAT.....	45
6. VÝSLEDKY	52
6.1. MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	52
6.1.1. STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ.....	52
6.1.2. ELASTICKÝ GRADIENT	54
6.1.3. ABSORBOVANÁ ENERGIE	56
6.1.4. ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE	58
6.2. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY	60
6.3. SEM.....	62
6.4. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	66
7. DISKUZE	69
8. ZÁVĚR.....	71
9. PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY	72
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
11. SEZNAM OBRÁZKŮ	78
12. SEZNAM TABULEK	81
13. SEZNAM ROVNIC.....	81
14. SEZNAM PŘÍLOH.....	81

1. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$a_{(i)}$	Parametr dat (statistická analýza)
d	Počet porovnání (statistická analýza)
d_{coh}	Cohenovo d (statistická analýza)
d_{H_2O}	Deionizovaná voda
E [kPa]	Elastický gradient (tlaková zkouška)
e [mm]	Posuv příčnicku stroje (tlaková zkouška)
EDC	Ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
F	F-test testové kritérium (statistická analýza)
F [N]	Síla (tlaková zkouška)
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
FYZ	Fyziologický roztok
GFOGER	Peptid (GGYGGGP(GPP)5GFOGER(GPP)5GPC)
Gly	Glycin
H_0	Nulová hypotéza (statistická analýza)
h_0 [mm]	Počáteční výška vzorku (tlaková zkouška)
H_1	Alternativní hypotéza (statistická analýza)
<i>in vitro</i>	„ve skle“ = pozorování v laboratorních podmínkách
IN VIVO	Vzorky kultivované <i>in vivo</i> (označení)
<i>in vivo</i>	„v živém“ = pozorování v reálných tělních podmínkách
KMAX	Nejvyšší koncentrace kolagenázy (označení)
KMID	Střední koncentrace kolagenázy (označení)
KMIN	Minimální koncentrace kolagenázy (označení)
m_0 [g]	Počáteční hmotnost vzorku (hmotnostní úbytky)
MEM	Minimum essential media
m_t [g]	Hmotnost vzorku po expozici v médiu (hmotnostní úbytky)
n	Počet pozorování (statistická analýza)
NHS	N-Hydroxysukcinimid
p-hodnota	Nejmenší hladina významnosti kdy ještě zamítáme H_0 (statistická analýza)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCL	Polykaprolakton
PDS	Polydioxanon
PGA	Polyglykolid

PHB	Polyhydroxybutyrát
PLA	Kyselina polymléčná
R	Pořadí seřazeného souboru (statistická analýza)
S_0 [mm ²]	Počáteční plocha vzorku v kolmém směru (tlaková zkouška)
SD	Směrodatná odchylka výběru (přílohy – tabulky s výsledky)
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
Φ	Kumulativní distribuční funkce
S_{j2}	Výběrový rozptyl (statistická analýza)
t	T-test testové kritérium (statistická analýza)
$t_{1-\alpha/2, (n+1)}$	Kvantil Studentova t-rozložení (statistická analýza)
U	Mann–Whitney test testové kritérium (statistická analýza)
v	Počet stupňů volnosti (statistická analýza)
W	Shapiro–Wilk testové kritérium (statistická analýza)
W [kJ·m ³]	Absorbovaná energie (tlaková zkouška)
W_e [%]	Účinnost absorpce energie (tlaková zkouška)
$X_{(i)}$	I-té pozorování vzestupně řazeného souboru (statistická analýza)
\bar{x}	Aritmetický průměr (statistická analýza)
z-hodnota	Standardizované skóre (statistická analýza)
α [-]	Hladina významnosti testu (statistická analýza)
α_{bonf} [-]	Korigovaná hladina významnosti testu (statistická analýza)
β [-]	Pravděpodobnost chyby druhého druhu (statistická analýza)
Δm [%]	Hmotnostní úbytky (hmotnostní úbytky)
ϵ [-]	Relativní deformace (tlaková zkouška)
μ	Střední hodnota (statistická analýza)
σ [kPa]	Smluvní napětí (tlaková zkouška)
σ_2	Rozptyl (statistická analýza)
σ_{pl} [kPa]	Stabilní hladina napětí (tlaková zkouška)

2. ÚVOD

U materiálů, jež mají potenciál pro léčbu tkání a měly by být umístěny přímo do těla pacienta je nutné sledovat jejich odezvu na toto tělní prostředí. A to ať už z důvodu ověření jejich požadovaných vlastností, tak i z důvodu ověření jejich nezávadnosti pro příjemce. K tomuto účelu bývají v prvotní fázi výzkumu z etických i finančních důvodů využívána různá *in vitro* simulační média a až ve druhé fázi se přistupuje k *in vivo* experimentům na zvířecích modelech, jejichž tělní prostředí je velmi podobné lidskému.

Pro verifikaci výsledků z první fáze experimentů a jejich extrapolaci na tělní podmínky je však nutné znát srovnání výsledků při použití simulačního média s *in vivo* experimentem, aby nedošlo k mylným závěrům a v podstatě zbytečnému dalšímu experimentu. Z tohoto důvodu je nutné simulační média verifikovat a ověřit tak, jak relevantní jsou výsledky získané z těchto experimentů.

Pro účel srovnání degradace ve vybraných enzymatických *in vitro* prostředí s *in vivo* podmínkami byly použity kolagenní scaffoldy (lešení – konstrukt tkáňového inženýrství). Tento materiál má potenciál pro léčbu kostních defektů a mohl by dopomoci k léčbě těchto zranění i v případech, kdy je kompletní zhojení obtížné.

Tyto scaffoldy byly kultivovány ve vybraných třech koncentracích roztoku kolagenázy po dobu 1, 7, 14 a 21 dní a v peritoneu experimentálního zvířete po dobu 7, 14, 21 dní. Následovalo vyhodnocení mechanických charakteristik pomocí tlakových zkoušek, vyhodnocení změny hmotnosti vzorků, a analýza struktury a složení vzorků po kultivaci za účelem srovnání zmíněných charakteristik mezi třemi koncentracemi kolagenázy a *in vivo* podmínkami kultivace.

3. CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této práce je posoudit, do jaké míry je enzymatické prostředí, reprezentované třemi koncentracemi enzymu kolagenáza, schopné napodobit skutečné podmínky *in vivo*. Vliv simulovaného a tělního prostředí je v práci ověřován na modelových porézních scaffoldech připravených z kolagenu typu I.

Nulová hypotéza předpokládá, že všechny použité koncentrace kolagenázy mají na sledované vlastnosti kolagenových scaffoldů stejný vliv jako tělní prostředí ve všech sledovaných časových úsecích a že jsou tudíž schopny věrně simulovat prostředí *in vivo*.

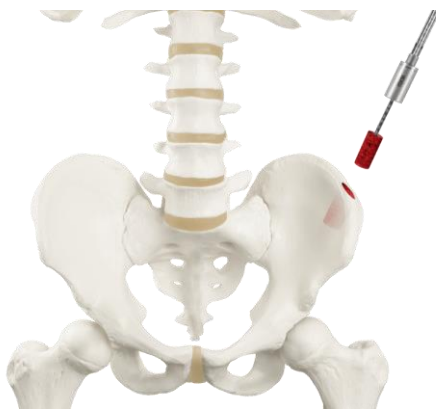
Alternativní hypotéza předpokládá, že pokud se nepodaří prokázat platnost nulové hypotézy s dostatečnou mírou pravděpodobnosti, vybraná simulovaná prostředí mají na sledované vlastnosti kolagenových scaffoldů odlišný vliv než tělní prostředí a že nejsou schopny věrně simulovat prostředí *in vivo*.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. KOSTNÍ DEFEKTY A JEJICH LÉČBA

Motivací pro výzkum podobných materiálů a jejich chování v lidském těle je hlavně jejich potenciální význam při léčbě komplikovanějších zranění. V případě kolagenních scaffoldů by se jednalo o léčbu kostní tkáně. Primárně by pak šlo o léčbu komplikovaných zranění, jejichž hojení je již poměrně problematické a běžnými postupy lze úplného zotavení dosáhnout jen obtížně. Takovým případem je defekt kosti spojený se značným poškozením okolní tkáně (vazů, svalů, cév, atd.), například vlivem nádorového onemocnění, zánětu či nějakého závažného traumatu [1].

Dnes asi nepoužívanější metodou je léčba za použití takzvaného autologního kostního štěpu. Spočívá v odebrání části kosti z pánevního hřebenu, holenní či stehenní kosti pacienta. Kost je následně vložena do defektu, jakožto kostní štěp, který zaplní defekt v kosti a v ideálním případě sroste se zbytkem kosti. Tím nahradí scházející kostní tkáň. Konkrétní metodika vkládání a způsob fixace se může lišit. Metoda je značně limitována velikostí štěpu, který lze získat bez závažnějšího zásahu do těla pacienta (viz **Obrázek 1**). Kromě velikostní limitace štěpu se taktéž u této metody mohou vyskytnout komplikace v podobě rizikivosti samotného odběru kosti, jenž je provázen řadou komplikací. E. M. Younger a M. W. Chapman zjistili, že se závažné komplikace při odběru kostní tkáně z pánve objevily v 8,6 % případů na vzorku 239 pacientů. V případě použití stejných nástrojů na odběr kosti i na jejich následnou aplikaci na poškozené místo, se pak závažnější komplikace objevily v 17,9 % [2], [3].

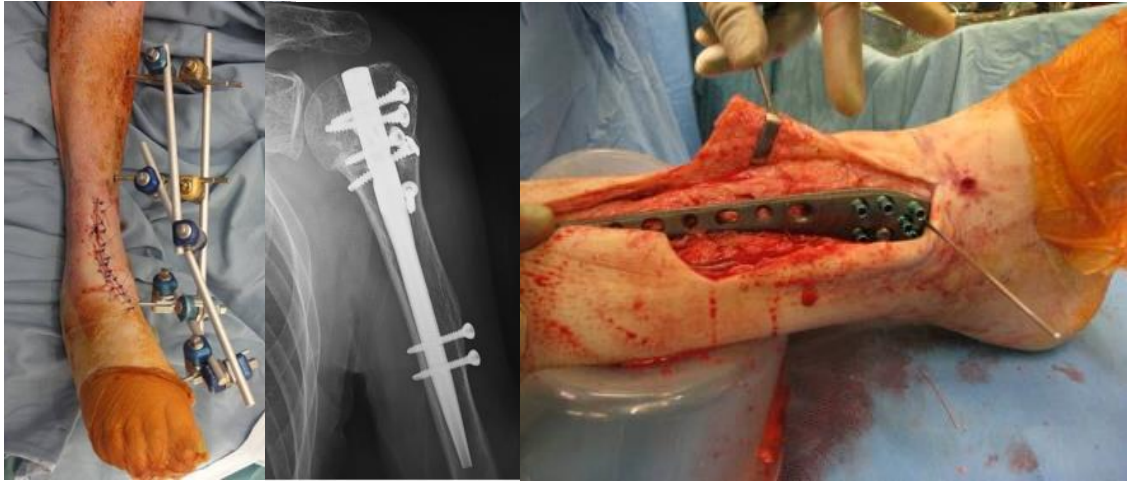


OBRÁZEK 1 Odběr kostní tkáně z pánevního hřebene (zdroj: [4])

Další možností léčby je využití alograftů. Alograft je založen v zásadě na podobném principu jako autologní kostní štěp, jen je využita kost dárce, například z orgánových bank. Tato kost tedy mohla být před aplikací zmrazena, což může hojení mírně zkomplikovat, avšak zároveň snížit imunitní odezvu těla na cizí tkáň. Nicméně je s touto metodou spojeno taky poměrně velké procento komplikací. Kupříkladu H. J. Mankin a kolektiv při přezkoumání své práce uvedli, že pouze 70 % aplikovaných alograftů proběhlo úspěšně. (13 % infekce, 17 % zlomenina, 11 % nesjednocení s okolní kostí) Pro vložení kostního štěpu do defektu lze využít i xenogenní kost. Xenogenní kost je kost z jedince jiného živočišného druhu, zatímco kost alogenní je kost příslušníka stejného živočišného druhu s odlišným DNA. S touto metodou je spojeno poměrně velké riziko odmítnutí štěpu a zároveň možnost zavlečení infekčních onemocnění do pacienta. To je důvod výjimečného použití této metody dnes [3], [5], [6].

Další alternativní metodou léčby vybraného typu kostních poranění je léčba za použití zevních fixátorů, takzvaná Ilizarovova technika (viz **Obrázek 2**). Při této metodice se využívá schopnosti kosti růst pod napětím. Pomocí zevní fixace je vytvořena v kosti úzká mezera, která začne postupně dorůstat, následně se fixace posune a mezera se zvětšuje, dokud kost nemá požadované rozměry. Tato metoda je nevhodná pro pacienty, jejichž kosti nejsou schopny dostatečné remodelace a růstu. Je zároveň velmi časově náročná a spojená s řadou komplikací. Především se jedná o různé infekce a nepohodlí spojené s vnějšími fixátory, bolesti v natahovaných tkáních, případně poškození některého z okolních kloubů vlivem změny zatěžování. Z těchto důvodů se tato metoda léčby dnes v případě závažných kostních defektů příliš nevyužívá [7].

V případě léčby kostních defektů lze v některých případech využít hřebování, či dlahování (viz **Obrázek 2**). K této metodě léčby se přistupuje v méně závažných případech a v případech menších defektů kosti [3].



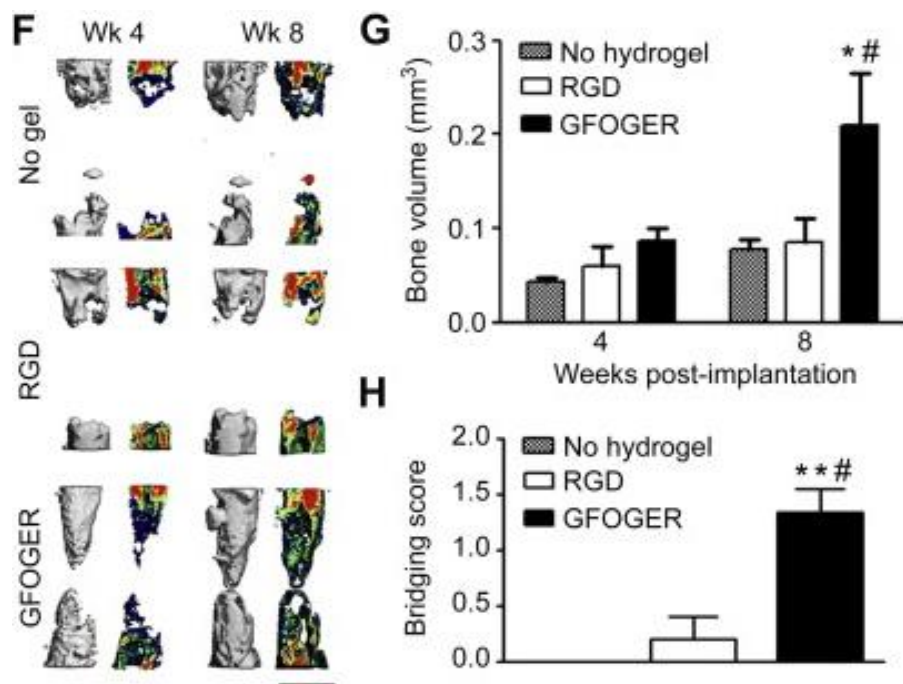
OBRÁZEK 2 Vlevo Ilizarovova technika, ve středu nitrodřeňový hřeb, vpravo umístování dlahy na kost (zdroj: upraveno z [1], [8])

4.2. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Směr, kam se vkládají naděje na zlepšení léčby velkých kostních defektů, je tkáňové inženýrství. Má potenciál při použití principů regenerativní medicíny a nových postupů, aby dopomohl kléčbě kostních defektů i u jedinců, jejichž regenerace je již omezená.

Tkáňové inženýrství k dosažení tohoto cíle využívá dodávání buněk, podpůrných struktur a různých chemických sloučenin. Příkladem jsou růstové hormony a podpůrné struktury takzvané scaffoldy [7].

Metodou, která má potenciál jako alternativa kostních štěpů je například využití scaffoldu, jenž by byl schopen tělu dodávat po celou dobu hojení růstový faktor. Takto by bylo kladně ovlivněno hojení kostního defektu. Růstové faktory jsou obecně látky, jenž se v kosti v průběhu hojení přirozeně vyskytují [6]. Existuje více systémů a přístupů k tomuto problému, příkladem jsou scaffoldy potažené systémem GFOGER jakožto nosičem růstového faktoru [7]. Systém GFOGER (GGYGGGP(GPP)5GFOGER(GPP)5GPC) je peptid použitý na scaffoldy, jenž byly následně použity jako nosiče růstového faktoru BMP-2 a byl implantován do experimentálních zvířat. Zvířata tímto typem léčby vykazovala značné zlepšení hojení sledovaných defektů (viz Obrázek 3) [9].



OBRÁZEK 3 Srovnání hojení kostních defektů u myši při použití GFOGER a při přirozeném hojení (zdroj: upraveno z [9])

Dalším z principů tkáňového inženýrství je dodání konstruktů obsahujícího buňky, například osteoblasty či progenitorové buňky [6]. Mezi takové principy se řadí i kupříkladu využití progenitorových buněk za účelem podpory angiogeneze (tvorba cév) v nitru scaffoldu [7].

Každopádně pro větší kostní defekty je klíčové využití scaffoldu jakožto mechanického „lešení“ pro hojící se tkáň [6].

4.3. SCAFFOLDY

Scaffoldy obecně jsou materiály, jejichž účelem by měla být tvorba základu pro živé buňky, a to převážně z mechanického a strukturního hlediska (jak již bylo zmíněno). Důležité jsou i další faktory. Tyto buňky by měly být v scaffoldu schopny kultivace a postupného včlenění do organismu v místě, kde byl scaffold implantován. Je žádoucí, aby scaffoldy byly vyrobeny z materiálů, jejichž vlastnosti odpovídají účelu použití konkrétního typu scaffoldu, například typu nahrazované tkáně, požadované doby degradace apod.

Co se druhů scaffoldů týká, nedělí se pouze podle konkrétního typu použití, ale i podle dalších vlastností. Scaffoldy se dají rozdělit podle možného způsobu implantace. Takto na tuhé a injektovatelné. Další způsob dělení scaffoldů

je na acelulární a celulární. Zde dle toho, jestli jsou v takovém materiálu kultivovány další buňky či nikoliv. Zda materiál implantovaný do pacienta již nějaké buňky obsahuje nebo do něho budou následně pouze vrůstat buňky až přímo v těle [10].

4.3.1. VLASTNOSTI

Biokompatibilita a biodegradabilita

Obecně vlastnosti scaffoldů závisí na jejich aplikaci. Jak již bylo zmíněno, pro všechny materiály používané v medicíně platí, že musí být především biokompatibilní. To znamená, že nesmí být toxické ani jinak škodlivé pro pacienta. Z toho plyne, že scaffold nesmí být karcinogenní ani jedovatý. Materiál umístěný do pacienta by také neměl vyvolat výraznou odezvu imunitního systému, čímž by byla značně narušena integrovatelnost tohoto materiálu do těla a nedošlo by ke zhojení léčeného místa. Důležitá je i nízká reaktivita materiálu s tělním prostředím [10], [11].

Scaffoldy by měly být v ideálním případě bezpečně degradovatelné a následně odbouratelné. Tímto způsobem je sníženo riziko spojené s dlouhodobou přítomností cizího předmětu v těle a zároveň je tělu umožněno nahradit scaffold vlastní tkání. Proto se u materiálů potenciálně vhodných pro tkáňové inženýrství posuzuje i biodegradabilita [12], [13].

S biodegradabilitou úzce souvisí i biokompatibilita. A to z pohledu, že produkty degradace musí být ideálně stejně biokompatibilní a přirozeně resorbovatelné jako samotný scaffold [12], [13].

Z hlediska postupné degradace scaffoldu je nutné posoudit i rychlost tohoto procesu. Ta totiž může značně ovlivnit hojení v daném místě. Příliš rychlá degradace scaffoldu oslabí z hlediska mechanických vlastností dřívě, než bude vlastní tkáň schopna převzít jeho podpůrnou funkci v místě zranění. Příliš rychlá degradace může způsobit až změnu pH v daném místě vlivem velkého množství odpadních látek. Změna pH pak dále značně komplikuje proces hojení [12], [13].

Rychlost degradace v organismu ovlivňuje celá řada faktorů. Mimo materiálového složení je to vnitřní struktura, topografie povrchu nebo jeho smáčivost [12].

Podstatným faktorem značně souvisejícím s biokompatibilitou je požadavek, aby materiál vkládaný do lidského těla ideálně nepřenášel žádné patogeny. Tohoto stavu se zcela dosáhnout nedá. Lze však materiál zbavit alespoň některých nežádoucích živých organismů pomocí sterilizace. Tato procedura se, v různé podobě, využívá ve zdravotnictví. Podstatná je i schopnost materiálu takovouto proceduru podstoupit, aniž by se výrazně měnily vlastnosti, ať už mechanické, či chemické. A mohla tak být provedena sterilizace bez zvláštních opatření s následující bezpečnou implantací [10],[11].

Osteokonduktivita a osteoinduktivita

V případě scaffoldů používaných pro kostní tkáňové inženýrství je klíčová vlastnost to, jak materiál podporuje růst kostní tkáně. Existují dva principy funkcí umělého materiálu v těle z hlediska růstu kostní tkáně, materiály podporující osteoindukci a materiály podporující osteokondukci [10].

Osteoindukce spočívá v tom, že se kmenové buňky, které nejsou obecně součástí kostní tkáně, diferencují na kostní buňky. Tímto způsobem pak vzniká kostní tkáň. Osteoindukcí se vytvoří kostní tkáň i tam, kde by se za normálních okolností nevytvořila [10].

Na druhou stranu osteokondukce spočívá v zarůstání cizích buněk do kostní struktury. Osteokondukční materiály umožňují růst kosti v místě, kde by i za normálních okolností došlo k hojení. Osteokonduktivita materiálu závisí i na jeho struktuře a umístění [10].

Porozita

Velikost a tvar pórů je velmi podstatný faktor ovlivňující značně funkčnost scaffoldu. Póry musí být dostatečně velké, aby buňky, které mají ve struktuře růst, mohly proliferovat dovnitř. Proto tento faktor značně ovlivňuje, které buňky se ve struktuře uchytní a dokonce, zda bude daný typ buněk schopen se na povrchu udržet dlouhodobě. V případě kostí se tato struktura mění i s konkrétním místem využití scaffoldu [10]. Například Eichi Tsuruga a spolupracovníci došli ve své studii

k výsledku, že optimální velikost pórů keramického scaffoldu pro tvorbu ektopické kosti je 300 - 400 μm [14]. R. E. Holmes obdobně zjistil, že optimální velikost pórů je 200-400 μm s předpokladem, že lidský osteon měří přibližně 100-200 μm [15].

Póry by měly být zároveň vzájemně propojeny, aby došlo k rovnoměrnému prorůstání tkáně, vaskularizaci a vytvoření homogenní trojrozměrné tkáňové struktury. Propojenost je nutná i z hlediska vyživování tkáně a odvádění odpadních látek [16], [17].

Cirkulaci živin a odvod odpadních látek lze dále podpořit zvláštní úpravou scaffoldu. Touto úpravou je kupříkladu takzvaná prevaskularizace scaffoldu. Například lze uvést konstrukty obsahující progenitorové buňky a endoteliální buňky. Tyto buňky pak podpoří tvorbu cév ve scaffoldu, čímž se zlepší právě hospodaření se živinami a odpadními látkami. Tato metoda se využívá primárně pro svalové implantáty. Je však nevhodná pro nahrazování tkáně, která přirozeně neobsahuje cévy. Taktéž lze využít dodání růstového faktoru do scaffoldu, to však s sebou nese jistá rizika [16].

Obecně by objem pórů scaffoldu měl být alespoň 75 % z objemu scaffoldu, aby bylo buňkám umožněno správné vrůstání do materiálu. Póry dosahující až na povrch, zvětšují plochu povrchu scaffoldu, čímž umožňují tkáni se lépe se scaffoldem propojit. Toto propojení tkáně se scaffoldem je pak klíčové pro dlouhodobou přítomnost scaffoldu v těle. Porozita nicméně ovlivňuje i mechanické vlastnosti, takže je při návrhu vhodné pórovitosti nutné přihlédnout i k tomuto faktoru [10], [11], [16].

Pórovitá struktura by měla být ideálně nahodilá, aby tak umožnila tkáni růst pro ni v ideálním směru. Tato vlastnost je obzvláště podstatná, pokud je scaffold v těle pouze dočasně [16].

Mechanické vlastnosti

Obecně se o mechanických vlastnostech scaffoldů dá říci, že by se měly co nejvíce blížit vlastnostem tkáně, kterou nahrazují. Tímto způsobem by byla zajištěna jak dostatečná mechanická podpora poškozeného místa, ale i téměř zdravé namáhání okolní tkáně. Při nedodržení těchto požadavků v případě kostní tkáně se dá mluvit o takzvaném „stress-shielding“ efektu,

20

který může u kosti vlivem nedostatečného namáhání způsobit nevhodný průběh remodelace, vedoucí až k jejímu oslabení [18], [19].

Pro příklad u kostní tkáně bývá běžně napětí v tlaku okolo 4 MPa, u šlach a vazů se dá mluvit i o hodnotách až dvacetkrát vyšších. V případě kyčelního kloubu se jedná o zatížení až desetinásobkem tělesné hmotnosti, tomu odpovídá i napětí v daném místě. Právě kvůli takto značně odlišnému namáhání, se pak používají i různé scaffoldy. Důležité je i správné rozložení zatížení a jeho přenos do okolní tkáně [18].

Co se mechanických vlastností tkáně týká, liší se v některých případech i v závislosti na směru. Například kortikální kost v podélném směru má pevnost v tahu zhruba 80 MPa až 190 MPa (v závislosti na věku, pohlaví, kosti a dalších faktorech), zatímco v příčném směru pouze zhruba 50 MPa. I tomu by měl v ideálním případě scaffold odpovídat [18], [20].

V případě kosti je pak nutno přihlídnout i k typu kostní tkáně. Kortikální kost má pevnost v tlaku zhruba 100 MPa až 200 MPa a Youngův modul v rozmezí 15 GPa až 20 GPa. Na rozdíl od spongiózní kosti, u které se pevnost v tlaku pohybuje v intervalu 2 MPa až 20 MPa a Youngův modul dosahuje pouze 0,1 GPa až 2 GPa [18].

Podstatná je i schopnost materiálu co nejlépe přilnout ke kosti pacienta, pouze tak lze totiž dosáhnout uspokojivých výsledků růstu nové kosti. Při nedostačující přizpůsobivosti tvaru scaffoldu totiž nemusí dojít ke vhodnému srůstu obou částí kosti. Proto by takovéto materiály měly být dostatečně tvárné a zároveň by neměly být příliš křehké. Díky těmto vlastnostem by měly být scaffoldy schopny se nepravidelným tvarům kosti přímo při implantaci přizpůsobit a dosáhnout tak ideálního rozhraní s kostí. Materiál by měl být snadno tvarovatelný, aby byl lékař schopen ho přizpůsobit. Zároveň by měl materiál být i dostatečně odolný, aby vyhovoval namáhání vyvíjenému při jeho implantaci do tkáně a nebyl tímto případným tlakem poškozen natolik, aby nemohl být použit [10], [11].

Co se dalších mechanických vlastností týče, scaffoldy musí být dostatečně odolné, aby podpořily okolní tkáně a zabránily tak prolapsu. Ten by mohl nastat nedlouho po implantaci scaffoldu do pacienta. Tuto pevnost by si i přes případné degradační procesy měl materiál zachovat dostatečně dlouho na to, aby tkáním

poskytl mechanickou podporu, a tak zabránil případnému prolapsu, dokud nebude nově vzniklá tkáň dostatečně vyvinutá [11].

Tento požadavek může však být poměrně problematický vzhledem k různé rychlosti hojení u různých jedinců a i vzhledem k faktu, že nelze dopředu jednoznačně určit optimální rychlost degradace pro daného jedince. Další komplikací pak může být i odlišná rychlost degradace v simulovaném tělním prostředí *in vitro* oproti degradaci *in vivo* [12].

4.3.2. MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU SCAFFOLDŮ

Na základě výše zmíněných vlastností jsou využívány materiály, které se tomuto ideálu co nejvíce blíží. Tyto materiály lze rozdělit do několika skupin [21].

První skupinou je takzvaná biodegradovatelná keramika. Do této skupiny lze zařadit keramiku na bázi kalcium fosfátů jako hydroxyapatit, fosforečnan vápenatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, síran vápenatý, biokeramiku na bázi silikátu, různé kompozitní materiály založené na bioaktivní keramice. Biokeramika je stejně jako všechny tyto materiály biokompatibilní, jedná se však o materiály relativně křehké. Výhodou může být i přesné chemické složení. Další výhodná vlastnost je i vysoká korozní odolnost a tělními procesy řízená degradace. Zástupce scaffoldů vyrobených z tohoto materiálu je vyobrazen na **Obrázku 4** [21].

Další skupinou jsou kovové materiály schopné biodegradace. Mezi tyto materiály se řadí především ty obsahující hořčík, železo a zinek a jejich slitiny. Vyznačují dobrou biokompatibilitou, a to i na buněčné fázi a zároveň i jistou biodegradabilitou. Scaffold vyrobený z biodegradovatelného kovu je zobrazen na **Obrázku 4** [21].

Zajímavou skupinou jsou takzvaná bioaktivní skla. Do této skupiny se řadí různé materiály na oxidické bázi. Konkrétně se jedná například o oxid křemičitý, oxid vápenatý či oxid fosforečný [21].

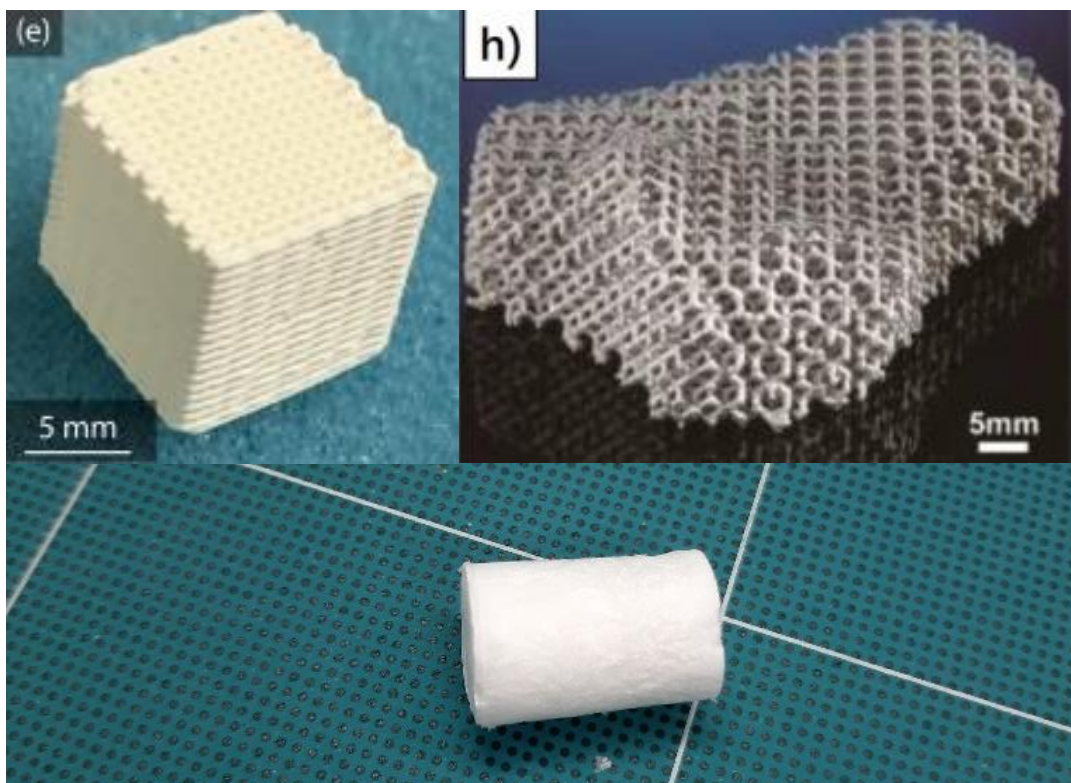
Další skupinou jsou syntetické biodegradovatelné polymery. Zde jsou zařazeny například PCL (polykaprolakton), PLA (kyselina polyléččná), PDS (polydioxanon),

PHB (polyhydroxybutyrát), nebo PGA (polyglykolid). Materiály z této skupiny byly navrženy tak, aby byly biokompatibilní a aby ani produkty jejich degradace nebyly nijak škodlivé pro okolní tkáň [21].

Zvláštní skupinou jsou přírodní biodegradovatelné polymery nebo polysacharidy, což jsou materiály vyskytující se v živých organizmech. Do této skupiny se řadí kolagen (viz **Obrázek 4**), chitosan (vnější skelet korýšů), fibrin a přírodní hedvábí (výměšky housenky bource morušového). Tyto materiály se vyznačují především biodegradabilitou, biokompatibilitou a bioaktivitou. Nicméně mají poměrně špatné mechanické vlastnosti, vysokou rozpustnost ve vodě nebo nebezpečí spojené s možnou denaturací při procesu jejich výroby [21].

K tvorbě funkčních scaffoldů se dnes však hojně využívají i nejrůznější kombinace těchto materiálů s cílem zajistit co nejlepší kombinaci vlastností [7].

V případě této práce se budeme dále zabírat scaffoldy tvořenými kolagenem.



OBRÁZEK 4 Vlevo nahoře keramický scaffold, vpravo nahoře scaffold z biodegradovatelného kovu a dole kolagenní scaffold (zdroj: upraveno z [22], [23])

4.4. KOLAGEN

Kolagen je přirozeně se v těle vyskytující bílkovina. Jedná se v zásadě o základ pojivových tkání. Vyskytuje se přirozeně například v kůži, šlachách, vazech nebo kostech. Doposud bylo identifikováno asi dvacet osm kolagenových typů, a to na základě obsahu různých aminokyselin v jeho molekule a různého uspořádání jeho struktury [24], [25], [26].

4.4.1. VNITŘNÍ STRUKTURA

Kolagen typu I je z hlediska uspořádání aminokyselin charakterizován třemi paralelními polypeptidovými vlákny, která tvoří společně troj-šroubovici. Prolin umožňuje α -řetězci zaujmout konfiguraci levotočivé spirály, kde na každou otáčku připadají tři aminokyselinové zbytky. Jednotlivá polypeptidová vlákna jsou pak vzájemně pospojována pomocí vodíkových můstků. Toto uspořádání nicméně vyžaduje, aby každý třetí aminokyselinový zbytek byl glycin (Gly), jehož velikost umožňuje těsné uspořádání spirály. Proto lze jednotlivá polypeptidová vlákna popsat pomocí opakující se jednotky tripeptidů ve tvaru Gly – X – Y, kde X a Y jsou jakékoli aminokyseliny (nejčastěji prolin a hydroxyprolin). Tato charakteristika se vyskytuje u všech typů kolagenu [24], [25], [26].

Dalším charakteristickým znakem je příčné pruhování fibril pozorovatelné pod elektronovým mikroskopem. Toto pruhování je způsobeno rozličným uspořádáním částí obsahujících aminokyseliny s různou molekulární hmotností. Části obsahující aminokyseliny s nízkou molární hmotností jsou poměrně orientované. Na druhou stranu úseky obsahující aminokyseliny s vysokou molekulární hmotností nemají příliš uspořádanou strukturu [26].

