



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Strojní fakulta**

**Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**

**Analýza mechanických a strukturních vlastností kompozitních nosičů pro  
regeneraci kostních defektů**

**Analysis of mechanical and structural properties of composite scaffolds  
for bone defects regeneration**

Diplomová práce

Studijní program: Strojní inženýrství

Studijní obor: Biomechanika a lékařské přístroje

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

**Bc. Jiří Majvald**

---

**Praha 2016**



## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Majvald** Jméno: **Jiří** Osobní číslo: **439452**  
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**  
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**  
Studijní program: **Strojní inženýrství**  
Studijní obor: **Biomechanika a lékařské přístroje**

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Analýza mechanických a strukturních vlastností kompozitních nosičů pro regeneraci kostních defektů**

Název diplomové práce anglicky:

**Analysis of Mechanical and Structural Properties of Composite Scaffolds for Bone Defects Regeneration**

Pokyny pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na téma kompozitních nosičů mezenchymálních kmenových buněk se zaměřením na kompozity na bázi přírodních polymerů.
2. Navrhněte a realizujte experimentální analýzu mechanických vlastností nosičů v suchém a hydratovaném stavu, analyzujte jejich degradabilitu v simulovaném tělním prostředí.
3. Zpracujte a interpretujte získané výsledky, navrhněte optimální složení nosičů. Rozsah grafických prací: cca 10 stran  
Rozsah průvodní zprávy: 50 stran

Seznam doporučené literatury:

1. FRATZL, Peter. Collagen: structure and mechanics. New York: Springer, 2008.
2. SUCHÝ, Tomáš, et al. Biomedical Materials, 2015, 10.6: 065008.
3. VARLEY, M. C., et al. Acta Biomaterialia, 2016, 33, 166-175.
4. ČSN ISO 13314. Mechanické zkoušení kovů - Zkoušení tvářitelnosti - Zkouška poréznych a pěnových kovů tlakem, 2012.
5. MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. Statistická analýza experimentálních dat. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004. ISBN 80200-1254-0.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

**Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.**

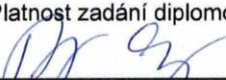
Jméno a pracoviště konzultanta(ky) diplomové práce:

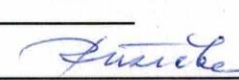
**Ing. Radek Sedláček, Ph.D.**

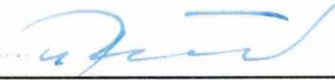
Datum zadání diplomové práce: **11.04.2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12.08.2016**

Platnost zadání diplomové práce: \_\_\_\_\_

  
Podpis vedoucí(ho) práce

  
Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

  
Podpis děkana(ky)

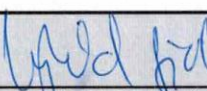
*Neodevzdá-li student bakalářskou nebo diplomovou práci v určeném termínu, tuto skutečnost předem písemně zdůvodní a omluva byla děkanem uznána, stanoví děkan studentovi náhradní termín odevzdání bakalářské nebo diplomové práce. Pokud se však student řádně neomluvil nebo omluva nebyla děkanem uznána, může si student zapsat bakalářskou nebo diplomovou práci podruhé*

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

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

25.4.2016

Datum převzetí zadání

  
Podpis studenta(ky)



# Anotační list

Jméno autora: Jiří Majvald

Název diplomové práce: Analýza mechanických a strukturních vlastností kompozitních nosičů pro regeneraci kostních defektů

Anglický název: Analysis of mechanical and structural properties of composite scaffolds for bone defects regeneration

Rok: 2016

Obor studia: Biomechanika a lékařské přístroje

Ústav: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

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

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

Bibliografické údaje: počet stran - 62

počet obrázků - 39

počet tabulek – 4

Klíčová slova: tkáňové inženýrství, nosič, kmenové buňky, kost, kolagen

Key words: tissue engineering, scaffold, stem cells, bone, collagen

Anotace: Diplomová práce se zabývá testováním mechanických vlastností kompozitních scaffoldů s různým materiálovým složením, určených pro kostní tkáňové inženýrství ve třech stavech – suchém a hydratovaném po dobu 24 a 48 hodin. Dále je v práci provedena analýza porozity a degradace materiálu během hydratace.

Abstract: This diploma thesis deals with testing of mechanical properties of composite scaffolds with different material composition, to be used for bone tissue engineering in three different states – dry and hydrated for the time period of 24 and 48 hours. Following this, the analysis of material porosity, mass loss and swelling behaviour of the samples during the hydration were carried out.



## Poděkování

Děkuji především Ing. Tomášovi Suchému, Ph.D. za přijetí, moudré vedení práce a věcné připomínky při jejím zpracování.

Děkuji také Ing. Radkovi Sedláčkovi, Ph.D. za vedení experimentální části práce, ochotu a pomoc při vyhodnocování experimentálních dat.

Dále také děkuji přátelům Lukášovi Bajerovi a Václavovi Kašparovi za pomoc a neustálou podporu a Markétě Imlaufové za jazykovou korekturu.

Konečně děkuji také rodině za dlouhodobou podporu během celého studia.



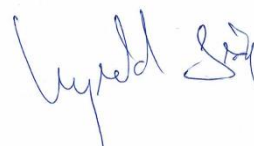


## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s tím, že její výsledky mohou být dále použity podle uvážení vedoucího diplomové práce jako jejího spoluautora. Souhlasím také s případnou publikací výsledků diplomové práce nebo její podstatné části, pokud budu uveden jako její spoluautor.

Dne 21. 8. 2016

Podpis



## Citace diplomové práce

Majvald, Jiří. *Analýza mechanických a strukturních vlastností kompozitních nosičů pro regeneraci kostních defektů*. Diplomová práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, 2016.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá testováním mechanických vlastností kompozitních scaffoldů pro tkáňové inženýrství kostí. Cílem práce je porovnat mechanické vlastnosti jednotlivých vzorků, které se liší materiálovým složením a jsou testovány tlakovou zkouškou ve třech stavech – suchém a hydratovaném po dobu 24 a 48 hodin. V rámci zkoumání byla provedena také analýza velikosti pórů scaffoldů a otevřená porozita pomocí přístroje  $\mu$ CT. Dále byla v rámci práce provedena analýza úbytku materiálu a bobtnání vzorků během hydratace. Data získaná z měření byla statisticky vyhodnocena. Poznatky budou dále použity při řešení programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR „Vývoj a komplexní preklinické testování nových kompozitních materiálů pro kostní chirurgii“ (č. 15-25813A).

## Klíčová slova

Tkáňové inženýrství, nosič, kmenové buňky, kost, kolagen

## Abstract

This diploma thesis deals with testing of mechanical properties of scaffolds for bone tissue engineering. The aim of this work is to compare the mechanical properties of individual samples with different material composition in three different states - dry and hydrated for the time period of 24 and 48 hours. Within the scope of testing, pore size analysis has been conducted together with open porosity using the  $\mu$ CT device. Following this, the analysis of mass loss and swelling behaviour of the samples during the hydration were carried out. The data obtained were evaluated statistically. The findings of which will be consequently used in the project „Development and comprehensive pre-clinical testing of novel composite materials for bone surgery“ supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. 15-25813A.

## Key words

Tissue engineering, scaffold, stem cells, bone, collagen



# Obsah

1	Úvod a cíle práce .....	15
2	Teoretická část .....	16
2.1	Tkáňové inženýrství kostí .....	16
2.2	Kmenové buňky.....	16
2.3	Scaffold.....	18
2.3.1	Vlastnosti scaffoldu .....	18
2.4	Materiál scaffoldu .....	19
2.4.1	Přírodní polymery.....	19
2.4.2	Syntetické polymery.....	21
2.4.3	Anorganické materiály .....	21
2.4.4	Kompozitní materiály .....	22
2.5	Technologie a metody výroby scaffoldů .....	24
2.5.1	Lyofilizace .....	24
2.5.2	Aditivní technologie .....	25
2.5.3	Elektrostatické zvlákňování .....	25
3	Experimentální část.....	27
3.1	Použité materiály a příprava vzorků .....	27
3.2	Metodika testování porézních kompozitních materiálů .....	30
3.2.1	Porozita .....	31
3.2.2	Tlaková zkouška .....	31
3.2.3	Degradace scaffoldů během kultivace .....	34
3.2.4	Statistické vyhodnocení .....	35
4	Výsledky .....	36
4.1	Vyhodnocení porozity .....	36
4.2	Vyhodnocení mechanických zkoušek.....	39

4.2.1	Vliv materiálového složení na mechanické vlastnosti.....	40
4.2.2	Vliv hydratace na materiálové vlastnosti.....	44
4.2.3	Degradace scaffoldů během kultivace.....	48
5	Diskuze.....	52
6	Závěr.....	55
7	Seznam použité literatury.....	56
	Seznam obrázků.....	61
	Seznam tabulek.....	63

# 1 Úvod a cíle práce

Všeobecné pokroky v medicíně vedou k prodloužení průměrné délky života, což vytváří v lékařství nové problémy a výzvy, mezi které patří nárůst nemocí spojených s vyšším věkem [1]. Často tak dochází ke ztrátě kostní tkáně, což má za následek další zranění a kostní defekty. Také z tohoto důvodu je tkáňové inženýrství velmi rychle se rozšiřující oblastí napříč vědeckými obory, která má za cíl zlepšit kvalitu života tím, že umožní obnovení nebo zachování funkce tkání a orgánů pomocí biologicky odpovídajících náhrad [2]. Tkáňový nosič neboli scaffold musí být s nahrazovanou tkání kompatibilní, měl by vykazovat vhodnou míru degradability, vhodné mechanické vlastnosti a také odpovídající porozitu a morfologii pro transport buněk, živin, signálních molekul, plynů a metabolických produktů. Po osazení buňkami by tedy nosič měl sloužit jako dočasná mechanická opora a měl by poskytnout vhodné prostředí pro adhezi, růst a proliferaci buněk.

Pro správnou funkci nosiče buněk je nutné charakterizovat jeho vlastnosti nejen v suchém stavu, ale také v podmínkách, ve kterých bude osazován buňkami a později implantován. Cílem této práce je experimentální analýza mechanických a strukturních vlastností nových kompozitních nosičů buněk v suchém a hydratovaném stavu. Studované kompozitní nosiče pro náhrady kostní tkáně jsou připraveny z poly(DL-laktidových) nanovláken, kalcium fosfátových nanočástic, hyaluronanu sodného a kolagenové matrice. Volbou poměru jednotlivých složek bylo připraveno celkem 8 typů materiálu. Práce si klade za cíl posoudit vliv materiálového složení a hydratace na funkční charakteristiky kompozitu jako nosiče buněk.

Práce je rozdělena do pěti kapitol. Druhá kapitola podává stručný přehled o základních principech tkáňového inženýrství a popisuje charakteristiky, jež by měly scaffoldy pro tkáňové inženýrství splňovat. Zároveň obsahuje současné trendy technologií, které se pro výrobu scaffoldů v poslední době používají. Ve třetí kapitole jsou popsány materiály a metodika testování, jež byly pro tento experiment využity. V dalších dvou kapitolách jsou zaznamenány dosažené výsledky práce a diskuze nad získanými výsledky. Poslední kapitola obsahuje konečné shrnutí práce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Tkáňové inženýrství kostí

První zmínky o tkáňovém inženýrství byly publikovány v 80. letech minulého století v Americe. Indikací pro tuto metodu byl především nedostatek dárců pro implantaci orgánů a také riziko odmítnutí implantátu imunitním systémem pacienta. Princip tkáňového inženýrství spočívá v naočkování buněk do nosiče, tzv. lešení neboli scaffoldu, které svými parametry udržuje buňky ve stabilním stavu a poskytne jim vhodné prostředí pro migraci, růst a proliferaci, případně je stimuluje k tvorbě mezibuněčné hmoty. Následně je nosič s buňkami použit k implantaci, obnovení či udržení funkce porušených tkání. Abychom však mohli rozumět principu tkáňového inženýrství, je zapotřebí porozumět fungování jednotlivých buněk, jelikož se struktury a tkáně, které nás zajímají, zpravidla skládají z mnohobuněčných systémů. K růstu buňky dochází díky výměně živin, plynů a metabolických produktů, která probíhá na povrchu buňky. Objem buňky, jenž ke svému životu potřebuje výměnu živin a další buněčné procesy, je řádově mnohem větší než povrch buňky, kterým tyto procesy probíhají. Tento problém byl vyřešen větvením struktury a tedy razantním nárůstem povrchu buňky [3].

V případě kostního tkáňového inženýrství jsou spolu s kmenovými buňkami do nosiče přidávány další biomolekuly – proteiny, ovlivňující růst a hojení kostních defektů. Jejich přítomnost umožňuje například urychlení migrace a vyvolání proliferace a diferenciaci kostních buněk. Tyto biomolekuly tedy ovlivňují osteogenezi a regeneraci kostní tkáně a jejich vhodným začleněním do nosičů lze výrazně urychlit dobu léčení pacienta [5]. Kost je vysoce prokrvená tkáň [5]. Přívod živin a kyslíku je nutný pro přežití tvořící se tkáně v nosiči a je tedy určující podmínkou při jeho samotné výrobě. Vaskularizace probíhá spontánně v odezvě na vznik zánětlivé reakce po implantaci scaffoldu. Nedostatečná nebo nesprávná vaskularizace vede k nerovnoměrné buněčné diferenciaci a následné buněčné smrti [5].