4.4.2. FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI KOLAGENU

Kolagen má obecně polyelektrolytický charakter. To znamená, že iontové reakce kolagenu jsou závislé na pH okolního prostředí. Náboj molekuly kolagenu se tedy mění v závislosti na pH okolí. V kyselejších prostředí má molekula kladný náboj, zatímco v zásaditém prostředí je náboj molekuly záporný [26].

Kolagen řadící se k přechodným koloidním soustavám je schopen bobtnání při ponoření do vody. Tento proces spočívá v navázání a proniknutí vody

do struktury kolagenu. Dochází tak ke změně objemu, délky i pružnosti vláken. Při procesu bobtnání dochází zároveň v některých případech k narušování vodíkových můstků, nebo dokonce k rozpouštění kolagenu. Látkám způsobujícím tento proces se říká lyotropní činidla. Nicméně důležitým důsledkem bobtnání je vyšší obsah vody v kolagenu. Tato voda se rozlišuje na vodu bobtnací, kterou lze ze struktury vypudit mechanickým působením, a na vodu hydratační, jenž je možno ze struktury odstranit pouze sušením [26].

Tím se dostáváme k hydrataci kolagenu. Asi 10-20 % hmotnosti kolagenu by měla tvořit voda, aby byly udrženy požadované fyzikální vlastnosti. Plnou hydrataci kolagenu je totiž umožněna větší pohyblivost v peptidových řetězcích polyfibril. Voda je v hydratovaném kolagenu vázána na dva druhy skupin, a to polární skupiny v některých aminokyselinových zbytcích a na dusík s kyslíkem, které jsou přítomné v peptidických vazbách [26]. Tyto vlastnosti byly ověřeny v studii Suchého a kol., ve které byly porovnávány mechanické vlastnosti suchých a hydratovaných scaffoldů. Z této studie pak vyplynulo, že suché scaffoldy mají diametrálně odlišné mechanické vlastnosti oproti hydratovaným scaffoldům [27].

Další vlastností kolagenu je jeho hydrotermální nestabilita. Při překročení takzvané teploty smrštění, kdy dochází ke zkrácení kolagenních vláken zhruba o třetinu jejich délky, totiž začíná docházet k denaturaci kolagenu. Teplota, při které dochází k denaturaci, se u různě zpevněných molekul kolagenu může značně lišit [26].

Denaturace kolagenu spočívá ve štěpení intermolekulárních příčných vazeb a intramolekulárních vazeb. K denaturaci pak dochází za působení vyšší teploty případně vlivem některých chemikálií, přičemž produktem tohoto procesu je želatina. Kolagen takto ztrácí některé vlastnosti, ale při delším odstavení kolagenu do prostoru o nižší teplotě dochází k částečné renaturaci [26].

Degradace kolagenu

Zásadní vlastností z hlediska využití kolagenu pro tkáňové inženýrství na výrobu scaffoldů je degradace. Degradace by se dala rozdělit na hydrolytickou degradaci, enzymatickou degradaci a oxidační štěpení. V případě hydrolytické

degradace dochází k hydrolyze příčných kovalentních vazeb, esterových a peptidických vazeb. Při enzymatické degradaci zase nastává štěpení převážně peptidových vazeb. Zatímco k enzymatické degradaci dochází za působení takzvaných kolagenáz, tedy proteáz rozkládajících kolagen [26].

Degradační procesy kolagenu závisí i na dalších faktorech. Na rychlost degradace má vliv především teplota a pH. Enzymatickou degradaci ovlivňuje především teplota, kdy za vyšší teploty dochází k rozpadu sekundární, nikoli primární struktury kolagenu [26].

4.4.3. IZOLACE KOLAGENU

Kolagen bývá běžně pro účely výzkumné a lékařské, ale i pro použití v potravinářství získáván izolací z tkání. Převážně se izoluje z různých tkání zvířat, zejména z kůží. Lze však využít i zbytky tkání po operacích na lidech, případně cílených odběrů tkáně pacienta za účelem provedení autologní transplantace. Existuje celá řada postupů, jak kolagen z tkáně izolovat. Některé postupy jsou poměrně zdlouhavé až v řádu dní [28].

Izolaci kolagenu si můžeme ilustrovat na příkladu postupu popsaném ve studii C. A. Pacaka a kol. (*An Improved Method for the Preparation of Type I Collagen From Skin*) [28].

V první fázi je vzorek očištěn od všech vlasů, chlupů, pojivové tkáně a tuků, je opláchnut v dH₂O (4 °C) a následně rozdělen na dílky o rozměrech 1x1 cm.

V další fázi je třeba zbavit se nekolagenních rozpustných látek v tkáni. Na 5 g vzorku se odměří 30 ml octanu sodného (0,5 M; 4 °C). V tomto roztoku je materiál míchán po dobu 1 minuty rychlostí asi 6 m·s⁻¹. Po této proceduře je z nádoby odstraněna tekutá část. Celý proces je opakován sedmkrát. Na závěr je hmota opět propláchnuta v dH₂O (4 °C) pro odstranění zbytkového octanu sodného.

Poslední fáze je samotná extrakce kolagenu. Materiál je dvakrát promyt v citrátu sodném (2 ml·g⁻¹; 0,075 M) po dobu jedné minuty rychlostí 6 m·s⁻¹. Po propláchnutí se přidá nový citrát sodný o stejné koncentraci a provede se šest homogenizačních cyklů bez nutnosti měnit roztok mezi cykly (1 min; 6 m·s⁻¹).

Roztok citrátu sodného je přemístěn do sběrné trubice a následuje ještě jeden cyklus, i po tomto cyklu je roztok přemístěn do sběrné trubice. Tento roztok je následně odstředován, čímž je kolagen oddělen od ostatních složek (3200 x g; 10 min + 30 min).

4.4.4. POUŽITÍ KOLAGENU

Kolagen je hojně využíván v lékařské praxi, a to zejména kvůli jeho vhodným vlastnostem, a to především biokompatibilitě a resorbovatelnosti. Díky své struktuře je také relativně snadné ho izolovat a dosáhnout jeho vysoké čistoty. Je vhodným nosičem léčiv, ale na druhou stranu jsou tyto materiály na bázi kolagenu velmi náchylné k enzymatické degradaci. I přesto se však jedná o potenciálně významný prostředek medikace [26].

Co se konkrétních příkladů využití týká, lze uvést šicí vlákna dnes již běžně používaná v chirurgii. Dalším uspořádáním kolagenu využitelným v medicíně jsou nahodile uspořádaná vlákna, s jejichž pomocí lze zastavovat krvácení (kryty ran), opravovat poškozené cévy, případně nahrazovat část pokožky. I tyto metody léčby se dnes využívají. Kolagen by taktéž šlo využít v komplexnější struktuře jakožto orgánový implantát, tedy scaffold. Uvažuje se i o využití kolagenu spolu s klasickými implantáty a tím docílení lepších vlastností výsledné protézy. Avšak tyto metody léčby jsou dnes stále předmětem výzkumu a úvah, případně spíše výjimkou v běžných postupech medikace [26].

4.5. VYŠETŘOVÁNÍ DEGRADACE

4.5.1. VÝZNAM POPISU DEGRADACE

Jak již bylo zmíněno dříve, degradace je jeden z faktorů významně ovlivňující vhodnost materiálu pro účely tkáňového inženýrství. A to jak z hlediska rychlosti degradace a tím spojenou změnou mechanických vlastností, tak z hlediska chemického, především vzhledem k odpadním produktům degradace. Z tohoto důvodu je třeba před nasazením potenciálně vhodného materiálu provést řadu testů hodnotících tyto faktory [12].

4.5.2. DEGRADAČNÍ PROSTŘEDÍ

Existuje mnoho způsobů jak zkoumat degradaci materiálů určených pro lékařství. Nejpřesnější degradační prostředí z hlediska napodobení podmínek v lidském těle je samozřejmě tělo samotné, než však může být takový materiál vložen do některého pacienta, musí proběhnout řada jiných testů.

Z „nelidských“ prostředí se tomu lidskému blíží nejvíce prostředí zvířecího těla, takové testy jsou však z etických a finančních důvodů využívány až po provedení řady testů *in vitro*. Existuje pak celá řada různých simulačních kapalin, jenž se k těmto účelům využívají. Cílem těchto kapalin je napodobení podmínek v těle, některé pak napodobují například krevní plazmu.

Mezi takovéto kapaliny se řadí PBS (fosfátový pufovaný fyziologický roztok), HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), MEM (Modified Eagle Medium), SBF (Simulated Body Fluid). Tyto kapaliny jsou založeny primárně na bázi obsahu různých iontů, jenž se vyskytují například v krevní plazmě. Takto je napodobeno z hlediska obsahu iontů tělní prostředí [29].

Využívají se i simulační média na bázi enzymů. Mezi takováto média se řadí různé proteinázy a kolagenázy. Mezi takováto média patří i kolagenáza použitá k simulaci tělního prostředí v této práci. Kolagenázu lze v různých koncentracích rozpouštět v celé řadě roztoků, například v PBS. Kolagenáza jako enzym se vyskytuje přirozeně v lidském těle a jeho účelem je rozkládání kolagenu. Je tak součástí i například procesu remodelace kosti. Kolagenáza může být produkována například fibroblasty (vazivové buňky) či osteoklasty (kostní buňky) [30].

4.5.3. ENZYMATICKÁ DEGRADACE

Enzymatická degradace je degradační proces probíhající v prostředí, jenž obsahuje různé enzymy, jakými jsou například kolagenáza, elastáza, trypsin, lysozym a další. Enzymy jsou látky na bázi bílkovin běžně se vyskytující v těle. Tyto látky pak v zásadě řídí chemické reakce v těle, jedná se totiž o katalyzátory těchto reakcí. Proteázy, esterázy, glykosidázy a fosfatázy jsou pak schopny katalyzovat hydrolitické reakce, které vedou k degradaci některých scaffoldů.

Tato skutečnost může zapříčinit značné odlišnosti v postupu degradace v různých enzymatických prostředích nebo v prostředích o různém obsahu enzymů [13].

Obecně enzymatická degradace probíhá v několika fázích. Nejprve enzym difunduje do materiálu, následně se váže na materiál. Následuje samotná hydrolytická reakce a poslední fází je odvod produktů reakce z místa reakce. Rychlost a rozsah výsledné degradace je ovlivněn průběhem těchto jednotlivých kroků. Rychlost reakce závisí na mnoha faktorech, jakými jsou například teplota, pH, koncentrace enzymu, ale i vliv případných chemických modifikací rozkládaného materiálu (zesíťování materiálu, absorpce proteinů a chemické modifikace samotného materiálu). Nicméně materiály, jež degradují primárně enzymaticky, by měly být z hlediska tkáňového inženýrství velmi výhodné. A to primárně proto, že v zásadě degraduje v odezvě na buněčnou aktivitu, a tím pádem ne v závislosti na čase, ale v závislosti na fázi hojení. Tímto způsobem by mohl být eliminován problém potřeby různé rychlosti degradace v závislosti na rychlosti hojení jednotlivých pacientů [13], [31].

4.5.4. METODY POPISU DEGRADACE

Obecně lze říct, že v případě výzkumu degradace se sledují parametry jako hmotnostní úbytky, množství absorbované vody, molekulární hmotnost (gelová permeační chromatografie, viskozimetrie), krystalinita (DSC-diferenční skenovací kalorimetrie, WAXD-širokoúhlá rentgenová difrakce), morfologie materiálu (světelná mikroskopie, SEM-rastrovací elektronová mikroskopie, AFM- mikroskopie atomárních sil), mechanické vlastnosti (tlakové zkoušky, tahové zkoušky) a v neposlední řadě produkty degradace (HPLC-vysokovýkonná kapalinná chromatografie, UV spektrofotometrie, NMR-nukleární magnetická rezonance, MS - hmotnostní spektroskopie) [13].

Konkrétní metodika výzkumu degradace kolagenu značně závisí nejen na zjišťovaných vlastnostech, ale i na dalších faktorech. Například na požadovaném tvaru zkoumaného materiálu, tedy zda se zkoumá kupříkladu degradaci membrány. Do jisté míry závisí metodika i na očekávaných výsledcích. Pokud čekáme rychlou degradaci, bude kulturační čas kratší, případně pro sledování některých jevů není zapotřebí dlouhodobější kultivace.

Kupříkladu pro vyhodnocení požadovaných parametrů kolagenové membrány využili Lee a kol. vzhledem k charakteru materiálu pro zjišťování mechanických vlastností tahovou zkoušku a pro vyhodnocení struktury analýzu pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) [32].

Na druhou stranu Arpornmaeklong a kol. použili k zjišťování mechanických vlastností tlakové zkoušky, jelikož se jednalo o výzkum trojrozměrných kolagenních struktur. A stejně jako v předchozím případě byla struktura materiálu vyhodnocována pomocí SEM. Mimo jiné pak byla provedena i zkouška bobtnání [33].

Zcela jiný způsob zkoumání degradace využili Huang a Yannas. Mechanické vlastnosti v případě této studie byly vyhodnocovány pomocí zkoušky spočívající v natažení kolagenního vlákna na určité prodloužení a následné měření odporu, který proti tomuto natažení vyvíjí. Avšak tento postup je do značné míry ovlivněn stářím tohoto experimentu (1977) [34].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. MATERIÁLY VZORKŮ A JEJICH VÝROBA

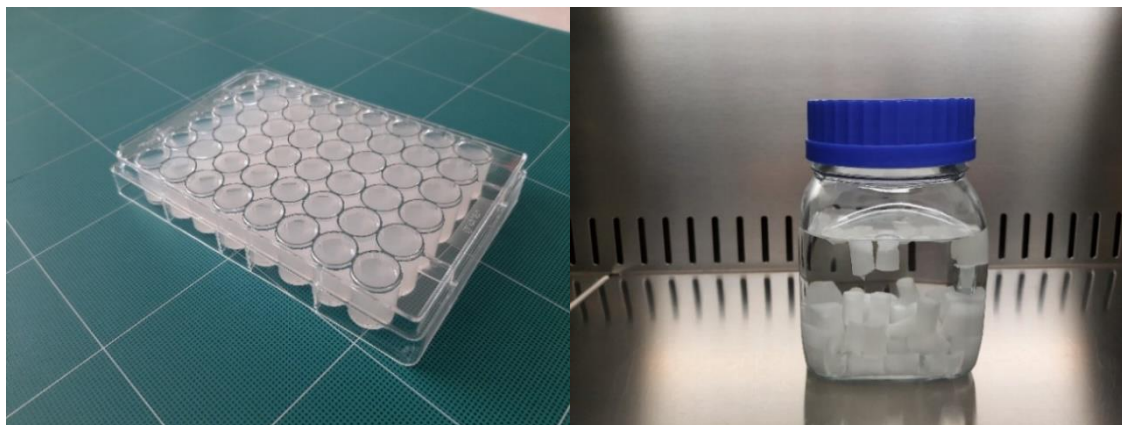
5.1.1. POSTUP VÝROBY VZORKŮ

Kolagenové scaffoldy použité pro tento experiment byly vyrobeny z kolagenu I. typu (VUP Medical, Brno, zdroj telecí kůže). Dodané kolagenové pláty byly rozstříhány na menší kousky a následně vloženy do deionizované vody. Ve vodě došlo k nabobtnání a rozvolnění kolagenu při pokojové teplotě (cca 20 °C). Vzniklá disperze (4 % hmot. kolagenu) byla dále homogenizována vysokootáčkovým homogenizátorem (10 000 ot/min; 10 min.). Následně je disperze ponechána zhruba hodinu v klidu při pokojové teplotě. Tato disperze byla nadávkována do válcových forem s průměrem 12 mm (48-jamkový kultivační plast, CELLSTAR, Cat.-No. 677 180, Greiner Bio-One GmbH, Rakousko). Takovýto kultivační plast je zobrazen na **Obrázku 5**. V další fázi disperze v kultivačním plastu prošla procesem lyofilizace, čímž bylo dosaženo opětovného přechodu disperze do tuhého skupenství a taktéž byla tímto postupem vytvořena pórovitá struktura vzorků. Lyofilizace sestávala z ochlazení na - 80 °C (suchý led, 3 hod.) a následného sušení provedeném na přístroji BenchTop Pro 8Z, VirTis, USA.

Protože při rozpouštění kolagenu došlo k rozvolnění vazeb, je nutné scaffoldy opět zesíťovat a tak zvýšit stabilitu kolagenu. K tomuto účelu byly jednotlivé scaffoldy ponořeny do směsi 95 % hmot. lihu (Penta, ČR), EDC (N- (3- dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridu) a NHS (N-hydroxysukcinimidu) (Sigma-Aldrich, USA). Směs obsahovala na 1 g kolagenu 142 ml lihu, 0,625 g EDC a 0,156 g NHS. Vzorky v síťovacím médiu jsou zobrazeny na **Obrázku 5**. Po zesíťování následuje dvakrát promytí 0,1 M hydrogen fosforečnanem disodným (Penta, ČR) (alespoň 45 minut) a promytí v destilované vodě (30 minut). Vzorky jsou následně zamraženy na -30 °C a opětovně lyofilizovány.

Posledním krokem přípravy vzorků pak bylo nařezání na rozměry potřebné pro mechanické zkoušky (průměr 11 mm, výška 13 mm) a stanovení hmotnostních úbytků (průměr 11mm, výška 5 mm) a následně jejich sterilizace.

Sterilizace byla zařazena z důvodu zamýšleného použití tohoto materiálu jakožto zdravotnického prostředku. Proto byla provedena sterilizace tak, jak by byla provedena při reálném využití scaffoldů jakožto lékařského materiálu. Sterilizace byla provedena gama zářením při standardní dávce 25 kGy (Bioster, ČR).



OBRÁZEK 5 Vlevo kultivační plast s nadávkovanou disperzí kolagenu, vpravo snímek vzorků v síťovacím médiu

5.2. PRŮBĚH EXPERIMENTU

5.2.1. *IN VIVO*

In vivo kontrolní vzorky byly implantovány do peritonea pokusného zvířete. V tomto případě se jednalo o prasce (*Sus scrofa domesticus*, 25 kg, schválení ID MSMT-33799/2021-4). Vzorky byly umístěny do trubiček vytvořených z kýlní síťky, která byla do tohoto tvaru sešita pomocí chirurgické nitě. V každém takovém válečku bylo umístěno pět vzorků kolagenních scaffoldů. Tyto vzorky byly zároveň navlečeny na chirurgickou nit. Tato opatření byla provedena za účelem zajištění dostatečného přichycení vzorků na stanoveném místě a zamezení jejich případného poškození či ztráty. Váleček se vzorky připravený k implantaci je pak zobrazen na **Obrázku 6**.

Před implantací do pokusných zvířat, která byla provedena u všech subjektů v jeden den, byly vzorky hydratovány v FYZ.

Do každého prasete pak byly umístěny dva takovéto válečky, tak aby se každý nacházel na jednom boku subjektu. Při tvorbě a umístování válečků bylo dodržováno to, že v každém válečku bylo pět vzorků buď na mechanické testy, nebo pět na hmotnostní úbytky, aby nedošlo k jejich záměně. K vyloučení vlivu

jednotlivých subjektů pak byla do každého pokusného zvířete umístěna jedna skupina určená k mechanickým zkouškám a jedna určená na hmotnostní úbytky.

Po explantaci byly tyto vzorky očištěny od veškerých tkání. Vzorky byly následně vloženy do fyziologického roztoku a v této podobě co nejrychleji transportovány na pracoviště, kde došlo k co nejrychlejšímu zahájení mechanických testů. Vzorky pro stanovení hmotnostních úbytků a související analýzy byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před samotným hodnocením lyofilizovány.



OBRÁZEK 6 Vlevo váleček s pěti vzorky těsně před implantací do pokusného zvířete, vpravo snímek z implantace vzorku do peritonea pokusného subjektu (na snímku je již jeden z dvojice válečků umístěn a přišit k vnitřní straně peritonea)

5.2.2. *IN VITRO*

V případě *in vitro* kultivovaných vzorků, byly tyto vzorky vloženy do nádobek s médiem a kultivovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 21, 14, 7 a 1 dne. Zvlášť byly umístěny vzorky určené pro zjišťování hmotnostních úbytků. Tato opatření měla zajistit správné přiřazení hmotnosti před kultivací ke správnému vzorku. Doba ani podmínky kultivace se jinak nelišily.

V tomto případě byla kultivačním médiem kolagenáza rozpuštěná v PBS, a to ve třech koncentracích. Nejnižší koncentrace $0,005\text{ U/ml}$, střední koncentrace $0,0125\text{ U/ml}$ a nejvyšší koncentrace $0,025\text{ U/ml}$. Tyto konkrétní koncentrace byly vybrány na základě předpokládaných koncentrací kolagenázy v okolí implantovaných scaffoldů vlivem činnosti buněk. Kultivační médium bylo zároveň v průběhu kultivace obměňováno (kompletní výměna média každý třetí den) s cílem udržet relativně stabilní koncentraci aktivních látek v médiu, protože tyto látky se s časem spotřebovávají právě na rozklad kolagenu.



OBRÁZEK 7 Snímek kultivačních nádob se všemi koncentracemi kolagenázy určené ke kultivaci po dobu sedmi dnů (horní menší nádoby naplněny vzorky určenými pro testy hmotnostních úbytků - navlečeny na vlasec)

5.3. ZNAČENÍ A POČTY VZORKŮ

Pro přehlednost bylo určeno označování jednotlivých vzorků a skupin vzorků. Byly použity tři koncentrace kolagenázy, ty byly v závislosti na koncentraci označovány jako KMIN pro nejnižší koncentraci, KMID pro střední koncentraci a KMAX pro nejvyšší koncentraci kolagenázy. Vzorky kultivované *in vivo* jsou označovány jako IN VIVO. V případě pouze hydratovaného stavu (výchozí stav pro mechanické zkoušky) nebyla využita kolagenáza, ale samotné PBS za předpokladu, že vliv kolagenázy během hydratace (20 minut) je zanedbatelný.

Vzorky byly kultivovány po různou dobu, to je ve značení vzorků zohledněno pomocí první číslice. Nula značí hydratovaný stav, tedy vzorky hydratované pouze hodinu. 1, 7, 14 a 21 pak označují počet dní, po který byly vzorky kultivovány. Viz Tabulka 1.

Druhá pořadová číslice pak charakterizuje konkrétní vzorek, tedy jeho pořadové číslo v rámci dané testovací skupiny.

Odlišeny jsou i vzorky, jež byly testovány na hmotnostní úbytky. Vzorky testované na hmotnostní úbytky mají ve svém označení kromě už zmíněných sad znaků ještě (M). Vzorky určené na FTIR analýzu vyhodnocování oblasti 1660 cm^{-1} jsou označeny (1660) a ty určené na porovnání oblastí 1660 cm^{-1} a 1690 cm^{-1} jsou označeny (1660/90).

TABULKA 1 Příklady označování jednotlivých vzorků

5. vzorek v kolagenáze s maximální koncentrací, kultivovaný po dobu 7 dní	KMAX_7_5
8. vzorek v kolagenáze s střední koncentrací, kultivovaný 21 dní, hmotnostní úbytky	KMID_21_8(M)
Vzorek v kolagenáze s minimální koncentrací, kultivovaný 1 den	KMIN_1_1
5. vzorek v PBS, hydratovaný stav	PBS_0_5

Celkově bylo pro účely této práce použito 136 vzorků na vyhodnocení mechanických vlastností a 108 vzorků na vyhodnocení hmotnostních úbytků (tyto vzorky byly taktéž využity pro SEM, FTIR). Konkrétní počty vzorků v jednotlivých skupinách jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

TABULKA 2 Počty vzorků ve skupinách

Název skupiny	Počet vzorků	Název skupiny	Počet vzorků	Název skupiny	Počet vzorků
KMIN_1	7	KMID_1	7	KMAX_1	7
KMIN_7	9	KMID_7	9	KMAX_7	8
KMIN_14	9	KMID_14	9	KMAX_14	9
KMIN_21	9	KMID_21	9	KMAX_21	9
IN VIVO_7	7	IN VIVO_14	10	IN VIVO_21	9
PBS_0	9	KMIN_1(M)	7	KMID_1(M)	5
KMAX_1(M)	6	KMIN_7(M)	7	KMID_7(M)	7
KMAX_7(M)	6	KMIN_14(M)	6	KMID_14(M)	7
KMAX_14(M)	7	KMIN_21(M)	7	KMID_21(M)	6
KMAX_21(M)	7	IN VIVO_7(M)	11	IN VIVO_14(M)	11
IN VIVO_21(M)	8	ORIG(1660)	10	KMIN(1660)	10
KMID(1660)	10	KMAX(1660)	10	IN VIVO(1660)	10
ORIG(1660/90)	20	IN VIVO(1660/90)	20		

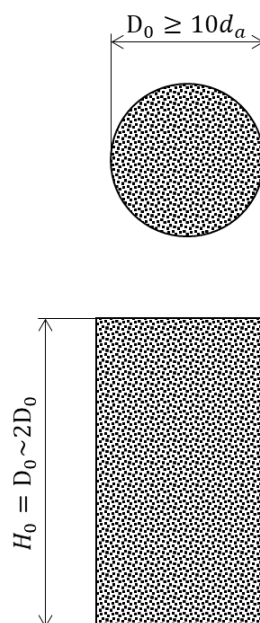
5.4. MECHANICKÉ VLASTNOSTI

Pro určování mechanických vlastností zkoumaného materiálu jsme vycházeli z normy ČSN ISO 13314 s názvem *Mechanické zkoušení kovů – zkoušení*

tvářitelnosti – Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem [35]. Zkoušky byly provedeny na zařízení MS Mini Bionix, MTS, Minnesota, USA.

5.4.1. ZKUŠEBNÍ VZOREK

V případě tohoto typu zkoušky byly využity zkušební vzorky válcového tvaru. Všechny prostorové rozměry zkušební vzorku pak musí být alespoň desetinásobkem průměrné velikosti póru. Minimální však 10 mm. Poměr výšky vzorku k charakteristickému rozměru průřezu, by se pak měl pohybovat v rozmezí



OBRÁZEK 8 Geometrické parametry zkušební vzorku dle normy ČSN ISO 13314 1 až 2 [35].

5.4.2. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

Zkouška se musí provádět v teplotním rozmezí 10 °C až 35 °C. Rychlost posuvu je taktéž blíže specifikována. Rychlost musí být konstantní a její velikost na počátku zkoušky by se měla pohybovat mezi $10^{-3} s^{-1}$ a $10^{-2} s^{-1}$ [35].

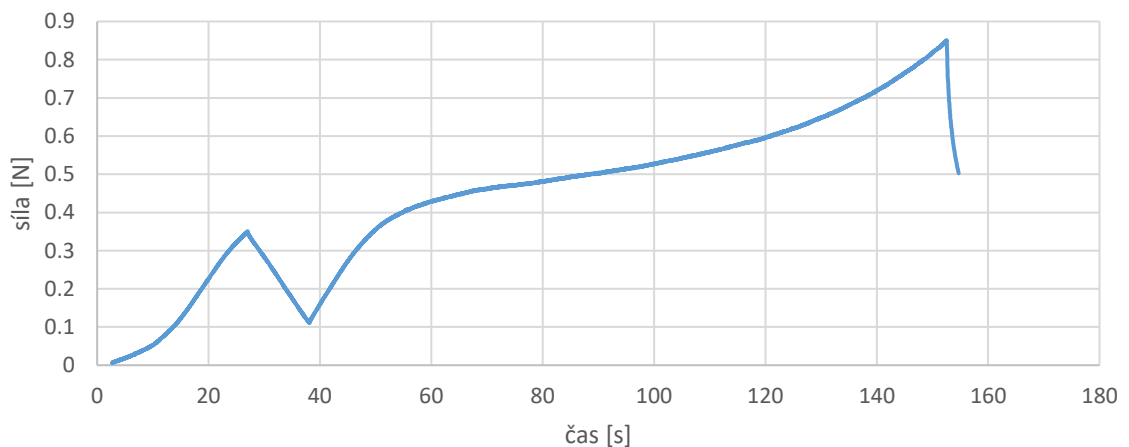
V prvním kroku je třeba určit rozměry daného zkušební vzorku s přesností alespoň na 0,1 mm. U vzorku se měří výška i průměr válce minimálně na třech různých místech. Z těchto údajů je určena počáteční plocha průřezu vzorku [35].

Následuje odhad stabilní hladiny napětí označovaná jako σ_{pl} . Díky tomuto odhadu následuje určení počátku hystereze, který odpovídá 70 % stabilní hladiny napětí. Určuje se taky bod zvratu, který odpovídá 20 % stabilní hladiny napětí.

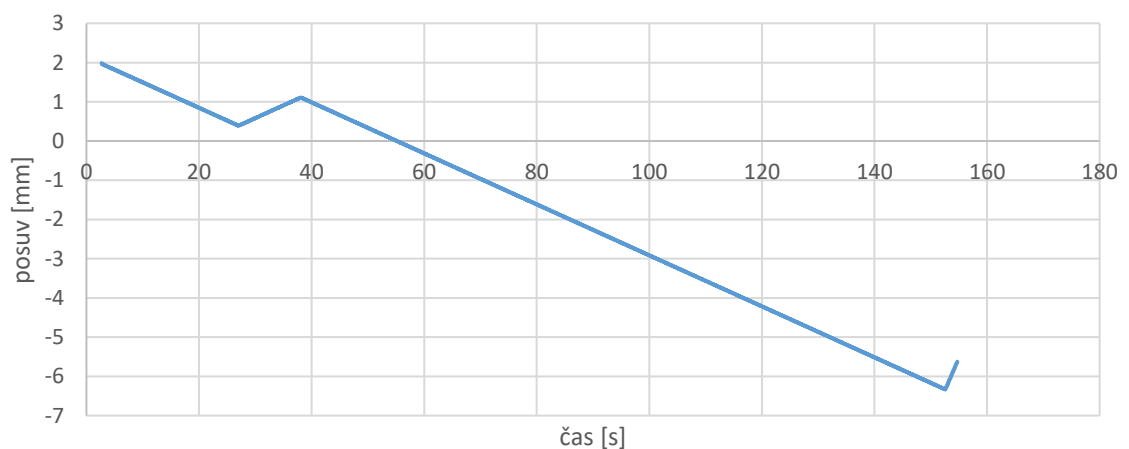
Před vlastním zatěžováním je potřeba určit maximální zátěžnou sílu, kterou chceme vzorek zatěžovat [35].

Vzorek je dále umístěn mezi desky zatěžovacího stroje a to tak, aby se jeho osa shodovala s osou horní desky stroje. Dalším krokem je zatížení vzorku nejprve rostoucí silou, následovanou poklesem, po kterém zátěžná síla roste až do maximální zátěžné síly. Díky tomuto zatížení lze na diagramu závislosti napětí na poměrném prodloužení pozorovat hysterezní smyčku [35].

Typický diagram závislosti síly na čase, tedy schéma zatěžování je znázorněn na **Obrázku 9**. V první části diagramu je patrný růst síly, následuje pokles, tedy odlehčení testovaného vzorku a další nárůst síly až do požadované maximální úrovně následované odlehčením. Nejedná se o přímkový graf, protože zatěžování je v tomto případě řízeno pomocí posuvu čelistí, aby byla splněna podmínka konstantní rychlosti deformace. Konkrétní průběh je zobrazen na **Obrázku 10**.



OBRÁZEK 9 Typický průběh zatěžování charakterizovaný závislostí síla - čas



OBRÁZEK 10 Průběh závislosti posuv - čas při zatěžování tlakem

5.4.3. VYHODNOCENÍ ZKOUŠKY

Na základě naměřených dat závislosti posunu čelistí, e [mm], na síle, F [N], vyhodnocujeme smluvní napětí v tlaku, σ [MPa], poměrné stlačení, ε [-], stabilní hladinu napětí, σ_{pl} [MPa], elastický gradient, E , absorbovanou energii, W $\left[\frac{MJ}{m^3}\right]$ a účinnost absorbování energie, W_e [%].

Diagram smluvní napětí - poměrné stlačení

Prvním krokem je převedení závislosti síly na posuvu na závislost smluvního napětí na poměrném stlačení. Přičemž na vodorovnou osu se vynáší zpravidla poměrné stlačení a na osu svislou se vynáší smluvní napětí. Tento převod naměřených dat se provádí primárně proto, aby byly výsledky vzájemně porovnatelné s ohledem na rozdílné rozměry jednotlivých vzorků [35].

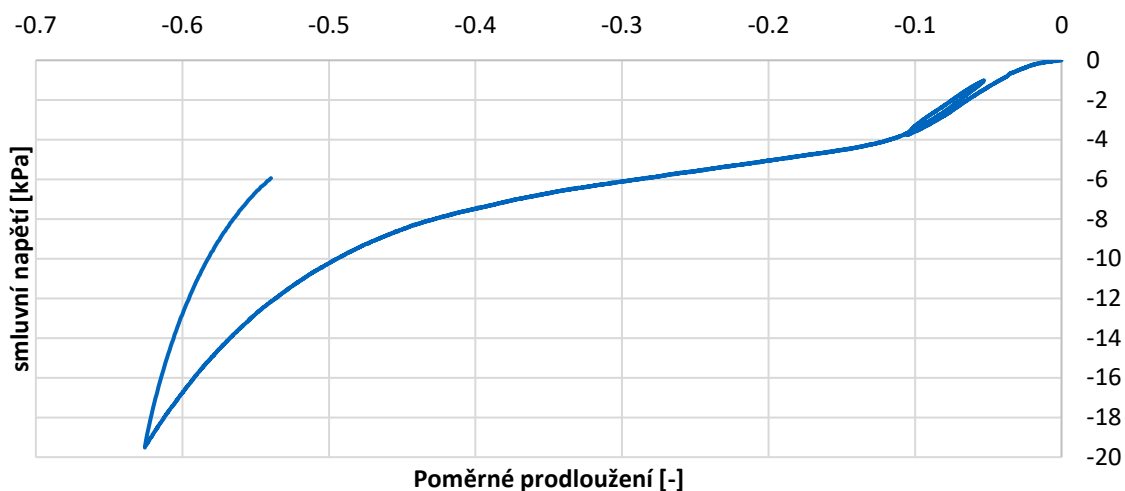
Poměrné stlačení odpovídá podílu změny výšky čelistí a výšky daného vzorku. Změna výšky čelistí je rovna rozdílu stlačení z původní výšky vzorku a původní výšky vzorku, tedy $\Delta e = h - h_0$.

$$\varepsilon = \frac{\Delta e}{h_0} [-] \quad (1)$$

Smluvní napětí se stanoví jako podíl působící síly a referenční, tedy počáteční, plochy průřezu vzorku ve směru kolmém na působící sílu, a to dle vztahu:

$$\sigma = \frac{F}{S_0} [MPa] \quad (2)$$

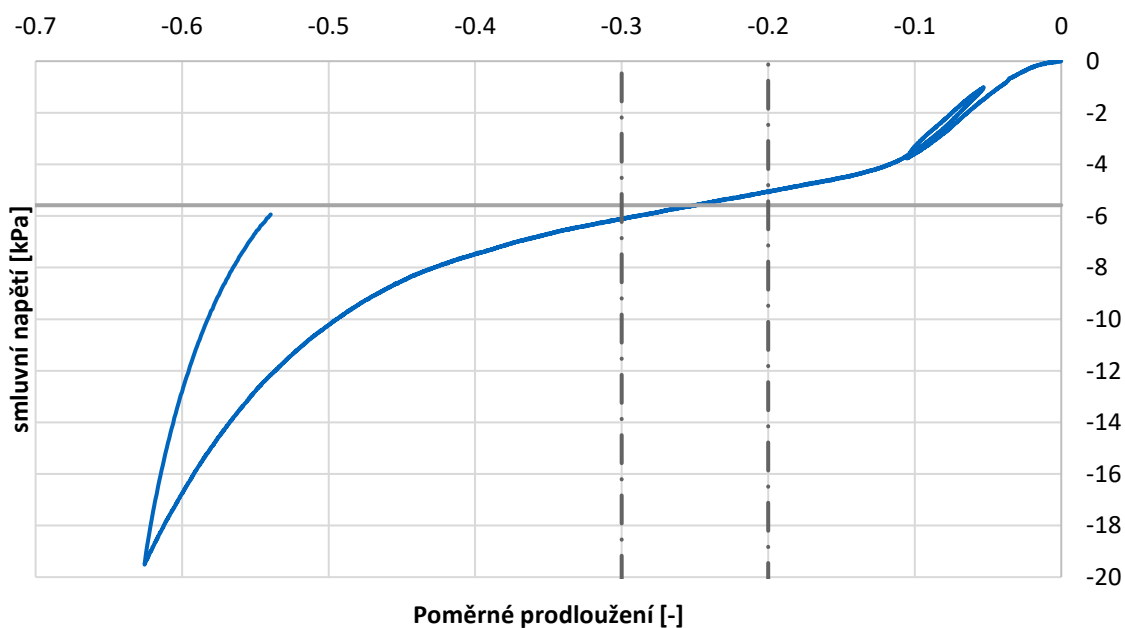
Typická křivka smluvní napětí - poměrné stlačení pro námi testované kolagenní scaffoldy je zobrazena na **Obrázku 11**. Na obrázku si lze všimnout již dříve zmíněné hysterezní smyčky v pravé části grafu.