### 2.2 Kmenové buňky

Pro osazování nosičů se nejčastěji používají dva typy buněk. Prvním typem jsou dospělé buňky, které mají tu výhodu, že jsou přesně definované a plně funkční [6]. Jejich nevýhoda spočívá v omezené životnosti a hlavně ve ztrátě jejich funkce a schopnosti se diferencovat při vyjmutí z přirozeného prostředí [6]. Mezi tento typ buněk patří osteoblasty, které se získávají z povrchu



kosti. V lidském těle se tyto buňky podílí na remodelaci, při experimentech bylo zjištěno, že dochází k osteogenní diferenciaci buněk a to v různých matricích [4]. Druhým typem jsou buňky kmenové, jejich hlavní předností je schopnost se diferencovat na buňky jiných druhů. Kmenové buňky se dělí na embryonální a dospělé kmenové buňky. Embryonální se získávají z vnitřní buněčné hmoty embrya ve fázi blastocysty [6]. Jejich schopností je diferenciaci do všech tří typů zárodečných listů, tedy včetně neuronů, endoteliálních buněk a srdečních, pankreatických nebo ledvinových buněk. Použití embryonálních buněk ve výzkumu bylo však omezeno z právních a etických důvodů [7]. Dospělé kmenové buňky se nachází na několika místech (kostní dřeň, svaly, spongiozní kost atd.), proto je možné je snadno získat. Je předpoklad, že slouží k hojení jejich odpovídajícímu orgánovému systému, tedy převážně pojivových tkání [6]. Existují však některé druhy, například buňky z tukové tkáně, které mají schopnost diferencovat se do odlišných tkání, například hepatocytů nebo nervových buněk, v závislosti na mechanické nebo chemické stimulaci [7]. Hlavní smysl aplikace dospělých autologních kmenových buněk je zamezení autoimunitní reakci příjemce. Dospělé kmenové buňky se rozdělují do tří skupin: heterologní – buňky jiného živočišného druhu, například prasečí; alogenní – buňky stejného druhu, například odebraná tkáň *ex vivo*; autologní – buňky pacienta. Mezenchymální kmenové buňky se v poslední době využívají také v léčebné terapii pro jejich schopnost pozitivního vlivu na jiné buňky. Vykazují schopnost ukotvit se primárně v místech poraněné tkáně, kde jsou parakrinní účinky kmenových buněk nejvíce zapotřebí [8]. Tuto vlastnost lze přisuzovat chemokinům, cytokinům se schopností regulace migrace buněk, a receptorům, které se vyskytují na povrchu extracelulární matrice. Při testování na myších bylo také zjištěno, že mezenchymální buňky mají schopnost zabraňovat buněčné smrti [8]. Po jejich aplikaci došlo ke zlepšení prokrvení tkáně a snížení nekrózy, díky několika růstovým faktorům, které jsou v kmenových buňkách přítomny. Tohoto jevu by se v budoucnu mohlo využívat při léčení akutního poranění, například selhání ledvin [8]. Testováním byl také zjištěn vliv kmenových buněk na buňky imunitního systému, kdy dokáží zpomalit nebo urychlit proliferaci lymfocytů [8]. Jiným testováním na myších byl zjištěn pozitivní vliv na hojení vnějšího poranění, při kterém na kůži nezůstávají jizvy. Lze tedy říct, že mezenchymální kmenové buňky představují velmi slibný nástroj k léčbě mnoha tkáňových poškození, protože vylučují velké množství biologicky aktivních molekul, které mohou v konečném důsledku vést k přetvoření poškozené tkáně [8]. Z důvodu potřebné doby pro izolaci a kultivaci kmenových buněk však zatím nelze pro akutní potřeby použít buňky autologní.

## 2.3 Scaffold

Nosič buněk neboli scaffold je prostorový porézní materiál, který je tvořen jedním nebo obvykle více typy buněk [4]. Vytváří specifické prostředí a podmínky pro rozmnožení a diferenciaci buněk. Zatímco dochází k proliferaci a přeměně buněk, samotná struktura scaffoldu degraduje. Slouží jako schránka na živiny, vodu a další nezbytné látky. Vhodný nosič by měl najít a vytvořit rovnováhu mezi funkcí mechanické opory a schopností umožnit distribuci živin [9]. Požadované vlastnosti nosičů, které lze ovlivnit volbou materiálů a metodou přípravy, jsou vyjmenovány dále.

### 2.3.1 Vlastnosti scaffoldu

Pro správnou funkci nosičů buněk jsou podstatné vlastnosti jako porozita, biokompatibilita, mechanické vlastnosti a biodegradabilita. Vnitřní struktura nosičů musí být tvořena sítí vzájemně propojených pórů tak, aby buňky mohly migrovat, proliferovat a přichytit se v celém jeho prostoru [7]. Pro potřebné šíření základních živin je žádoucí, aby velikost pórů byla minimálně 100  $\mu\text{m}$  [5]. Porozita nosiče současně výrazně ovlivňuje jeho mechanické vlastnosti. Chemické složení vnitřního povrchu nosiče nebo jeho povrchová úprava jsou důležité pro buněčnou adhezi [10].

Scaffold musí být vyroben z biokompatibilního materiálu a být slučitelný s buňkami, jež na něj adherují [7]. Biokompatibilita je popsána jako schopnost podporovat normální buněčnou aktivitu bez jakýchkoliv lokálních nebo celkových toxických účinků na hostitelské tkáň [5]. Z pohledu biomechaniky by ideální scaffold měl mít mechanické vlastnosti odpovídající nahrazované tkáni. V případě náhrady kostní tkáň se jedná zejména o tuhost a pevnost. Youngův modul pružnosti je v literatuře pro kortikální kost uváděn mezi 15 až 20 GPa, pro spongiózní 0,1 až 2 GPa [5]. Pevnost v tlaku je pro kortikální kost 100 až 200 MPa a pro spongiózu 2 až 20 MPa [5]. Tyto parametry pak předurčují scaffoldy pro zatěžované nebo nezatěžované aplikace. Biomechanické vlastnosti kostní tkáň jsou v první řadě dány kolagenovou maticí a minerály. Kolagenní vlákna jsou odolná v tahu, ale pro jiné způsoby zatížení jsou poddajná. Tvrdost a křehkost dodávají kosti minerální látky.

Vhodný scaffold by měl být dále schopen časem degradovat a při kontrolované rychlosti resorpce uvolňovat místo novotvořené kostní tkáni [5].

## 2.4 Materiál scaffoldu

Materiály, ze kterých se scaffoldy připravují, můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní materiály obvykle zastupují větší hmotností procento materiálu a syntetické materiály se používají ke zlepšení mechanických vlastností, mohou však vykazovat horší biokompatibilitu, zejména z pohledu degradačních produktů. Je známo, že vhodná struktura scaffoldů výrazně ovlivňuje diferenciační schopnost buněk. Materiály pro nosiče tkáňového inženýrství kostí by měly být osteoinduktivní, osteokonduktivní a mít schopnost osseointegrace. Osteoinduktivní jsou takové materiály, jež jsou schopné podporovat diferenciaci kmenových buněk do osteoblastických linií [11]. Osteokonduktivní materiály jsou, zjednodušeně řečeno, schopné přidržit buňky, které jsou pak dále schopné se množit a vytvářet tak mezibuněčnou hmotu. Osseointegračními nazýváme materiály, jež jsou schopné se začlenit do okolní kosti [11].

### 2.4.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery, mezi které řadíme například kolagen a fibrin, mají biologicky velmi vhodné vlastnosti pro výrobu scaffoldů. Jejich nevýhodou je neschopnost zajistit dostatečnou mechanickou podporu buňkám a riziko přenosu patogenů [10].

Kolagen je jedním z nejdůležitějších a nejhojnějších proteinů v živých organismech, v tělech savců představuje přibližně až 30 % všech proteinů. Proteiny obecně jsou v podstatě polymery aminokyselin poskládané do trojrozměrné struktury [12]. Vlastnosti a struktura tkání jsou silně závislé na proteinové složce, proto pro úpravu a náhradu tkání byly vyvinuty proteiny a polymery obsahující aminokyseliny [12]. Z biochemického hlediska vytváří vhodné prostředí pro buněčnou adhezi a migraci a zároveň funguje jako aktivní regulátor buněčné diferenciace [12]. Kolagen plní významnou roli v zachování celistvosti mezibuněčné hmoty, neboť slouží jako mechanická podpora tkání [13]. Kolagen je trimerní molekula skládající se ze tří polypeptidových řetězců [13]. Řetězce vzájemně tvoří trojitě šroubovice, což je typická charakteristika kolagenu. Známe nejméně 27 různých druhů kolagenu, které se liší svým chemickým složením a strukturou, nejdůležitějšími druhy jsou kolagen I-V, které se v těle vyskytují v největší míře. Rozpad kolagenu je způsoben katabolickými procesy v tkáních, mezi které patří například kolagenáza [13]. Ta se váže na povrch šroubovice a degraduje jednotlivá vlákna kolagenu, což vede k rozpadu tkáně z vnějšku dovnitř [13]. Po porušení vnějších vláken dojde k degradaci vnitřních molekul šroubovice pomocí dalších enzymů přispívajících k rozpadu. Kolagen není ve většině případů rozpustný ve vodě, ale jeho zahříváním ve vodném prostředí vzniká želatina, kdy dochází ke štěpení příčných kovalentních vazeb, denaturace struktury a degradace řetězců [12]. Jev

degradace polypeptidových řetězců je nežádoucí, neboť čím více těchto vazeb je rozštěpeno, tím horší fyzikální a chemické vlastnosti želatina má [12].

Díky vlastnostem kolagenu jako je schopnost řízené degradace, biokompatibilita a propustnost je často využíván pro výrobu nosičů pro tkáňové inženýrství. Protože aminokyseliny, které tvoří proteiny a tedy i kolagen, jsou produkovány v lidském organismu, lze předpokládat, že bude docházet k jejich degradaci za vzniku méně toxických látek než v případě degradace syntetických materiálů [12]. Použití kolagenu v tkáňovém inženýrství je však omezeno v důsledku jeho mechanických vlastností, velkou rychlostí a mírou bobtnání při kontaktu s vodou a nízkou strukturální stabilitou [14]. Aby se zamezilo těmto negativním jevům, způsobených také při jeho zpracování, zejména částečnou degradací jeho přirozené struktury, je nutné kolagenové nosiče ještě síťovat. Princip síťování kolagenu spočívá ve zpětném vytvoření trojitě šroubovice kolagenu vlivem chemické reakce nebo různých fyzikálních vlivů. Metody síťování rozdělujeme na fyzikální, mezi které patří fotooxidace, termální dehydratace nebo ultrafialové záření, a chemické, které zahrnuje například působení karboimidů, glutaraldehydů nebo například genipinu a dalších [12]. Použití různých chemických sloučenin s sebou však nese riziko vzniku sekundární toxicity, jak se ukázalo například v případě glutaraldehydu.

Kolagen je přítomný téměř ve všech tkáních a orgánech. Mezi bohaté zdroje vláknitého kolagenu patří například kůže, kosti a šlachy. Čistý kolagen lze získat také z periferní nervové tkáně [13]. Pro výzkumné účely se zpravidla, hlavně kvůli nižší pořizovací ceně, používá kolagen zvířecí a to hlavně hovězí, prasečí a v poslední době rybí, který se mnohem snadněji čistí. Při aplikaci živočišného kolagenu do lidského organismu však může dojít ke vzniku alergických reakcí a následných onemocnění. Proto byla v 80. letech snaha kultivovat kolagení buňky *in vitro* v přítomnosti cizorodých hostitelských buněk, nicméně experiment neměl zdárný konec [13].

Materiál scaffoldů by měl co nejvíce odpovídat vlastnostem a charakteristikám přirozené mezibuněčné hmoty, proto se očekává, že kolagen bude pro tyto účely velmi vhodný. Nevyhovující mechanické vlastnosti kolagenu lze navíc optimalizovat jeho kombinací s dalšími materiály přípravou kompozitních materiálů.

Dalším zástupcem přírodních polymerů je fibrin. Fibrin je vláknitý nerozpustný protein, který vzniká v procesu srážení krve, kdy plní funkci „záplaty“ pro místo, kde došlo k poranění a ke krvácení. Vzhledem k jeho schopnosti podpory angiogeneze, uchycení buněk v místě zranění a jejich následné proliferace vytváří vhodné prostředí pro regeneraci kostních defektů [15]. Scaffoldy, které byly vyrobeny pouze z fibrinu měly příliš nízkou porozitu, což způsobovalo

zamezení migrace buněk a tím pádem zpomalovalo hojení ran [15]. Proto se pro výrobu scaffoldů používá fibrin pouze v kombinaci s jinými materiály jako například s fosforečnanem vápenatým a vytváří tak kompozitní strukturu.

#### 2.4.2 Syntetické polymery

Vlivem růstu cen ropy a snahou chránit životní prostředí dochází v posledních letech k velkému rozmachu vývoje a aplikace biodegradabilních syntetických polymerů, které nezatěžují životní prostředí a současně mají díky schopnosti degradovat velké využití v medicínských oborech. Většina tradičních polymerů, které se získávají z ropy, je odolná vůči degradaci, které lze docílit pouze přidáním speciálních aditiv do polymerních řetězců, jako například antioxidantů [16]. I přesto, že se podařilo dosáhnout degradace těchto polymerů, nepoužívají se v lékařství, neboť panuje obava, jak bude degradovaný polymer reagovat na buňky lidské tkáně. Mezi syntetické polymery, které jsou hojně používány v tkáňovém inženýrství, patří alifatické polyestery, a to hlavně polymery kyseliny mléčné a glykolové, které degradují hydrolyticky.

Polyglykolid (PGA) se připravuje polymerací glykolidu a je vysoce krystalický, díky čemuž je také nerozpustný ve většině organických rozpouštědel [16]. Výhodou pro jeho použití v biomedicínských oborech jsou velmi dobré mechanické vlastnosti [16].

Polylaktid (PLA) se získává polykondenzací z kyseliny mléčné [16]. Další polymerizací lze docílit regulace fyzikálních vlastností a degradability polymeru, příkladem může být poly (DL-laktid) (PDLA) syntetizovaný polymerizací racemické směsi L- a D- laktidů.

Polylaktidglykol (PLGA) vzniká kopolymerací glykolidu a DL-laktidu. Hmotnostním poměrem jednotlivých monomerů lze ovlivnit rychlost degradace kopolymeru. Jestliže se poměr DL-laktid/glykolid zvětšuje, pak se rychlost degradace kopolymeru snižuje [16].

#### 2.4.3 Anorganické materiály

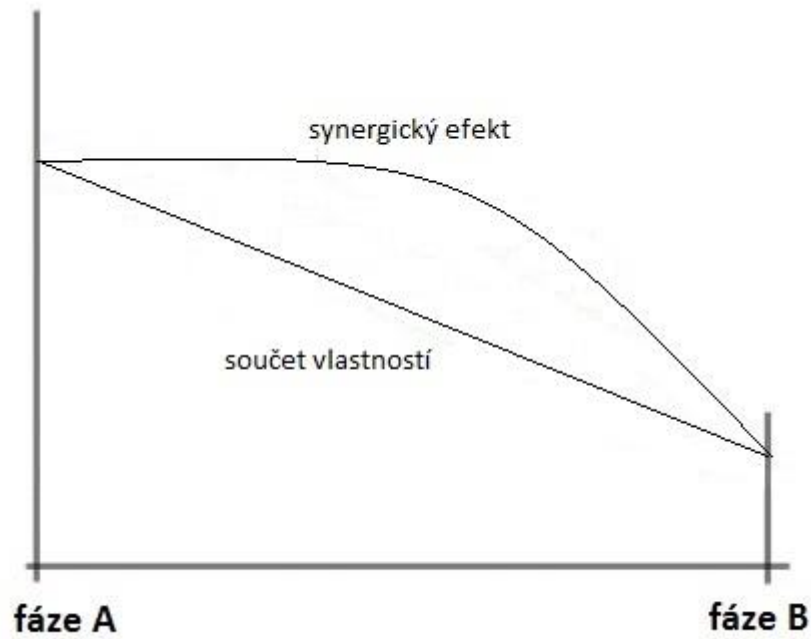
Anorganická složka, kalcium fosfát, tvoří v hmotnostním složení kosti až 60 % a vykazuje strukturní i chemické podobnosti s hydroxyapatitem ve formě nanokrystalů o velikosti 2-3 nm. V kostním tkáňovém inženýrství byla zkoumána celá řada anorganických látek právě z důvodu podobnosti s kostními minerály. Lidské kosti neobsahují stechiometricky čistý hydroxyapatit, ale substituovaný o další chemické prvky, některé jen na hladině ppm. Do rodiny kalcium fosfátů patří přibližně jedenáct druhů sloučenin s poměrem vápníku a fosforu v rozmezí mezi 0,5-2,0.

Mezi asi nejznámější zástupce patří například hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) nebo fosforečnan vápenatý ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) vyskytující se ve třech formách ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ).

Hydroxyapatit řadíme mezi keramické materiály, spolu s kolagenem tvoří základní stavební prvek kostí, je obsažený v dentinu, enamelu [17]. Mechanické vlastnosti hydroxyapatitu jsou ovlivněny mnoha faktory jako například zvolenou technikou přípravy, procesem tepelného zpracování atd. Základní charakteristikou u keramických materiálů je jejich hustota, jež má zásadní vliv na výsledné mechanické vlastnosti materiálu [17]. Hydroxyapatit má velmi dobré biomechanické vlastnosti, vykazuje také určitou míru bioaktivity, je schopný vázat se s kostí biochemickými vazbami, nevýhodou je však jeho křehkost. Fosforečnan vápenatý se od hydroxyapatitu liší nižší stabilitou a vyšší rozpustností. Vysoce rozpustná fosforečnan vápenatá keramika může být zdrojem stoupající koncentrace iontů vápníku, což může inhibovat migraci osteoklastů, které odpovídají za resorpci kostní matrix a pro úspěšnou resorpci vyžadují kyselé prostředí.

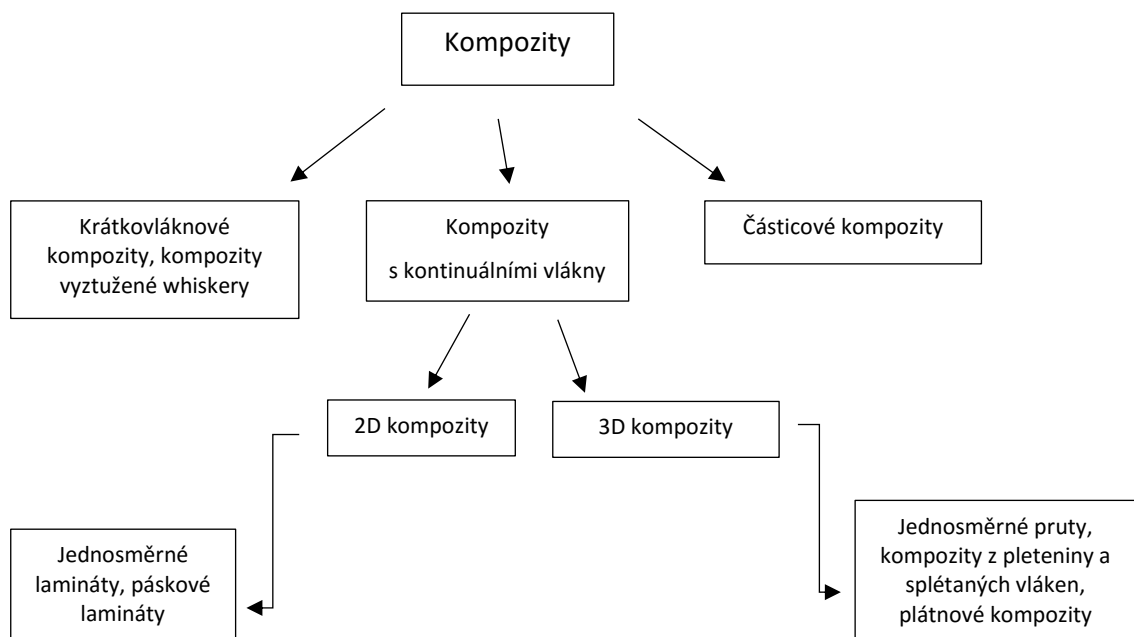
#### 2.4.4 Kompozitní materiály

Kompozitní materiály jsou složeny ze dvou nebo více vzájemně oddělených fází [18]. Jednotlivé fáze si v kompozitu ponechávají své vlastnosti, ale v systému uplatňují pouze přednosti a nedostatky jsou potlačovány. Výsledné vlastnosti celku jsou pak lepší než vlastnosti jednotlivých fází nebo jejich vzájemné sumace. Tento jev se nazývá synergický efekt a je znázorněn na Obr 2.1. Každý kompozitní materiál se skládá z matrice, což je spojitá fáze, která drží materiál pohromadě, a výztuže, jež by měla být v kompozitu rovnoměrně rozptýlená.



Obr. 2.1 Synergický efekt vlastností kompozitních materiálů [18].

Kompozitní materiály lze rozdělit například podle typu jejich výztuže (Obr. 2.2).



Obr. 2.2 Rozdělení kompozitních materiálů.

Výhodou kompozitních materiálů je možnost skládat na sebe vrstvy takovým způsobem, aby mechanické vlastnosti materiálu byly podle našich požadavků. V našem případě, kdy se snažíme imitovat kostní tkáň, se kompozit jeví jako nejvhodnější materiál.

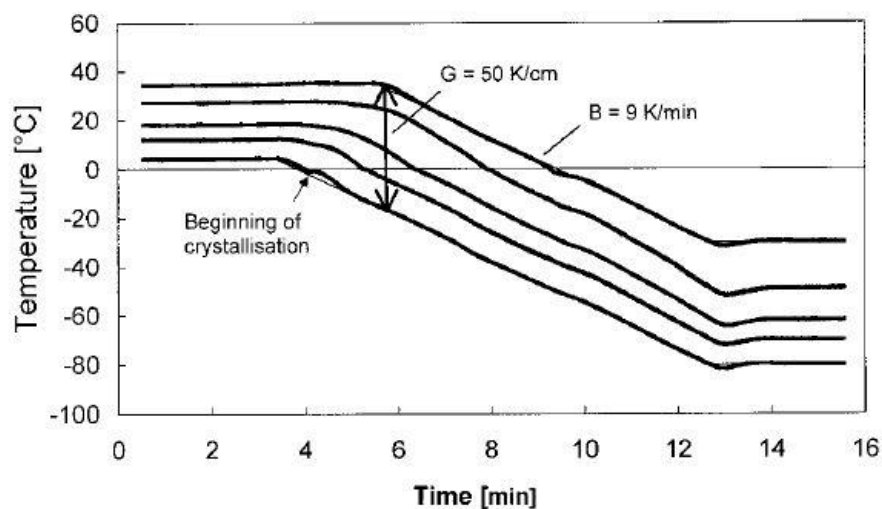
Kompozity lze dělit také podle jejich biodegradability, tj. kompozity částečně vstřebatelné nebo nevstřebatelné. Vstřebatelné kompozity jsou vyrobeny z výztuže i z matrice, jež jsou plně degradabilní. Poměrně velkou překážkou při konstrukci těchto materiálů je koordinace degradace obou fází, zvláště pak na jejich společném rozhraní. Částečně vstřebatelné kompozity jsou nejčastěji vyráběny z nevstřebatelných výztuží a vstřebatelných matic. Byly v podstatě jakýmsi předchůdcem plně vstřebatelných kompozitů, ale pozorované zánětlivé reakce na zbytkovou nedegradabilní fázi ve většině případů neumožnily jejich další rozšíření. Jejich použití je široké, a to především v oblastech, kde jsou požadovány klinické vlastnosti, které tradiční biomateriály postrádají.

## 2.5 Technologie a metody výroby scaffoldů

### 2.5.1 Lyofilizace

Lyofilizace se používá ve velké míře při přípravě nosičů, protože umožňuje snadné řízení velikosti pórů a jejich orientace. Jedná se o vytvoření tzv. houby vysrážením vody, sušením na kritickém bodu nebo vakuovém zmrazení. Při těchto procesech, kdy dojde k odstranění vody z materiálu, se výrazně zesílí mezimolekulární zesílení materiálu, čímž se docílí vytvoření stabilní houbové struktury [19]. Princip lyofilizace spočívá v tom, že vyrobenou homogenní směs při pokojové teplotě vložíme v kultivačních nádobách do lyofilizátoru, kde se chladí s určeným teplotním gradientem až na teplotu kolem  $-100^{\circ}\text{C}$  v prostředí blízkém vakuu. Na Obr. 2.3 jsou znázorněny teplotní křivky pro model lyofilizace. K ovlivnění velikosti a orientace pórů dochází několika způsoby. Před samotným vložením směsi do lyofilizátoru je směs uložena v mrazícím zařízení, při našem experimentu při teplotě  $-25^{\circ}\text{C}$ . Tato teplota výrazně ovlivňuje velikost pórů, neboť platí, že čím nižší teplota, tím menší velikost pórů vzniká.





Obr. 2.3 Teplotní křivky lyofilizace [19].

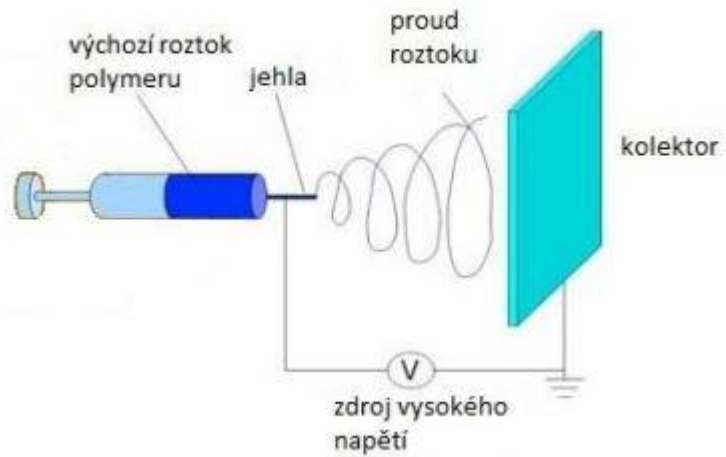
### 2.5.2 Aditivní technologie

Výroba nosičů pomocí 3D tisku se výrazně objevila až v poslední době díky velkému rozšíření samotného 3D tisku v průmyslu. Princip 3D tisku se liší dle metody, kterou tiskárna využívá. Spočívá ve vytvrzování materiálu, který je v dostatečné míře dodáván do tiskárny. Vytvrzování se děje například pomocí laseru, ultrafialového záření nebo vlivem tepelného působení. Výhodou této metody je možnost vyrobit přesnou strukturu podle našich požadavků. Nevýhodou však jsou omezené možnosti materiálů, které lze použít pro výrobu modelu pomocí této technologie. V nynější době se nejčastěji vyrábí v aditivní technologii modely matrice vyrobené z polymerů nebo případně modely kovové a keramické, do kterých se přidávají degradabilní vlákna.