OBRÁZEK 11 Typický graf závislosti smluvního napětí na poměrném prodloužení pro testované kolagenní vzorky (dle ČSN ISO 13314)

Stabilní hladina napětí

Dalším parametrem určovaným touto zkouškou je stabilní hladina napětí. Určí se jako aritmetický průměr naměřených smluvních napětí v intervalu poměrného stlačení -0,2 až -0,3. Tato hodnota pak reprezentuje smluvní mez pevnosti v tlaku daného materiálu [35].

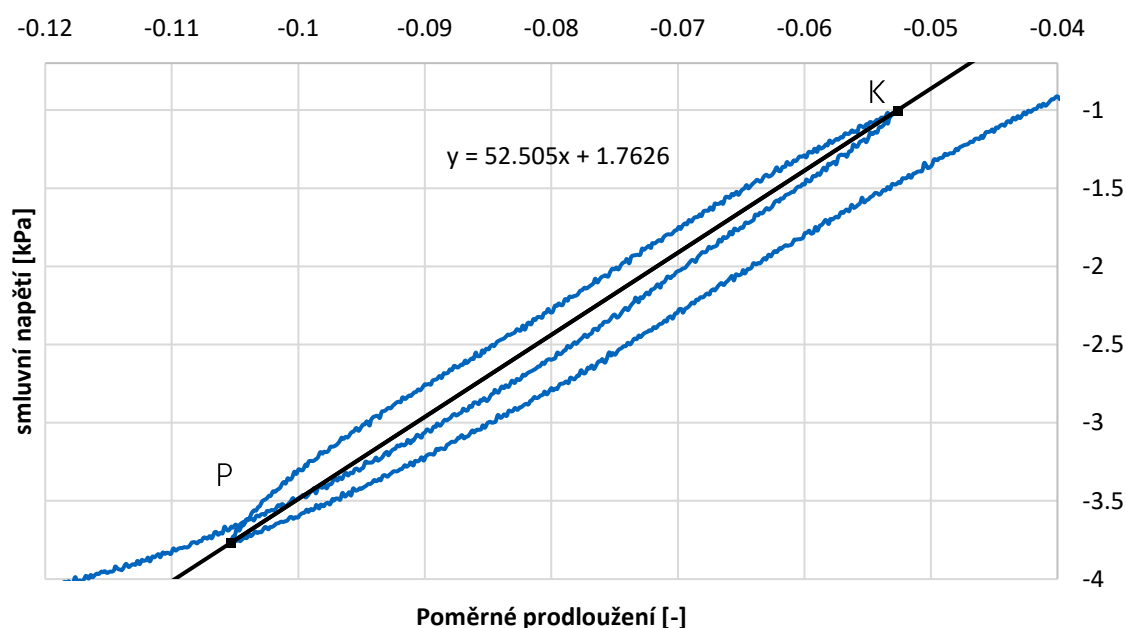


OBRÁZEK 12 Graf smluvního napětí v závislosti na poměrném prodloužení s vyznačeným vyhodnocení stabilní hladiny napětí

Elastický gradient

Elastický gradient reprezentuje tuhost závislou na porozitě vzorku. Jeho hodnota se však v průběhu deformace mění, proto se nejedná o obecnou materiálovou charakteristiku, jakou je kupříkladu Youngův modul, ale veličinu charakterizující nějakou konkrétní konstalaci materiálu. Právě zmíněnému Youngovu modulu by asi elastický gradient bylo možno přirovnat, protože vyjadřuje defacto schopnost materiálu se pružně deformovat [35].

Elastický gradient se určuje právě z hysterezní smyčky zobrazené v detailu na **Obrázku 13**. V grafu se vyznačí nejprve bod, který odpovídá začátku odlehčování, v **Obrázku 13** vyznačen jako bod P. Následně je nalezen bod K odpovídající vrcholu hysterezní smyčky. Těmito body je pak proložena přímka, jejíž rovnice odpovídá tvaru $y = a \cdot x + b$. Elastický gradient je definován jako směrnice této přímky, tedy odpovídá hodnotě a [35].



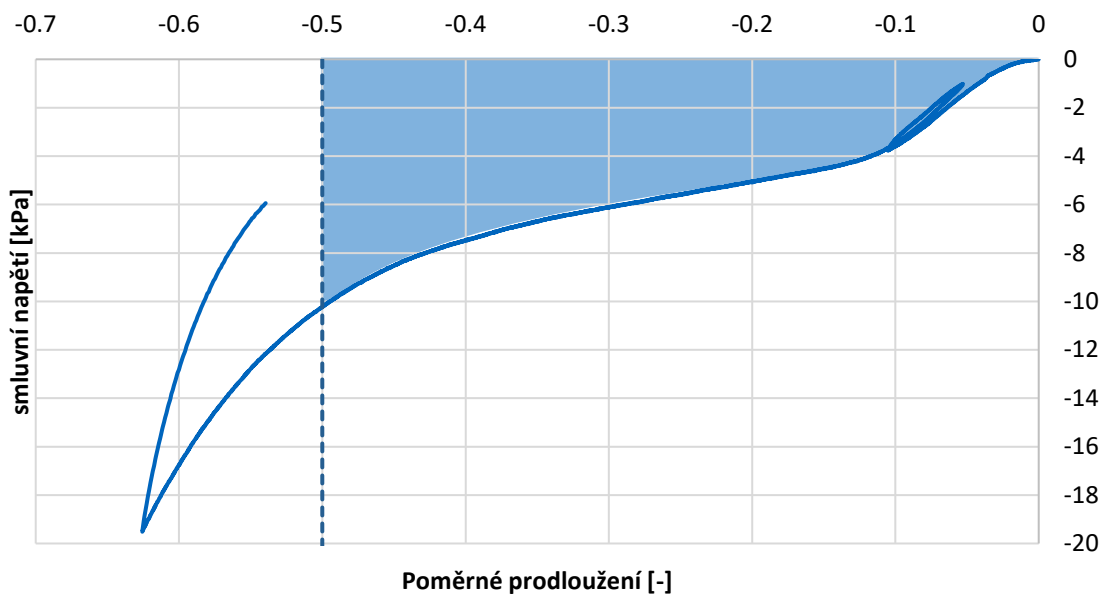
OBRÁZEK 13 Hysterezní smyčka a přímka pro určení elastického gradientu (vzorek MEM_0_8)

Určení absorbované energie

Dalším určovaným parametrem je absorbovaná energie. Tento parametr byl vyhodnocován v rozmezí od 0 do -0,5 poměrného stlačení. Je definován

jako plocha pod křivkou, respektive plocha omezená křivkou zatěžování smluvní napětí - poměrná deformace a vodorovnou osou. Plocha je vyznačena na **Obrázku 14**. Obsah této oblasti jsme zjišťovali pomocí aproximace, a to tak že byla celková plocha nahrazena vždy mezi dvěma sousedními naměřenými hodnotami lichoběžníkem. Výsledný obsah byl vypočten jako součet těchto lichoběžníků. Obecně je však tato veličina definována následujícím vztahem [35].

$$W = \frac{1}{100} \int_0^{\varepsilon_{50}} \sigma \cdot d\varepsilon \left[\frac{MJ}{m^3} \right] \quad (3)$$



OBRÁZEK 14 Graf závislosti smluvní napětí - poměrná deformace s vyznačenou oblastí reprezentující absorbovanou energii

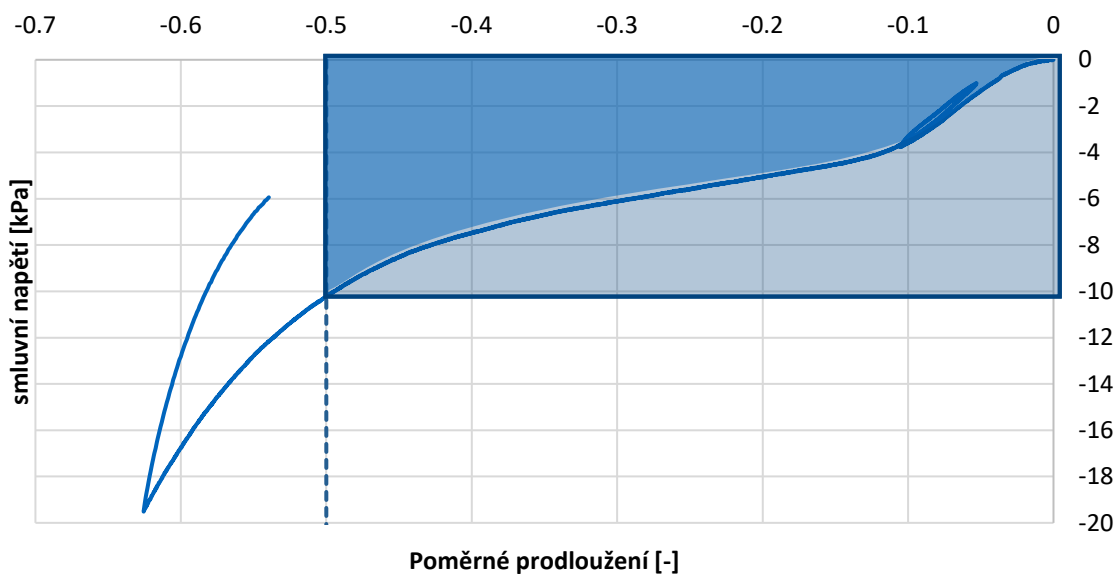
Účinnost absorbování energie

Posledním určovaným parametrem byla účinnost absorbování energie. Tato veličina je definována jako poměr absorbované energie ku ploše obdélníku opsaného závislosti napětí na poměrném prodloužení ve vyhodnocovaném rozsahu. Reprezentace účinnosti absorpce energie je vyznačeno na **Obrázku 15**.

Definována je pak vztahem:

$$W_e = \frac{W}{\sigma_{max} \cdot \varepsilon_{50}} [\%] \quad (4)$$

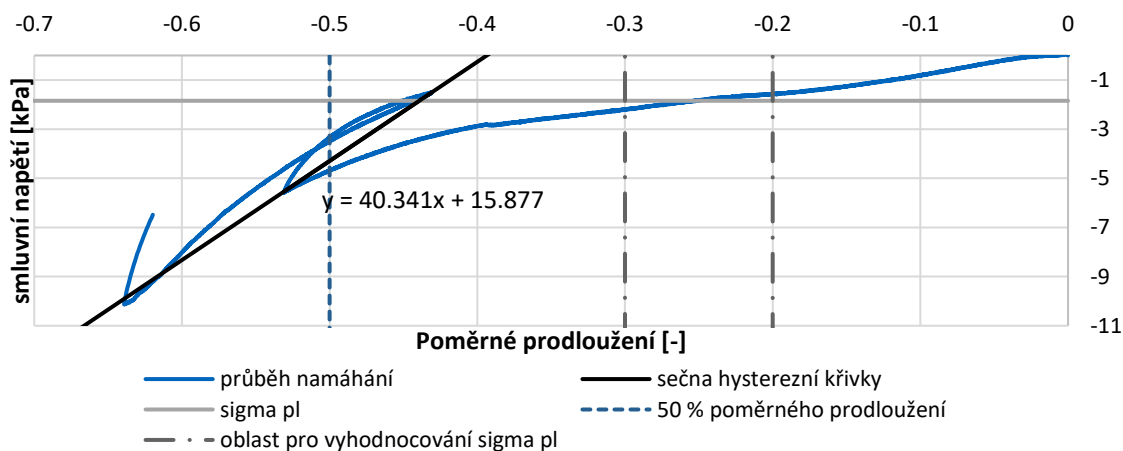
Tato veličina reprezentuje schopnost materiálu absorbovat energii, respektive jeho potenciál absorbovat energii.



OBRÁZEK 15 Graf závislosti smluvní napětí - poměrná deformace s vyznačenými oblastmi reprezentující účinnost absorpce energie

5.4.4. VYŘAZENÁ DATA

Některé vzorky musely být vyřazeny z vyhodnocení některé vlastnosti. Jednalo se primárně o vyhodnocení elastického gradientu. Vyřazeny byly vzorky, u nichž se pravděpodobně nepodařilo správně předem odhadnout velikost stabilní hladiny napětí, na jejímž základě probíhá tlaková zkouška. U takových vzorků došlo k posunu hysterezní smyčky. Vyhodnocený elastický gradient z takovéto hysterezní smyčky pak nemá dostatečnou vypovídající hodnotu ve srovnání s korektně získanými hodnotami elastického gradientu. Příklad vzorku, u kterého k tomuto jevu došlo, je uveden na **Obrázku 16**.



OBRÁZEK 16 Příklad vzorku vyřazeného z vyhodnocení elastického gradientu

5.5. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY

Vyhodnocovány byly také hmotnostní úbytky jednotlivých skupin scaffoldů po vystavení kultivačním médiím. Hmotnostní úbytky byly vyhodnocovány u skupin kultivovaných 1, 7, 14 a 21 dní. Vzorky určené na hmotnostní úbytky byly nejprve zváženy (m_0) a následně pro zachování přehledu o hmotnostech jednotlivých vzorků před kultivací navlečeny na nit. Po uběhnutí kultivačního času byly vzorky vyjmuty z média, propláchnuty deionizovanou vodou a následně lyofilizovány (zmražení na -30 °C, sušení 5 hodin). Po tomto procesu byly vzorky opět zváženy (m_t) a výsledná hmotnostní ztráta byla vypočtena dle vztahu (5) [36].

$$\Delta m = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \quad (5)$$

5.6. DALŠÍ VYHODNOCOVANÁ DATA SEM (rastrovací elektronová mikroskopie)

Vzorky byly podrobeny taktéž SEM analýze za účelem zjištění strukturálních rozdílů v jednotlivých skupinách vzorků. Na základě snímků ze SEM se bude vyhodnocovat výrazná změna struktury materiálu případně usazený materiál. Jedná se ovšem pouze o optické vyhodnocení obrazového materiálu získaného pomocí SEM.

Pro SEM analýzu byly použity vzorky vystavené médiu po dobu 21 dní, abychom tak mohli zhodnotit pozorovatelný vliv média. Vzorky byly před samotnou SEM analýzou vysušeny pomocí lyofilizace.

Pro SEM byly vzorky řezu jednotlivými scaffoldy pokryty v atmosféře Ar vrstvou Pt na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o., ČR). Vzhledem k větší topografii některých řezů byla zvolena tloušťka vrstvy Pt 15nm. SEM snímky byly pořízeny v režimu vysokého vakua na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, USA), zobrazení na ETD detektoru (Everhalt-Thorney detektor) v sekundárních elektronech za použití standard use case, ve zvětšení 100x – 10 000x. Náhledy celých řezů byly nasnímány po částech a následně zkompletovány v programu Maps 3.13. (ThermoFisher Scientific, USA).

Infračervená spektroskopie (FTIR)

Za účelem provedení analýzy chemického složení kultivovaných vzorků, objasnění toho, co se v těchto vzorcích v průběhu kultivace usazuje, a k analýze strukturálních změn probíhajících v kolagenu, byla provedena infračervená spektroskopie. Infračervená spektroskopie (FTIR) byla provedena na vzorcích kultivovaných po dobu 21 dní za účelem maximalizace efektu kultivačního média.

Infračervené spektrum bylo měřeno za pomoci spektrometru iS50 (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, WI, USA) v rozsahu 4000 až 400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} . V průměru bylo provedeno 16 skenů pomocí techniky ATR. Spektrální dekonvoluce amidového pásma I byla provedena v programu OMNIC 7. Počáteční parametry pro přizpůsobení křivky (číselná pásma a jejich pozice) byly předem určeny pomocí sekundární derivační metody a Fourierovy sebedekonvoluce [37].

5.7. STATISTICKÁ ANALÝZA

Pro interpretaci naměřených dat je nutné provést statistickou analýzu a na základě principů statistiky rozhodnout o platnosti, respektive neplatnosti nulové hypotézy na úrovni celé populace.

Obecně je prvním krokem statistické analýzy určení nulové a alternativní hypotézy. Nulová hypotéza (H_0) je tvrzení týkající se některého z parametrů základního souboru, a to takové, že rozdíl těchto parametrů není statisticky signifikantní. Alternativní hypotéza (H_1) je tvrzení o tomtéž parametru základního souboru a vyjadřuje statisticky signifikantní rozdíl. Tato hypotéza je považována za přijatou za předpokladu, že se nepodaří dostatečně potvrdit platnost nulové hypotézy.

Dalším podstatným krokem je stanovení vhodných testů statistické analýzy, pomocí kterých bude rozhodováno o těchto hypotézách. Výběr vhodných testů závisí do značné míry na charakteru dat a jejich vlastnostech (náhodnost výběru, nezávislost pozorovaných náhodných veličin, normalita, počet porovnávaných datových řad, shodnost rozptylů atd.). Na základě těchto vlastností se vybírají statistické testy vhodné pro pozorovaná data, a to buď parametrické, nebo neparametrické testy. Parametrický test je test, pro jehož provedení

musí být testovaný soubor z nějakého specifického rozložení pravděpodobnosti (nejčastěji normálního), případně musí mít nějaké jiné blíže specifikované parametry. V případě neparametrických testů tyto předpoklady o rozložení pravděpodobnosti nemusí být splněny [38].

Pro vyhodnocení dat pomocí statistické analýzy je nutné stanovit hladinu významnosti testu (α). Tedy jak přísně budou vyhodnocovaná data posuzována z hlediska přijetí či nepřijetí nulové hypotézy. Hladina významnosti testu se obvykle volí 0,05 nebo 0,01. Volená hladina významnosti testu je zároveň pravděpodobností vzniku chyby prvního druhu. Chyba prvního druhu znamená zamítnutí platné nulové hypotézy. Opakem je do jisté míry chyba druhého druhu, tedy nezamítnutí neplatné nulové hypotézy. Chyba druhého druhu souvisí s takzvanou silou testu. Síla testu je doplněk pravděpodobnosti chyby druhého druhu do jedničky a určuje pravděpodobnost, s jakou pomocí testu objevíme neplatnost nulové hypotézy. Pravděpodobnost chyby druhého druhu (β) dopředu zpravidla neznáme, její velikost nicméně klesá s narůstajícím počtem pozorování (opakování) a roste s klesající hladinou významnosti testu [38].

5.7.1. STATISTICKÁ ANALÝZA NAMĚŘENÝCH DAT

Pro vyhodnocení dat naměřených pomocí výše popsanych metod bylo postupováno následujícím způsobem. Nulová a alternativní hypotéza je popsána v kapitole cíle a hypotézy. K vyhotovení testů byl využit program Real Statistics (Real Statistics Resource Pack software (Release 7.6). Copyright (2013 – 2021) Charles Zaiontz. www.real-statistics.com) a program JASP (JASP Team (2022). JASP (Version 0.16.2)).

Rozložení pravděpodobnosti (Shapiro–Wilkův test)

Pro výběr vhodného testu byla provedena grafická analýza normality datových souborů pomocí Q-Q grafu a Shapiro–Wilkův testu.

Při sestavení Q-Q grafu jsou na osy vynášeny kvantily očekávaného normálního rozložení a na druhou osu kvantily zkoumaného souboru. Pokud je tento soubor z normálního rozložení, budou všechny jeho body ležet na přímce znázorňující příslušné normální rozdělení [39].

Shapiro–Wilkův test normality je jeden z nejsilnějších testů normality rozložení pravděpodobnosti náhodné veličiny. Testová statistika se pak počítá dle vztahu (6) [40], [41].

$$W = \frac{[\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}]^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

Kde $a_{(i)}$ je vyjádřeno vztahem (7), $x_{(i)}$ je i -té pozorování testovaného souboru, jehož data jsou seřazena vzestupně, a \bar{x} je aritmetický průměr. Test je pak zpravidla vyhodnocován na základě porovnání testové statistiky s tabelovanou kritickou hodnotou W_k [40], [42], [41].

$$a_i = \Phi^{-1}\left(\frac{8i - 3}{8n + 2}\right) \quad (7)$$

Kde Φ je kumulativní distribuční funkce standardního normálního rozložení pravděpodobnosti [41], [43].

U některých datových sad se nepodařilo s dostatečnou spolehlivostí prokázat normální rozložení pravděpodobnosti. Proto byl pro analýzu těchto dat zvolen Mann – Whitneyův U test (pořadový test, bude popsán dále). Data, u nichž byla prokázána normalita, byla následně podrobena F-testu za účelem ohodnocení schody rozptylů. Na základě výsledků F-testu byl následně zvolen T-test pro dva nezávislé soubory dat se stejnými případně různými rozptyly (testové statistiky budou blíže představeny níže).

Nezávislost dat

Na základě charakteru experimentu je nezávislost dat předpokládána automaticky. Nejedná se totiž o experiment, u něhož by bylo riziko, že pořadí vzorku ovlivní výsledné hodnoty měřených parametrů. Předpoklad o nezávislosti dat navíc podporuje fakt, že použitá měřící zařízení jsou pravidelně kalibrována.

F-test

F-test je parametrický test testující nulovou hypotézu o shodnosti rozptylů testovaných souborů dat. Testovaná data pak musí vycházet z Gaussova normálního rozdělení s parametry μ (střední hodnota) a σ^2 (rozptyl) [44].

Pro stanovení testové statistiky jsou nejprve vypočteny výběrové rozptyly (s_1^2, s_2^2) dle vztahu (8), kde x_i jsou jednotlivá data v daném datovém souboru a n_j je počet pozorování v tomto datovém souboru [44].

$$s_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} \left(x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^{n_j} x_i)^2}{n_j} \right)}{n_j - 1} \quad j = 1; 2 \quad (8)$$

Samotné kritérium je pak vypočteno na základě hodnot rozptylů dle vztahu (9) [44].

$$F = \frac{\max\{s_1^2; s_2^2\}}{\min\{s_1^2; s_2^2\}} \quad (9)$$

Následuje výpočet stupňů volnosti obou sad dat podle vztahu (10), na základě kterých je pak ve statistických tabulkách vyhledána kritická hodnota testovacího kritéria (F_{krit}) [44].

$$v_j = n_j - 1 \quad j = 1; 2 \quad (10)$$

T-test

T-test je stejně jako F-test parametrický test předpokládající, že testované soubory pochází z Gaussova normálního rozložení s parametry μ (střední hodnota) a σ^2 (rozptyl). Jedná se o test ověřující nulovou hypotézu o shodnosti středních hodnot [45].

V případě tohoto testu je nejprve nutné rozhodnout o shodnosti, nebo odlišnosti rozptylů testovaných souborů dat, protože existuje více variant T- testů (jednovýběrový, dvouvýběrový párový, dvouvýběrový nepárový se shodnými rozptyly, dvouvýběrový nepárový s různými rozptyly). Proto byl předřazen F-test na základě jehož výsledku byl volen druh T-testu pro vyhodnocení dat.

Dvouvýběrový nepárový T-test se shodnými rozptyly se pak vypočte dle vztahu (11) v případě, že počty dat v jednotlivých skupinách jsou různé. Za předpokladu, že by každá skupina obsahovala stejný počet dat, by bylo možné použít zjednodušenou variantu (12). Ve vzorcích \bar{x}_i vyjadřuje aritmetický průměr

odpovídajícího souboru dat, s_i^2 vyjadřuje rozptyl odpovídajícího souboru dat a n_i je počet pozorování v odpovídajícím datovém souboru [45].

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}} \quad (11)$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}} \quad (12)$$

Stupně volnosti dvouvýběrového T-testu pro data se shodným rozptylem, na základě kterých je pak v tabulce dohledána kritická hodnota testového kritéria, se vypočte dle vztahu (13) [45].

$$v = n_1 + n_2 - 2 \quad (13)$$

Dvouvýběrový T-test s rozdílnými rozptyly lze vypočítat podle vztahu (14), v případě stejného počtu dat v porovnávaných skupinách lze testové kritérium vypočítat dle vztahu (12) [45].

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (14)$$

Stupně volnosti dvouvýběrového T-testu s rozdílnými rozptyly se počítá dle vztahu (15). Na základě tohoto kritéria je pak z tabulky vybírána, stejně jako v případě dvouvýběrového T-testu se shodnými rozptyly, kritická hodnota testového kritéria [45].

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}} \quad (15)$$

Mann–Whitneyův test

Mann–Whitneyův test je určen pro nepárová pozorování dvou různých souborů, zároveň nemusí tato data být z normálního rozdělení, stačí pouze předpoklad

jejich náhodnosti a nezávislosti. Tato testová statistika pak hodnotí shodnost rozdělení pravděpodobností testovaných souborů (distribučních funkcí) [46].

Samotný test probíhá tak, že data z obou datových řad jsou seřazena vzestupně s tím, že znalost, ze které skupiny dat jednotlivá data pochází, musí být zachována. Následně jsou datům přiřazena pořadová čísla (R_{ij}). Tato pořadí jsou pak po skupinách sečtena [46].

$$R_j = \sum_{i=1}^{n_j} R_{ij} \quad (16)$$

V tomto vztahu index j označuje datovou sadu a n_j a n_k označuje počet hodnot v dané datové sadě.

Následně je vypočtena U statistika dle vztahu (17) pro obě datové sady. Pro vyhodnocení o přijetí či nepřijetí nulové hypotézy se pak vychází z menší z hodnot U a tato hodnota se porovnává s kritickou hodnotou U , jež je tabelována. Kritická hodnota U závisí primárně na počtu pozorování v jednotlivých datových sadách [46].

$$U_j = n_j \cdot n_k + \frac{n_j \cdot (n_j + 1)}{2} - R_j \quad (17)$$

Jeho rozšířením se lze dostat ke Kruskal–Wallisovu testu, který je vhodný pro více než dvě porovnání a dal by se tedy označit jako jednofaktorová neparametrická ANOVA.

Bonferroniho korekce

Při vícenásobném porovnání pomocí F-testů, T-testů a Mann–Whitney testů bylo nutné provést korekci za účelem snížení rizika vzniku chyby I. typu, respektive s cílem udržet tuto pravděpodobnost při vícenásobném porovnání na stanovené hladině. Byla provedena takzvaná Bonferroniho korekce, spočívající ve vydělení hodnoty hladiny významnosti testu (α) počtem porovnání (d) dle vztahu (18) [47].

$$\alpha_{bonf} = \frac{\alpha}{d} \quad (18)$$

Na základě této korekce pak byly p-hodnoty při porovnání mechanických vlastností v médiích srovnávány v případě KMIN, KMID a KMAX s hodnotou $\alpha_{bonf} = 0.005$ a skupina IN VIVO s $\alpha_{bonf} = 0.008$. Korekci nebylo třeba provádět při porovnávání skupin vždy pouze s příslušnou IN VIVO skupinou.

Cohenovo d

Kromě výsledků testové statistiky bylo dopočteno i takzvané Cohenovo d. Jedná se o parametr lépe charakterizující velikost rozdílu mezi daty. Je definován jako rozdíl průměrů dělený sdruženou směrodatnou odchylkou a reprezentuje tak rozdíl mezi vzorky vztažený právě k sdružené směrodatné odchylce. Lze ho pak spočítat dle vztahu (19) [48], [49].

$$d_{coh} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}}} \cdot K \quad (19)$$

Kde K je korekce pro malé počty dat.

Data, která nepocházela z normálního rozložení pravděpodobnosti byla vyhodnocována na základě Mann–Whitney testu. Na základě U statistiky z Mann – Whitney testu pak bylo pro data, z jiného než normálního rozložení pravděpodobnosti, vypočtena velikost Cohenova d. Přepočet byl proveden na základě vztahu (20) [49].

$$d_{coh} = \frac{2 \cdot \frac{z}{\sqrt{N}}}{\sqrt{1 - \left(\frac{z}{\sqrt{N}}\right)^2}} \quad (20)$$

Kde N je velikost datové sady a z je statistický údaj, jenž lze pomocí U statistiky vypočítat za vztahu (21) [49].

$$z = \frac{\left| \left| U - \frac{n_1 \cdot n_2}{2} \right| - \frac{1}{2} \right|}{s} \quad (21)$$

Kde n_1 a n_2 jsou počty vzorků v jednotlivých datových sadách a s je směrodatná odchylka [49].

Tento parametr následně slouží k určení velikosti efektu. Hodnocení velikosti efektu na základě velikosti Cohenova d definoval Cohen (1988). Tyto intervaly byly pak využity i v této práci. V příloze B jsou uvedeny výsledky testové statistiky spolu s Cohenovými d , a právě na základě těchto dat, jsou barevně odlišeny jednotlivé skupiny na základě velikosti efektu viz **Tabulka 3** [50], [48].

TABULKA 3 Barevná škála pro hodnocení velikosti efektu

0-0,2	Žádný efekt
0,2-0,5	Malý efekt
0,5-0,8	Střední efekt
> 0,8	Velký efekt

Grafické zobrazení dat

K zobrazení dat byly využity především takzvané krabicové grafy. Vyobrazují celé datové sady a jejich vnitřní variabilitu. Graf se skládá v zásadě ze tří částí obdélníku, vousů případně odlehlých pozorování. Hlavní částí je obdélník ohraničený shora a zdola třetím (75% kvantil) a prvním kvantilem (25%kvantil). V tomto obdélníku se nachází ještě vodorovná čára označující medián, čímž je umožněno rychlé porovnávání skupin dat i z hlediska tohoto parametru. Mimo to může být pomocí křížku v grafu zobrazen i aritmetický průměr. Takzvané vousy jsou svislé čáry vycházející z obdélníku, tyto čáry pak znázorňují maximální a minimální hodnotu, pokud jejich vzdálenost od bližšího z kvantilu (75%, 25%) nepřesáhne 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Pokud pak datová sada obsahuje hodnoty nesplňující tuto podmínku, jsou takové hodnoty zobrazeny jednotlivě, kupříkladu pomocí bodů mimo oblast vousů a krabice [51].

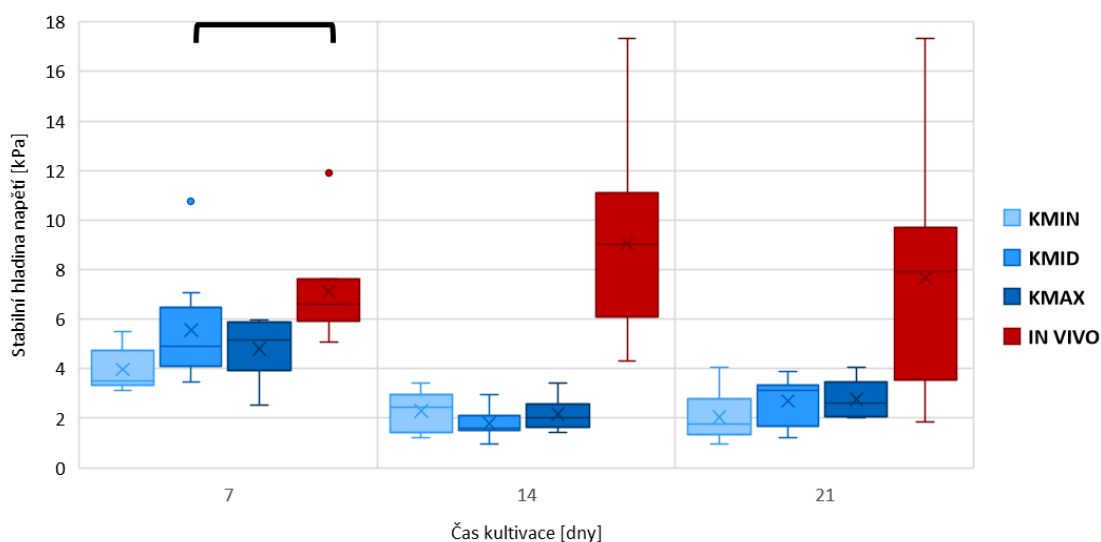
6. VÝSLEDKY

6.1. MECHANICKÉ VLASTNOSTI

Výsledné naměřené hodnoty sledovaných vlastností jednotlivých vzorků i skupin jsou uvedeny v příloze A. V příloze B jsou taktéž přiloženy výsledky statistické analýzy (v tabulkách jsou vyneseny p-hodnoty) a vždy jeden graf reprezentující každou skupinu vzorků (tento reprezentant byl vybrán jako vzorek s nejmenší odchylkou, dělenou směrodatnou odchylkou, od průměru). Statistické vyhodnocení těchto dat bylo provedeno na základě kapitoly statistická analýza. Pro grafické zobrazení získaných výsledků byly použity krabicové a sloupcové grafy. Do sloupcových grafů byly vyneseny mediány jednotlivých skupin a spojnice trendu. Skupiny, které dle testové statistiky dané vlastnosti nevykazují, na dané hladině významnosti, signifikantní rozdíl, jsou v těchto grafech vyznačeny svorkami.