### 2.5.3 Elektrostatické zvlákňování

Při elektrostatickém zvlákňování, které slouží k přípravě nanovláken z roztoku nebo taveniny, se využívá vodivosti polymerních roztoků a tavenin a jejich formování působením velkých elektrostatických sil. Tím vzniká vysoce porézní struktura s velmi jemnými vlákny [20]. Vzniklá vlákna jsou za působení elektrostatického pole deponována na podložku (kolektor). Proces elektrostatického zvlákňování je ovlivněn celou řadou parametrů, jednak parametry samotného procesu (napětí, vzdálenost elektrod, teplota, vlhkost atd.), tak především vlastnostmi

vlákenného roztoku (koncentrace, viskozita, povrchové napětí atd.). Jestliže je žádoucí, aby vlákna byla po dopadu orientována jedním směrem, používá se jako dopadající podložka rotující kolo nebo válec, kdy se vlákna vyrovnávají podle směru otáčení. Další princip elektrostatického zvlákňování pomocí kapiláry (emitor) je znázorněn na Obr. 2.4.



Obr. 2.4 Schéma stroje pro zvlákňování [21].

### 3 Experimentální část

V následující kapitole budou popsány materiály a metody testování, které byly použity pro náš experiment, který probíhal v rámci řešení programového projektu Ministerstva zdravotnictví České republiky „Vývoj a komplexní preklinické testování nových kompozitních materiálů pro kostní chirurgii“ (č. 15-25813A) na pracovišti Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i. a Laboratoři mechanických zkoušek na pracovišti Ústavu mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulty strojní ČVUT v Praze.

Vzorky byly kompletně připraveny v laboratoři ÚSMH pod vedením Ing. Tomáše Suchého, Ph.D. a s pomocí dalších odborných pracovníků ústavu. Celkem bylo připraveno osm skupin vzorků různého materiálového složení podle Tabulky 1. Každá skupina se skládala z minimálně 5 totožných vzorků, které byly později podrobeny tlakové zkoušce v Laboratoři mechanických zkoušek Fakulty strojní pod vedením Ing. Radka Sedláčka, Ph.D.

#### 3.1 Použité materiály a příprava vzorků

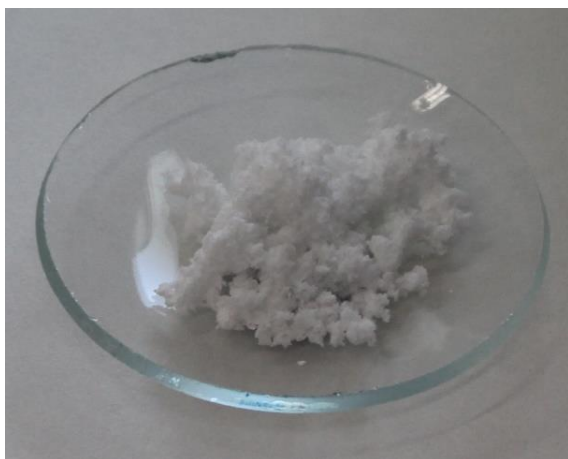
Pro přípravu kompozitních scaffoldů byly použity následující materiály. Jako prekurzor matrice byl použit lyofilizovaný kolagen typu I (COL) izolovaný z telecí kůže (VUP Medical, Česká republika). Výztuž kompozitu byla tvořena dvěma typy a to poly(DL-laktidovými) homogenizovanými nanovláknými (PDLLA) (Purasorb PDL 05, Corbion, Nizozemí) a nanočásticemi kalcium fosfátu (HA) izolovaného z prasečí kosti (postup izolace je popsán v práci Suchý a kol. [14]). Poslední složkou kompozitu byl hyaluronan sodný (HYA) (HySilk, Contipro, Česká republika). Matrice byla připravena jako vodní disperze kolagenu. Lyofilizovaný kolagen byl nejprve nastříhán na drobné kousky (Obr. 3.1) a poté k němu bylo přidáno dovážené množství deionizované vody. Po hodinovém bobtnání při pokojové teplotě (RT) byla směs homogenizována pomocí dezintegrátoru (IKA ULTRA-TURRAX, IKA) při 10 000 ot/min po dobu 10 minut a následně uložena po dobu 60 minut při RT.



Obr. 3.1 Pro snadnější přípravu disperze je lyofilizovaný kolagen nejprve nastříhán na drobné kousky.

PDLLA vlákna (průměru 275-300 nm) byla připravena elektrostatickým zvlákňováním na stroji Nanospider NS LAB 500 (Elmarco, Česká republika) z 10% hm. roztoku chloroformu (Penta, Česká republika). Připravené vrstvy byly poté homogenizovány dezintegrátorem po dobu 15 minut při otáčkách 14 000 ot/min (DI 18, IKA) v destilované vodě. Tato směs pak byla zmražena (-15°/24 hodin) a následně lyofilizována při teplotě -107° a tlaku cca 1,3 Pa (BenchTop 4KZL, VirTis).

Takto homogenizovaná vlákna PDLLA vlákna pak byla spolu s kalcium fosfátovými částicemi a hyaluronanem sodným (Obr. 3.2, Obr. 3.3) přidána do kolagenové disperze.



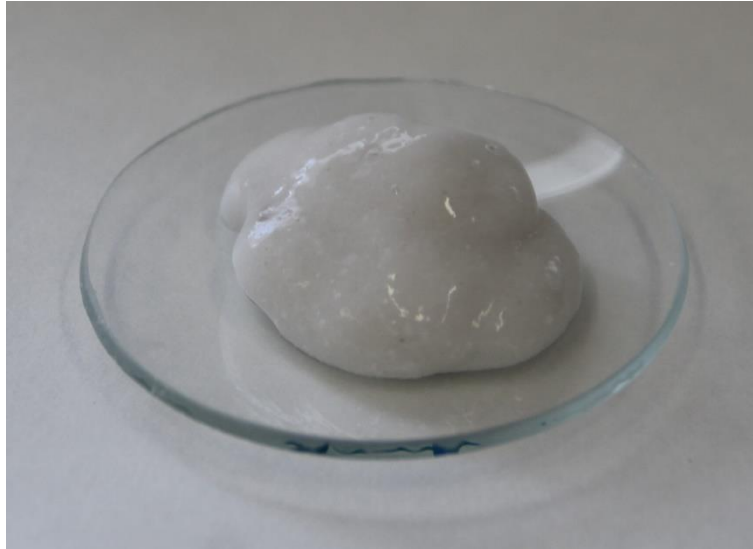
Obr. 3.2 Homogenizovaná PDLLA vlákna.



Obr. 3.3 Kalcium fosfát a hyaluronan sodný.

Celkový hmotnostní obsah vody v materiálu se udržoval na 90 %hm. u všech osmi typů připravovaných kompozitních scaffoldů. Konečné homogenizace této směsi bylo dosaženo opět dezintegrátorem při 6 500 ot/min po dobu 10 minut (Obr. 3.4) a následná směs byla dávkována do kultivačních jamek o průměru 6 mm (Obr. 3.5) a vložena do mrazicího zařízení, kde byla po dobu 12 hodin zmražena na -25 °C. Homogenizaci lze lépe provést ultrazvukovým

homogenizátorem, ale při této metodě je vyšší riziko zvýšené teploty disperze, jenž je nežádoucí z důvodu možné degradace kolagenu, proto je pro tento experiment dostačující homogenizace směsi mixováním.



Obr. 3.4 Kašovitá směs po homogenizaci.



Obr. 3.5 Dávkování směsi do kultivačních jamek.

Po vyjmutí kultivačních nádob z mrazícího zařízení byla směs lyofilizována ( $-107^{\circ}\text{C}$ , 1,3 Pa). Posledním krokem přípravy bylo síťování kolagenové složky scaffoldů za použití N-(3 dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) (EDC:NHS v hmotnostním poměru 4:1) rozpuštěných v 95 % ethanolu (Penta, Česká republika). Hmotnostní poměr EDC:kolagen se udržoval po celou dobu na hodnotě 5:8. Síťování probíhalo

po dobu 24 hodin při teplotě 37°C, poté se všechny scaffoldy dvakrát promyly v 0,1 M roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Penta, Česká republika) po dobu 45 minut a dále se scaffoldy promývaly v deionizované vodě po dobu 30 minut. Následně byly scaffoldy opět uloženy do mrazicího zařízení na 5 hodin při teplotě -15°C a poté opět vloženy do lyofilizátoru. Opětovné mražení a lyofilizace probíhá z důvodu zachování porozity scaffoldů.

Jednotlivé materiály byly namíchány dle Tabulky 2.1, bylo vytvořeno 8 typů kompozitních scaffoldů, které byly dále analyzovány.

Tabulka 2.1 Materiálové složení vzorků 1-8.

Označení vzorku	PDLLA [%hm]	COL [%hm]	HA [%hm]	HYA [%hm]
①	47	10	42,5	0,5
②	47	20	32,5	0,5
③	47	30	22,5	0,5
④	47	40	12,5	0,5
⑤	37	30	32,5	0,5
⑥	27	30	42,5	0,5
⑦	17	30	52,5	0,5
⑧	7	30	62,5	0,5

### 3.2 Metodika testování porézních kompozitních materiálů

V poslední době dochází k velkému rozmachu ve výrobě a použití kompozitních materiálů. Proto vzniká také mnoho nových zkušebních metod, které většinou odrážejí specifika dané oblasti a pro zkoušení tradičních materiálů ve strojírenství se nepoužívají [22]. Pro porézní kompozitní materiály je nejvhodnější metodou mechanického testování zkouška tlakem.

### 3.2.1 Porozita

Před samotným testováním na mechanické vlastnosti byly vzorky podrobeny měření porozity, která byla provedena dvěma metodami. První měření proběhlo pomocí volně přístupného software ImageJ (NIH, USA) hodnocením dvojrozměrných snímků skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Quanta 450 (FEI, USA). Vzorky byly před snímáním pokryty uhlíkem v atmosféře argonu na zařízení K550X Sputter Coater (EMITECH). Pro každý vzorek bylo pořízeno osm mikroskopických snímků struktury a na každém snímku bylo provedeno 20 měření pórů, z nichž pak byla spočtena střední hodnota a její odchylka.

Měření porozity bylo provedeno také pomocí trojrozměrné  $\mu$ CT analýzy na zařízení SkyScan 1272 (Bruker, Belgie) za pomoci originálního softwaru Bruker (NRecon, DataViewer, CTAn, CTvox, CTvol) na pracovišti Oddělení maxilofaciální chirurgie, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha (MUDr. Martin Bartoš).  $\mu$ CT představuje zobrazovací metodu založenou na RTG záření, která umožňuje zobrazení 3D struktury vzorků v rozlišení několika mikrometrů a jejich prostorovou analýzu, její zásadní předností je nedestruktivní charakter a přesnost. Pomocí  $\mu$ CT analýzy byla hodnocena otevřená a uzavřená porozita. Oba tyto parametry ovlivňují hydrataci vzorků a jsou podstatné pro správnou funkci scaffoldu, zejména z pohledu kultivace buněk (přívod živin, kyslíku, odvod atd.). Dalším hodnoceným parametrem byla velikost pórů. Zjednodušeně řečeno, trojrozměrná metoda určuje velikost pórů jako průměr největší koule vepsané do póru, přičemž cílem je vyplnění prostoru pomocí co nejmenšího počtu, co největších koulí. Z distribuce velikosti takovýchto pórů a jejich četnosti (structure separation distribution) lze pak stanovit střední hodnotu porozity a její parametry polohy.

### 3.2.2 Tlaková zkouška

Zkušební vzorek se umístí mezi tlakové desky zkušebního stroje tak, aby se osa zkušebního vzorku shodovala s osou horní a spodní tlakové desky. Jedná se o axiální zatěžování ideálně válcového vzorku při konstantní rychlosti působící síly. Všechny rozměry vzorku by měly být alespoň desetkrát větší než je průměrná velikost pórů vzorku. Během zkoušky tlakem se u každého vzorku zaznamenává křivka zatěžující síla/posuv za účelem stanovení charakteristických hodnot podle definic.

Použitá metodika vychází z normy ČSN ISO 13314 – Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tvárnosti – Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem.

Princip zkoušky spočíval v zatěžování testovaného vzorku vloženého mezi dvě kovové desky. Tlakové zatěžování probíhalo konstantní rychlostí  $2,0 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , přičemž bylo dosahováno rychlosti deformace cca  $0,003 \text{ s}^{-1}$  (rozsah  $10^{-3}$  až  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Všechny experimenty byly prováděny v laboratorním prostředí při teplotě vzduchu  $23\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  a vlhkosti  $45\pm 10 \text{ } \%$ .

### Použití zařízení testu

K testování byl použit systém MTS Mini Bionix 858.02 (metrologické označení PM 00) se silovými snímači 100 N (metrologické označení PM 00/16) a 10N (metrologické označení PM 00/08). Dále byl k testování použit přípravek určený pro realizaci tlakových zkoušek. Pro řízení testu byl použit program vytvořený v software FlexTest GT (metrologické označení PM 00/11). Pro měření vzorků byl použit digitální mikrometr MAHR 40 EX (metrologické označení PM 02). Dále byl pro záznam podmínek prostředí použit digitální teploměr-vlhkoměr COMET (metrologické označení PM 07).

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

### Vyhodnocované parametry

Ze získaných dat byly pro každý vzorek zatěžovaný tlakem vyhodnoceny následující parametry:

- pracovní diagram – závislost napětí na deformaci [ $\text{MPa} \times -$ ]
- stabilní hladina napětí  $\sigma_{pl}$  [MPa] (plateau stress) stanovená mezi 20% a 30% deformace
- deformace pro konec stabilní hladiny napětí  $e_{ple}$  [-] (plateau end) stanovená pro 1,3 násobek stabilní hladiny napětí
- elastický gradient  $E$  [MPa] (elastic gradient) – směrnice sečny získané z hysterezní smyčky při odlehčení
- smluvní mez kluzu  $\sigma_{kt}$  [MPa] (compressive proof stress) stanovená při plastickém stlačení o 1,0%
- absorbovaná energie  $W$  [ $\text{MJ}/\text{m}^3$ ] (energy absorption) při deformaci 50%
- účinnost absorbované energie  $W_e$  [%] (energy absorption efficiency)



## Postup zkoušky

- proměření vzorku – 3x průměr, 1x výška
- odhad  $\sigma_{pl}$  – proveden z prvotního měření jednoho vzorku skupiny nebo z průměrné hodnoty dosažené v testované skupině
- stanovení hodnot pro odlehčovací hysterezní smyčku –  $F_{70}$  a  $F_{20}$  ( $F_{70} = 0,7 * \sigma_{pl} * S_0$ ,  $F_{20} = 0,2 * \sigma_{pl} * S_0$ )
- stanovení maximální zatěžovací síly  $F_{max}$  ( $F_{max} = 1,3 * \sigma_{pl} * S_0$ ; požadovaná deformace větší než 50%)
- vložení vzorku mezi zatěžovací desky
- zatěžování s odlehčovací hysterezní smyčkou
- vyhodnocení  $\sigma_{pl}$  a ověření, zda byly hodnoty  $F_{70}$  a  $F_{20}$  nastaveny správně
- stanovení rychlosti deformace [ $s^{-1}$ ]
- ověření, zda je rychlost deformace v rozsahu  $10^{-3}$  až  $10^{-2} s^{-1}$

Mechanické zkoušky scaffoldů probíhaly ve dvou skupinách. Při prvním testování byly vzorky v suchém prostředí a nebyly tedy podrobeny žádným externím vlivům. Před druhým testováním byly vzorky uloženy v kultivačním roztoku po dobu 24 a 48 hodin. Cílem expozice v médiu bylo simulovat podmínky při osazování scaffoldů buňkami, jinými slovy charakterizace hydratovaného materiálu, se kterým jsou buňky v kontaktu a jehož mechanické vlastnosti v tomto stavu ovlivňují chování buněk. Vzorky byly exponovány v  $\alpha$  MEM mediu (používaném pro kultivaci mezenchymálních kmenových buněk), v inkubátoru s řízenou atmosférou (5 %  $CO_2$ ) (DH  $CO_2$  incubator, Thermo Scientific) a při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin, která simuluje přirozené prostředí v lidském organismu.

Před samotným zatěžováním byly vzorky změřeny mikrometrem a změřené hodnoty byly zaznamenány do tabulky (Obr. 3.6). Následně byly vzorky postupně podrobeny tlakové zkoušce podle výše popsané metodiky. Pro každý vzorek bylo zapotřebí odhadnout hodnotu  $\sigma_{pl}$ , pro kterou pak byly spočítané hodnoty síly  $F_{20}$  a  $F_{70}$ , které charakterizovaly hysterezní smyčku.



Obr. 3.6 Zaznamenávání rozměrů vzorků mikrometrem.

Odlehčení vzorku musí být provedeno v oblasti deformace 0 – 0,2, jinak hysterezní smyčka zasahuje do oblasti  $\sigma_{pl}$  a výpočet je pak nepřesný. Z mechanických zkoušek jsme získali hodnoty posuvu zatěžovací desky a tlakové síly vzorku na desku. Z těchto hodnot byly pomocí algoritmu, který byl vytvořen v software Matlab, spočítány ostatní parametry potřebné k vyhodnocení zkoušek. Deset vzorků bylo pro kontrolu vyhodnoceno také ručně, aby byla zajištěna správnost výsledků vypočítaných pomocí algoritmu. Vypočtené hodnoty parametrů byly přehledně zapsány do tabulky a byly dále podrobeny statistickému zpracování v software STATGRAPHICS.

### 3.2.3 Degradace scaffoldů během kultivace

Degradace scaffoldů během kultivace v médiu byla hodnocena pomocí stanoven hmotnostních úbytků, dále byla stanovena míra bobtnání. Experiment si kladl za cíl simulovat podmínky expozice scaffoldů v kultivačním médiu za stejných podmínek, jakým byly vystaveny pro dosažení hydratovaných stavů při stanovení mechanických vlastností, a charakterizovat možné změny v chování scaffoldů. Vzorky byly po tyto periody exponovány v  $\alpha$  MEM mediu, v inkubátoru s řízenou atmosférou (5 % CO<sub>2</sub>) a při 37 °C. Po expozici byly vzorky pečlivě promyty deionizovanou vodou, zmrazeny a vysušeny lyofilizací. Míra degradace byla vypočtena jako poměr rozdílu hmotností vzorku před ( $W_0$ ) a po degradaci ( $W_t$ ), a hmotnosti před degradací ( $W_0$ );  $D = \frac{W_0 - W_t}{W_0} 100$  [%]. Míra bobtnání byla stanovena jako poměr rozdílu hmotností nasáklého vzorku ( $W_{sw}$ ) a vzorku před expozicí v médiu ( $W_0$ );  $E_{sw} = \frac{W_{sw} - W_0}{W_0} 100$  [%]. Hmotnost vzorku po

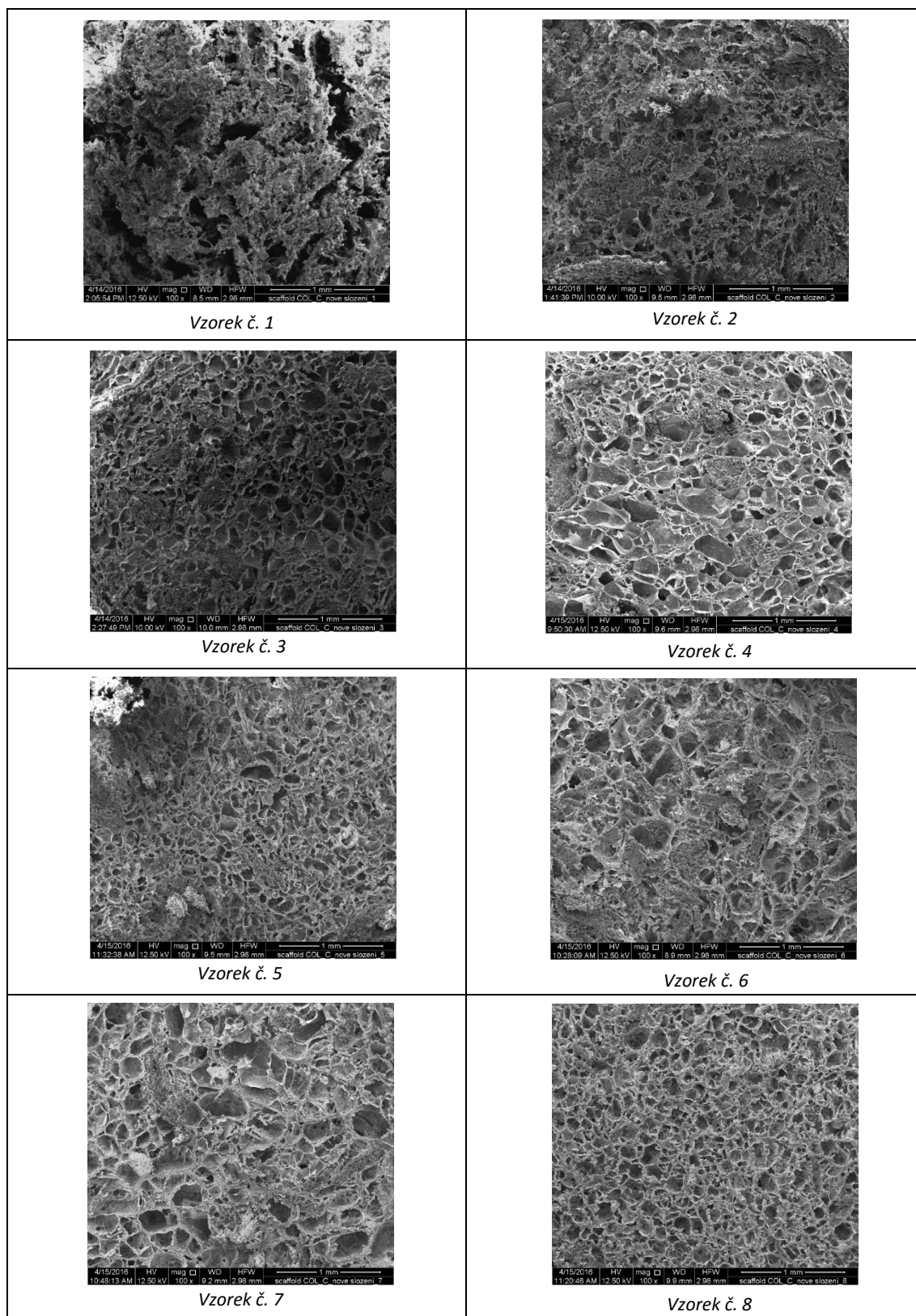
expozici byla stanovena po vyjmutí vzorku z média a po 1 min prodlevě, při které bylo odstraněno médium z okolí vzorku, hmotnost v suchém stavu byla stanovena opět po lyofilizaci.

#### 3.2.4 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru STATGRAPHICS Centurion XV, (StatPoint, USA). Aby bylo možné zvolit metodu, podle které budou data dále zpracována, bylo nutné provést test normality, pro který byl použit Shapiro-Wilkův test. Dále byl proveden test homoskedasticity, neboli rovnosti rozptylů, podle Barlettovy - Levenovy metody, vše na hladině spolehlivosti 95 %. U všech hodnocených souborů dat byla vždy porušena jedna ze dvou podmínek pro použití parametrických testů, proto byl pro statistické vyhodnocení použit Kruskal-Wallisův neparametrický test a následně Mann Whitneyův post-hoc test (M-W), kdy byly mezi sebou vzájemně porovnány mediány jednotlivých vzorků. Testy byly opět provedeny na hladině spolehlivosti 95 %. Výsledné hodnoty jsou v práci vyneseny v krabicových grafech, kde je medián znázorněn čarou uvnitř krabice a aritmetický průměr červeným křížem v krabici. Velikost krabice je dána 25% a 75% kvantilem. Vousy krabice udávají 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí (IQR) odečteného nebo přičteného k hodnotě 25% nebo 75% kvantilu. Dále jsou v krabicovém grafu uváděny také samostatné body (odlehle hodnoty), které se do tohoto rozpětí nevešly, pokud jsou až za trojnásobkem IQR, jedná se o extrémní odchylky.