6.1.1. STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ

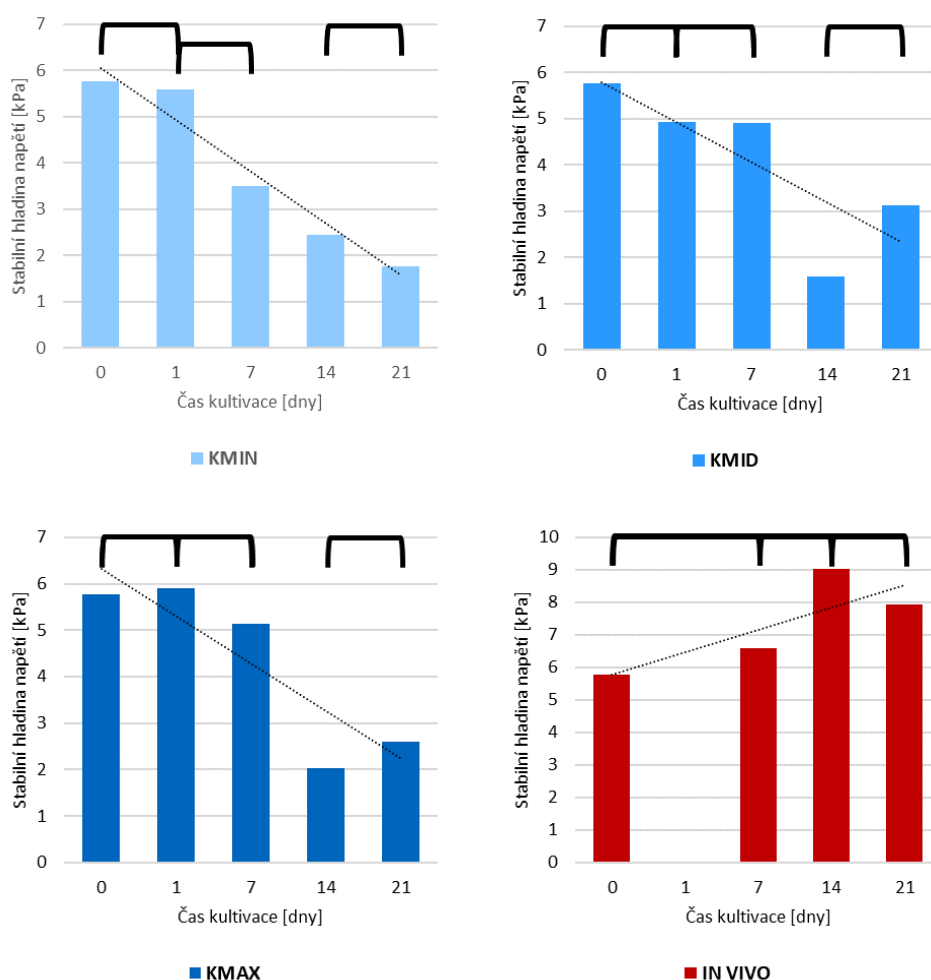
Všechny zjištěné hodnoty stabilní hladiny napětí jsou uvedeny v příloze A pro jednotlivá média i doby expozice. Na následujícím obrázku, **Obrázek 17**, jsou zobrazeny v krabicovém grafu hodnoty stabilní hladiny napětí podle doby expozice v médiu. Vzorky byly porovnávány pouze *sin vivo* podmínkami, nikoli mezi sebou s ohledem na cíl práce.



OBRÁZEK 17 Graf stabilních hladin napětí skupin vzorků dle doby expozice v médiu (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$)

Z Obrázku 17 je patrné, že jediná skupina, jejíž naměřená stabilní hladina napětí dle testové statistiky nevykazuje signifikantní rozdíl vzhledem k odpovídající *in vivo* skupině, je skupina KMID_7. Z toho lze dojít k závěru, že žádná z koncentrací kolagenázy není schopna dostatečně simulovat *in vivo* podmínky z hlediska stabilní hladiny napětí při delším čase vystavení danému prostředí. Avšak lze konstatovat, že střední koncentrace kolagenázy je schopna simulovat tělní prostředí při kratší době kultivace.

Další srovnání bylo provedeno v rámci jednotlivých médií v průběhu degradace a stanovení trendu stabilní hladiny napětí v průběhu degradace. Tato porovnání jsou zobrazena na Obrázku 18.



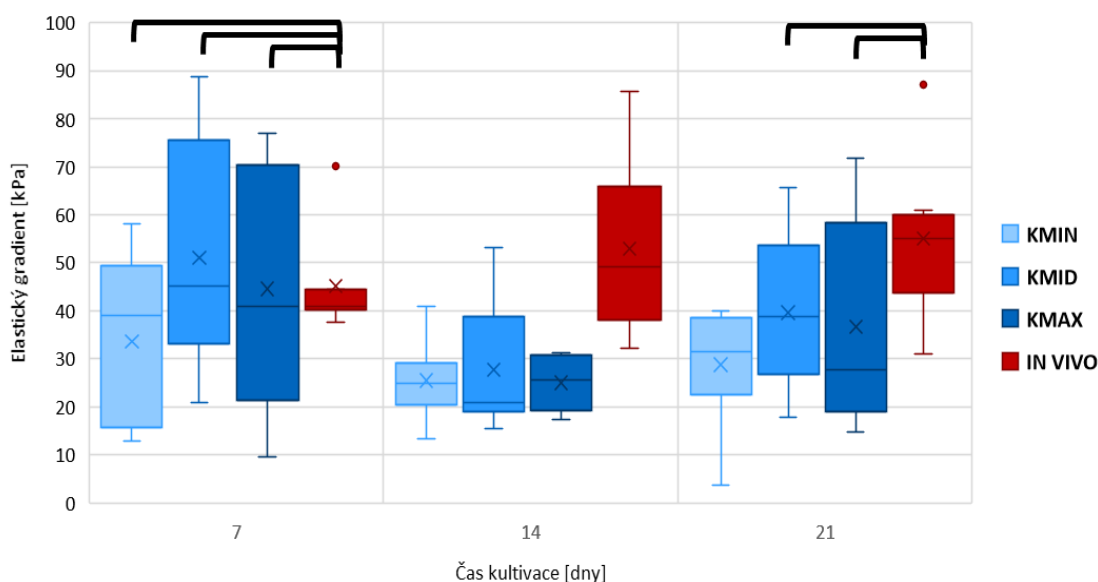
OBRÁZEK 18 Graf stabilních hladin napětí skupin vzorků dle médií (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota > α ; Mann–Whitney test-KMID a IN VIVO; T-test – KMIN a KMAX; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru n=9). První vynesená hodnota vždy reprezentuje skupinu PBS_0 (referenční)

Z grafů a zároveň z testové statistiky vyplývá, že v případě všech koncentrací kolagenázy se poslední hodnota signifikantně liší od první. Vzhledem k vynesným grafům lze konstatovat klesající trend v případě všech koncentrací kolagenázy. Na druhou stranu v případě *in vivo* prostředí z testové statistiky vyplývá, že žádné skupiny dat při jejich vzájemném porovnání nedosahují signifikantních rozdílů. Proto rostoucí trend mediánů zobrazený na **Obrázku 18** nemusí vypovídat o charakteru změn stabilní hladiny napětí.

Ze sloupcového grafu s vynesnými mediány se nicméně zdá, že skupina IN VIVO má na rozdíl od ostatních skupin rostoucí případně stagnující trend. Z toho plyne, že ani charakter změny této vlastnosti v simulačních médiích není stejný jako v případě *in vivo* podmínek.

6.1.2. ELASTICKÝ GRADIENT

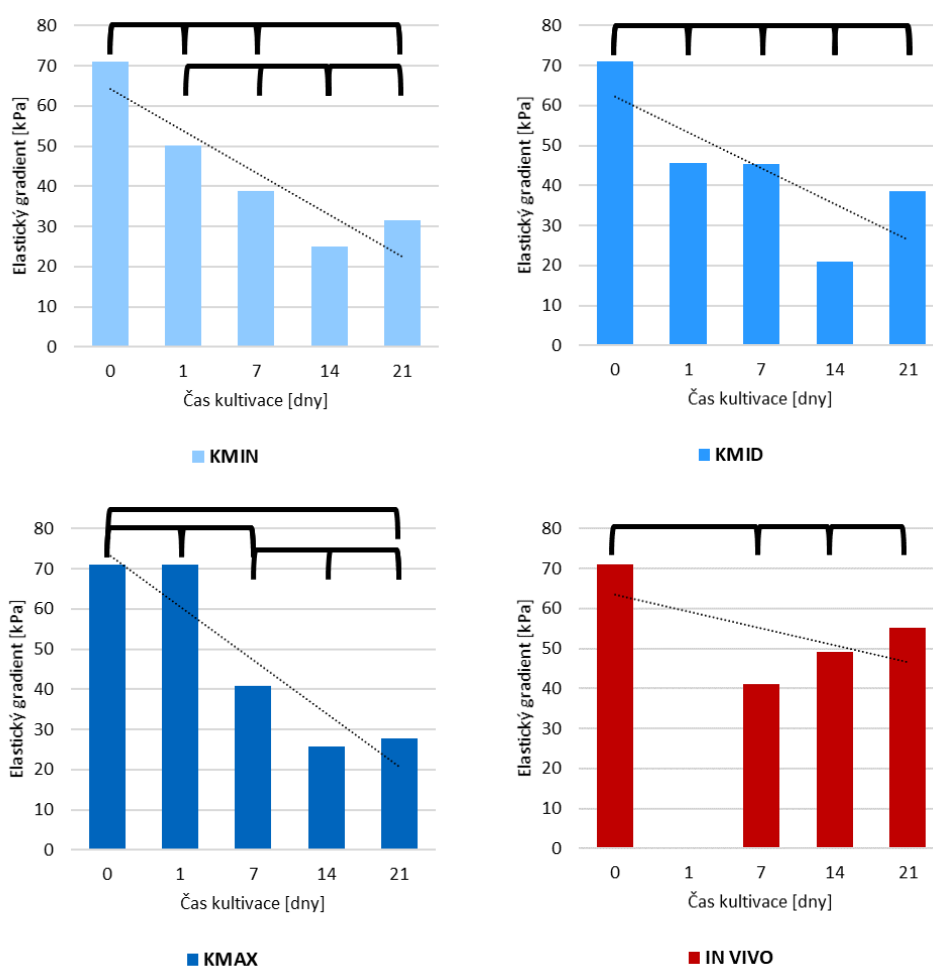
Všechny zjištěné hodnoty elastického gradientu jsou uvedeny v příloze A pro jednotlivá média i doby expozice. Na následujícím obrázku, **Obrázek 19**, jsou zobrazeny v krabicovém grafu hodnoty elastického gradientu podle doby expozice v médiu. Vzorky byly porovnávány pouze s *in vivo* podmínkami, nikoli mezi sebou s ohledem na cíl práce.



OBRÁZEK 19 Graf elastických gradientů skupin vzorků dle doby expozice v médiu (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$)

Z Obrázku 19 je patrné, že signifikantní rozdíl není mezi IN VIVO_7 a KMIN_7, KMID_7 ani KMAX_7. Signifikantní rozdíl v tomto případě není ani mezi IN VIVO_21 při porovnání s KMID_21 a KMAX_21. Nicméně i zde lze konstatovat, že žádné ze simulačních prostředí není schopno, z hlediska elastického gradientu, dostatečně simulovat tělní prostředí. Všechny tři koncentrace kolagenázy jsou nicméně schopny simulovat *in vivo* podmínky v případě kratšího času kultivace.

Další srovnání bylo provedeno v rámci jednotlivých médií v průběhu degradace a stanovení trendu elastického gradientu v průběhu degradace. Tato porovnání jsou zobrazena na Obrázku 20.



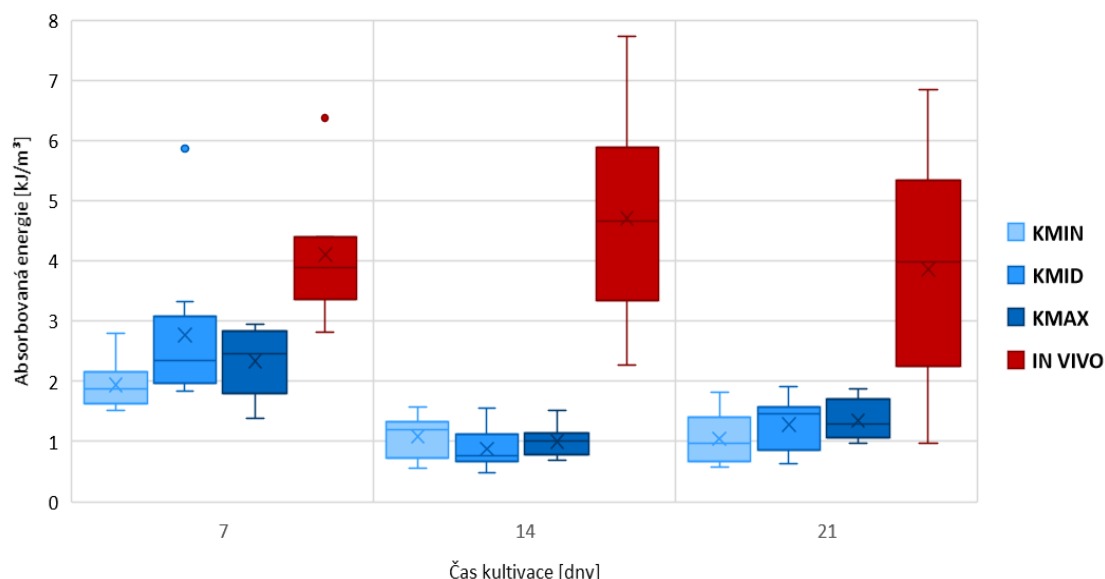
OBRÁZEK 20 Graf elastických gradientů skupin vzorků dle médií (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota > α ; Mann–Whitney test-KMID a IN VIVO; T-test – KMIN a KMAX; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru n=9) První vynesená hodnota vždy reprezentuje skupinu PBS_0 (referenční)

Z grafu a testové statistiky plyne, že v případě skupiny KMIN lze signifikantní rozdíl nalézt pouze v případě porovnání s PBS_0 s KMIN_14. V případě skupiny KMID nebyl nalezen signifikantní rozdíl v žádné z porovnávaných dvojic dat. V případě skupiny KMAX lze konstatovat signifikantní rozdíl mezi skupinami PBS_0 a KMAX_14, KMAX_1 a KMAX_14, KMAX_1 a KMAX_21. U IN VIVO skupiny nebyla pomocí testové statistiky nalezena žádná dvojice vykazující signifikantní rozdíl z hlediska elastického gradientu. Z tohoto charakteru výsledků lze konstatovat, že nelze jednoznačně rozhodnout o trendu vývoje elastického gradientu v případě všech skupin.

Z vnesených mediánů se nicméně jeví být trend všech datových sad klesající. Z tohoto hlediska se tedy zdá charakter ovlivnění elastického gradientu v různých médiích podobný.

6.1.3. ABSORBOVANÁ ENERGIE

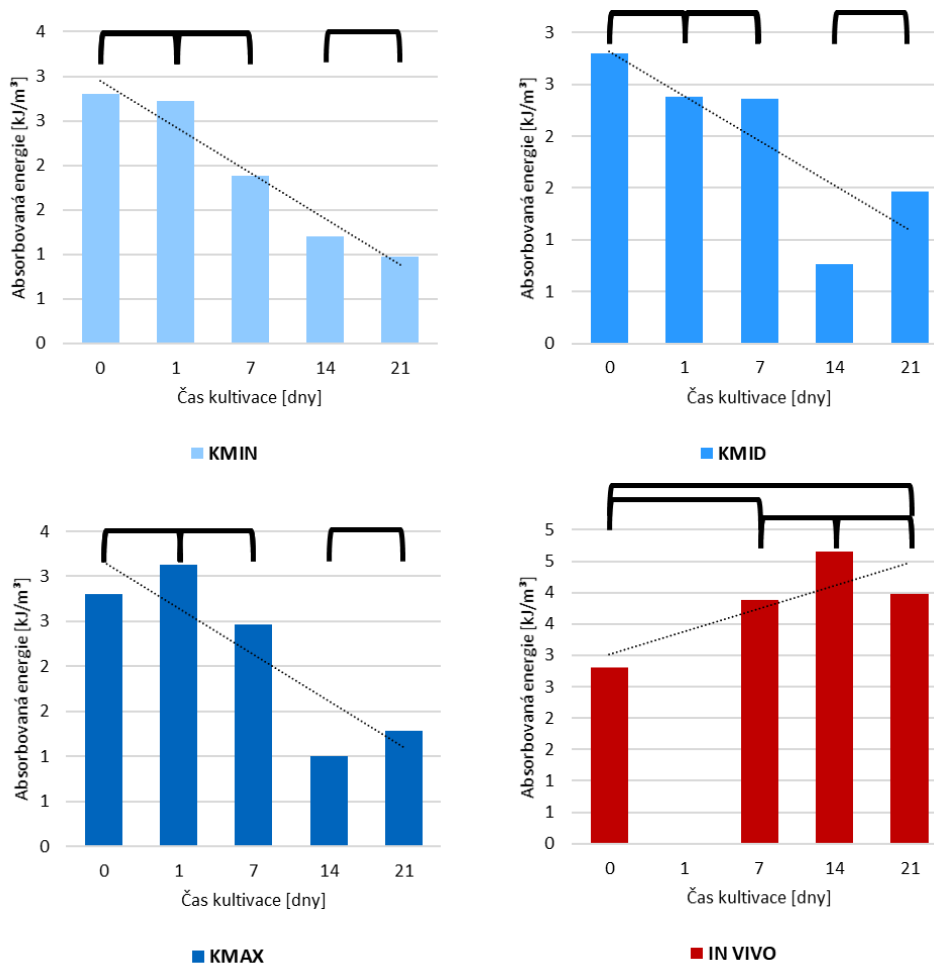
Všechny zjištěné hodnoty absorbované energie jsou uvedeny v příloze A pro jednotlivá média i doby expozice. Na následujícím obrázku, **Obrázek 21**, jsou zobrazeny v krabicovém grafu hodnoty absorbované energie podle doby expozice v médiu. Vzorky byly porovnávány pouze *in vivo* podmínkami, nikoli mezi sebou s ohledem na cíl práce.



OBRÁZEK 21 Graf absorbovaných energií skupin vzorků dle doby expozice v médiu (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$)

Z Obrázku 21 je vidět, že všechny skupiny mají signifikantní rozdíl při porovnání s *in vivo* podmínkami. Z toho plyne, že žádná z testovaných skupin není schopna z hlediska absorbované energie napodobit dostatečně podmínky v těle.

Další srovnání bylo provedeno v rámci jednotlivých médií v průběhu degradace a stanovení trendu absorbované energie v průběhu degradace. Tato porovnání jsou zobrazena na Obrázku 22.



OBRÁZEK 22 Graf absorbovaných energií skupin vzorků dle médií (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test- KMID; T-test– KMIN, KMAX a IN VIVO; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$). První vynesená hodnota vždy reprezentuje skupinu PBS_0 (referenční)

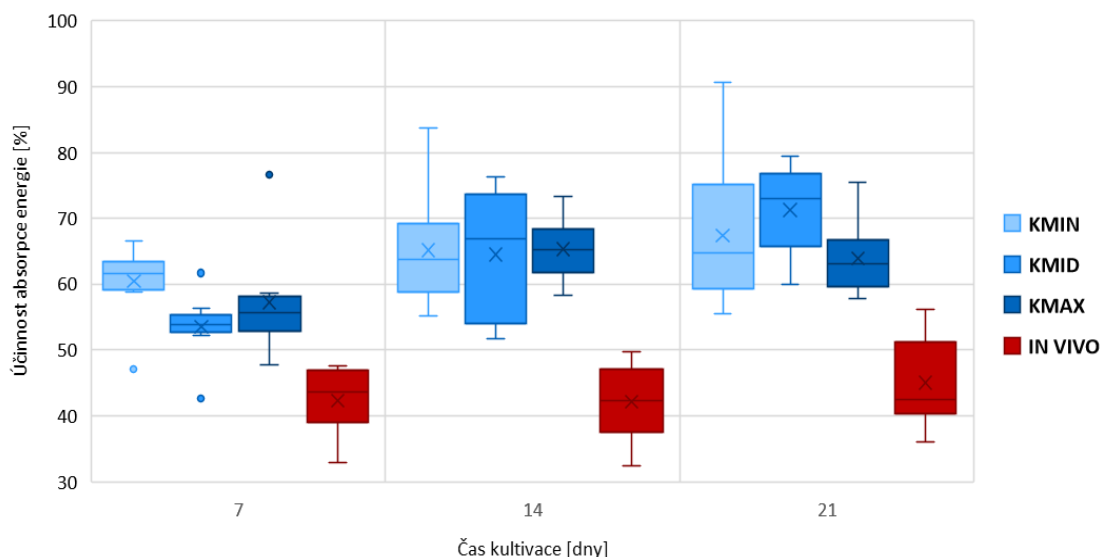
Z testové statistiky vyplývá, že v případě skupiny KMIN lze konstatovat signifikantní rozdíl mezi posledními dvěma a prvními třemi měřeními. V případě skupiny KMID lze signifikantní rozdíly konstatovat taktéž mezi posledními dvěma

měřeními a prvními třemi. Tytéž výsledky vykazuje i skupina KMAX. V případě skupiny IN VIVO je signifikantní rozdíl pouze při porovnání PBS_0 a IN VIVO_14.

Z vynesných mediánů je nicméně patrné, že trend simulačních médií je klesající, zatímco trend mediánů absorbované energie je rostoucí. Z toho vyplývá, že vliv simulačních médií na absorbovanou energii má obrácený trend než vliv *in vivo* podmínek.

6.1.4. ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE

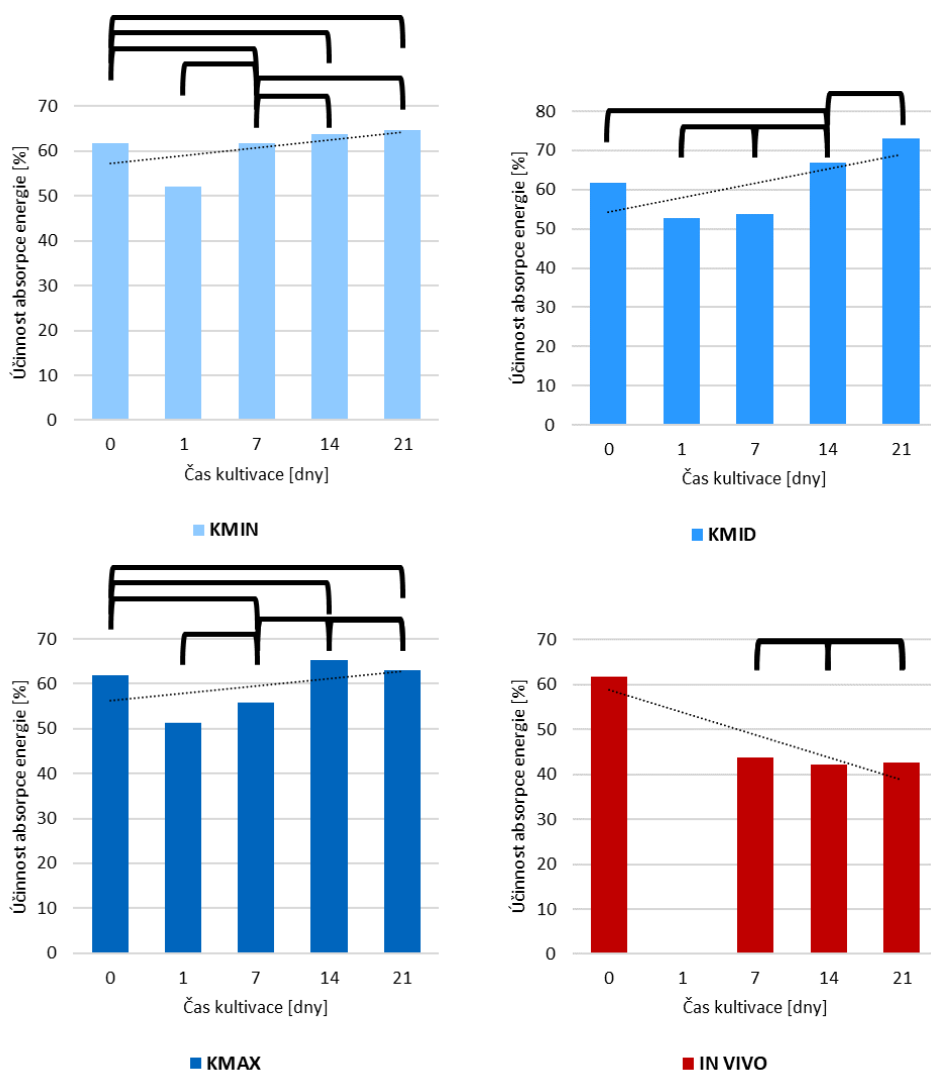
Všechny zjištěné hodnoty účinnosti absorpce energie jsou uvedeny v příloze A pro jednotlivá média i doby expozice v médiu. Na následujícím obrázku, **Obrázek 23**, jsou zobrazeny v krabicovém grafu hodnoty účinnosti absorpce energie podle doby expozice v médiu. Vzorky byly porovnávány pouze s *in vivo* podmínkami, nikoli mezi sebou s ohledem na cíl práce.



OBRÁZEK 23 Graf účinností absorpce energie skupin vzorků dle doby expozice v médiu (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$)

Na **Obrázku 23** je vidět, že všechny skupiny vykazují signifikantní rozdíl při porovnání s *in vivo* podmínkami. Z toho plyne, že žádná z testovaných skupin není schopna z hlediska absorbované energie napodobit dostatečně podmínky v těle.

Další srovnání bylo provedeno v rámci jednotlivých médií v průběhu degradace a stanovení trendu účinnosti absorpci energie v průběhu degradace. Tato porovnání jsou zobrazena na Obrázku 24.



OBRÁZEK 24 Graf účinností absorpce energie skupin vzorků dle médií (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test- KMIN a KMAX; T-test- KMID a IN VIVO; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=9$). První vynesená hodnota vždy reprezentuje skupinu PBS_0 (referenční)

Z testové statistiky vyplývá, že v případě skupiny KMIN je signifikantní rozdíl mezi skupinami KMIN_1 a PBS_0, KMIN_1 a KMIN_14, KMIN_1 a KMIN_21, KMIN_14 a KMIN_21. V případě skupiny KMID je signifikantní rozdíl mezi PBS_0 a KMID_1, KMID_7, KMID_21. Signifikantní rozdíl je i v případě porovnání skupin KMID_1, KMID_7 s KMID_21. V případě vyhodnocování dat týkajících se skupiny KMAX byl signifikantní rozdíl nalezen při porovnání PBS_0 s KMAX_1, KMAX_1

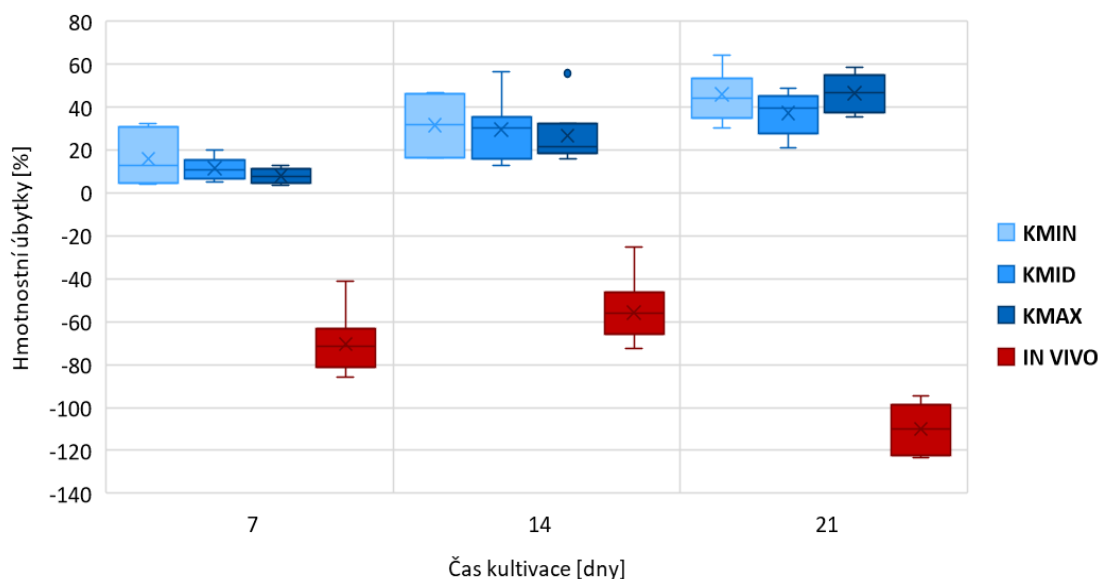
s KMAX_14 a KMAX_1 s KMAX_21. IN VIVO skupiny vzájemně nevykazují signifikantní rozdíly, ale signifikantní rozdíl je mezi PBS_0 a všemi IN VIVO skupinami.

Z výše zmíněných dat vyplývá, že rozhodnout o trendu změny účinnosti absorpce energie nelze jednoznačně rozhodnout.

6.2. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY

Jednotlivé naměřené hodnoty týkající se hmotnostních úbytků jsou přiloženy v příloze A. V přílohách jsou taktéž zaznamenány výsledky statistické analýzy. Statistická analýza dat byla provedena dle kapitoly statistická analýza. Pro grafické zobrazení získaných výsledků byly použity krabicové a sloupcové grafy. Do sloupcových grafů byly vyneseny mediány jednotlivých skupin a spojnice trendu. Skupiny, které dle testové statistiky nevykazují, na dané hladině významnosti, signifikantní rozdíl jsou v těchto grafech vyznačeny svorkami.

Na **Obrázku 25** jsou pak zobrazena pomocí krabicového grafu data vypočtených hmotnostních úbytků.

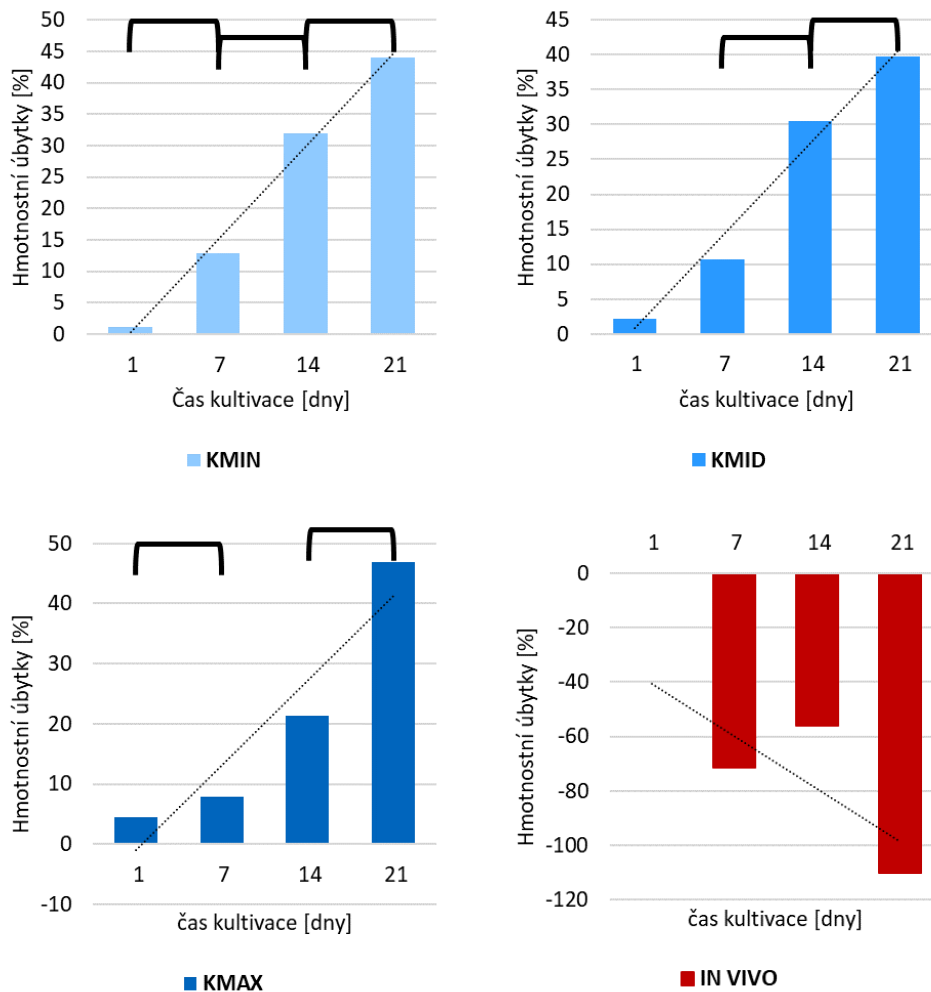


OBRÁZEK 25 Graf hmotnostních úbytků (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=7$)

Z **Obrázku 25** vyplývá, že všechny koncentrace kolagenázy při porovnání s *in vivo* podmínkami vykazují signifikantní rozdíl. V případě vzorků kultivovaných *in vitro* došlo u všech vzorků k hmotnostnímu úbytku, zatímco v případě *in vivo*

vzorků došlo k nárůstu hmotnosti. Tento nárůst hmotnosti byl pravděpodobně způsoben usazováním proteinů, buněk, vrůstáním vaziva či tělními tekutinami, jež se do scaffoldu taktéž mohly dostat během implantace.

Další srovnání bylo provedeno v rámci jednotlivých médií v průběhu degradace a stanovení trendu hmotnostních úbytků v průběhu degradace. Tato porovnání jsou zobrazena na **Obrázku 26**. Trend je však patrný již z předchozího grafu.



OBRÁZEK 26 Graf hmotnostních úbytků skupin vzorků dle médií (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; Mann–Whitney test- KMIN a KMAX; T-test- KMID a IN VIVO; hladina významnosti testu α byla 0,05; v průměru $n=7$)

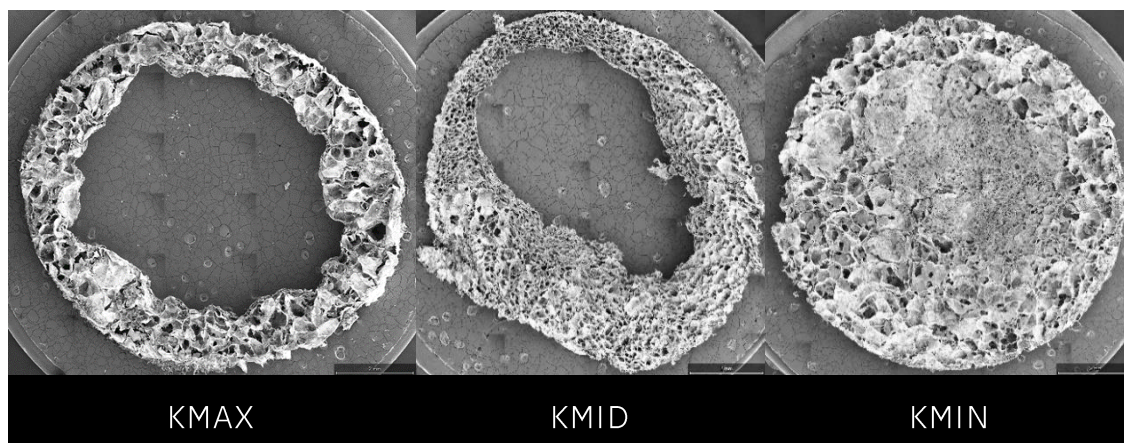
Z **Obrázku 26** vyplývá, že v případě skupiny KMIN nebyl nalezen signifikantní rozdíl v případě porovnání KMIN_1 s KMIN_14, KMIN_1 s KMIN_21, KMIN_7 s KMIN_21. V případě skupiny KMID byl signifikantní rozdíl nalezen při porovnání skupin KMID_1 se všemi dalšími skupinami a při porovnání KMID_7 s KMID_21. U

skupiny KMAX nebyl nalezen signifikantní rozdíl při porovnání KMAX_1 s KMAX_7 a KMAX_14 s KMAX_21. Z těchto výsledků nicméně vyplývá, že trend hmotnostních úbytků lze v těchto případech považovat za rostoucí. V případě skupiny IN VIVO byl nalezen signifikantní rozdíl v případě všech měření. Z tohoto důvodu pak lze zobrazený trend považovat za relevantní.

Lze tedy prohlásit, že i z těchto grafů vyplývá, že trend hmotnostních úbytků je v případě *in vivo* skupiny oproti *in vitro* skupině zcela opačný.

6.3. SEM

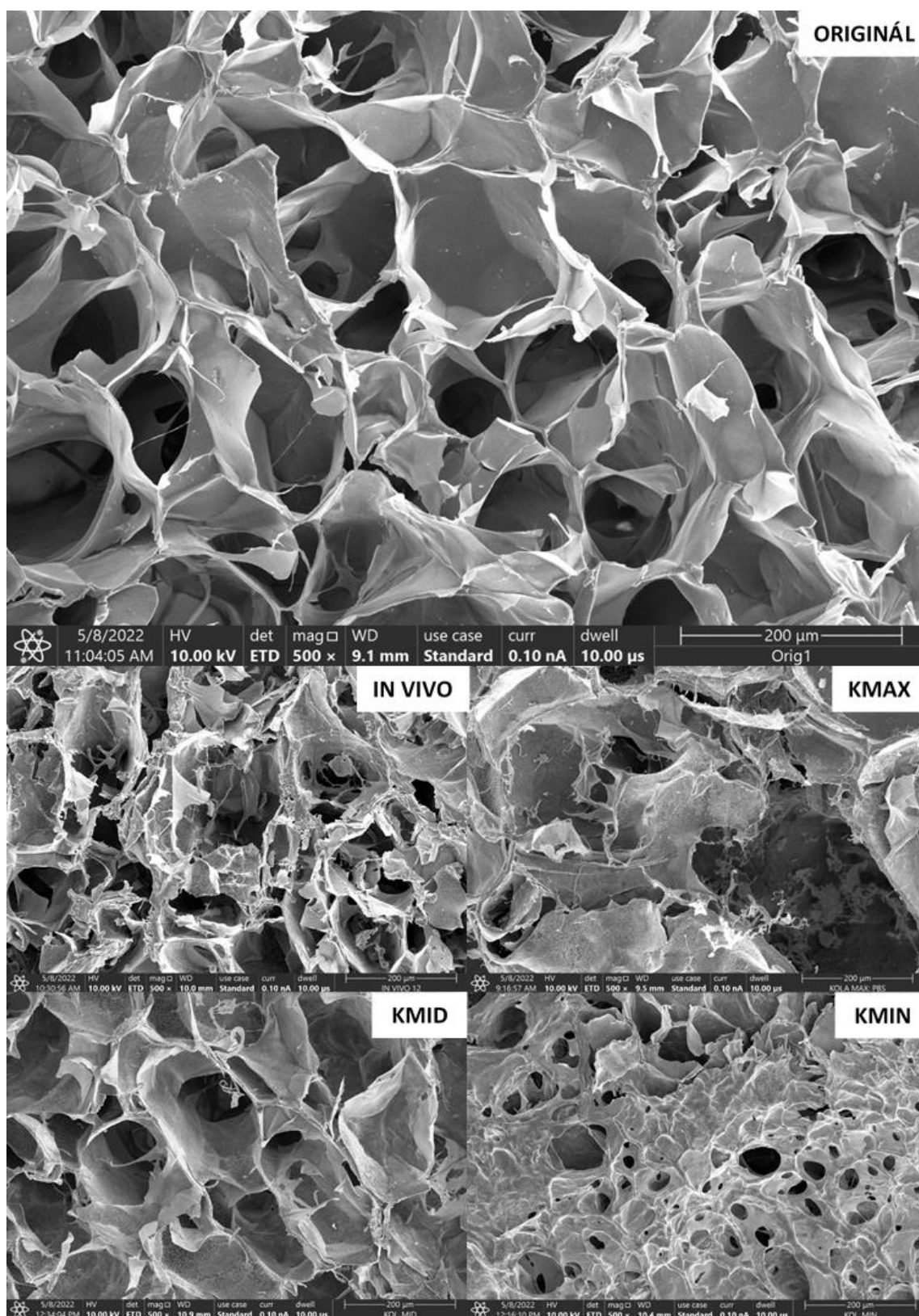
I když z hmotnostních úbytků jednoznačně nevyplývá, zda platí předpoklad, že vyšší koncentrace kolagenázy bude způsobovat větší hmotnostní úbytky. Nicméně, z provedené SEM analýzy byly zjištěny nejvyšší úbytky materiálu u vzorků KMAX a nejnižší u KMIN. To je patrné z **Obrázku 27**. Úbytek materiálu primárně ve středové oblasti scaffoldu si vysvětlujeme nedokonalým sesíťováním struktury ve středové oblasti. Zároveň byly u vzorků narušeny právě lépe zesíťované oblasti při přípravě, díky čemuž se kultivační médium dostalo snadněji právě této oslabené části scaffoldu.



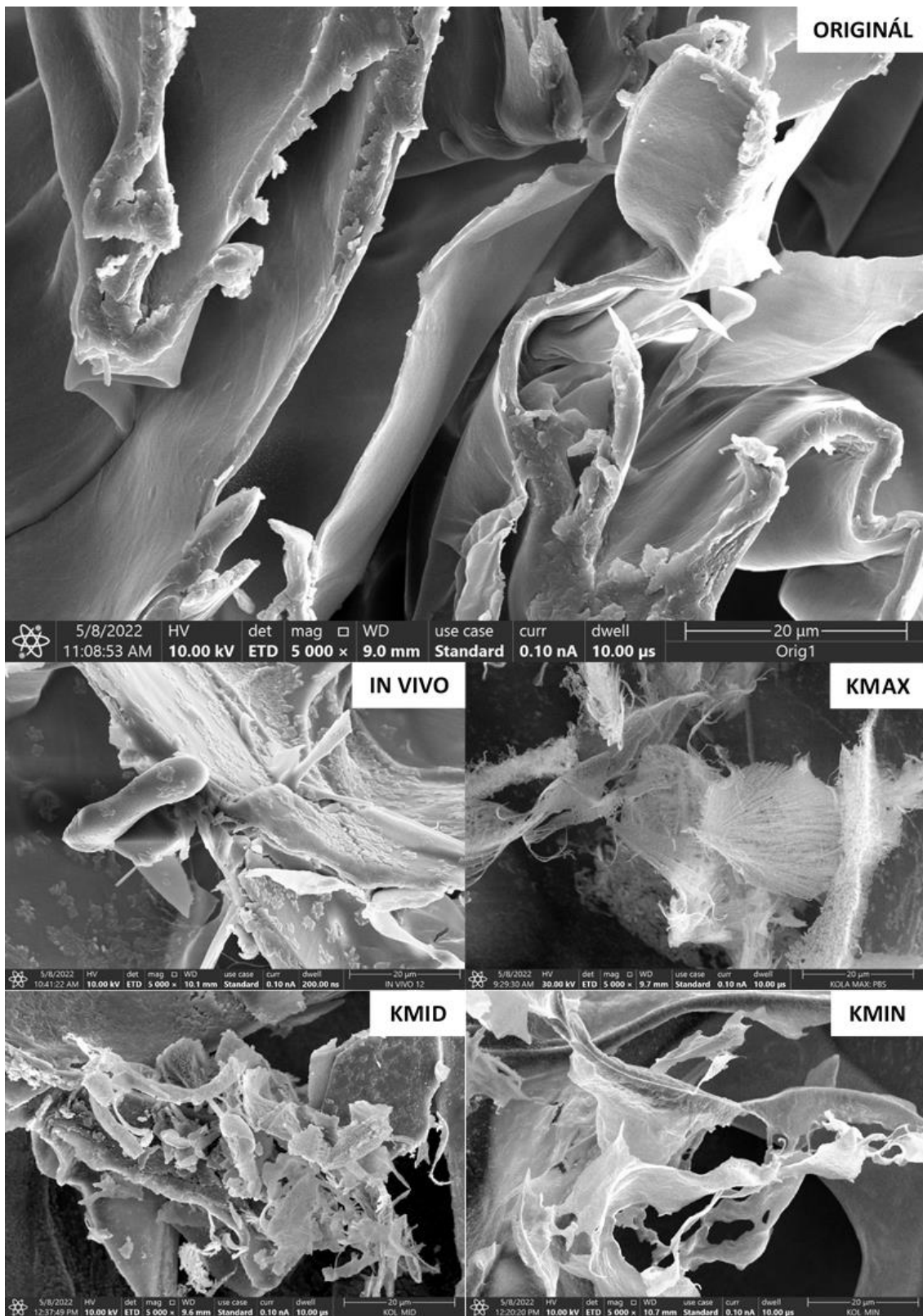
OBRÁZEK 27 Vzorky použité pro SEM analýzu kultivované 21 dní v roztoku kolagenázy (celkový náhled), zvětšení 50x.

Dále můžeme díky SEM zhodnotit pohledovou změnu struktury v jednotlivých skupinách vzorků. Tyto snímky jsou zobrazeny na **Obrázku 28**. Z tohoto obrázku je pak patrné, že struktura všech vzorků, které byly kultivovány v některém z kultivačních médií, nebo *in vivo* podmínkách, se mírně liší od originálního kolagenního scaffoldu. Největší rozdíl je patrný u skupiny KMIN a IN VIVO. V případě skupiny IN VIVO si můžeme povšimnout, že struktura působí potřhaně což může

být dáno usazeninami na struktuře. Tento jev by mohl být způsoben i různými usazeninami, které se eventuelně mohly do struktury dostat. V případě struktury vzorku ze skupiny KMIN pozorujeme opačný efekt, kdy je jeho struktura naopak zdánlivě vyhlazeněji oproti originálnímu vzorku. To by mohlo být způsobeno usazeninami, avšak může jít i o důsledek kultivace v médiu, které by mělo přímo rozkládat kolagen. V případě skupin KMID a KMAX již změny ve struktuře nejsou až tak markantní. Je však pozorovatelné zvětšení pórů oproti nekultivovanému vzorku a zároveň již dříve zmíněný značný úbytek materiálu patrný z **Obrázku 27**. Právě tento značný úbytek materiálu ve středu scaffoldu může být příčinou méně patrných změn ve struktuře materiálu.



OBRÁZEK 28 SEM snímky struktury jednotlivých skupin (porovnání struktury) po 21-denní expozici, zvětšení 500x.



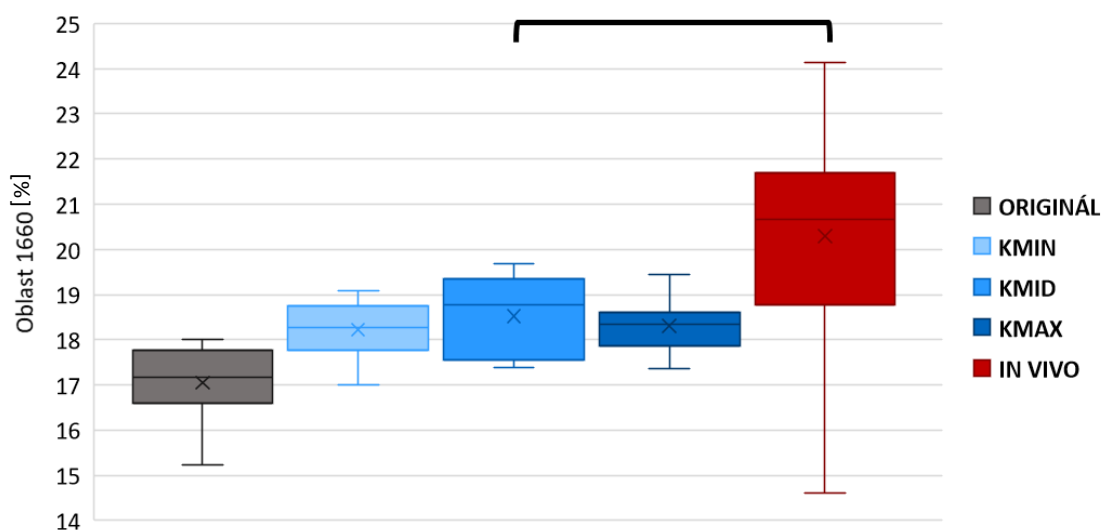
OBRÁZEK 29 SEM snímky usazenin v kolagenových scaffoldech po 21-denní expozici v jednotlivých prostředích, zvětšení 5000x.

Na **Obrázku 29** je pak zobrazeno přiblížení struktur jednotlivých scaffoldů. V případě všech kultivovaných skupin si můžeme na stěnách struktury povšimnout jakýchsi útvarů, které jsou nejvýraznější u IN VIVO vzorku. Jedná se s největší pravděpodobností o usazený materiál (v případě kolagenáz pravděpodobně o soli obsažené v PBS). Ze snímků jsou patrné i další struktury značně se lišící od struktury nekultivovaného vzorku. Může se jednat o různé usazeniny či pouze anomálii ve struktuře, nelze to však říci s jistotou.

6.4. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE

Byly vyhodnocovány změny v pěti charakteristických amidových pásmech. Vzorky vystavené různým koncentracím kolagenázy vykazovaly všechny charakteristické znaky pro kolagen ve všech amidových pásmech. Ovšem asi 40% vzorků vystavených *in vivo* podmínkám nevykazovalo ve III amidovém pásmu všechny charakteristické znaky. Spektrum těchto vzorků pak mělo charakter spíše nějakého nekolagenního proteinu [52].

Byl vyhodnocován poměr určující, kolik z plochy I. amidového pásu zabírá oblast pod 1660 cm^{-1} (marker pro existenci kolagenních struktur v materiálu). Velikosti těchto ploch jsou pak zaznamenány v **Obrázku 30**.

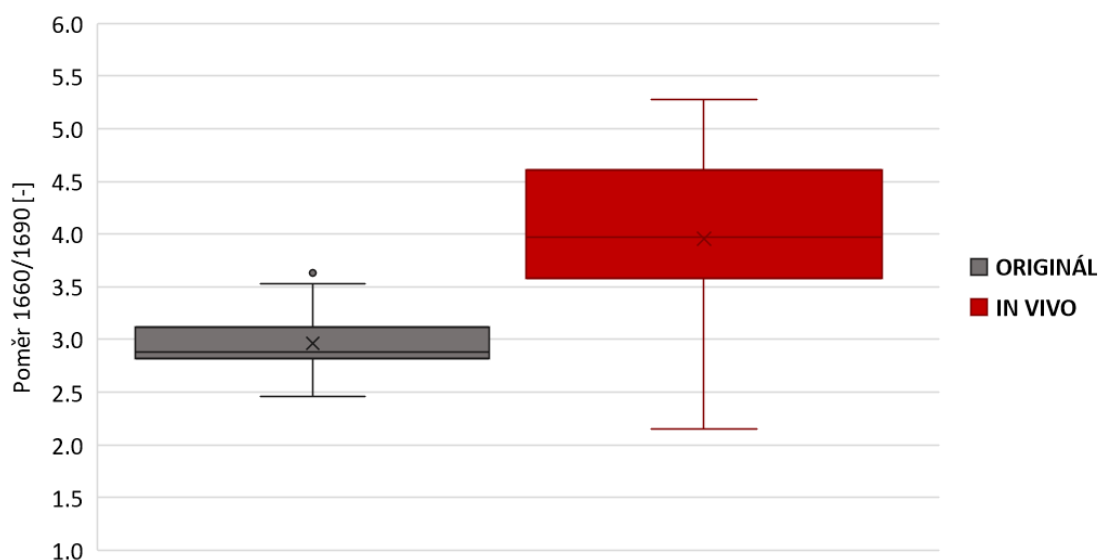


OBRÁZEK 30 Oblast 1660 – plochy pod křivkou (černé svorky v horní části grafu vyznačují skupiny, u nichž byla p hodnota $> \alpha$; T-testy; hladina významnosti testu α byla 0,05; n=10)

Z grafu pak vyplývá, že statisticky nesignifikantní rozdíl na dané hladině významnosti je patrný pouze při porovnání skupiny IN VIVO se skupinou KMID.

Zároveň je z grafu patrné, že vzorky kultivované *in vivo* vykazují vyšší hodnoty oproti ostatním skupinám, nicméně oproti originálnímu vzorku se vyšší hodnoty objevují v případě všech skupin.

In vivo prostředí by taktéž vzhledem k přítomnosti enzymů mělo mít potenciál přetvářet kolagenní strukturu. Tyto vzorky by měly pak vykazovat určitý podíl nedokončených kolagenních vláken, které vykazují mírně odlišnou odezvu. Tento fenomén lze do jisté míry kvantifikovat porovnáním ploch pod křivkou v oblastech 1660 cm^{-1} a 1690 cm^{-1} . Porovnání IN VIVO vzorků se vzorky nekultivovanými pak charakterizuje **Obrázek 31**. Ostatní zkoumaná média tento potenciál nemají, a proto k tomuto fenoménu u nich vůbec nedochází.



OBRÁZEK 31 Porovnání poměru ploch oblastí 1660 a 1690 (střední hodnoty vykazují statisticky významný rozdíl; T-testy; hladina významnosti testu α byla 0,05; $n=20$)

Z grafu je pak patrný statisticky signifikantní rozdíl mezi vzorkem, jenž nebyl vystaven žádnému médiu a vzorkem kultivovaným *in vivo*.

V rámci další analýzy získaných spekter bylo zjišťováno, jaké látky se mohly usadit ve struktuře kolagenu. Získaná spektra byla porovnávána s původní kolagenní strukturou. Ze získaných spekter vyplývá, že ve všech vzorcích vystavených působení některé z koncentrací kolagenázy, byly zaznamenány aktivity v oblastech patřících hydrogen fosforečnanům. V případě vzorků kultivovaných *in vivo* byla detekována aktivita v pásech typických pro fosforečnany vápenaté.

Z FTIR pak vyplývá, že se ve scaffoldech usazují jiné materiály, v případě srovnání *in vivo* podmínek s různými koncentracemi kolagenázy. Navíc v případě vzorků kultivovaných *in vivo* dochází do jisté míry k přestavbě kolagenu a u některých vzorků i k dalším změnám ve struktuře kolagenu.

7. DISKUZE

Byly porovnány vlastnosti kolagenních scaffoldů kultivovaných *in vivo* a *in vitro* (tři různé koncentrace kolagenázy). Předpokládalo se, že alespoň jedna z koncentrací kolagenázy dosáhne ve sledovaných vlastnostech dostatečné shody s *in vivo* kultivovanými vzorky. Navzdory tomuto předpokladu se však toto tvrzení nepodařilo prokázat u žádné z koncentrací kolagenáz v plném rozsahu. Podařilo se nalézt shodu v případě některých mechanických vlastností pouze při kratší době kultivace a v případě hmotnostních úbytků nebyla nalezena dokonce žádná shoda. Z hlediska analýzy struktury (SEM analýza) a usazenin, jež se do materiálu dostaly v průběhu kultivace (SEM analýza a FTIR analýza), byly taktéž v tomto případě očekávané rozdíly.

Tyto výsledky mohou být do jisté míry ovlivněny relativně malým počtem vzorků v jednotlivých skupinách. Tento počet však, obzvláště v případě *in vivo* kultivovaných vzorků, nejde příliš navýšit, a to primárně z etických a finančních důvodů.

V případě vyhodnocování elastického modulu jsme dosáhli poměrně velkého rozptylu. Tento fakt bych přiřadila nedokonalosti použité metody, kdy je stabilní hodnota před samotným měřením pouze odhadnuta, a tak hysterezní smyčka nemusela být vždy provedena přesně v normou stanoveném rozmezí a vyřazení extrémních hodnot nemusí postihnout poměrně nepatrné odchýlení, které však může způsobit právě velký rozptyl hodnot. Tento nedostatek však díky různému stupni degradace vzorků nemůžeme zcela odstranit, jelikož předběžné měření by taktéž značně ovlivnilo získaná data. Řádově stejné rozptyly se u měření elastického gradientu objevily i u Suchého a kol. [36]. Na druhou stranu v případě studie Peka a kol. [53] se objevuje měření modulu, jenž by se měl alespoň blížit hodnotám zjištěným v této práci, avšak při porovnání se výsledky řádově liší. To může být způsobeno mírně odlišnou procedurou výroby vzorků, obsahem dalších látek ve vzorcích či jinou metodikou tlakové zkoušky.

Hodnoty mechanických vlastností naměřené v této studii jsou pak řádově stejné, jako v případě studie Suchého a kol. [36] a to i přes to, že byly měřeny kolagenní vzorky kultivované v jiných médiích. Měřené vlastnosti pak v případě

vzorků kultivovaných v PBS vykazují podobný trend jako vzorky kultivované v třech koncentracích kolagenázy, a to v případě elastického gradientu, stabilní hladiny napětí i hmotnostních úbytků. V případě elastického gradientu pak dosahují vzorky kultivované v kolagenáze vyšších hodnot než v případě vzorků PBS ve zmíněné studii. Na druhou stranu v případě stabilní hladiny napětí je situace opačná. Tento fenomén bych pak přiřadila nedokonalé metodice měření elastického gradientu s očekávanou nižší hodnotou v případě vzorků kultivovaných v kolagenáze.

Mechanické vlastnosti pomocí tlakových zkoušek určoval ve studii i Bao a kol. [54]. I když byly mechanické testy dělány až do tlakového lomu a tedy i dle jiné metodiky, je z grafů v této studii patrné, že při vyhodnocení stabilní hladiny napětí v rozmezí -20% a -30% poměrného prodloužení bychom došli pravděpodobně k řádově stejným hodnotám.

Hmotnostními úbytky se zabýval ve studii i Arpornmaeklong a kol. [33]. Z porovnání těchto dat vyplývá, že vzorky zkoumané Arpornmaeklongem a kol. [33] dosahovaly výrazně větších hmotnostních úbytků vzhledem k době kultivace, to však bylo pravděpodobně způsobeno výrazně větší koncentrací kolagenázy v kultivačním médiu. Při porovnání s maximální koncentrací kolagenázy použité v této práci se jedná nejméně o 1000 větší koncentraci. Tomu také odpovídá výrazně větší rychlost degradace.

V případě vzorků kultivovaných v PBS (Suchý a kol. [36]) byly na základě FTIR nalezeny markery ukazující na přítomnost hydrogen fosforečnanů. Je tedy pravděpodobné, že se tato látka dostala do scaffoldů kultivovaných v kolagenáze právě z PBS, ve kterém je kolagenáza rozpuštěna.

8. ZÁVĚR

Byly srovnány vyhodnocované charakteristiky (mechanické vlastnosti, změna hmotnosti, analýza struktury a chemického složení) mezi kolageními scaffoldy kultivovanými v třech koncentracích kolagenázy a scaffoldy vystavenými *in vivo* podmínkám. Z naměřených dat vyplývá, že žádná z třech koncentrací kolagenázy není schopna v celém rozsahu simulovat *in vivo* podmínky.

Ze srovnání sledovaných mechanických vlastností vyplývá, že střední koncentrace kolagenázy je schopna při kratší době kultivace napodobit vliv na stabilní hladinu napětí a elastický gradient (v případě elastického gradientu dosáhly při krátkodobé kultivaci schody s *in vivo* podmínkami všechny koncentrace kolagenázy). Z hlediska absorbované energie a účinnosti absorpce energie nebylo dosaženo schody u žádné koncentrace kolagenázy.

Z hlediska hmotnostních úbytků se žádná z koncentrací kolagenázy *in vivo* podmínkám nepřiblížila. Zatímco vzorky kultivované *in vitro* na hmotnosti ubývaly, vzorky kultivované *in vivo* naopak nabývaly na hmotnosti.

Při porovnání chemických a strukturálních změn (SEM a FTIR analýza) ve vzorcích kultivovaných *in vivo* a *in vitro* je patrné, že z hlediska komplexního chování *in vivo* podmínek je charakter změny odlišný. V *in vitro* kultivovaných vzorcích se usazovaly soli z kultivačního roztoku, zatímco vzorcích kultivovaných *in vivo* se usazoval fosforečnan vápenatý s pravděpodobně bílkovinné komponenty krevní plazmy.

Celkově lze tedy konstatovat, že odlišný charakter média při porovnání s *in vivo* podmínkami hraje značnou roli. Z tohoto důvodu lze na základě naměřených výsledků předpokládat, že žádná z testovaných koncentrací kolagenázy není schopna dostatečně přesně napodobit *in vivo* podmínky.

9. PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

- [1] VOPÁLKOVÁ, Marika, Tomáš SUCHÝ, Radek SEDLÁČEK, Lucie VIŠTEJNOVÁ a Pavel KLEIN. Various Aspects of Collagen Scaffolds Degradation Processes: in vitro vs. in vivo Condition. KUBÁŠOVÁ, Kristýna, Zdeněk PADOVEC a Radek SEDLÁČEK, ed. 23rd International Scientific Conference APPLIED MECHANICS 2022 - Book of Abstracts. 1. Prague: Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Technická 4, 166 07 Prague 6, 2022, s. 121-124. ISBN 978-80-01-06974-5.
- [2] VOPÁLKOVÁ, Marika, SUCHÝ, Tomáš, ed. Verifikace vybraných in vitro enzymatických prostředí s in vivo podmínkami. In: NOVÁK PH.D., doc. Ing. Martin. Sborník abstraktů: Konference studentské tvůrčí činnosti. Praha: Fakulta strojní, ČVUT v Praze, 2022, s. 8.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GIANNOUDIS, Peter V., Omar FAOUR, Thomas GOFF, Nikolaos KANAKARIS a Rozalia DIMITRIOU. Masquelet technique for the treatment of bone defects: Masquelet technique for the treatment of bone defects. *Injury* [online]. 2011, 42(6), 591-598 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0020-1383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.036>.
- [2] YOUNGER, Edward M. a Michael W. CHAPMAN. Morbidity at Bone Graft Donor Sites. *Journal of Orthopaedic Trauma* [online]. 1989, 3(3), 192-195 [cit. 2022-03-07]. ISSN 0890-5339. Dostupné z: doi:10.1097/00005131-198909000-00002
- [3] PERRY, Clayton R. Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft Substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [online]. 1999, 360, 71-86 [cit. 2022-03-07]. ISSN 0009-921X. Dostupné z: doi:10.1097/00003086-199903000-00010
- [4] Retrieve-Bone-Graft-Harvest__Removal. In: *Globusmedical: RETRIEVE® Bone Graft Harvest System* [online]. [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: https://www.globusmedical.com/wp-content/uploads/2019/07/Retrieve-Bone-Graft-Harvest__Removal.png
- [5] MANKIN, H. J., S. DOPPELT a w. TOMFORD. Clinical experience with allograft implantation. *Clin Orthop Relat Res* [online]. 1983, 174, 69-86 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6339144/>

- [6] BERNER, A., J.C. REICHERT a M.B. MÜLLER. Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. *Cell Tissue Res* [online]. 2012, **347**, 501–519 [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1184-8>
- [7] RODDY, Erika, Malcolm R. DEBAUN, Adam DAOUD-GRAY, Yunzhi P. YANG a Michael J. GARDNER. *Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives* [online]. 2018, **28**(3), 351-362 [cit. 2022-03-07]. ISSN 1633-8065. Dostupné z: doi:10.1007/s00590-017-2063-0
- [8] MATSUMURA, Noboru, Ryogo FURUHATA, Takumi NAKAMURA, Hiroo KIMURA, Taku SUZUKI a Takuji IWAMOTO. Blocking screw augmentation in intramedullary nailing for displaced surgical neck fractures of the proximal humerus. *JSES Reviews, Reports, and Techniques* [online]. 2022, **2**(1), 46-51 [cit. 2022-04-23]. ISSN 26666391. Dostupné z: doi:10.1016/j.xrrt.2021.09.011
- [9] SHEKARAN, Asha, José R. GARCÍA, Amy Y. CLARK, Taylor E. KAVANAUGH, Angela S. LIN, Robert E. GULDBERG a Andrés J. GARCÍA. Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(21), 5453-5461 [cit. 2022-05-01]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.055
- [10] BURG, Karen J. L., Scott PORTER a James F. KELLAM. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. Science Direct, 2000, **21**(23), 2347-2359 [cit. 2021-11-09]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00102-2).
- [11] BREKKE, John H. a Jeffrey M. TOTH. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* [online]. 1998, **43**(4), 380-398 [cit. 2021-11-09]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291097-4636%28199824%2943%3A4%3C380%3A%3AAID-JBM6%3E3.O.CO%3B2-D>
- [12] SUNG, Hak-Joon, Carson MEREDITH, Chad JOHNSON a Zorina S. GALIS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(26), 5735-5742 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0142 - 9612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.066>.
- [13] AZEVEDO, Helena S. a Rui L. REIS. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. *1936__book.fm* [online]. CRC Press LLC, 2005, (12), 178-197 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0-8493-1936-6/05. Dostupné z: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/14150/1/file.pdf>
- [14] TSURUGA, Eichi, Hiroko TAKITA, Hideaki ITOH, Yuichi WAKISAKA a Yoshinori KUBOKI. Ore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *The Journal of Biochemistry* [online]. 1997,

121(2), 317–324 [cit. 2021-12-04]. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021589>

- [15] HOLMES, RE. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg.* [online]. 1979, 63(5), 626-33 [cit. 2021-12-04]. Dostupné z: doi:10.1097/00006534-197905000-00004.
- [16] STEVENS, Molly M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2008, 11(5), 18-25 [cit. 2021-11-19]. ISSN 1369-7021. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70086-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5).
- [17] PACOLOVÁ, Bc. Klára. *Biologické vlastnosti scaffoldů* [online]. Zlín, 2017 [cit. 2021-12-04]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/40733/pacolov%C3%A1__2017__dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Humpolíček Ph.D.
- [18] RAMAKRISHNA, S., J. MAYER, E. WINTERMANTEL a Kam W. LEONG. *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. Composites Science and Technology* [online]. 2001, 61(9), 1189-1224 [cit. 2021-12-04]. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [19] AL-TAMIMI, Abdulsalam A., Chris PEACH, Paulo Rui FERNANDES, Akos CSEKE a Paulo J.D.S. BARTOLO. Topology Optimization to Reduce the Stress Shielding Effect for Orthopedic Applications. *Procedia CIRP* [online]. 2017, 65, 202-206 [cit. 2021-12-05]. ISSN 2212-8271. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procir.2017.04.032>.
- [20] LINDAHL, Olov a Ake G. H. LINDGREN. Cortical Bone in Man II. Variation in Tensile Strength with Age and Sex. *Acta Orthopaedica Scandinavica* [online]. 2009, 38(1-4), 141-147 [cit. 2022-04-19]. ISSN 0001-6470. Dostupné z: doi:10.3109/17453676708989628
- [21] WEI, Shuai, Jian-Xiong MA, Lai XU, Xiao-Song GU a Xin-Long MA. Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Med Res* [online]. 2020, 7(54) [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s40779-020-00280-6>
- [22] TABARD, L., V. GARNIER, E. PRUD'HOMME, E.-J. COURTIAL, S. MEILLE, J. ADRIEN, Y. JORAND a L. GREMILLARD. Robocasting of highly porous ceramics scaffolds with hierarchized porosity. *Additive Manufacturing* [online]. 2021, 38 [cit. 2022-04-23]. ISSN 22148604. Dostupné z: doi:10.1016/j.addma.2020.101776
- [23] QIN, Yu, Peng WEN, Hui GUO et al. Additive manufacturing of biodegradable metals: Current research status and future perspectives. *Acta Biomaterialia* [online]. 2019, 98, 3-22 [cit. 2022-04-23]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2019.04.046

- [24] MAYNE, Richard a Robert E. BURGESSON. *Biology of extracellular matrix: a series: Structure and function of collagen types*. London: Academic press INC., 1987. ISBN 0 12 481280-5.
- [25] SHOULDERS, Matthew D. a Ronald T. RAINES. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009, **78**(1), 929-958 [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: doi:0.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- [26] PETERKOVÁ, Petra a Lubomír LAPČÍK JR. Kolagen: Vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické Listy*. 2000, **94**, 371-379.
- [27] SUCHÝ, Tomáš, Monika ŠUPOVÁ, Martin BARTOŠ et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2018, **29**(2) [cit. 2022-04-29]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-017-6024-2
- [28] PACAK, Christina A., Allison A. MACKAY a Douglas B. COWAN. An Improved Method for the Preparation of Type I Collagen From Skin. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2014, (83) [cit. 2022-03-20]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/51011
- [29] YILMAZ, Bengi, Ahmet Engin PAZARCEVIREN, Aysen TEZCANER a Zafer EVIS. Historical development of simulated body fluids used in biomedical applications: A review. *Microchemical Journal* [online]. 2020, **155** [cit. 2022-04-30]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2020.104713
- [30] BAUER, Eugene A., George P. STRICKLIN, John J. JEFFREY a Arthur Z. EISEN. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1975, **64**(1), 232-240 [cit. 2022-04-30]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(75)90243-0
- [31] AZEVEDO, Helena S., Francisco M. GAMA a Rui L. REIS. In Vitro Assessment of the Enzymatic Degradation of Several Starch Based Biomaterials. *Biomacromolecules* [online]. 2003, **4**(6), 1703–1712 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:doi:10.1021/bm0300397
- [32] LEE, Jong Eun, Jong Chul PARK, Yu Shik HWANG, Jeong Koo KIM, Joong Gon KIM a Hwal SUH. Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes: morphology, enzymatic degradation, and mechanical properties. *Yonsei Medical Journal* [online]. 2001, **42**(2) [cit. 2022-04-29]. ISSN 0513-5796. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2001.42.2.172
- [33] ARPORNMAEKLONG, P., P. PRIPATNANONT a N. SUWATWIROTE. Properties of chitosan–collagen sponges and osteogenic differentiation of rat-bone-marrow stromal cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. 2008, **37**(4), 357-366 [cit. 2022-02-28]. ISSN 09015027. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijom.2007.11.014

- [34] HUANG, C. a I. V. YANNAS. Mechanochemical studies of enzymatic degradation of insoluble collagen fibers. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1977, **11**(1), 137-154 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.820110113
- [35] ČSN ISO 13314. *Mechanické zkoušení kovů - Zkoušení tvářitelnosti - Zkouška poréznych a pěnových kovů tlakem*. První. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012.
- [36] SUCHÝ, Tomáš, Martin BARTOŠ, Radek SEDLÁČEK, Monika ŠUPOVÁ, Margit ŽALOUDKOVÁ, Grażyna Simha MARTYNKOVÁ a René FOLTÁN. Various Simulated Body Fluids Lead to Significant Differences in Collagen Tissue Engineering Scaffolds. *Materials* [online]. 2021, **14**(16) [cit. 2022-04-19]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14164388
- [37] PAYNE, K. J. a A. VEIS. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers* [online]. 1988, **27**(11), 1749-1760 [cit. 2022-05-27]. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.360271105
- [38] NOVOVIČOVÁ, Jana. Pravděpodobnost a a matematická statistika. NOVOVIČOVÁ, Jana. *Pravděpodobnost a a matematická statistika* [online]. 12. Praha: vydavatelství ČVUT, 2006 [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: <http://staff.utia.cas.cz/novovic/files/skmain.pdf>
- [39] DJUROVIC, Z., B. KOVACEVIC a V. BARROSO. QQ-plot based probability density function estimation. *Proceedings of the Tenth IEEE Workshop on Statistical Signal and Array Processing (Cat. No.00TH8496)* [online]. IEEE, 2000, 243-247 [cit. 2022-03-28]. ISBN 0-7803-5988-7. Dostupné z: doi:10.1109/SSAP.2000.870120
- [40] YAP, B. W. a C. H. SIM. Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation* [online]. 2011, **81**(12), 2141-2155 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0094-9655. Dostupné z: doi:10.1080/00949655.2010.520163
- [41] HANUSZ, Zofia a Joanna TARASLIŃSKA. Normalization of the Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests of normality. *Biometrical Letters* [online]. 2015, **52**(2), 85-93 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1896-3811. Dostupné z: doi:10.1515/bile-2015-0008
- [42] SHAPIRO, S. S. a M. B. WILK. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* [online]. 1965, **52**(34) [cit. 2022-03-28]. ISSN 00063444. Dostupné z: doi:10.2307/2333709
- [43] GUNER, Baris, Mark T. FRANKFORD a Joel T. JOHNSON. A Study of the Shapiro–Wilk Test for the Detection of Pulsed Sinusoidal Radio Frequency Interference. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* [online].