## 4 Výsledky

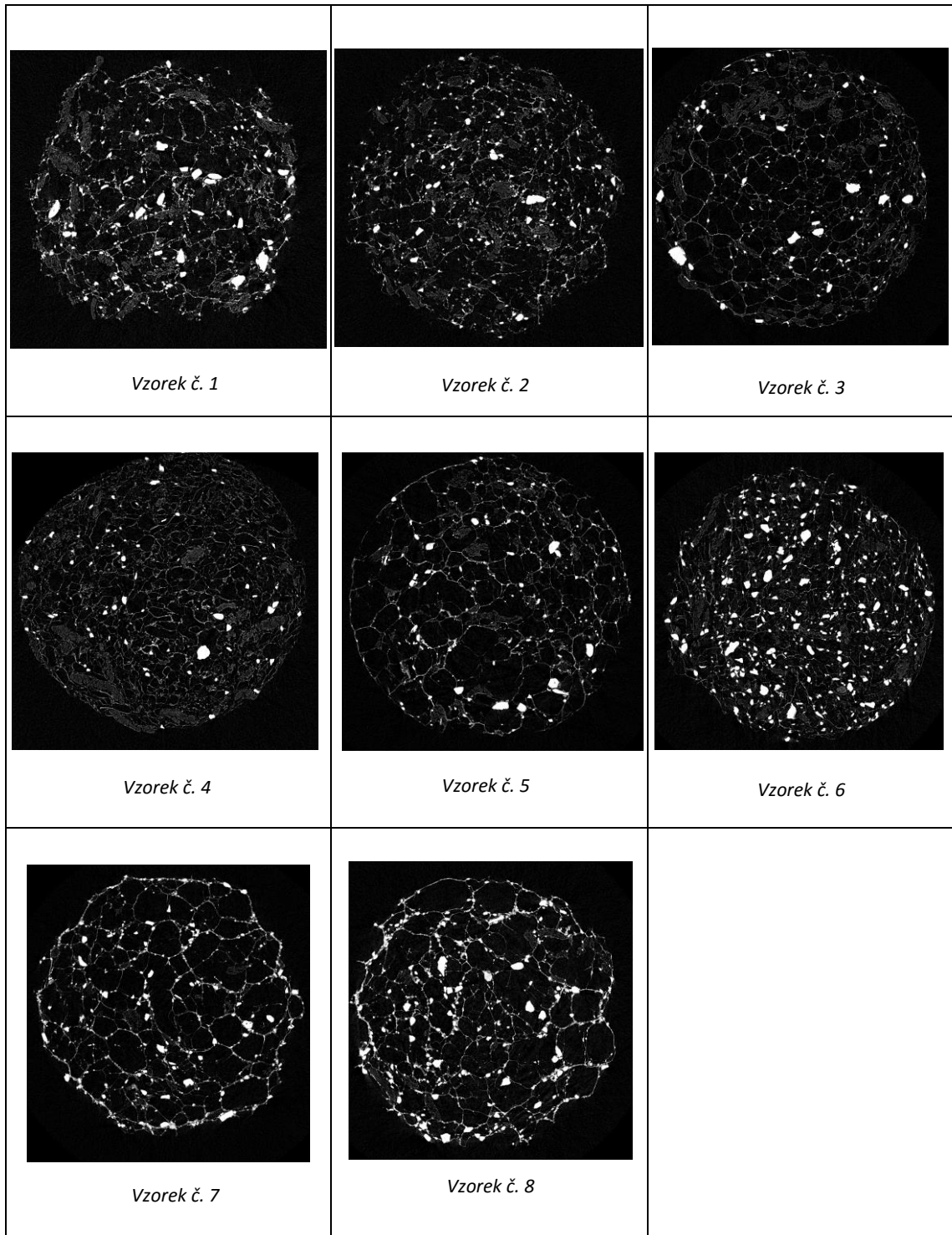
### 4.1 Vyhodnocení porozity



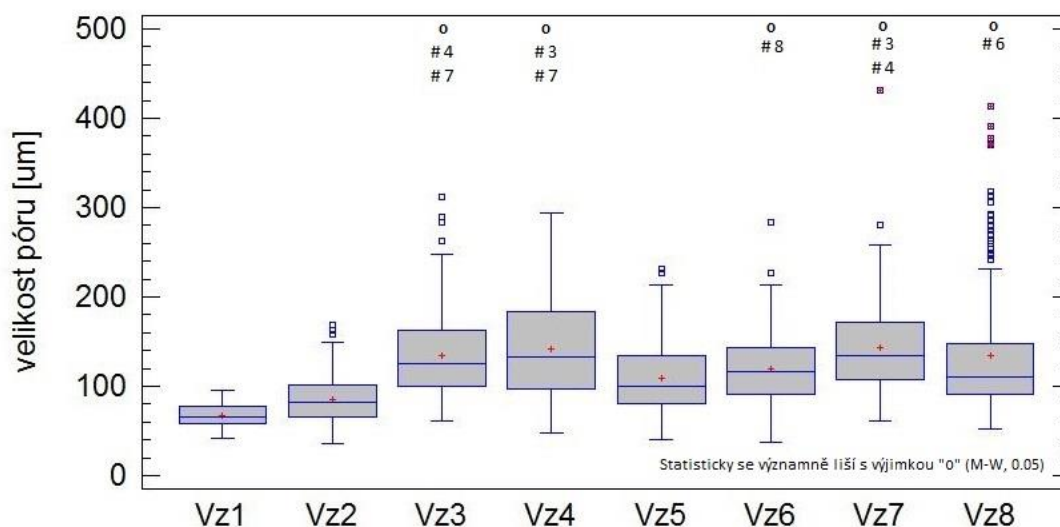
Obr. 4.1 Ukázka mikroskopických SEM snímků struktury scaffoldů, přiblížení 100x.

Tabulka 4.1 Tabulka vzorků podle obsahu kolagenu.

	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6	vzorek 7	vzorek 8
% hm kolagenu	10	20	30	40	30	30	30	30



Obr. 4.2 Ukázka  $\mu$ CT snímků struktury scaffoldů.

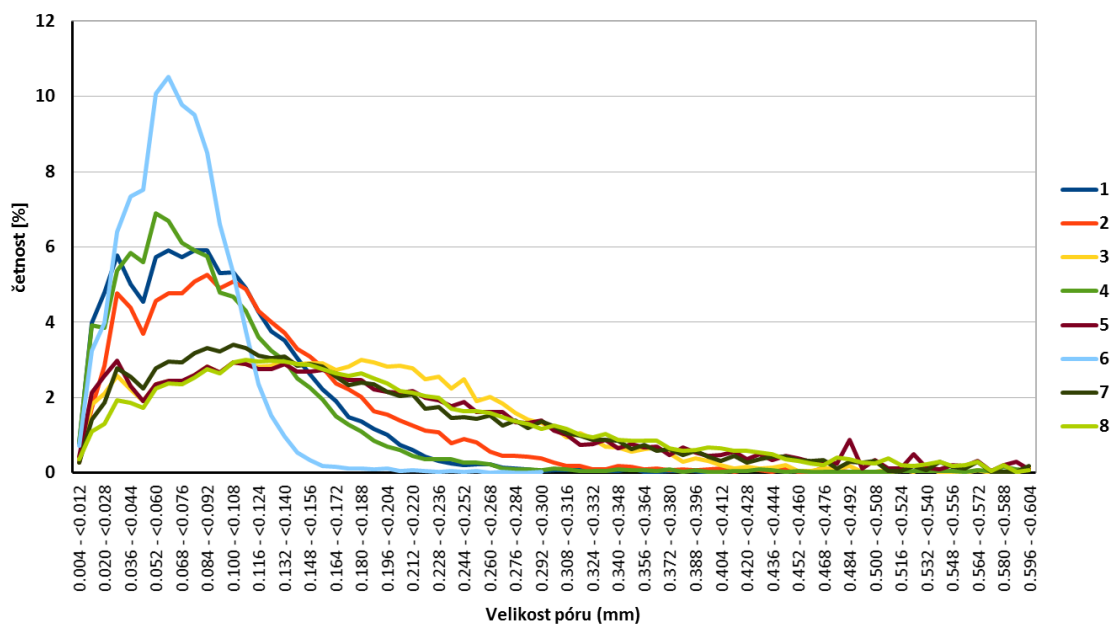


Obr. 4.3 Krabicový graf statistických parametrů hodnot z měření porozity v software ImageJ. V grafu jsou vyznačeny soubory dat, které se vzájemně statisticky významně liší kromě "o" (M-W, 0,05)

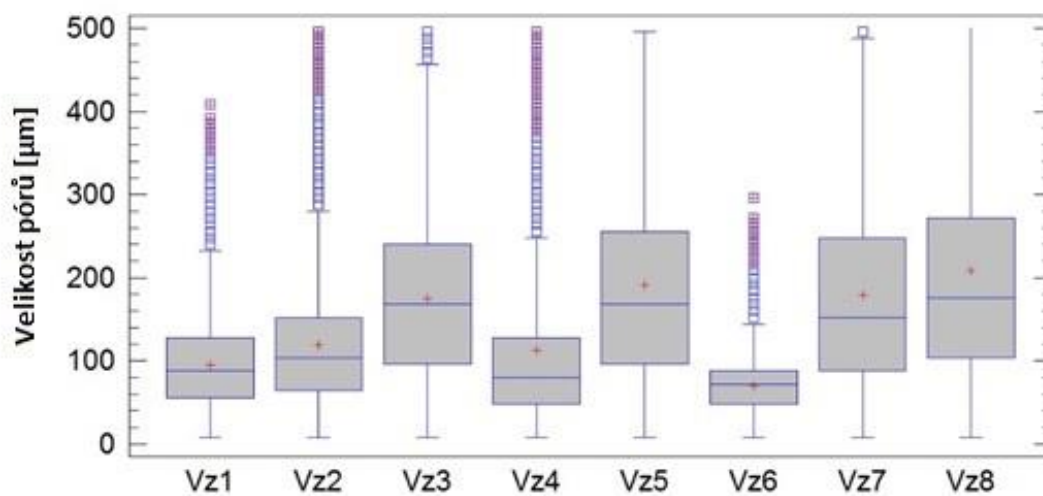
Z přístroje  $\mu$ CT byla kromě porozity hodnocena také otevřená nebo případně uzavřená porozita. Všechny zjištěné údaje jsou přehledně zapsány v Tabulce 4.2, z níž vychází Obr. 4.4, respektive Obr. 4.5.

Tabulka 4.2 Porozity a velikost pórů kompozitních scaffoldů stanovené trojrozměrnou  $\mu$ CT analýzou a hodnocením dvojrozměrných SEM snímků (2D).

vzorek	otevřená porozita	uzavřená porozita	velikost póru medián	velikost póru medián <sup>2D</sup>	velikost póru IQR	velikost póru IQR <sup>2D</sup>
	[%]	[%]	[um]	[um]	[um]	[um]
①	82,30	0,01	88	67	<56; 128>	<58; 77>
②	87,81	0,01	104	86	<64; 152>	<65; 101>
③	86,74	0,06	168	135	<96; 240>	<101; 162>
④	83,48	0,06	80	141	<48; 128>	<97; 184>
⑤	87,06	0,03	168	109	<96; 256>	<80; 134>
⑥	81,41	0,07	72	120	<48; 88>	<92; 143>
⑦	86,01	0,02	152	143	<88; 248>	<107; 171>
⑧	85,73	0,06	176	134	<104; 272>	<91; 147>



Obr. 4.4 Distribuce velikosti póruů získaných z  $\mu$ CT 3D analýzy.



Obr. 4.5 Velikost póruů získaných z  $\mu$ CT 3D analýzy.

## 4.2 Vyhodnocení mechanických zkoušek

Nejprve byl vyhodnocován vliv materiálového složení na mechanické vlastnosti a dále pak byly mezi sebou porovnány vzorky se stejným materiálovým složením ze všech tří zkoušek – 1.

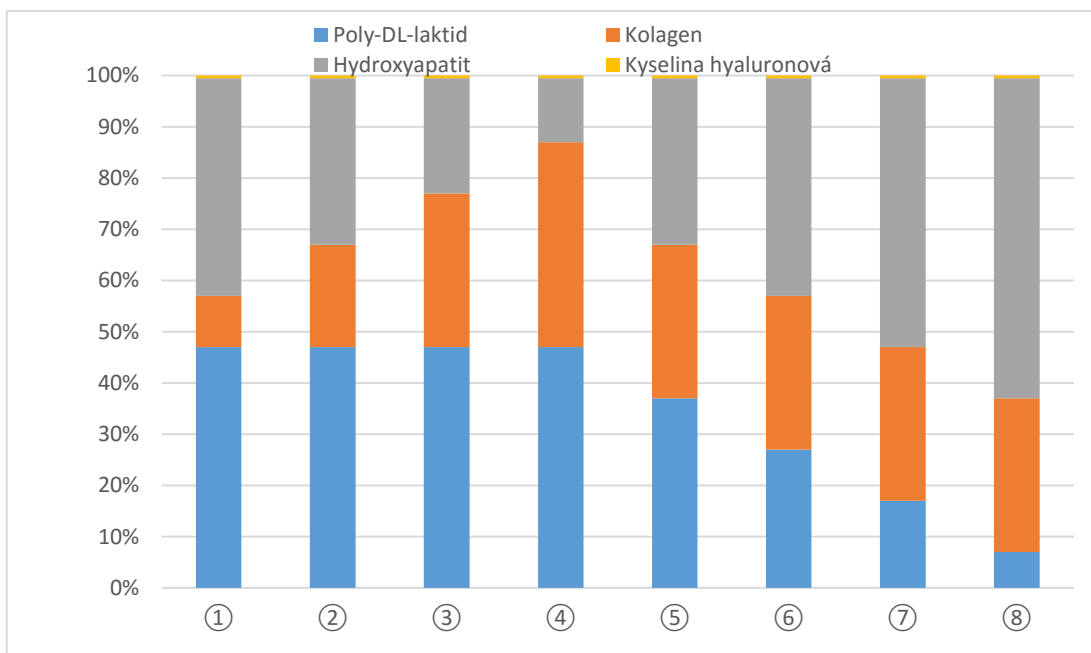
zkouška v suchém stavu, 2. zkouška v roztoku po dobu 24 hodin, 3. zkouška v roztoku po dobu 48 hodin.



Obr. 4.6 Mechanické zkoušky vzorků v roztoku.