- 2009, 47(6), 1745-1751 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0196-2892. Dostupné z: doi:10.1109/TGRS.2008.2006906
- [44] MOSER, Barry K. a Gary R. STEVENS. *Communications in Statistics - Theory and Methods* [online]. 1989, 18(11) [cit. 2022-03-28]. ISSN 0361-0926. Dostupné z: doi:10.1080/03610928908830135
- [45] RUXTON, Graeme D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology* [online]. 2006, 17(4), 688-690 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1465-7279. Dostupné z: doi:10.1093/beheco/ark016
- [46] LIKEŠ, Jiří a Josef MACHEK. *Matematická statistika* [online]. 2. Praha 1: Nakladatelství technické literatury, 1988 [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: https://sms.nipax.cz/_media/mat_statist_lima.pdf
- [47] SEDGWICK, P. Multiple significance tests: the Bonferroni correction. *BMJ* [online]. 2012, 344(254), 509-509 [cit. 2022-05-12]. ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.e509
- [48] COHEN, Jacob. A power primer. *Psychological Bulletin* [online]. 1992, 112(1), 155-159 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1939-1455. Dostupné z: doi:10.1037/0033-2909.112.1.155
- [49] FRITZ, Catherine O., Peter E. MORRIS a Jennifer J. RICHLER. Effect size estimates: Current use, calculations, and interpretation. *Journal of Experimental Psychology: General* [online]. 2012, 141(1), 2-18 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1939-2222. Dostupné z: doi:10.1037/a0024338
- [50] COHEN, Jacob. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* [online]. 1988 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: doi:10.4324/9780203771587
- [51] BENJAMINI, Yoav. Opening the Box of a Boxplot. *The American Statistician* [online]. 1988, 42(4), 257-262 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0003-1305. Dostupné z: doi:10.1080/00031305.1988.10475580
- [52] PRYSTUPA, D.A. a A.M. DONALD. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. *Polymer Gels and Networks* [online]. 1996, 4(2), 87-110 [cit. 2022-05-27]. ISSN 09667822. Dostupné z: doi:10.1016/0966-7822(96)00003-2
- [53] PEK, Y.S., M. SPECTOR, I.V. YANNAS a L.J. GIBSON. Degradation of a collagen–chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. *Biomaterials* [online]. 2004, 25(3), 473-482 [cit. 2022-05-28]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00541-6
- [54] BAO, Zixian, Minghong GAO, Xiying FAN et al. Development and characterization of a photo-cross-linked functionalized type-I collagen (Oreochromis niloticus) and polyethylene glycol diacrylate hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 155, 163-

173 [cit. 2022-05-28]. ISSN 01418130. Dostupné z:
doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.210

[55] JENNINGS, Thomas A. Lyophilization Introduction and Basic Principles. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles* [online]. 1. Boca Raton: CRC Press, 2013, s. 4-6 [cit. 2022-02-01]. ISBN 9780429135415. Dostupné z:
<https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b14424/lyophilization-thomas-jennings>

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 ODBĚR KOSTNÍ TKÁNĚ Z PÁNEVNÍHO HŘEBENE (ZDROJ: [4])	14
OBRÁZEK 2 VLEVO IIIZAROVOVA TECHNIKA, VE STŘEDU NITRODŘEŇOVÝ HŘEB, VPRAVO UMISŤOVÁNÍ DLAHY NA KOST (ZDROJ: UPRAVENO Z [1], [8]).....	16
OBRÁZEK 3 SROVNÁNÍ HOJENÍ KOSTNÍCH DEFEKTŮ U MYŠÍ PŘI POUŽITÍ GFOGER A PŘI PŘIROZENÉM HOJENÍ (ZDROJ: UPRAVENO Z [9]).....	17
OBRÁZEK 4 VLEVO NAHOŘE KERAMICKÝ SCAFFOLD, VPRAVO NAHOŘE SCAFFOLD Z BIODEGRADOVATELNÉHO KOVU A DOLE KOLAGENNÍ SCAFFOLD (ZDROJ: UPRAVENO Z [22], [23]).....	23
OBRÁZEK 5 VLEVO KULTIVAČNÍ PLAST S NADÁVKOVANOU DISPERZÍ KOLAGENU, VPRAVO SNÍMEK VZORKŮ V SÍŤOVACÍM MÉDIU	32
OBRÁZEK 6 VLEVO VÁLEČEK S PĚTI VZORKY TĚSNĚ PŘED IMPLANTACÍ DO POKUSNÉHO ZVÍŘETE, VPRAVO SNÍMEK Z IMPLANTACE VZORKU DO PERITONEA POKUSNÉHO SUBJEKTU (NA SNÍMKU JE JIŽ JEDEN Z DVOJICE VÁLEČKŮ UMÍSTĚN A PŘÍŠIT K VNITŘNÍ STRANĚ PERITONEA).....	33
OBRÁZEK 7 SNÍMEK KULTIVAČNÍCH NÁDOB SE VŠEMI KONCENTRACEMI KOLAGENÁZY URČENÉ KE KULTIVACI PO DOBU SEDMI DNŮ (HORNÍ MENŠÍ NÁDOBKY NAPLNĚNY VZORKY URČENÝMI PRO TESTY HMOTNOSTNÍCH ÚBYTKŮ - NAVLEČENY NA VLASEC)	34
OBRÁZEK 8 GEOMETRICKÉ PARAMETRY ZKUŠEBNÍHO VZORKU DLE NORMY ČSN ISO 13314	36
OBRÁZEK 9 TYPICKÝ PRŮBĚH ZATĚŽOVÁNÍ CHARAKTERIZOVANÝ ZÁVISLOSTÍ SÍLA - ČAS.....	37
OBRÁZEK 10 PRŮBĚH ZÁVISLOSTI POSUV - ČAS PŘI ZATĚŽOVÁNÍ TLAKEM.....	37
OBRÁZEK 11 TYPICKÝ GRAF ZÁVISLOSTI SMLUVNÍHO NAPĚTÍ NA POMĚRNÉM PRODLOUŽENÍ PRO TESTOVANÉ KOLAGENNÍ VZORKY (DLE ČSN ISO 13314)	39

OBRÁZEK 12 GRAF SMLUVNÍHO NAPĚTÍ V ZÁVISLOSTI NA POMĚRNÉM PRODLOUŽENÍ S VYZNAČENÝM VYHODNOCENÍ STABILNÍ HLADINY NAPĚTÍ.....	39
OBRÁZEK 13 HYSTEREZNÍ SMYČKA A PŘÍMKA PRO URČENÍ ELASTICKÉHO GRADIENTU (VZOREK MEM_0_8).....	40
OBRÁZEK 14 GRAF ZÁVISLOSTI SMLUVNÍ NAPĚTÍ - POMĚRNÁ DEFORMACE S VYZNAČENOU OBLASTÍ REPREZENTUJÍCÍ ABSORBOVANOU ENERGII.....	41
OBRÁZEK 15 GRAF ZÁVISLOSTI SMLUVNÍ NAPĚTÍ - POMĚRNÁ DEFORMACE S VYZNAČENÝMI OBLASTMI REPREZENTUJÍCÍ ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE	42
OBRÁZEK 16 PŘÍKLAD VZORKU VYŘAZENÉHO Z VYHODNOCENÍ ELASTICKÉHO GRADIENTU.....	42
OBRÁZEK 17 GRAF STABILNÍCH HLADIN NAPĚTÍ SKUPIN VZORKŮ DLE DOBY EXPOZICE V MEDIU (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA $> \alpha$; MANN–WHITNEY TEST; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9).....	52
OBRÁZEK 18 GRAF STABILNÍCH HLADIN NAPĚTÍ SKUPIN VZORKŮ DLE MÉDIÍ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA $> \alpha$; MANN–WHITNEY TEST-KMID A IN VIVO; T-TEST – KMIN A KMAX; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9). PRVNÍ VYNESENÁ HODNOTA VŽDY REPREZENTUJE SKUPINU PBS_0 (REFERENČNÍ)...	53
OBRÁZEK 19 GRAF ELASTICKÝCH GRADIENTŮ SKUPIN VZORKŮ DLE DOBY EXPOZICE V MEDIU (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA $> \alpha$; MANN–WHITNEY TEST; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9).....	54
OBRÁZEK 20 GRAF ELASTICKÝCH GRADIENTŮ SKUPIN VZORKŮ DLE MÉDIÍ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA $> \alpha$; MANN–WHITNEY TEST-KMID A IN VIVO; T-TEST – KMIN A KMAX; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9) PRVNÍ VYNESENÁ HODNOTA VŽDY REPREZENTUJE SKUPINU PBS_0 (REFERENČNÍ)	55
OBRÁZEK 21 GRAF ABSORBOVANÝCH ENERGIÍ SKUPIN VZORKŮ DLE DOBY EXPOZICE V MEDIU (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA $> \alpha$; MANN–WHITNEY TEST; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9).....	56
OBRÁZEK 22 GRAF ABSORBOVANÝCH ENERGIÍ SKUPIN VZORKŮ DLE MÉDIÍ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA	

P HODNOTA > A; MANN–WHITNEY TEST- KMID; T-TEST– KMIN, KMAX A IN VIVO; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9). PRVNÍ VYNESENÁ HODNOTA VŽDY REPREZENTUJE SKUPINU PBS__0 (REFERENČNÍ).....	57
OBRÁZEK 23 GRAF ÚČINNOSTÍ ABSORPCE ENERGIE SKUPIN VZORKŮ DLE DOBY EXPOZICE V MEDIU (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA > A; MANN–WHITNEY TEST; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9)	58
OBRÁZEK 24 GRAF ÚČINNOSTÍ ABSORPCE ENERGIE SKUPIN VZORKŮ DLE MÉDIÍ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA > A; MANN– WHITNEY TEST- KMIN A KMAX; T-TEST- KMID A IN VIVO; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=9). PRVNÍ VYNESENÁ HODNOTA VŽDY REPREZENTUJE SKUPINU PBS__0 (REFERENČNÍ)....	59
OBRÁZEK 25 GRAF HMO TNOSTNÍCH ÚBYTKŮ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA > A; MANN–WHITNEY TEST; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=7).....	60
OBRÁZEK 26 GRAF HMO TNOSTNÍCH ÚBYTKŮ SKUPIN VZORKŮ DLE MÉDIÍ (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA > A; MANN– WHITNEY TEST- KMIN A KMAX; T-TEST- KMID A IN VIVO; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; V PRŮMĚRU N=7).....	61
OBRÁZEK 27 VZORKY POUŽITÉ PRO SEM ANALÝZU KULTIVOVANÉ 21 DNÍ V ROZTOKU KOLAGENÁZY (CELKOVÝ NÁHLED), ZVĚTŠENÍ 50X.	62
OBRÁZEK 28 SEM SNÍMKY STRUKTURY JEDNOTLIVÝCH SKUPIN (POROVNÁNÍ STRUKTURY) PO 21 DENNÍ EXPOZICI, ZVĚTŠENÍ 500X.....	64
OBRÁZEK 29 SEM SNÍMKY USAZENIN V KOLAGENOVÝCH SCAFFOLDECH PO 21-DENNÍ EXPOZICI V JEDNOTLIVÝCH PROSTŘEDÍCH, ZVĚTŠENÍ 5000X.	65
OBRÁZEK 30 OBLAST 1660 – PLOCHY POD KŘIVKOU (ČERNÉ SVORKY V HORNÍ ČÁSTI GRAFU VYZNAČUJÍ SKUPINY, U NICHŽ BYLA P HODNOTA > A; T-TESTY; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; N=10).....	66
OBRÁZEK 31 POROVNÁNÍ POMĚRU PLOCH OBLASTÍ 1660 A 1690 (STŘEDNÍ HODNOTY VYKAZUJÍ STATISTICKY VÝZNAMNÝ ROZDÍL; T-TESTY; HLADINA VÝZNAMNOSTI TESTU A BYLA 0,05; N=20).....	67

12. SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 PŘÍKLADY OZNAČOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ	35
TABULKA 2 POČTY VZORKŮ VE SKUPINÁCH	35
TABULKA 3 BAREVNÁ ŠKÁLA PRO HODNOCENÍ VELIKOSTI EFEKTU.....	51

13. SEZNAM ROVNIC

(1) POMĚRNÉ PRODLOUŽENÍ	38
(2) SMLUVNÍ NAPĚTÍ	38
(3) ABSORBOVANÁ ENERGIE.....	41
(4) ÚČINNOST ABSORBCE ENERGIE.....	41
(5) VÝPOČET HMOTNOSTNÍCH ÚBYTKŮ.....	43
(6) SHAPIRO-WILKŮV TEST NORMALITY	46
(7) SHAPIRO-WILKŮV TEST NORMALITY - $\alpha_{(i)}$	46
(8) ROZPTYL.....	47
(9) F-TEST	47
(10) F-TEST – STUPNĚ VOLNOSTI.....	47
(11) T-TEST SE SHODNÝMI ROZPTYLY (RŮZNÁ N)	48
(12) T-TEST SE SHODNÝMI ROZPTYLY (SHODNÁ N)	48
(13) T-TEST SE SHODNÝMI ROZPTYLY – STUPNĚ VOLNOSTI	48
(14) T-TEST S RŮZNÝMI ROZPTYLY	48
(15) T-TEST S RŮZNÝMI ROZPTYLY – STUPNĚ VOLNOSTI	48
(16) MANN-WHITNEYŮV TEST - POŘADÍ.....	49
(17) MANN-WHITNEYŮV TEST	49
(18) BONFERRONIHO KOREKCE	49
(19) COHENOVO D (Z PRŮMĚRŮ).....	50
(20) COHENOVO D (ZE Z-HODNOTY)	50
(21) Z-HODNOTA (Z U-HODNOT)	50

14. SEZNAM PŘÍLOH

1. PŘÍLOHA A.....	83
1.1. MECHANICKÉ VLASTNOSTI – SOUHRN.....	83
1.2. MECHANICKÉ VLASTNOSTI – JEDNOTLIVÉ VZORKY	83
1.3. CHARAKTERISTICKÉ GRAFY JEDNOTLIVÝCH SKUPIN.....	89
1.3.1. KMIN	89

1.3.2. KMID	90
1.3.3. KMAX.....	91
1.3.4. IN VIVO	92
1.4. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY	93
1.5. VÝSLEDKY FTIR ANALÝZY.....	94
2. PŘÍLOHA B	96
2.1. VÝSLEDKY STATISTICKÉ ANALÝZY	96
2.1.1. MECHANICKÉ TESTY-NORMALITA	96
2.1.2. Q-Q GRAFY.....	97
2.1.3. MECHANICKÉ TESTY-POROVNÁNÍ S IN VIVO	103
2.1.4. MECHANICKÉ TESTY-POROVNÁNÍ V RÁMCI MÉDIA.....	104
2.1.5. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-NORMALITA.....	110
2.1.6. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-POROVNÁNÍ S IN VIVO.....	112
2.1.7. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-POROVNÁNÍ V RÁMCI MÉDIA.....	112
2.1.8. FTIR ANALÝZA – OBLAST 1660	116
2.1.9. FTIR ANALÝZA – POMĚR 1660/1690.....	117

1. PŘÍLOHA A

1.1. MECHANICKÉ VLASTNOSTI – SOUHRN

Skupina	Stabilní hladina napětí [kPa]		Elastický gradient [kPa]		Absorbovaná energie [kJ/m ³]		Účinnost absorpce energie [%]	
	Průměr	Medián	Průměr	Medián	Průměr	Medián	Průměr	Medián
PBS_0	5,54	5,77	64,37	71,08	2,66	2,80	63,08	61,84
KMIN_1	5,54	5,58	49,64	50,04	2,75	2,72	52,96	52,10
KMIN_7	3,96	3,51	33,59	38,91	1,94	1,89	60,46	61,68
KMIN_14	2,30	2,44	25,50	24,97	1,09	1,20	65,16	63,83
KMIN_21	2,04	1,77	26,65	30,39	1,05	0,98	67,41	64,67
KMID_1	4,98	4,94	39,61	40,25	2,49	2,38	53,35	52,71
KMID_7	5,55	4,92	46,55	39,10	2,77	2,36	53,50	53,77
KMID_14	1,78	1,58	27,67	20,92	0,87	0,76	64,52	66,83
KMID_21	2,70	3,13	39,64	38,69	1,28	1,47	71,25	73,00
KMAX_1	6,02	5,90	72,71	71,02	3,03	3,12	52,53	51,28
KMAX_7	4,79	5,14	44,59	40,83	2,34	2,47	57,20	55,74
KMAX_14	2,16	2,02	24,96	25,61	1,00	1,01	65,32	65,31
KMAX_21	2,76	2,60	33,38	25,10	1,35	1,29	63,93	63,02
IN VIVO_7	7,14	6,58	45,18	41,00	4,11	3,89	42,30	43,68
IN VIVO_14	9,04	9,02	52,89	49,16	4,71	4,66	42,15	42,22
IN VIVO_21	7,67	7,93	53,39	54,36	3,86	3,99	45,05	42,51

1.2. MECHANICKÉ VLASTNOSTI – JEDNOTLIVÉ VZORKY

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
PBS_0_1	4,66	36,70	2,30	58,12
PBS_0_2	6,03	61,13	2,80	59,67
PBS_0_3	3,54	23,36	1,68	66,44
PBS_0_4	5,88	77,68	2,90	61,84
PBS_0_5	5,77	71,08	2,68	61,39
PBS_0_6	6,34	91,58	3,08	64,68
PBS_0_7	7,53	107,19	3,57	71,08
PBS_0_8	4,32	31,13	2,03	64,04
PBS_0_9	5,76	79,46	2,89	60,46
Průměr	5,54	64,37	2,66	63,08
Medián	5,77	71,08	2,80	61,84
SD	1,12	27,05	0,54	3,75

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMIN_1_1	5,58	52,51	2,70	52,87
KMIN_1_2	5,32	50,04	2,72	52,10
KMIN_1_3	7,18	104,78	3,68	55,80
KMIN_1_4	3,86	17,30	2,00	51,37
KMIN_1_5	6,33	45,55	3,03	51,75
KMIN_1_6	6,53	59,37	3,10	49,19
KMIN_1_7	3,93	17,96	2,01	57,66
Průměr	5,54	49,64	2,75	52,96
Medián	5,58	50,04	2,72	52,10
SD	1,18	27,28	0,56	2,65

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMIN_7_1	3,51	50,89	1,89	66,54
KMIN_7_2	3,41	19,72	1,62	61,68
KMIN_7_3	4,54	38,91	2,09	58,77
KMIN_7_4	5,51	47,73	2,81	47,05
KMIN_7_5	4,01	58,03	2,01	59,51
KMIN_7_6	3,28	12,87	1,65	62,70
KMIN_7_7	3,39	16,60	1,69	63,53
KMIN_7_8	4,92	42,96	2,22	63,43
KMIN_7_9	3,11	14,63	1,51	60,97
Průměr	3,96	33,59	1,94	60,46
Medián	3,51	38,91	1,89	61,68
SD	0,80	16,61	0,38	5,22

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMIN_14_1	2,55	13,28	1,23	63,83
KMIN_14_2	2,27	24,97	1,12	56,48
KMIN_14_3	1,47	22,99	0,73	63,81
KMIN_14_4	3,43	40,94	1,57	65,80
KMIN_14_5	2,59	26,64	1,22	61,10
KMIN_14_6	3,35	28,19	1,42	63,97
KMIN_14_7	2,44	24,77	1,20	55,22
KMIN_14_8	1,21	17,70	0,56	83,66
KMIN_14_9	1,35	30,00	0,71	72,56
Průměr	2,30	25,50	1,09	65,16
Medián	2,44	24,97	1,20	63,83
SD	0,77	7,34	0,33	8,12

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMIN_21_1	4,05	39,88	1,81	68,77
KMIN_21_2	2,61	30,39	1,30	61,69
KMIN_21_3	2,94	39,23	1,51	58,80
KMIN_21_4	1,77	-	1,07	90,65
KMIN_21_5	1,10	9,98	0,69	81,35
KMIN_21_6	1,82	26,89	0,98	59,65
KMIN_21_7	1,55	21,09	0,85	65,52
KMIN_21_8	1,54	32,78	0,65	64,67
KMIN_21_9	0,95	36,59	0,57	55,57
Průměr	2,04	28,81	1,05	67,41
Medián	1,77	31,58	0,98	64,67
SD	0,94	11,22	0,40	10,82

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMID_1_1	6,89	65,11	3,47	49,68
KMID_1_2	4,05	18,91	2,10	49,36
KMID_1_3	5,21	50,75	2,75	47,49
KMID_1_4	4,79	40,25	2,27	60,18
KMID_1_5	5,73	57,54	2,69	58,09
KMID_1_6	3,25	-	1,78	55,94
KMID_1_7	4,94	33,41	2,38	52,71
Průměr	4,98	44,33	2,49	53,35
Medián	4,94	45,50	2,38	52,71
SD	1,08	15,43	0,50	4,47

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMID_7_1	7,05	60,81	3,32	54,33
KMID_7_2	4,46	32,44	2,10	53,77
KMID_7_3	3,77	20,89	1,85	53,11
KMID_7_4	5,90	88,85	2,84	56,28
KMID_7_5	4,75	39,10	2,24	54,32
KMID_7_6	3,44	-	1,83	61,69
KMID_7_7	10,76	80,42	5,88	42,57
KMID_7_8	4,92	51,39	2,55	53,16
KMID_7_9	4,92	34,83	2,36	52,28
Průměr	5,55	51,09	2,77	53,50
Medián	4,92	45,24	2,36	53,77
SD	2,10	22,50	1,18	4,68

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMID_14_1	1,79	15,51	0,76	66,83
KMID_14_2	1,48	18,53	0,62	72,08
KMID_14_3	1,53	24,30	0,79	54,62
KMID_14_4	1,71	42,94	1,10	51,66
KMID_14_5	0,97	19,25	0,47	75,12
KMID_14_6	2,40	34,50	1,13	68,64
KMID_14_7	1,57	20,92	0,75	62,05
KMID_14_8	1,58	20,06	0,70	76,36
KMID_14_9	2,97	53,07	1,55	53,35
Průměr	1,78	27,67	0,87	64,52
Medián	1,58	20,92	0,76	66,83
SD	0,55	12,21	0,31	8,98

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMID_21_1	3,13	61,36	1,57	70,56
KMID_21_2	3,27	45,70	1,47	73,00
KMID_21_3	3,43	65,55	1,57	77,70
KMID_21_4	2,80	30,79	1,19	79,36
KMID_21_5	3,90	43,25	1,91	64,60
KMID_21_6	3,14	38,69	1,47	66,84
KMID_21_7	1,71	26,78	0,94	59,98
KMID_21_8	1,68	17,76	0,78	73,25
KMID_21_9	1,21	26,90	0,63	75,95
Průměr	2,70	39,64	1,28	71,25
Medián	3,13	38,69	1,47	73,00
SD	0,88	15,20	0,40	6,04

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMAX_1_1	5,61	50,42	2,93	48,44
KMAX_1_2	6,86	76,46	3,50	47,97
KMAX_1_3	6,39	92,43	3,13	60,13
KMAX_1_4	4,46	65,11	2,24	51,28
KMAX_1_5	5,90	71,02	2,85	56,71
KMAX_1_6	7,07	94,12	3,41	57,01
KMAX_1_7	5,87	59,44	3,12	46,20
Průměr	6,02	72,71	3,03	52,53
Medián	5,90	71,02	3,12	51,28
SD	0,81	15,10	0,38	4,99

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMAX_7_1	5,04	32,91	2,54	47,71
KMAX_7_2	5,23	43,24	2,39	52,13
KMAX_7_3	4,12	17,46	2,16	56,23
KMAX_7_4	5,70	76,91	2,87	55,35
KMAX_7_5	5,91	71,62	2,95	56,13
KMAX_7_6	2,52	9,46	1,38	76,68
KMAX_7_7	3,89	38,42	1,68	58,67
KMAX_7_8	5,95	66,73	2,75	54,73
Průměr	4,79	44,59	2,34	57,20
Medián	5,14	40,83	2,47	55,74
SD	1,12	23,49	0,53	7,98

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
KMAX_14_1	1,93	30,60	1,01	58,30
KMAX_14_2	3,41	31,29	1,52	63,93
KMAX_14_3	2,39	20,52	1,03	65,81
KMAX_14_4	2,75	30,79	1,21	68,51
KMAX_14_5	2,02	25,61	0,93	73,39
KMAX_14_6	2,25	30,04	1,08	68,35
KMAX_14_7	1,67	20,03	0,78	65,31
KMAX_14_8	1,44	17,39	0,69	64,78
KMAX_14_9	1,60	18,34	0,79	59,49
Průměr	2,16	24,96	1,00	65,32
Medián	2,02	25,61	1,01	65,31
SD	0,59	5,55	0,24	4,35

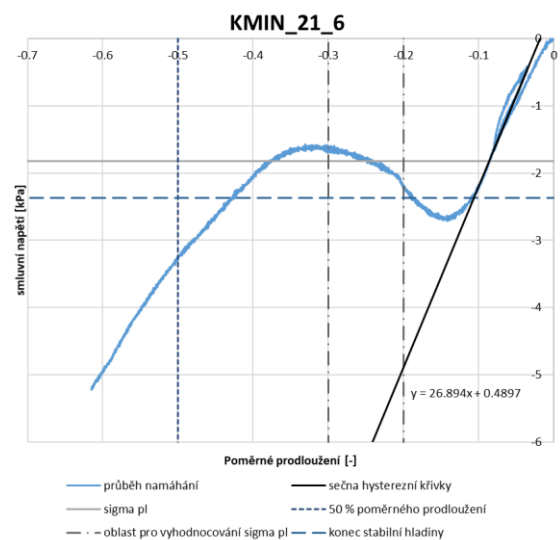
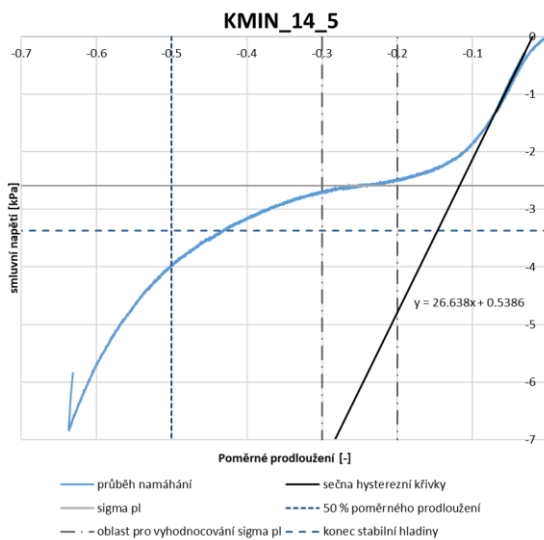
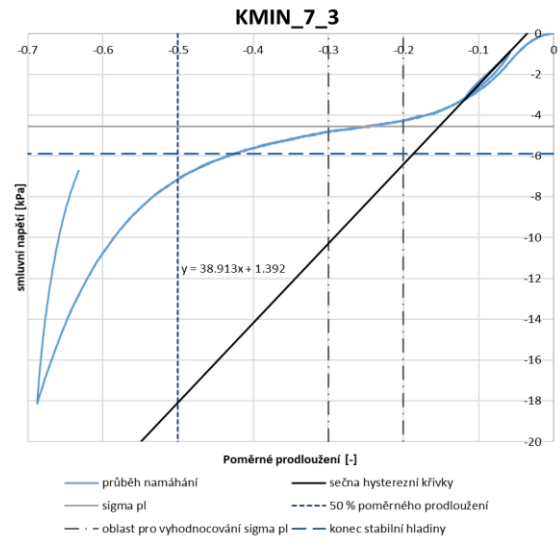
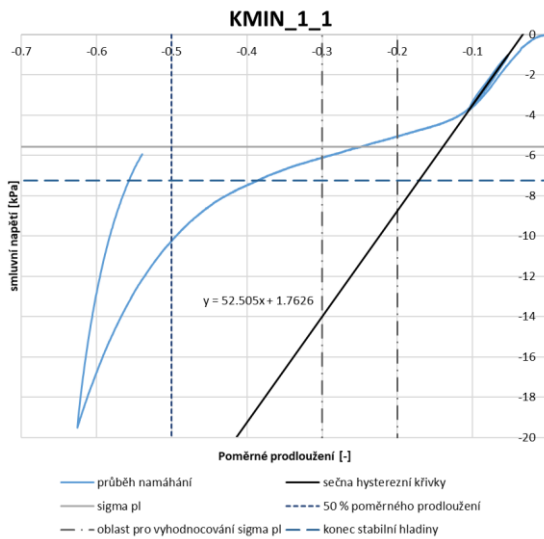
Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
IN VIVO_7_1	6,96	37,52	4,02	38,96
IN VIVO_7_2	11,89	70,19	6,39	47,63
IN VIVO_7_3	5,95	44,50	3,37	43,68
IN VIVO_7_4	6,58	41,00	3,87	46,90
IN VIVO_7_5	5,07	42,77	2,82	42,07
IN VIVO_7_6	7,62	40,09	4,41	43,97
IN VIVO_7_7	5,90	40,18	3,89	32,90
Průměr	7,14	45,18	4,11	42,30
Medián	6,58	41,00	3,89	43,68
SD	2,08	10,41	1,04	4,69

Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
IN VIVO_14_1	5,87	32,28	2,97	38,15
IN VIVO_14_2	8,80	46,38	4,43	49,77
IN VIVO_14_3	6,18	40,06	3,47	35,70
IN VIVO_14_4	11,14	61,87	5,06	42,14
IN VIVO_14_5	4,30	32,49	2,28	46,49
IN VIVO_14_6	9,24	77,76	4,89	41,77
IN VIVO_14_7	11,10	53,96	6,31	42,30
IN VIVO_14_8	17,34	85,78	7,75	48,80
IN VIVO_14_9	9,27	48,76	5,74	43,96
IN VIVO_14_10	7,14	49,55	4,24	32,40
Průměr	9,04	52,89	4,71	42,15
Medián	9,02	49,16	4,66	42,22
SD	3,49	16,91	1,54	5,26

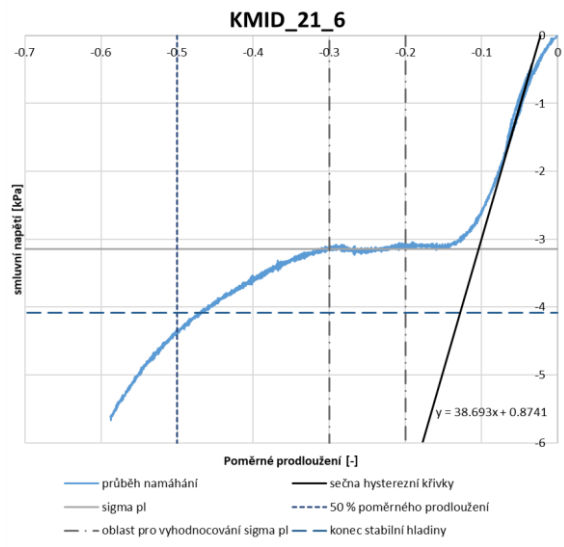
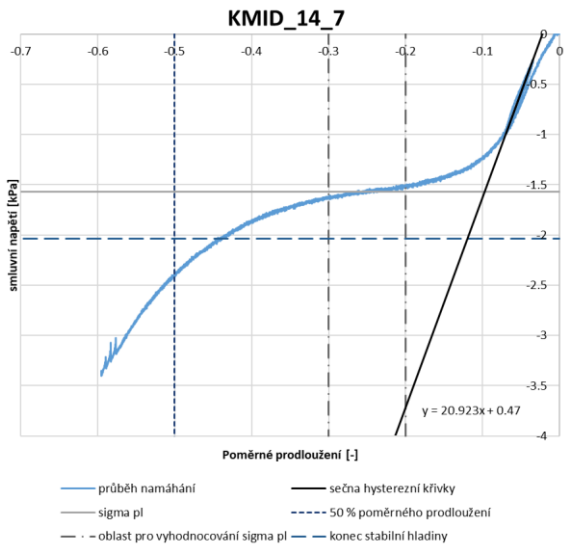
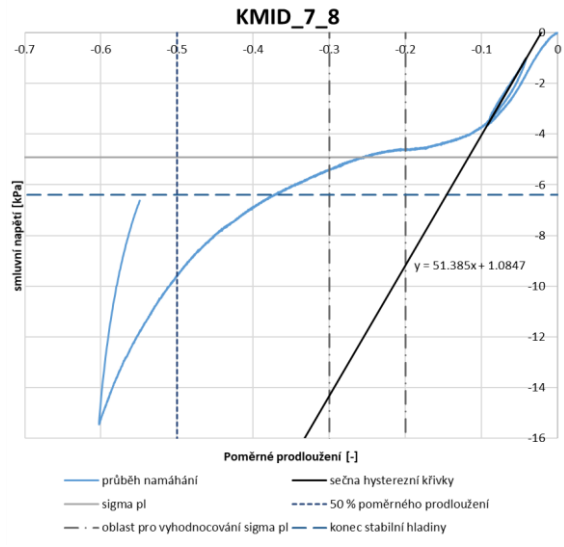
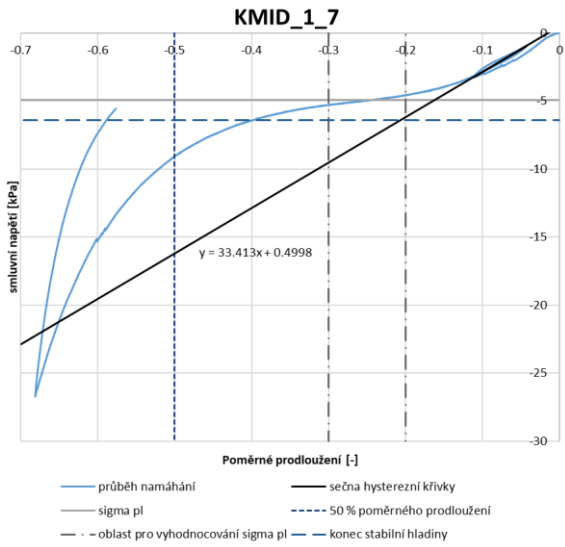
Označení vzorku	Stabilní hladina napětí [kPa]	Elastický gradient [kPa]	Absorbovaná energie [kJ/m ³]	Účinnost absorpce energie [%]
IN VIVO_21_1	10,38	60,97	6,04	40,98
IN VIVO_21_2	17,32	87,15	6,85	46,10
IN VIVO_21_3	7,33	55,91	4,46	39,80
IN VIVO_21_4	8,09	52,44	3,99	47,91
IN VIVO_21_5	1,84	-	0,97	41,57
IN VIVO_21_6	7,93	57,36	3,28	54,38
IN VIVO_21_7	9,04	54,36	4,66	42,51
IN VIVO_21_8	3,91	40,90	2,82	35,98
IN VIVO_21_9	3,16	31,04	1,70	56,22
Průměr	7,67	55,02	3,86	45,05
Medián	7,93	55,14	3,99	42,51
SD	4,36	15,23	1,80	6,38

1.3. CHARAKTERISTICKÉ GRAFY JEDNOTLIVÝCH SKUPIN

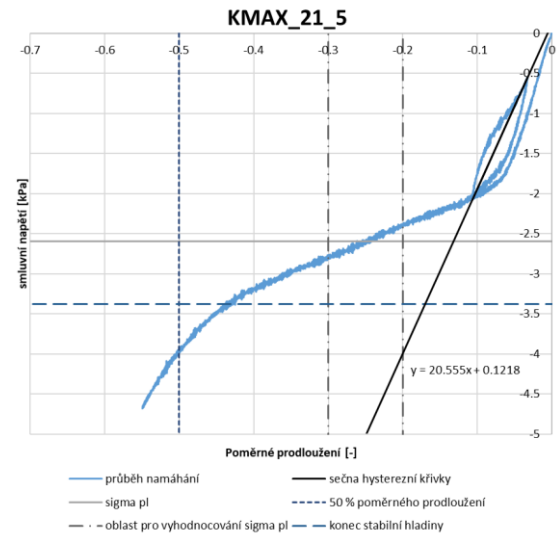
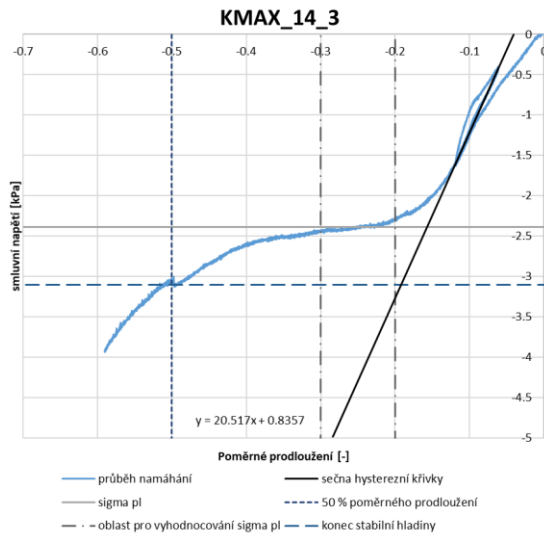
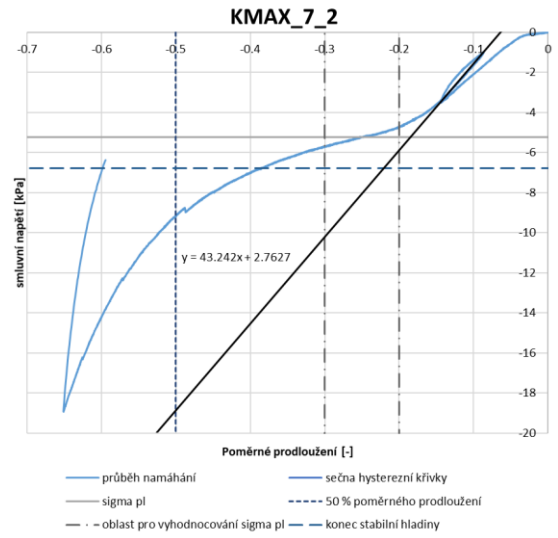
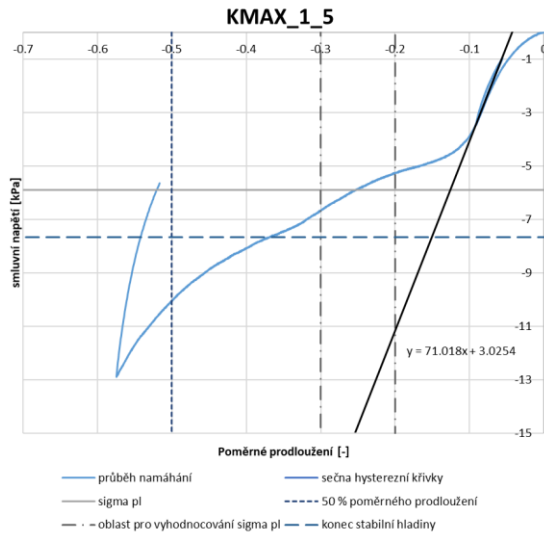
1.3.1. KMIN



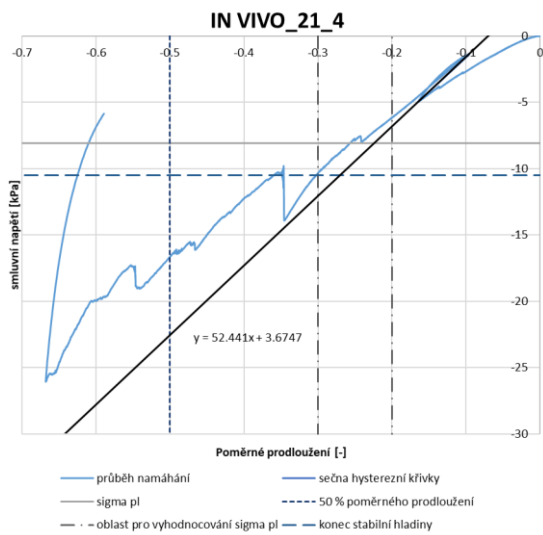
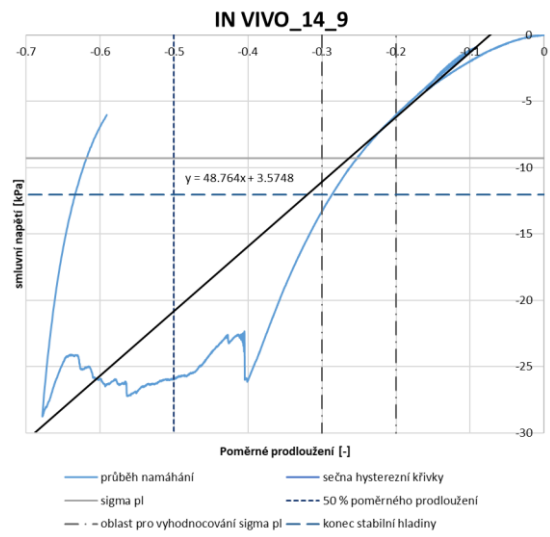
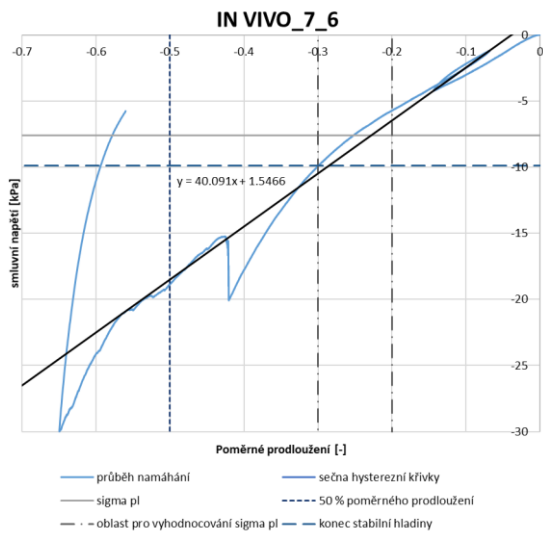
1.3.2. KMID



1.3.3. KMAX



1.3.4. IN VIVO



1.4. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY

Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]
KMIN_1_1(M)	0,74	KMID_1_1(M)	1,40	KMAX_1_1(M)	4,12
KMIN_1_2(M)	5,82	KMID_1_2(M)	2,14	KMAX_1_2(M)	0,00
KMIN_1_3(M)	1,14	KMID_1_3(M)	8,31	KMAX_1_3(M)	4,90
KMIN_1_4(M)	7,22	KMID_1_4(M)	4,22	KMAX_1_4(M)	4,20
KMIN_1_5(M)	1,22	KMID_1_5(M)	1,33	KMAX_1_5(M)	5,36
KMIN_1_6(M)	0,98	-	-	KMAX_1_6(M)	7,34
KMIN_1_7(M)	0,10	-	-	-	-
Průměr	2,46	Průměr	3,48	Průměr	4,32
Medián	1,14	Medián	2,14	Medián	4,55
SD	2,62	SD	2,63	SD	2,21

Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]
KMIN_7_1(M)	9,16	KMID_7_1(M)	15,49	KMAX_7_1(M)	5,38
KMIN_7_2(M)	31,04	KMID_7_2(M)	15,33	KMAX_7_2(M)	3,35
KMIN_7_3(M)	16,31	KMID_7_3(M)	7,94	KMAX_7_3(M)	12,74
KMIN_7_4(M)	4,24	KMID_7_4(M)	5,28	KMAX_7_4(M)	10,52
KMIN_7_5(M)	12,83	KMID_7_5(M)	20,02	KMAX_7_5(M)	5,16
KMIN_7_6(M)	4,47	KMID_7_6(M)	10,65	KMAX_7_6(M)	10,45
KMIN_7_7(M)	32,58	KMID_7_7(M)	6,86	-	-
Průměr	15,81	Průměr	11,65	Průměr	7,93
Medián	12,83	Medián	10,65	Medián	7,91
SD	10,88	SD	5,02	SD	3,45

Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]
IN VIVO_7_1(M)	-72,23	KMIN_14_1(M)	16,38	KMID_14_1(M)	12,74
IN VIVO_7_2(M)	-62,77	KMIN_14_2(M)	16,58	KMID_14_2(M)	22,37
IN VIVO_7_3(M)	-85,22	KMIN_14_3(M)	45,69	KMID_14_3(M)	30,50
IN VIVO_7_4(M)	-81,39	KMIN_14_4(M)	46,76	KMID_14_4(M)	35,67
IN VIVO_7_5(M)	-85,70	KMIN_14_5(M)	24,96	KMID_14_5(M)	56,47
IN VIVO_7_6(M)	-73,24	KMIN_14_6(M)	39,03	KMID_14_6(M)	15,97
IN VIVO_7_7(M)	-70,27	-	-	KMID_14_7(M)	32,01
IN VIVO_7_8(M)	-68,34	-	-	-	-
IN VIVO_7_9(M)	-62,99	-	-	-	-
IN VIVO_7_10(M)	-71,35	-	-	-	-
IN VIVO_7_11(M)	-40,98	-	-	-	-
Průměr	-70,41	Průměr	31,57	Průměr	29,39
Medián	-71,35	Medián	32,00	Medián	30,50
SD	11,95	SD	12,81	SD	13,56

Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]
KMAX_14_1(M)	21,32	IN VIVO_14_1(M)	-65,74	KMIN_21_1(M)	53,34
KMAX_14_2(M)	55,67	IN VIVO_14_2(M)	-46,43	KMIN_21_2(M)	64,39
KMAX_14_3(M)	20,33	IN VIVO_14_3(M)	-25,22	KMIN_21_3(M)	52,43
KMAX_14_4(M)	15,67	IN VIVO_14_4(M)	-52,12	KMIN_21_4(M)	42,64
KMAX_14_5(M)	18,38	IN VIVO_14_5(M)	-59,56	KMIN_21_5(M)	34,98
KMAX_14_6(M)	22,45	IN VIVO_14_6(M)	-55,80	KMIN_21_6(M)	44,09
KMAX_14_7(M)	32,22	IN VIVO_14_7(M)	-50,79	KMIN_21_7(M)	30,29
-	-	IN VIVO_14_8(M)	-72,68	-	-
-	-	IN VIVO_14_9(M)	-65,76	-	-
-	-	IN VIVO_14_10(M)	-46,13	-	-
-	-	IN VIVO_14_11(M)	-72,13	-	-
Průměr	26,58	Průměr	-55,67	Průměr	46,02
Medián	21,32	Medián	-55,80	Medián	44,09
SD	12,81	SD	13,21	SD	10,80

Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]	Označení vzorku	Hmotnostní úbytky [%]
KMID_21_1(M)	30,25	KMAX_21_1(M)	46,96	IN VIVO_21_1(M)	-94,65
KMID_21_2(M)	41,75	KMAX_21_2(M)	35,46	IN VIVO_21_2(M)	-122,33
KMID_21_3(M)	37,79	KMAX_21_3(M)	54,83	IN VIVO_21_3(M)	-99,04
KMID_21_4(M)	43,98	KMAX_21_4(M)	58,42	IN VIVO_21_4(M)	-111,15
KMID_21_5(M)	21,06	KMAX_21_5(M)	40,80	IN VIVO_21_5(M)	-108,74
KMID_21_6(M)	48,97	KMAX_21_6(M)	51,29	IN VIVO_21_6(M)	-98,89
-	-	KMAX_21_7(M)	37,43	IN VIVO_21_7(M)	-122,52
-	-	-	-	IN VIVO_21_8(M)	-123,37
Průměr	37,30	Průměr	46,46	Průměr	-110,09
Medián	39,77	Medián	46,96	Medián	-109,94
SD	9,26	SD	8,21	SD	11,01

1.5. VÝSLEDKY FTIR ANALÝZY

Oblast 1660	ORIGINAL	KMIN	KMID	KMAX	IN VIVO
	15,2	18,9	17,5	18,7	21,2
	17,7	19,1	18,9	17,4	20,6
	16,6	17,0	17,8	18,3	19,1
	17,5	18,2	19,7	19,4	20,8
	16,6	17,8	19,7	18,3	14,6
	16,6	18,0	17,6	18,6	23,2
	18,0	18,7	18,8	18,3	24,1
	17,2	18,4	19,2	18,3	20,5
	17,2	18,5	17,4	17,8	21,1
	18,0	17,6	18,7	17,9	17,9
Průměr	17,0	18,2	18,5	18,3	20,3
Medián	17,2	18,3	18,8	18,3	20,7
SD	0,80	0,60	0,86	0,53	2,54

	ORIGINAL	IN VIVO
Poměr 1660/1690	2,5	3,9
	2,7	3,2
	3,1	3,1
	3,6	3,6
	2,9	3,8
	2,5	4,7
	2,8	5,0
	3,5	4,9
	3,1	5,3
	2,8	4,0
	3,3	4,0
	3,3	3,9
	2,9	4,4
	2,8	4,4
	2,9	3,8
	3,0	4,9
	3,1	2,2
	2,8	3,6
2,8	4,3	
2,9	2,2	
Průměr	3,0	4,0
Medián	2,9	4,0
SD	0,30	0,82

2. PŘÍLOHA B

2.1. VÝSLEDKY STATISTICKÉ ANALÝZY

V následujících tabulkách jsou uvedeny p-hodnoty. Hladina významnosti všech prováděných testů byla 0,05.

2.1.1. MECHANICKÉ TESTY-NORMALITA

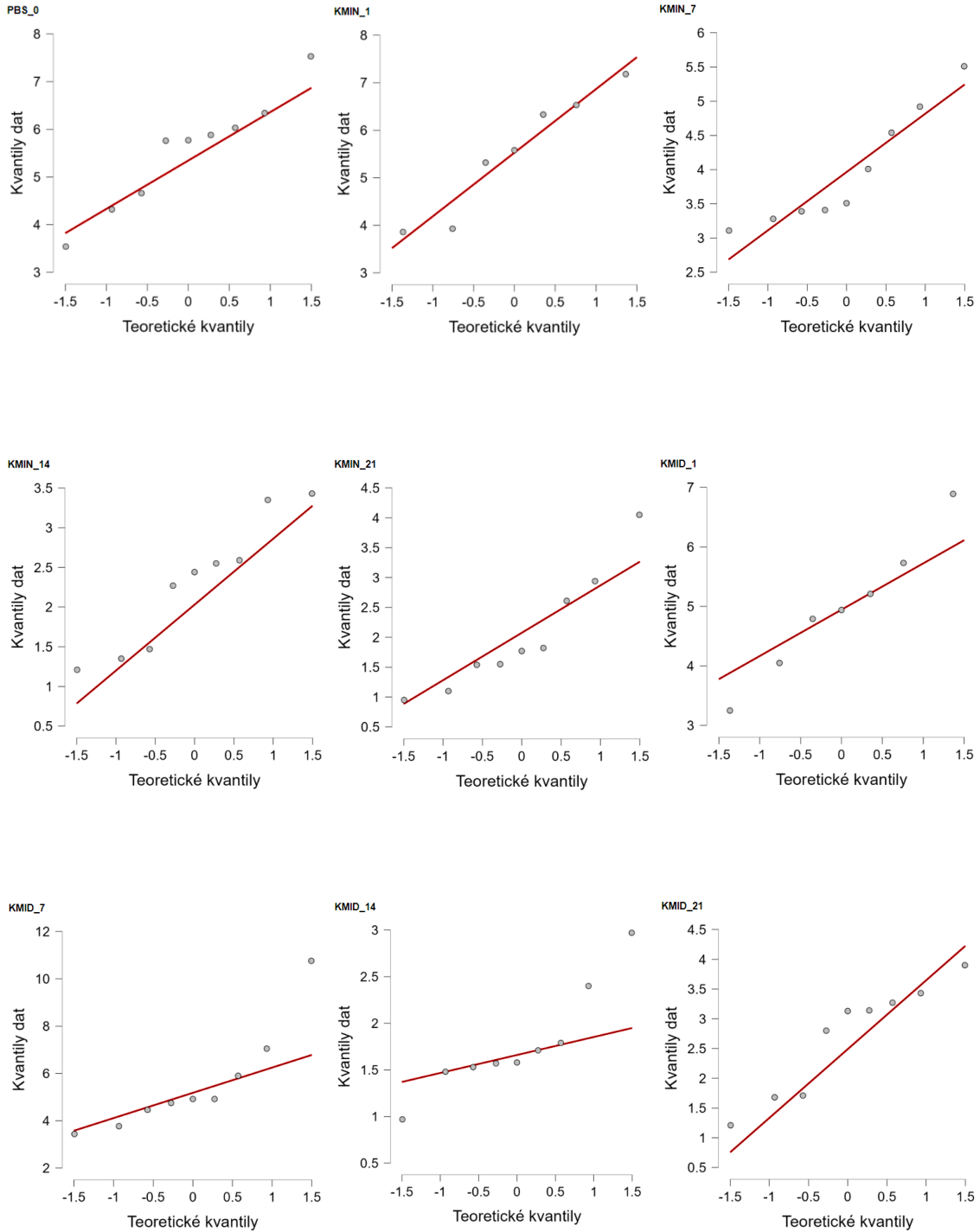
Shapiro-Wilk testy

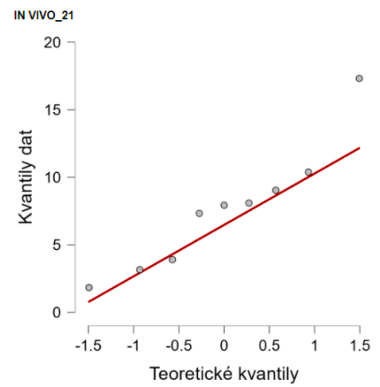
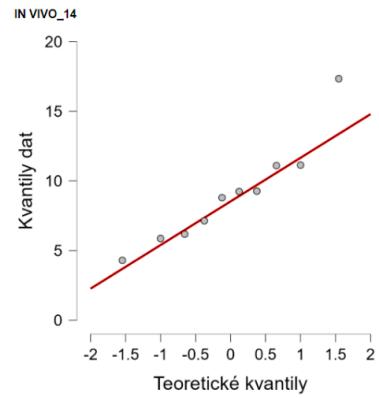
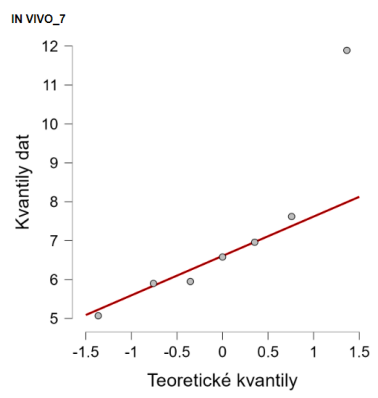
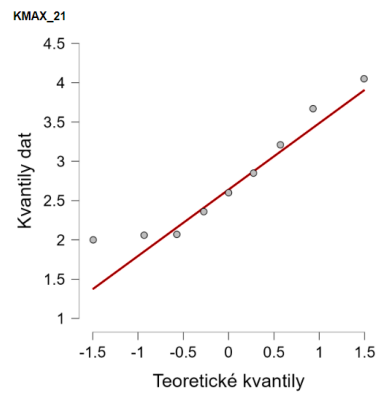
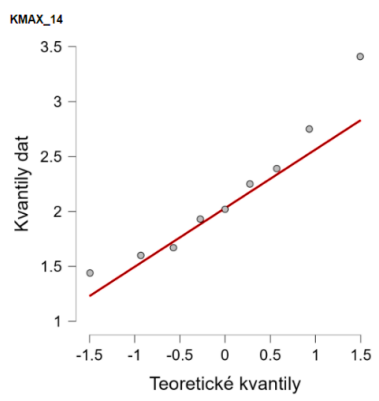
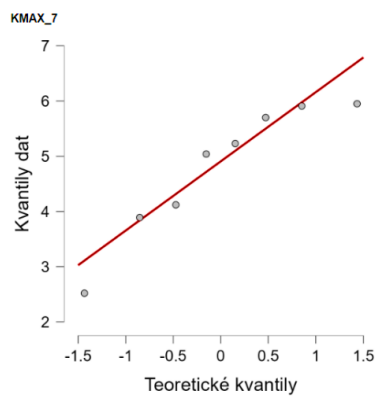
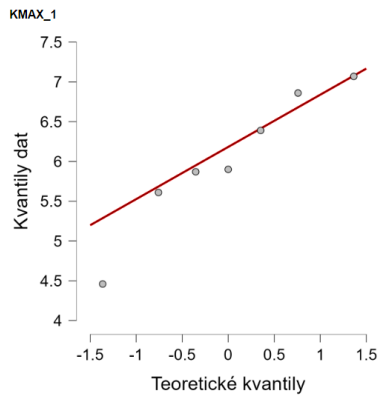
	SIGMA PLATEAU	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	0,740	0,663	0,869	0,618
KMIN_1	0,487	0,267	0,542	0,599
KMIN_7	0,141	0,154	0,212	0,017
KMIN_14	0,332	0,716	0,414	0,175
KMIN_21	0,253	0,133	0,525	0,099
KMID_1	0,983	0,945	0,833	0,589
KMID_7	0,026	0,567	0,003	0,063
KMID_14	0,157	0,049	0,244	0,306
KMID_21	0,230	0,607	0,602	0,777
KMAX_1	0,673	0,687	0,458	0,383
KMAX_7	0,247	0,538	0,416	0,017
KMAX_14	0,512	0,051	0,538	0,796
KMAX_21	0,273	0,172	0,169	0,366
IN VIVO_7	0,036	0,001	0,160	0,418
IN VIVO_14	0,296	0,341	0,989	0,819
IN VIVO_21	0,383	0,363	0,966	0,476

2.1.2. Q-Q GRAFY

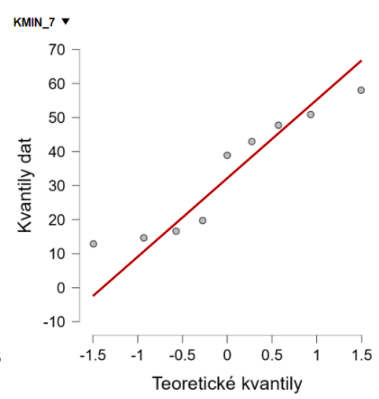
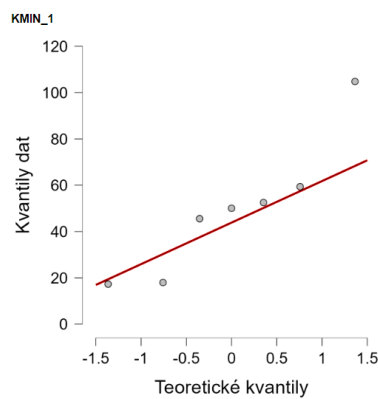
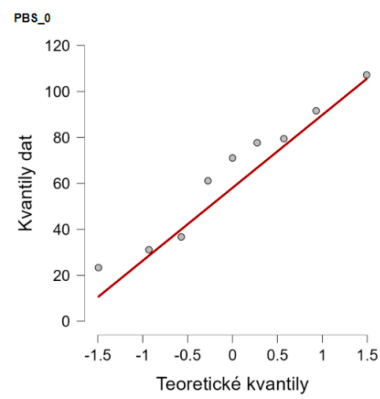
V následující části jsou uvedeny Q-Q grafy jednotlivých datových sad pro všechny sledované mechanické vlastnosti. Tyto grafy byly vytvořeny v programu JASP.