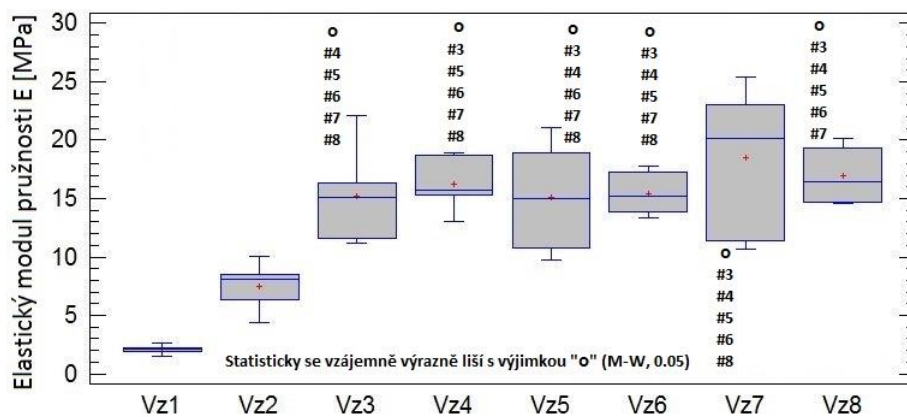
#### 4.2.1 Vliv materiálového složení na mechanické vlastnosti

První část vyhodnocení byla zaměřena na to, jaký vliv na mechanické vlastnosti má materiálové složení. Materiálové složení je patrné z Obr. 4.7, který vychází z Tabulky 2.1.

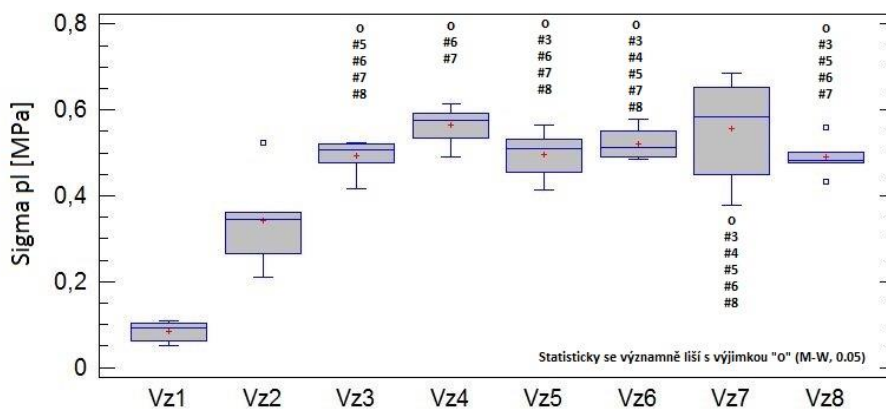


Obr. 4.7 Materiálové složení vzorků.

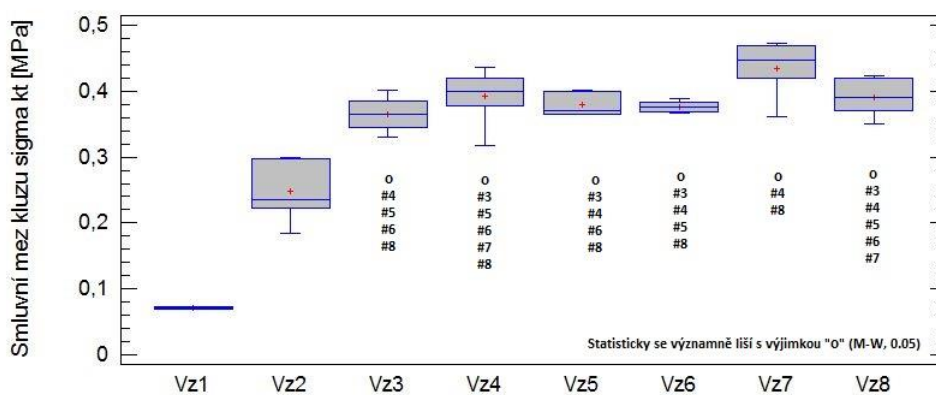




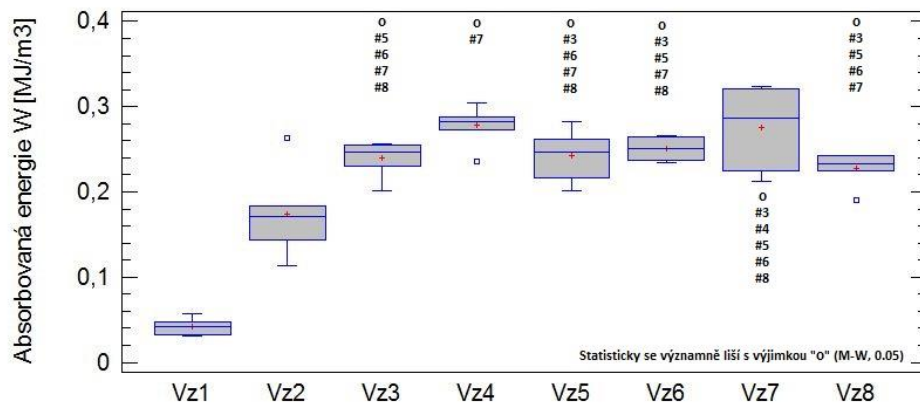
Obr. 4.8 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v suchém stavu. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.9 Vliv materiálového složení na  $\sigma_{pl}$  v suchém stavu. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).

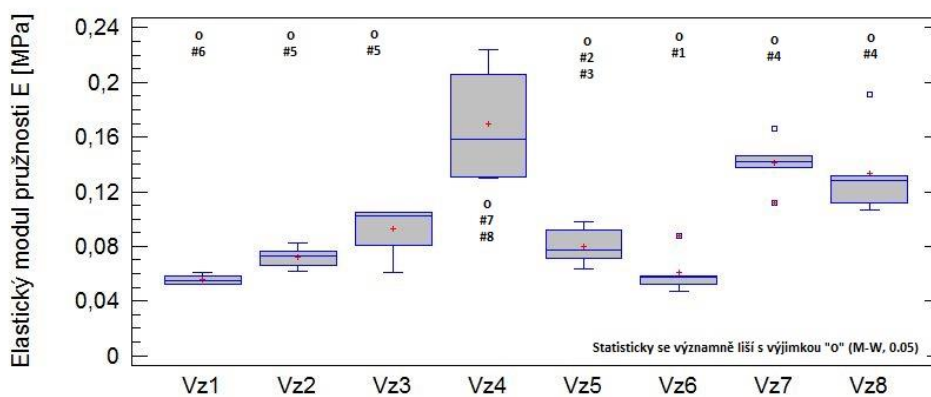


Obr. 4.10 Vliv materiálového složení na  $\sigma_{kt}$  v suchém stavu. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).

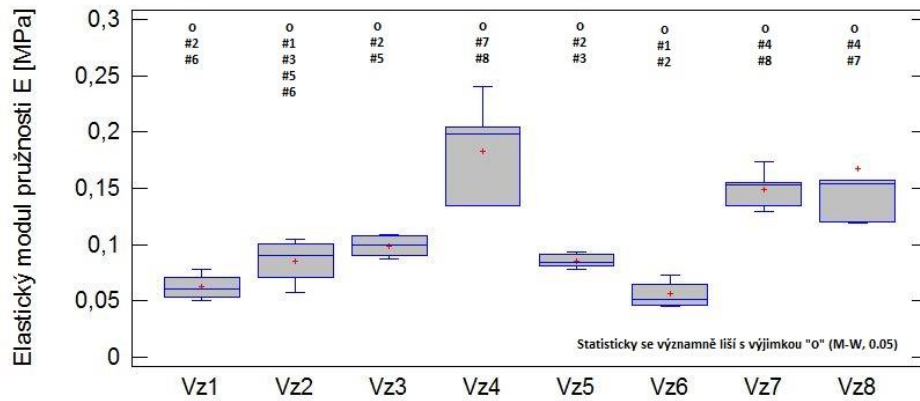


Obr. 4.11 Vliv materiálového složení na absorbovanou energii v suchém stavu. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).

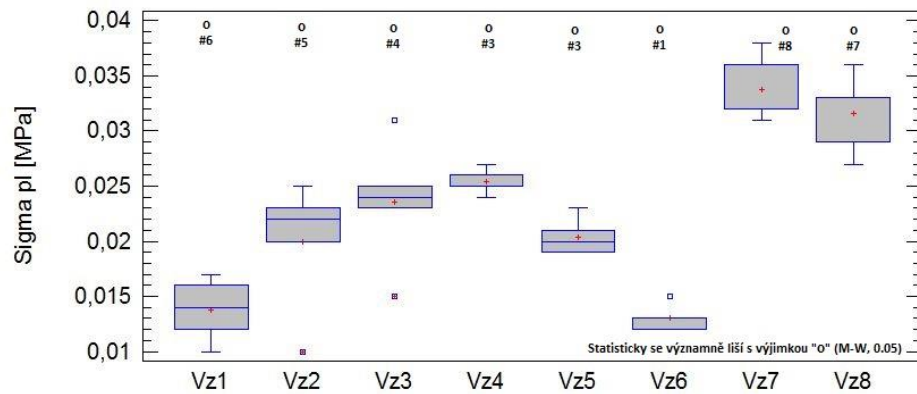
Následně byly provedeny měření elastického modulu pružnosti a  $\sigma_{pl}$  v hydratovaných stavech po 24 a 48 hodinách.



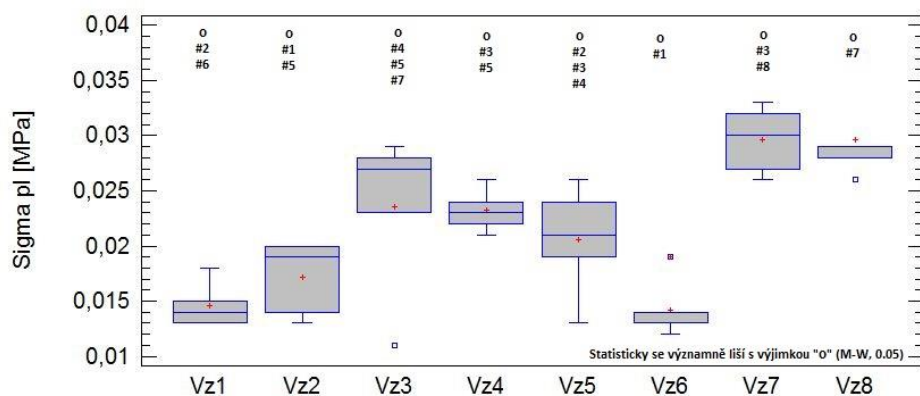
Obr. 4.12 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v hydratovaném stavu po dobu 24 hodin. Soubory dat se vzájemně výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.13 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v hydratovaném stavu po dobu 48 hodin. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.14 Vliv materiálového složení na  $\sigma_p$  v hydratovaném stavu po dobu 24 hodin. Soubory dat se statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



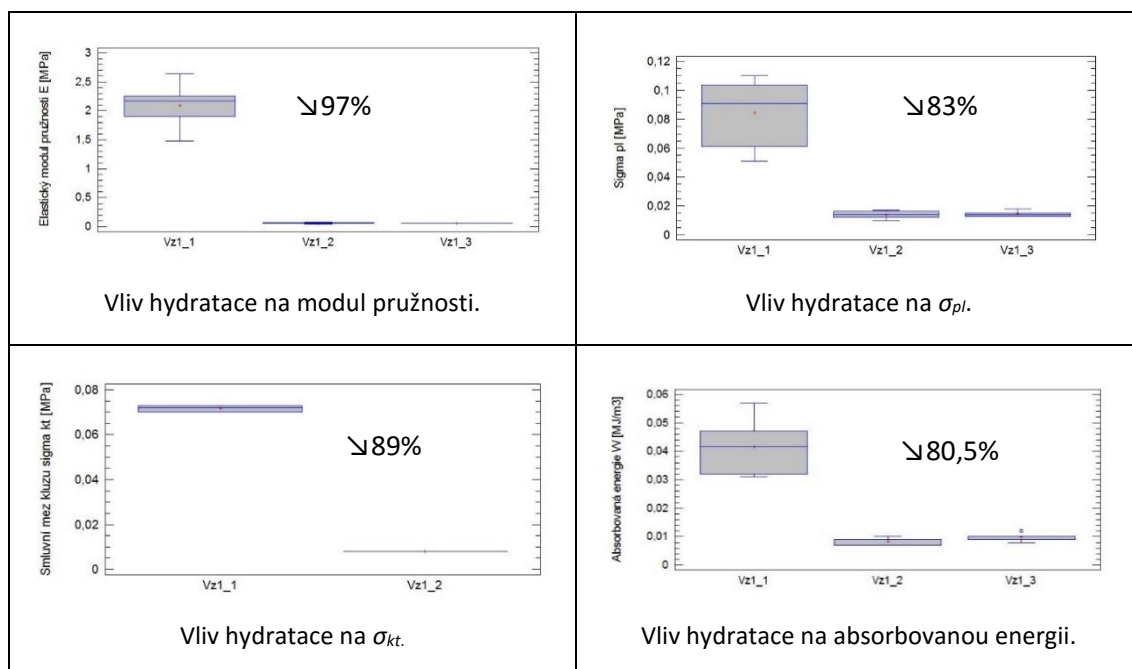
Obr. 4.15 Vliv materiálového složení na  $\sigma_p$  v hydratovaném stavu po dobu 48 hodin. Soubory dat se vzájemně statisticky výrazně liší kromě "o" (M-W, 0,05).