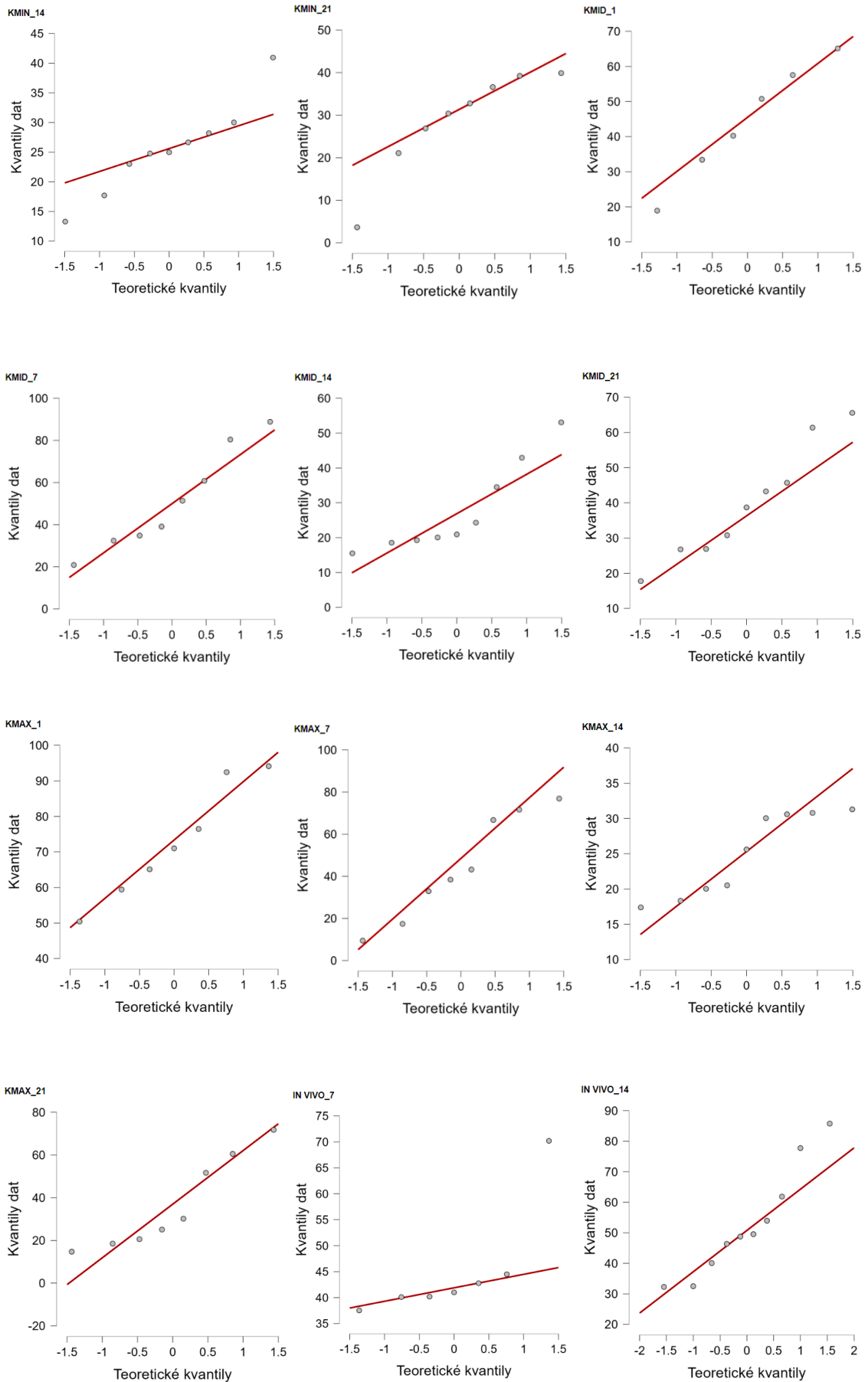
Stabilní hladina napětí

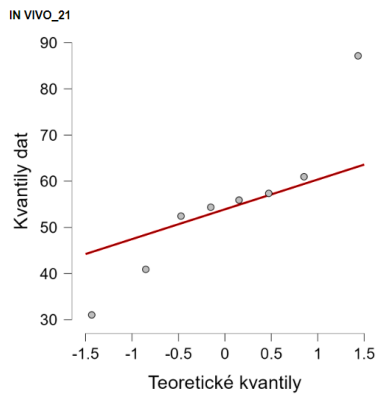




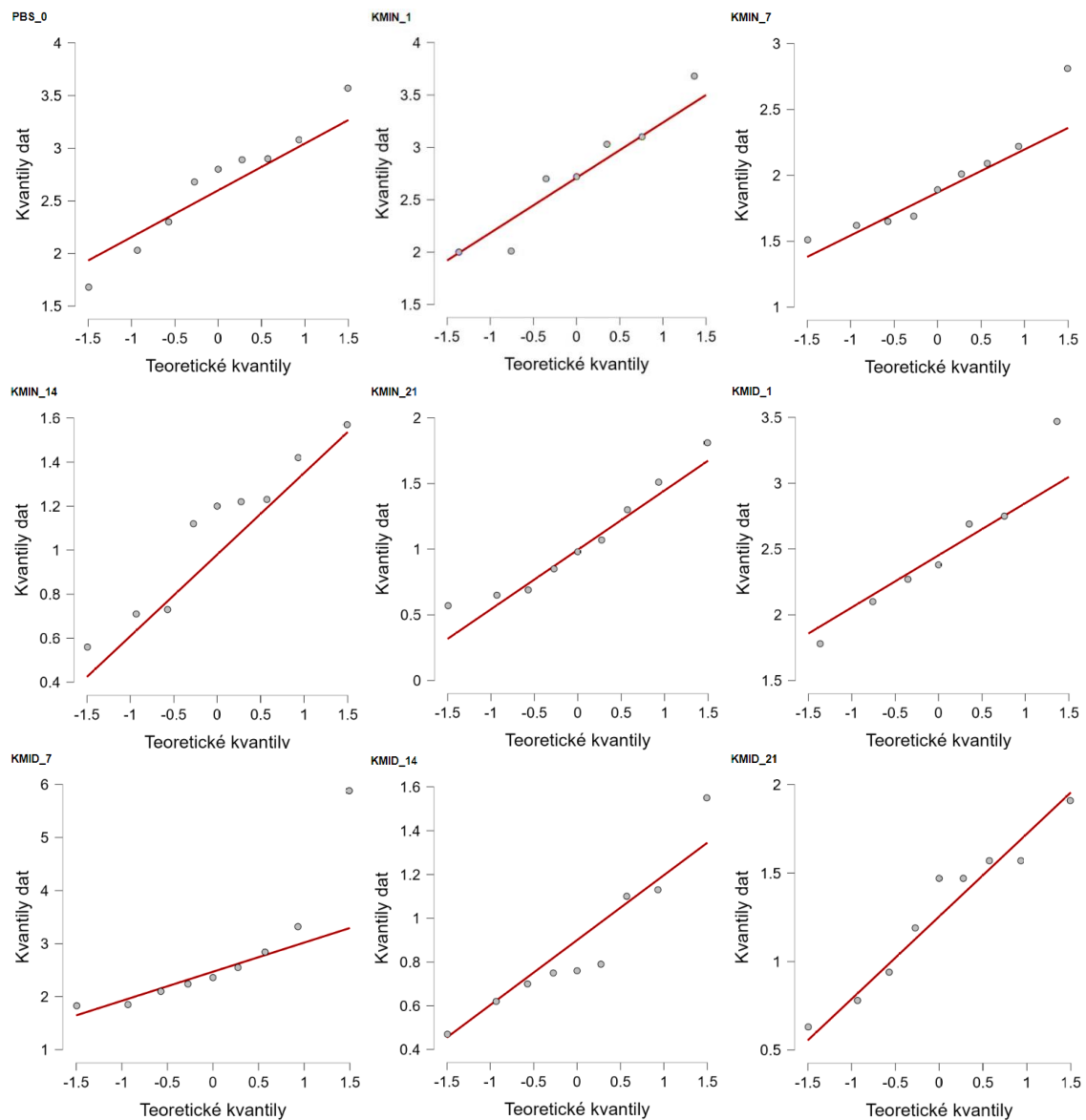
Elastický gradient

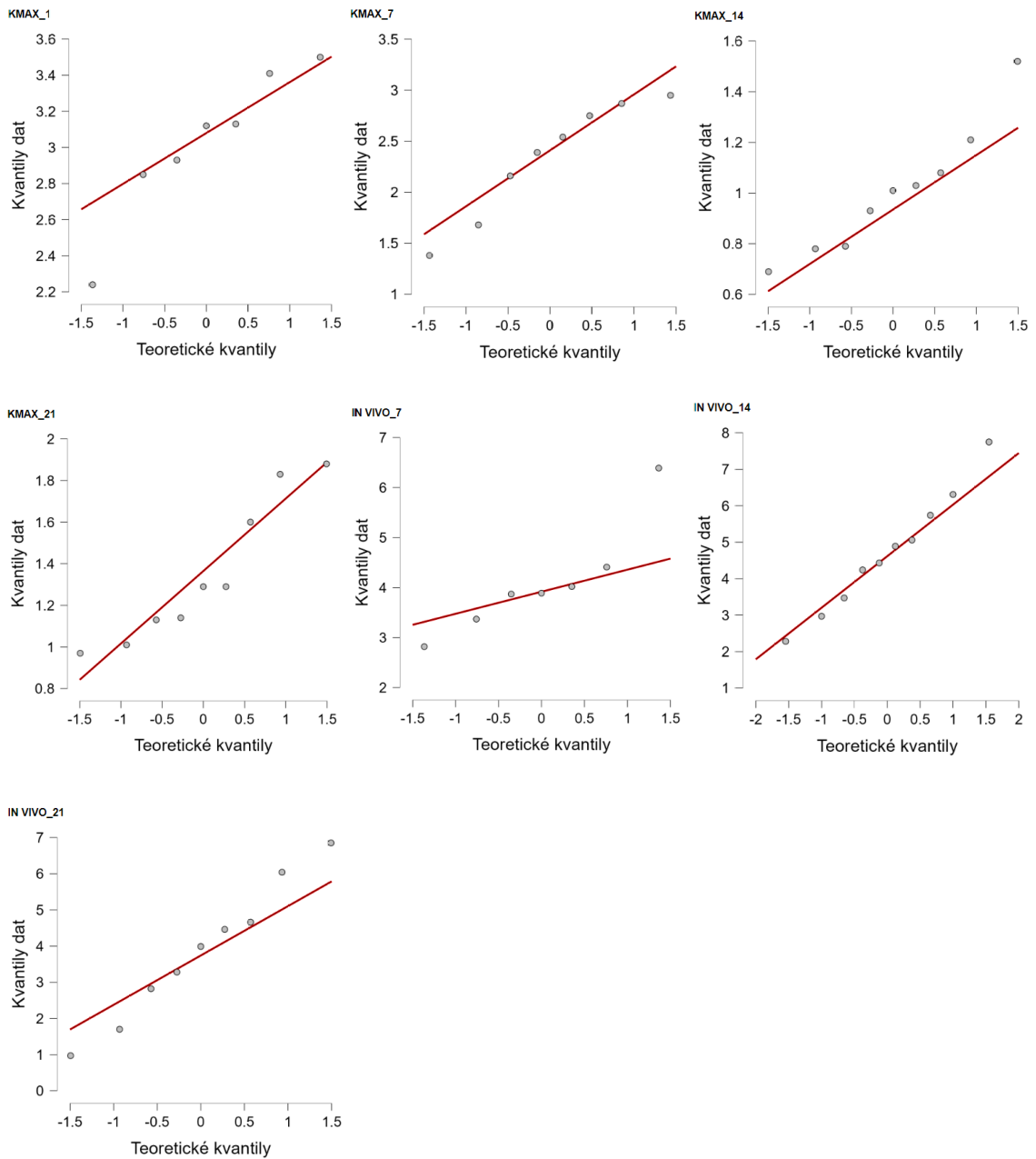




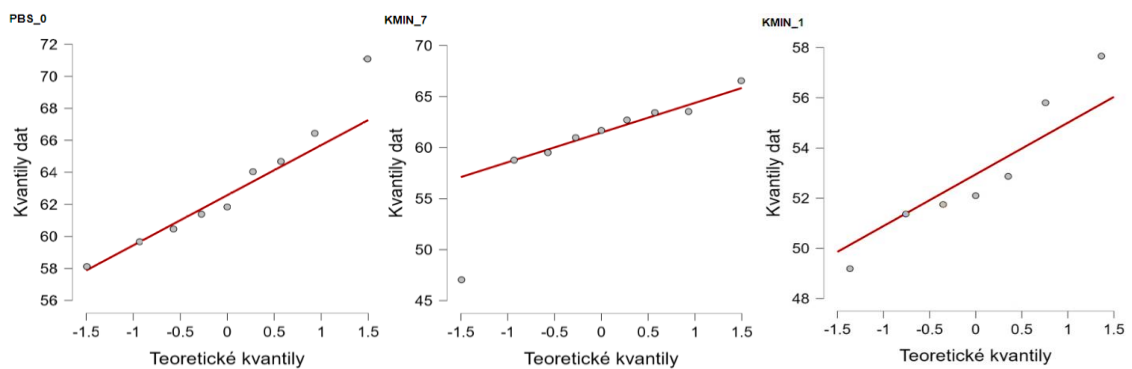


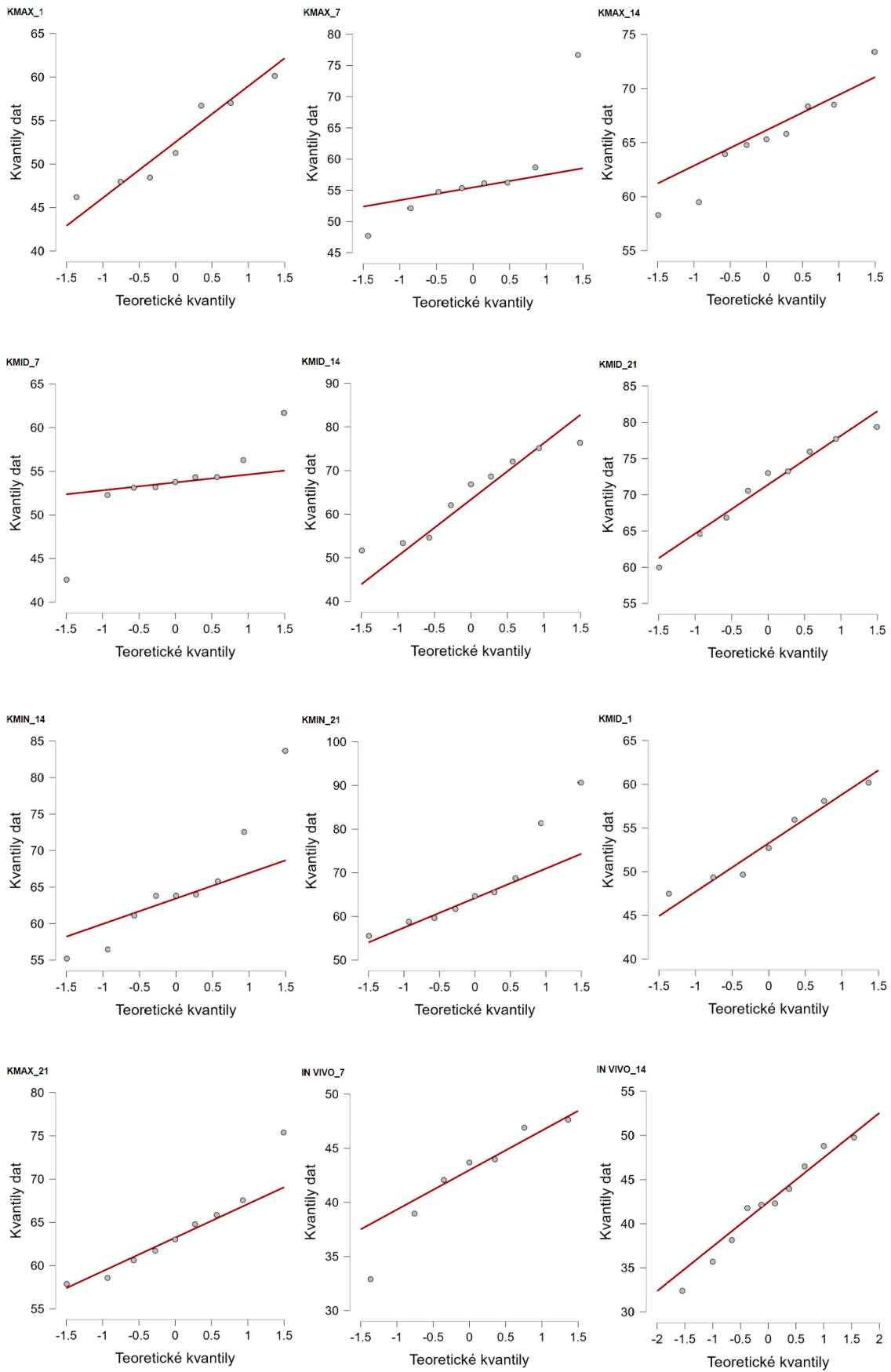
Absorbovaná energie

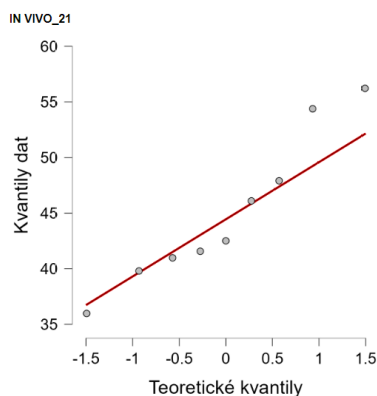




Účinnost absorpce energie







2.1.3. MECHANICKÉ TESTY-POROVNÁNÍ S IN VIVO

Mann-Whitney testy

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohena d a to ve tvaru p / d_{coh} .

všechna data porovnána s příslušnou skupinou IN VIVO		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
IN VIVO_7	KMIN_7	0,001 / 2,7 *	0,459 / 0,41 *	0,001 / 2,9	0,001 / 2,7 *
	KMID_7	0,057 / 1,1 *	0,954 / 0,24 *	0,015 / 1,6 *	0,004 / 2,1 *
	KMAX_7	0,013 / 1,7 *	0,862 / 0,12 *	0,003 / 2,2	0,001 / 3,1 *
IN VIVO_14	KMIN_14	0,000 / 2,6	0,001 / 2,1	0,000 / 3,2	0,000 / 3,4
	KMID_14	0,000 / 2,8	0,006 / 1,7 *	0,000 / 3,4	0,000 / 3,1
	KMAX_14	0,000 / 2,7	0,000 / 2,2	0,000 / 3,3	0,000 / 4,8
IN VIVO_21	KMIN_21	0,002 / 1,8	0,004 / 2,0	0,003 / 2,2	0,001 / 2,5
	KMID_21	0,001 / 1,6	0,112 / 1,0	0,004 / 2,0	0,000 / 4,2
	KMAX_21	0,017 / 1,6	0,083 / 1,0	0,008 / 1,9	0,000 / 3,3

* V případě datových sad která nebyla z normálního rozložení pravděpodobnosti bylo d_{coh} vyhodnocováno na základě výsledku Mann – Whitney testů.

2.1.4. MECHANICKÉ TESTY-POROVNÁNÍ V RÁMCI MÉDIA

Mann-Whitney testy

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMIN_1	-	-	-	0,001
	KMIN_7	-	-	-	0,48
	KMIN_14	-	-	-	0,86
	KMIN_21	-	-	-	0,724
KMIN_1	KMIN_7	-	-	-	0,011
	KMIN_14	-	-	-	0,003
	KMIN_21	-	-	-	0,002
KMIN_7	KMIN_14	-	-	-	0,185
	KMIN_21	-	-	-	0,251
KMIN_14	KMIN_21	-	-	-	0,791
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMID_1	0,290	0,175	0,459	-
	KMID_7	0,659	0,413	0,596	-
	KMID_14	0,000	0,006	0,000	-
	KMID_21	0,001	0,077	0,001	-
KMID_1	KMID_7	1,000	0,747	1,000	-
	KMID_14	0,001	0,112	0,001	-
	KMID_21	0,003	0,596	0,001	-
KMID_7	KMID_14	0,000	0,030	0,000	-
	KMID_21	0,001	0,361	0,001	-
KMID_14	KMID_21	0,034	0,093	0,042	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMAX_1	-	-	-	0,002
	KMAX_7	-	-	-	0,014
	KMAX_14	-	-	-	0,289
	KMAX_21	-	-	-	0,791
KMAX_1	KMAX_7	-	-	-	0,524
	KMAX_14	-	-	-	0,002
	KMAX_21	-	-	-	0,002
KMAX_7	KMAX_14	-	-	-	0,014
	KMAX_21	-	-	-	0,018
KMAX_14	KMAX_21	-	-	-	0,427

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	IN VIVO_7	0,072	0,341	-	-
	IN VIVO_14	0,016	0,488	-	-
	IN VIVO_21	0,251	0,361	-	-
IN VIVO_7	IN VIVO_14	0,306	0,354	-	-
	IN VIVO_21	0,681	0,244	-	-
IN VIVO_14	IN VIVO_21	0,348	0,564	-	-

F-testy

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMIN_1	0,831	0,917	0,865	-
	KMIN_7	0,351	0,189	0,338	-
	KMIN_14	0,306	0,001	0,175	-
	KMIN_21	0,622	0,033	0,400	-
KMIN_1	KMIN_7	0,277	0,180	0,286	-
	KMIN_14	0,241	0,001	0,148	-
	KMIN_21	0,501	0,032	0,339	-
KMIN_7	KMIN_14	0,925	0,033	0,677	-
	KMIN_21	0,656	0,327	0,905	-
KMIN_14	KMIN_21	0,590	0,249	0,593	-

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMID_1	-	-	-	0,594
	KMID_7	-	-	-	0,542
	KMID_14	-	-	-	0,023
	KMID_21	-	-	-	0,199
KMID_1	KMID_7	-	-	-	0,973
	KMID_14	-	-	-	0,115
	KMID_21	-	-	-	0,509
KMID_7	KMID_14	-	-	-	0,084
	KMID_21	-	-	-	0,489
KMID_14	KMID_21	-	-	-	0,281

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMAX_1	0,469	0,186	0,452	-
	KMAX_7	0,967	0,738	0,998	-
	KMAX_14	0,088	0,000	0,035	-
	KMAX_21	0,206	0,470	0,169	-
KMAX_1	KMAX_7	0,457	0,313	0,465	-
	KMAX_14	0,376	0,011	0,204	-
	KMAX_21	0,655	0,509	0,599	-
KMAX_7	KMAX_14	0,088	0,001	0,039	-
	KMAX_21	0,204	0,704	0,181	-
KMAX_14	KMAX_21	0,638	0,001	0,424	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	IN VIVO_7	-	-	0,082	0,514
	IN VIVO_14	-	-	0,007	0,360
	IN VIVO_21	-	-	0,003	0,153
IN VIVO_7	IN VIVO_14	-	-	0,384	0,853
	IN VIVO_21	-	-	0,216	0,496
IN VIVO_14	IN VIVO_21	-	-	0,641	0,566

T-testy se schodnými rozptyly

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMIN_1	1,000	-	0,762	-
	KMIN_7	0,005	-	0,007	-
	KMIN_14	0,000	-	0,000	-
	KMIN_21	0,000	-	0,000	-
KMIN_1	KMIN_7	0,010	-	0,006	-
	KMIN_14	0,000	-	0,000	-
	KMIN_21	0,000	-	0,000	-
KMIN_7	KMIN_14	0,001	-	0,000	-
	KMIN_21	0,000	-	0,000	-
KMIN_14	KMIN_21	0,554	-	0,836	-

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMID_1	-	-	-	0,001
	KMID_7	-	-	-	0,000
	KMID_14	-	-	-	0,681
	KMID_21	-	-	-	0,005
KMID_1	KMID_7	-	-	-	0,953
	KMID_14	-	-	-	0,014
	KMID_21	-	-	-	0,000
KMID_7	KMID_14	-	-	-	0,007
	KMID_21	-	-	-	0,000
KMID_14	KMID_21	-	-	-	0,098
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMAX_1	0,380	-	0,176	-
	KMAX_7	0,222	-	0,269	-
	KMAX_14	0,000	-	0,000	-
	KMAX_21	0,000	-	0,000	-
KMAX_1	KMAX_7	0,044	-	0,021	-
	KMAX_14	0,000	-	0,000	-
	KMAX_21	0,000	-	0,000	-
KMAX_7	KMAX_14	0,000	-	0,000	-
	KMAX_21	0,001	-	0,000	-
KMAX_14	KMAX_21	0,081	-	0,027	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	IN VIVO_7	-	-	-	0,000
	IN VIVO_14	-	-	-	0,000
	IN VIVO_21	-	-	-	0,000
IN VIVO_7	IN VIVO_14	-	-	-	0,955
	IN VIVO_21	-	-	-	0,386
IN VIVO_14	IN VIVO_21	-	-	-	0,319

T-testy s různými rozptyly

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMIN_1	-	0,334	-	-
	KMIN_7	-	0,017	-	-
	KMIN_14	-	0,003	-	-
	KMIN_21	-	0,006	-	-
KMIN_1	KMIN_7	-	0,233	-	-
	KMIN_14	-	0,075	-	-
	KMIN_21	-	0,120	-	-
KMIN_7	KMIN_14	-	0,233	-	-
	KMIN_21	-	0,520	-	-
KMIN_14	KMIN_21	-	0,518	-	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMID_1	-	-	-	-
	KMID_7	-	-	-	-
	KMID_14	-	-	-	-
	KMID_21	-	-	-	-
KMID_1	KMID_7	-	-	-	-
	KMID_14	-	-	-	-
	KMID_21	-	-	-	-
KMID_7	KMID_14	-	-	-	-
	KMID_21	-	-	-	-
KMID_14	KMID_21	-	-	-	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMAX_1	-	0,476	-	-
	KMAX_7	-	0,150	-	-
	KMAX_14	-	0,003	-	-
	KMAX_21	-	0,039	-	-
KMAX_1	KMAX_7	-	0,023	-	-
	KMAX_14	-	0,000	-	-
	KMAX_21	-	0,003	-	-
KMAX_7	KMAX_14	-	0,064	-	-
	KMAX_21	-	0,508	-	-
KMAX_14	KMAX_21	-	0,178	-	-

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	IN VIVO_7	-	-	0,014	-
	IN VIVO_14	-	-	0,003	-
	IN VIVO_21	-	-	0,102	-
IN VIVO_7	IN VIVO_14	-	-	0,379	-
	IN VIVO_21	-	-	0,754	-
IN VIVO_14	IN VIVO_21	-	-	0,314	-

Celkové shrnutí

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohenova d a to ve tvaru p / d_{coh} .

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMIN_1	1,000 / 0	0,334 / 0,54	0,762 / 0,16	0,001 / 3,0
	KMIN_7	0,005 / 1,6	0,017 / 1,4	0,007 / 1,5	0,480 / 0,36 *
	KMIN_14	0,000 / 3,4	0,003 / 2,0	0,000 / 3,5	0,860 / 0,10
	KMIN_21	0,000 / 3,4	0,006 / 1,7	0,000 / 3,4	0,724 / 0,19
KMIN_1	KMIN_7	0,010 / 1,6	0,233 / 0,74	0,006 / 1,7	0,011 / 1,7 *
	KMIN_14	0,000 / 3,4	0,075 / 1,3	0,000 / 3,7	0,003 / 2,3
	KMIN_21	0,000 / 3,3	0,120 / 1,0	0,000 / 3,6	0,002 / 2,5
KMIN_7	KMIN_14	0,001 / 2,1	0,233 / 0,63	0,000 / 2,4	0,185 / 0,68 *
	KMIN_21	0,000 / 2,2	0,520 / 0,33	0,000 / 2,3	0,251 / 0,59 *
KMIN_14	KMIN_21	0,554 / 0,30	0,518 / 0,35	0,836 / 0,11	0,791 / 0,15
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMID_1	0,290 / 0,58	0,175 / 0,78	0,459 / 0,41	0,001 / 2,4
	KMID_7	0,659 / 0,23 *	0,413 / 0,43	0,596 / 0,27 *	0,000 / 2,3
	KMID_14	0,000 / 3,1	0,006 / 1,7 *	0,000 / 3,1	0,681 / 0,21
	KMID_21	0,001 / 2,9	0,077 / 0,94	0,001 / 2,9	0,005 / 1,6
KMID_1	KMID_7	1,000 / 0,026 *	0,747 / 0,21	1,000 / 0,026 *	0,953 / 0,033
	KMID_14	0,001 / 3,0	0,112 / 0,94 *	0,001 / 3,0	0,014 / 1,5
	KMID_21	0,003 / 2,3	0,596 / 0,44	0,001 / 2,7	0,000 / 3,3
KMID_7	KMID_14	0,000 / 3,1 *	0,030 / 1,3 *	0,000 / 3,1 *	0,007 / 1,5
	KMID_21	0,001 / 2,7 *	0,361 / 0,48	0,001 / 2,7 *	0,000 / 3,3
KMID_14	KMID_21	0,034 / 1,2	0,093 / 0,89 *	0,042 / 1,1	0,098 / 0,88

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,005$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	KMAX_1	0,380 / 0,48	0,476 / 0,37	0,176 / 0,77	0,002 / 2,5
	KMAX_7	0,222 / 0,67	0,150 / 0,78	0,269 / 0,6	0,014 / 1,5 *
	KMAX_14	0,000 / 3,8	0,003 / 2,0	0,000 / 4,0	0,289 / 0,54
	KMAX_21	0,000 / 3,0	0,039 / 1,2	0,000 / 3,0	0,791 / 0,15
KMAX_1	KMAX_7	0,044 / 1,2	0,023 / 1,4	0,021 / 1,5	0,524 / 0,36 *
	KMAX_14	0,000 / 5,6	0,000 / 4,4	0,000 / 6,6	0,002 / 2,5
	KMAX_21	0,000 / 4,4	0,003 / 2,0	0,000 / 4,8	0,002 / 2,5
KMAX_7	KMAX_14	0,000 / 3,0	0,064 / 1,19	0,000 / 3,3	0,014 / 1,5 *
	KMAX_21	0,001 / 2,2	0,508 / 0,36	0,000 / 2,3	0,018 / 1,4 *
KMAX_14	KMAX_21	0,081 / 0,93	0,178 / 0,81	0,027 / 1,2	0,427 / 0,40
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		STABILNÍ HLADINA NAPĚTÍ	ELASTICKÝ GRADIENT	ABSORBOVANÁ ENERGIE	ÚČINNOST ABSORPCE ENERGIE
PBS_0	IN VIVO_7	0,072 / 1,0 *	0,341 / 0,52 *	0,014 / 1,8	0,000 / 5,0
	IN VIVO_14	0,016 / 1,4	0,488 / 0,34	0,003 / 1,7	0,000 / 4,5
	IN VIVO_21	0,251 / 0,59	0,361 / 0,48	0,102 / 0,90	0,000 / 3,4
IN VIVO_7	IN VIVO_14	0,306 / 0,54 *	0,354 / 0,49 *	0,379 / 0,44	0,955 / 0,03
	IN VIVO_21	0,681 / 0,24 *	0,244 / 0,77 *	0,754 / 0,16	0,386 / 0,48
IN VIVO_14	IN VIVO_21	0,348 / 0,46	0,564 / 0,30	0,314 / 0,51	0,319 / 0,50

* V případě datových sad která nebyla z normálního rozložení pravděpodobnosti bylo d_{coh} vyhodnocováno na základě výsledku Mann – Whitney testů.

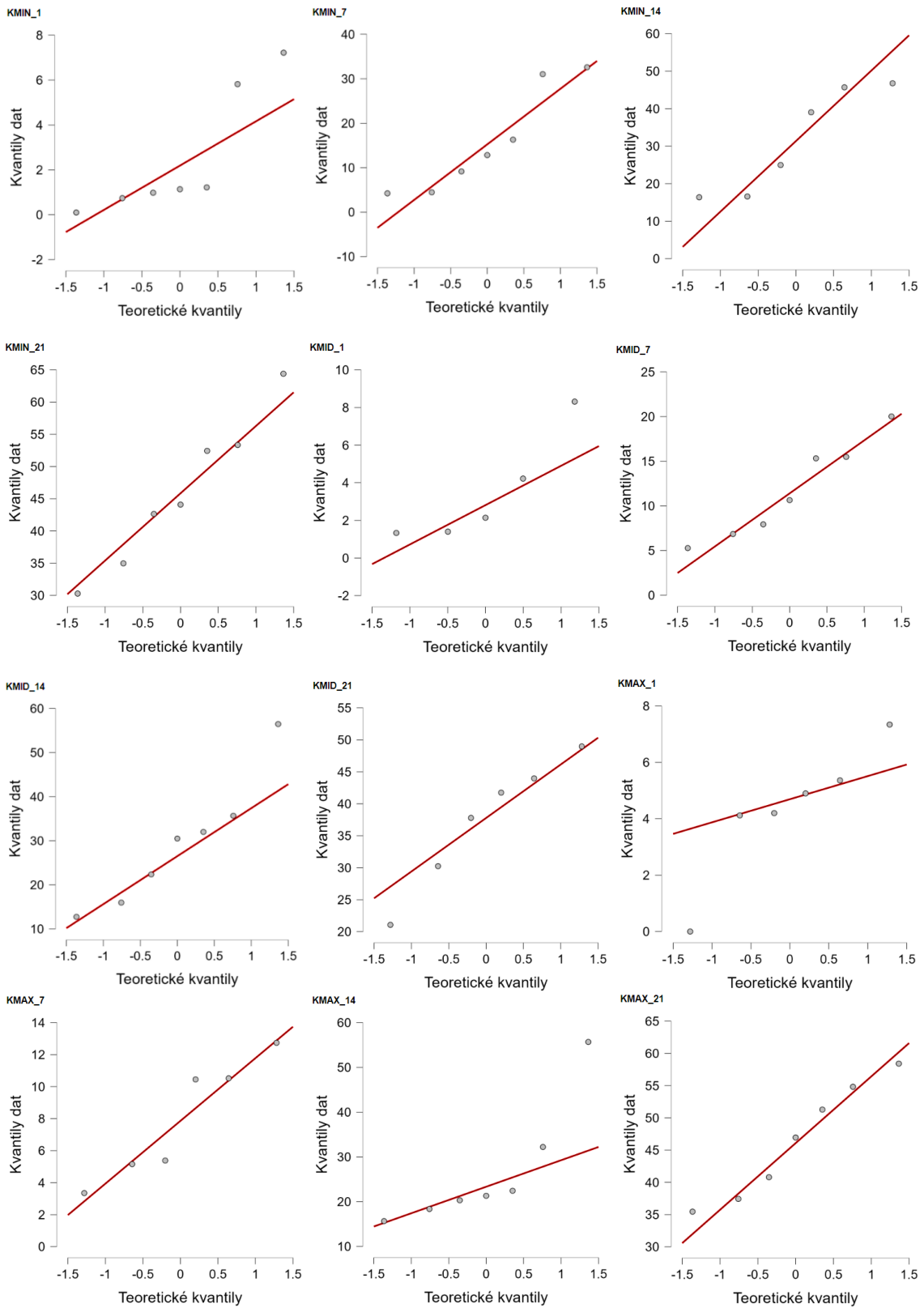
2.1.5. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-NORMALITA

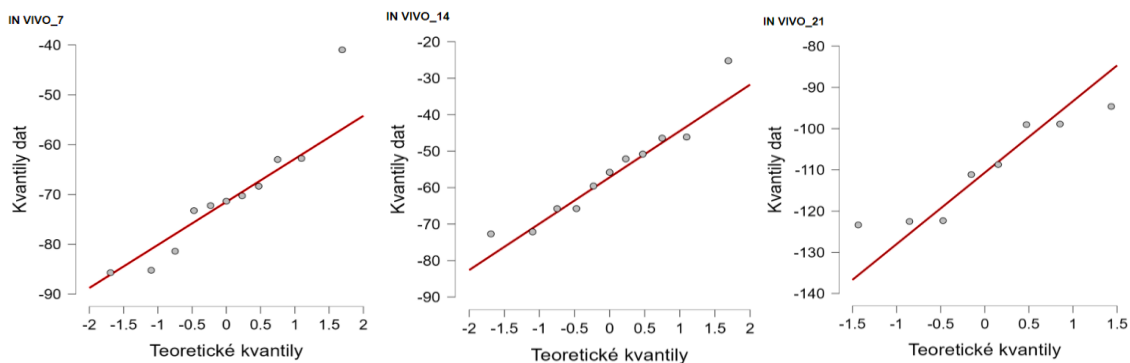
Shapiro-Wilk testy

KMIN_1	0,014
KMIN_7	0,155
KMIN_14	0,160
KMIN_21	0,922
KMID_1	0,112
KMID_7	0,583
KMID_14	0,541
KMID_21	0,771
KMAX_1	0,370
KMAX_7	0,342
KMAX_14	0,014
KMAX_21	0,649
IN VIVO_7	0,161
IN VIVO_14	0,405
IN VIVO_21	0,155

Q-Q grafy

V následující části jsou uvedeny Q-Q grafy jednotlivých datových sad pro hmotnostní úbytky. Tyto grafy byly vytvořeny v programu JASP.





2.1.6. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-POROVNÁNÍ S IN VIVO

Mann-Whitney testy

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohena d a to ve tvaru p / d_{coh} .

IN VIVO_7	KMIN_7	0,001 / 7,5
	KMID_7	0,001 / 8,3
	KMAX_7	0,001 / 7,9
IN VIVO_14	KMIN_14	0,001 / 6,7
	KMID_14	0,001 / 6,4
	KMAX_14	0,001 / 2,9 *
IN VIVO_21	KMIN_21	0,001 / 14,3
	KMID_21	0,002 / 14
	KMAX_21	0,001 / 16

* V případě datových sad která nebyla z normálního rozložení pravděpodobnosti bylo d_{coh} vyhodnocováno na základě výsledku Mann – Whitney testů.

2.1.7. HMOTNOSTNÍ ÚBYTKY-POROVNÁNÍ V RÁMCI MÉDIA

Mann-whitney testy

$\alpha_{bonf} = 0,008$		
KMIN_1	KMIN_7	0,011
	KMIN_14	0,003
	KMIN_21	0,002
KMIN_7	KMIN_14	0,038
	KMIN_21	0,005
KMIN_14	KMIN_21	0,134

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMID_1	KMID_7	-
	KMID_14	-
	KMID_21	-
KMID_7	KMID_14	-
	KMID_21	-
KMID_14	KMID_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMAX_1	KMAX_7	0,128
	KMAX_14	0,003
	KMAX_21	0,003
KMAX_7	KMAX_14	0,003
	KMAX_21	0,003
KMAX_14	KMAX_21	0,021
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,017$		
IN VIVO_7	IN VIVO_14	-
	IN VIVO_21	-
IN VIVO_14	IN VIVO_21	-

F-testy

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMIN_1	KMIN_7	-
	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_7	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_14	KMIN_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMID_1	KMID_7	0,256
	KMID_14	0,0079
	KMID_21	0,033
KMID_7	KMID_14	0,029
	KMID_21	0,160
KMID_14	KMID_21	0,437
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMAX_1	KMAX_7	-
	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_7	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_14	KMAX_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,017$		
IN VIVO_7	IN VIVO_14	0,757
	IN VIVO_21	0,895
IN VIVO_14	IN VIVO_21	0,684

T-testy se schodnými rozptyly

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMIN_1	KMIN_7	-
	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_7	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_14	KMIN_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMID_1	KMID_7	-
	KMID_14	-
	KMID_21	-
KMID_7	KMID_14	-
	KMID_21	-
KMID_14	KMID_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMAX_1	KMAX_7	-
	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_7	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_14	KMAX_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,017$		
IN VIVO_7	IN VIVO_14	0,017
	IN VIVO_21	0,000
IN VIVO_14	IN VIVO_21	0,000

T-testy s různými rozptyly

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMIN_1	KMIN_7	-
	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_7	KMIN_14	-
	KMIN_21	-
KMIN_14	KMIN_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMID_1	KMID_7	0,0078
	KMID_14	0,003
	KMID_21	0,000
KMID_7	KMID_14	0,018
	KMID_21	0,001
KMID_14	KMID_21	0,278

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMAX_1	KMAX_7	-
	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_7	KMAX_14	-
	KMAX_21	-
KMAX_14	KMAX_21	-
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,017$		
IN VIVO_7	IN VIVO_14	-
	IN VIVO_21	-
IN VIVO_14	IN VIVO_21	-

Celkové shrnutí

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohena d a to ve tvaru p / d_{coh} .

$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMIN_1	KMIN_7	0,011 / 1,7
	KMIN_14	0,003 / 3,3
	KMIN_21	0,002 / 5,5
KMIN_7	KMIN_14	0,038 / 1,3
	KMIN_21	0,005 / 2,8
KMIN_14	KMIN_21	0,134 / 1,2
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMID_1	KMID_7	0,0078 / 1,9
	KMID_14	0,003 / 2,4
	KMID_21	0,000 / 4,8
KMID_7	KMID_14	0,018 / 1,7
	KMID_21	0,001 / 3,5
KMID_14	KMID_21	0,278 / 0,67
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,008$		
KMAX_1	KMAX_7	0,128 / 1,2
	KMAX_14	0,003 / 2,3
	KMAX_21	0,003 / 6,8
KMAX_7	KMAX_14	0,003 / 1,9
	KMAX_21	0,003 / 5,9
KMAX_14	KMAX_21	0,021 / 1,8
$\alpha_{\text{bonf}} = 0,017$		
IN VIVO_7	IN VIVO_14	0,017 / 1,2
	IN VIVO_21	0,000 / 3,4
IN VIVO_14	IN VIVO_21	0,000 / 4,4

* V případě datových sad která nebyla z normálního rozložení pravděpodobnosti bylo d_{coh} vyhodnocováno na základě výsledku Mann – Whitney testů.

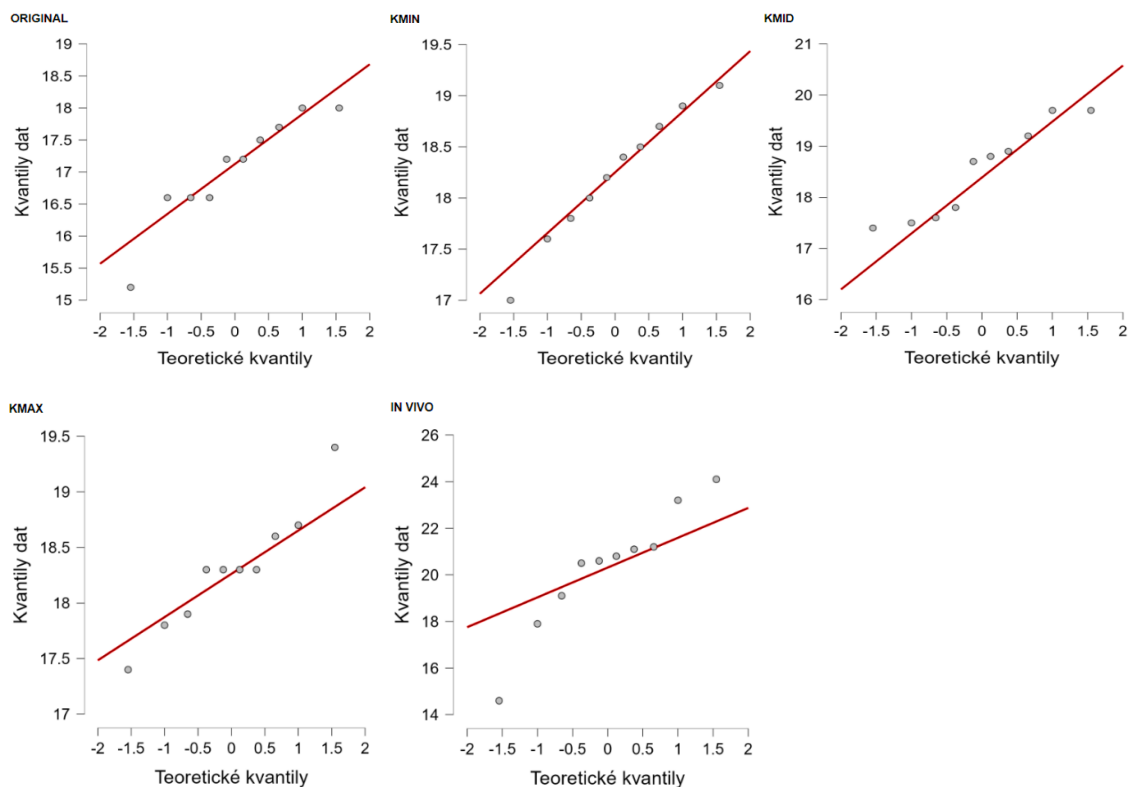
2.1.8. FTIR ANALÝZA – OBLAST 1660

Shapiro–Wilk testy

ORIGINAL	0,26
KMIN	0,92
KMID	0,13
KMAX	0,71
IN VIVO	0,46

Q-Q grafy

V následující části jsou uvedeny Q-Q grafy jednotlivých datových sad pro FTIR analýzu oblasti 1660. Tyto grafy byly vytvořeny v programu JASP.



F-testy

$\alpha = 0,05$		
ORIGINAL	KMIN	0,412
	KMID	0,837
	KMAX	0,241
	IN VIVO	0,002
IN VIVO	KMIN	0,000
	KMID	0,003
	KMAX	0,000

T-testy s různými rozptyly

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohenova d a to ve tvaru p / d_{coh} .

$\alpha = 0,05$		
ORIGINAL	KMIN	0,003 / 1,7
	KMID	0,001 / 1,8
	KMAX	0,001 / 1,9
	IN VIVO	0,004 / 1,8
IN VIVO	KMIN	0,038 / 1,1
	KMID	0,073 / 0,95
	KMAX	0,045 / 1,1

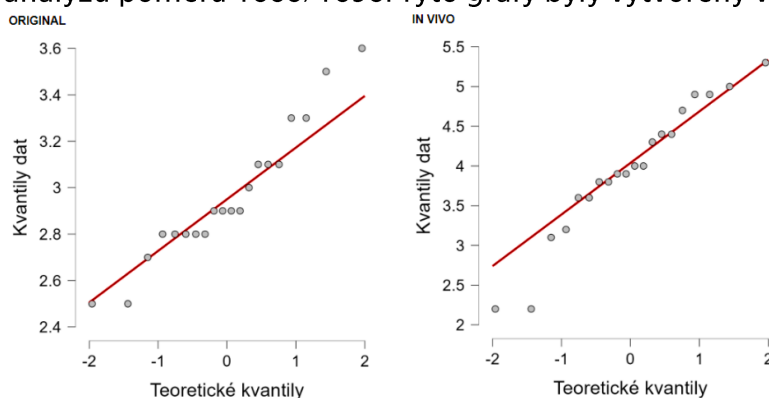
2.1.9. FTIR ANALÝZA – POMĚR 1660/1690

Shapiro-Wilk testy

ORIGINAL	0,271
IN VIVO	0,378

Q-Q grafy

V následující části jsou uvedeny Q-Q grafy jednotlivých datových sad pro FTIR analýzu poměru 1660/1690. Tyto grafy byly vytvořeny v programu JASP.



F-testy

$\alpha = 0,05$		
ORIGINAL	IN VIVO	0,000

T-testy s různými rozptyly

V tabulce celkového shrnutí jsou kromě velikosti p-hodnoty uvedeny i hodnoty Cohenova d a to ve tvaru p / d_{coh} .

$\alpha = 0,05$		
ORIGINAL	IN VIVO	0,000 / 1,6