#### 4.2.2 Vliv hydratace na materiálové vlastnosti

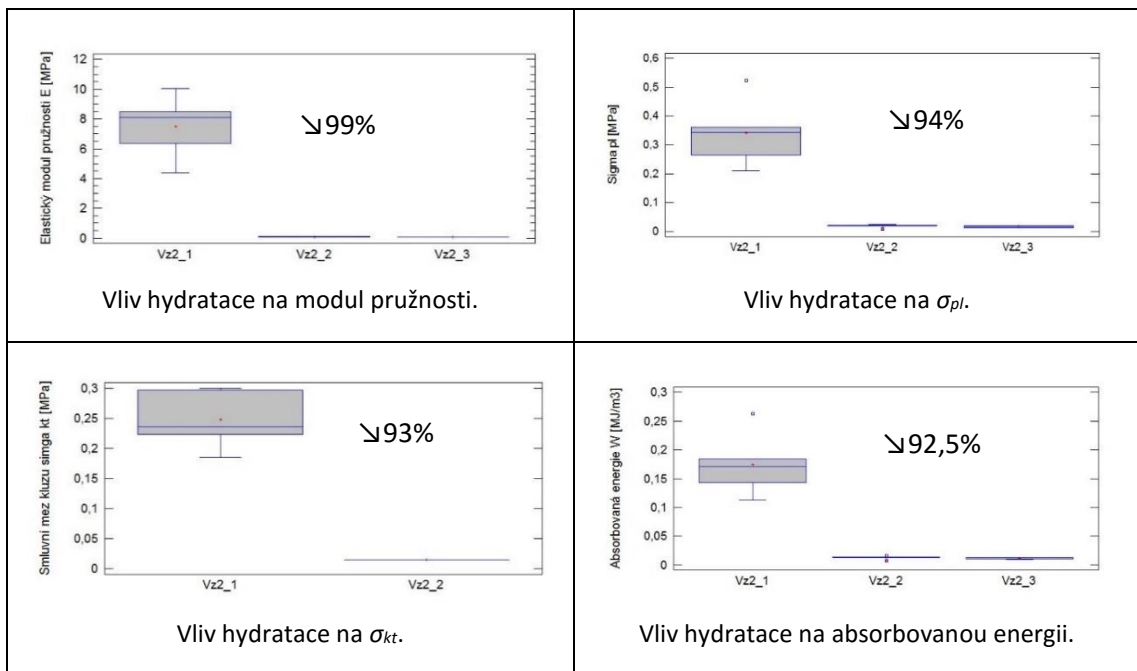
Dále bylo provedeno vyhodnocení výsledků dle vlivu hydratace na mechanické vlastnosti scaffoldů. Byly mezi sebou porovnány vzorky se stejným materiálovým složením v suchém stavu a při hydrataci po dobu 24 a 48 hodin. Obecně lze říci, že hodnoty parametrů se mezi stavy hydratace (24 a 48 hodin) vzájemně statisticky významně neliší, proto procentuální porovnání, tedy procentuální pokles hodnot parametrů mezi dvěma stavy, je provedeno pouze pro suchý stav a stav po 24 hodinách hydratace. U vzorku 3 nebylo vzhledem k získaným datům možné stanovit parametr  $\sigma_{kt}$ . U vzorku 1, 2 a 5 nebylo z důvodu nedostatku dat možné parametr  $\sigma_{kt}$  určit v hydratovaném stavu po dobu 24 respektive 48 hodin.

Tabulka 4.3 Znárodnění značení jednotlivých stavů.

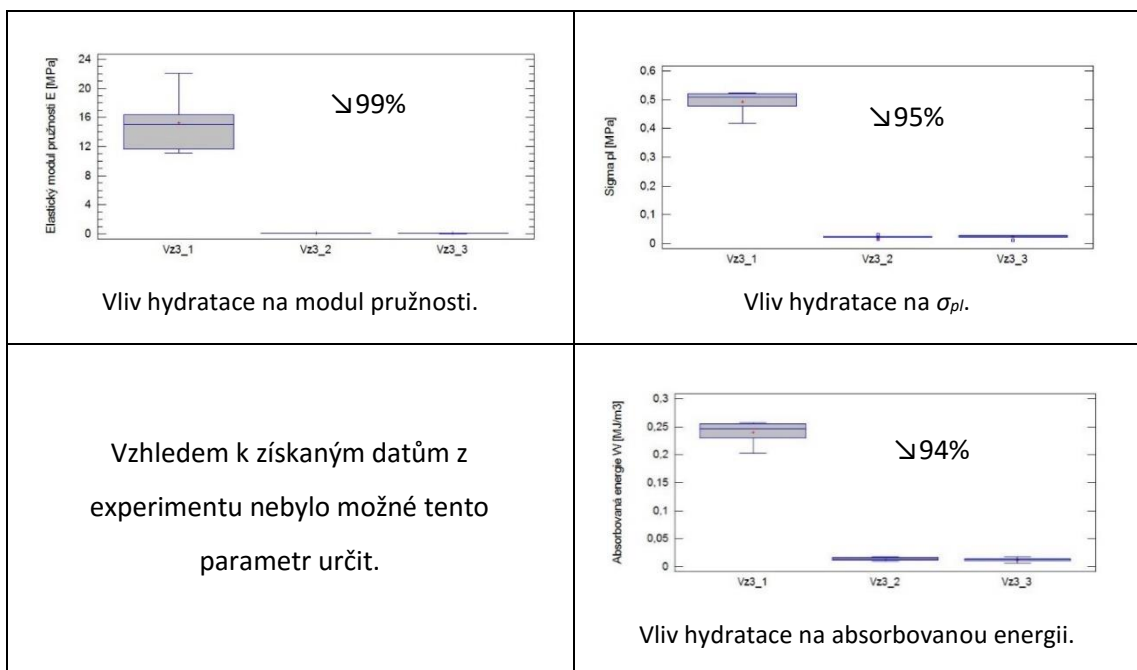
Vz1_1	Vz1_2	Vz1_3
Vzorek 1 v suchém stavu	Vzorek 1 v hydratovaném stavu po dobu 24 hodin	Vzorek jedna v hydratovaném stavu po dobu 48 hodin



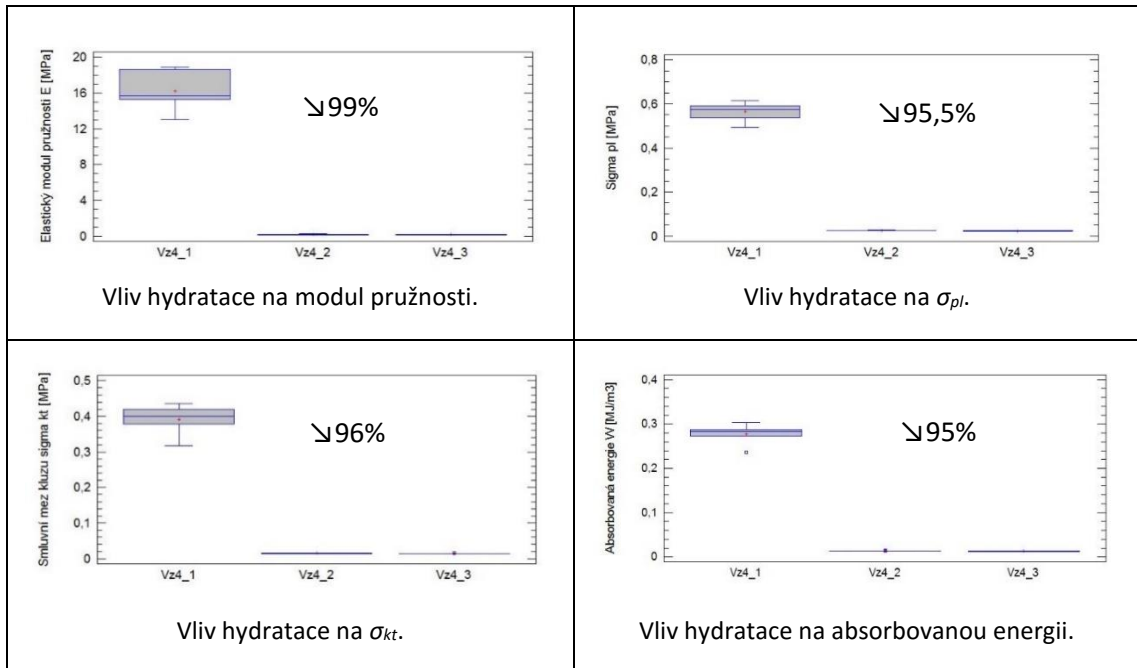
Obr. 4.16 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 1.



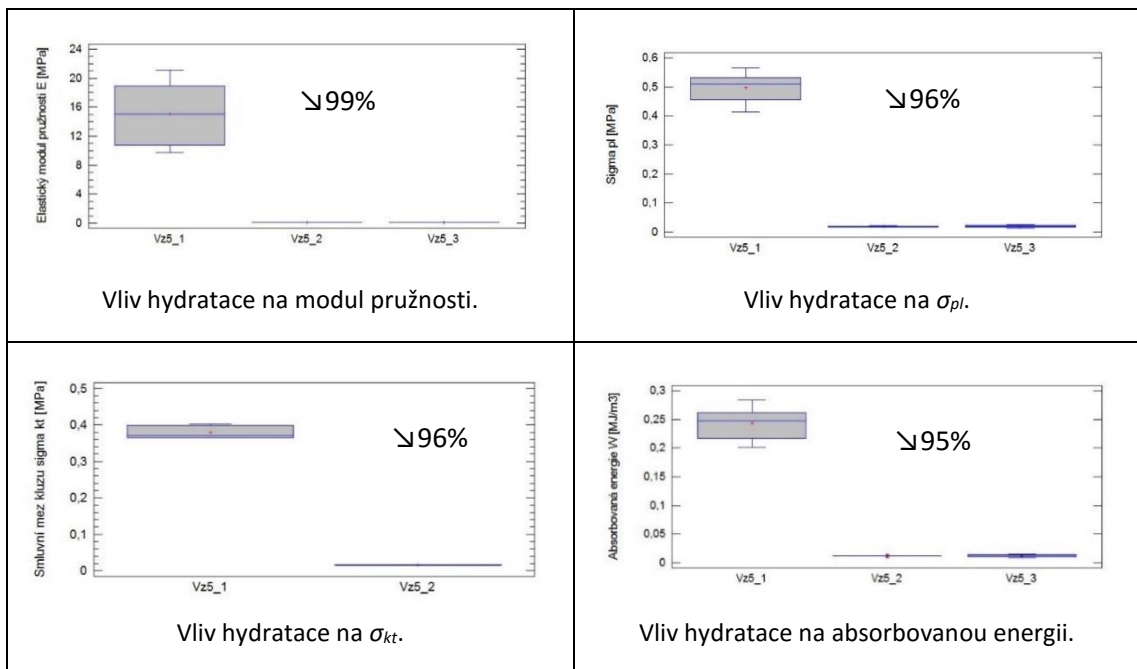
Obr. 4. 17 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 2.



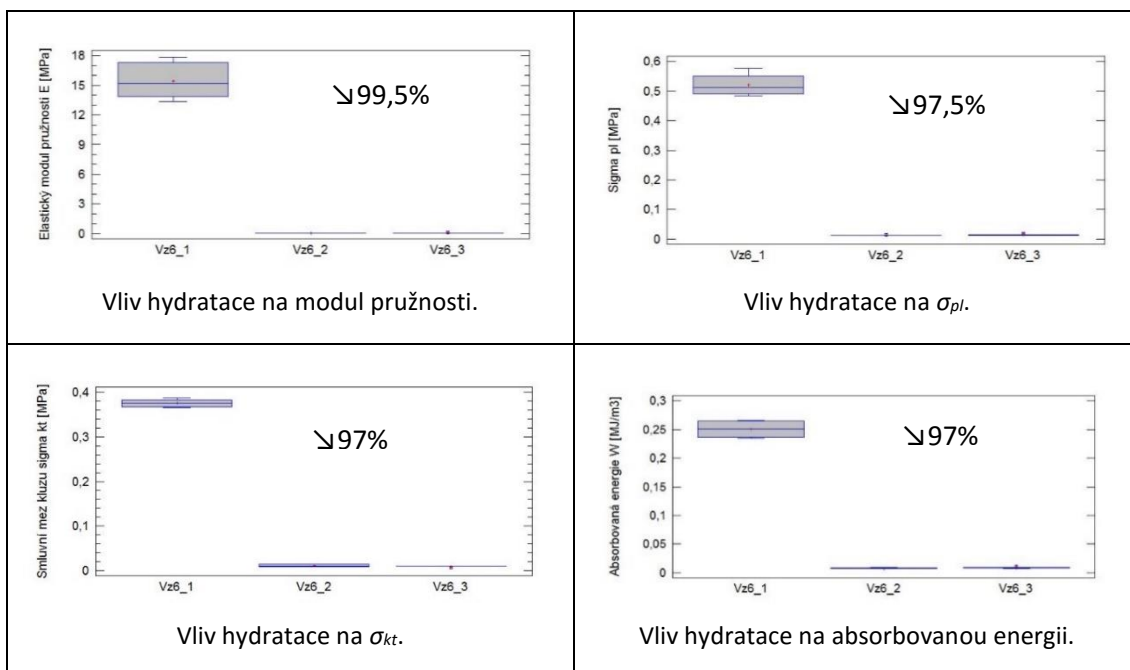
Obr. 4.18 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 3.



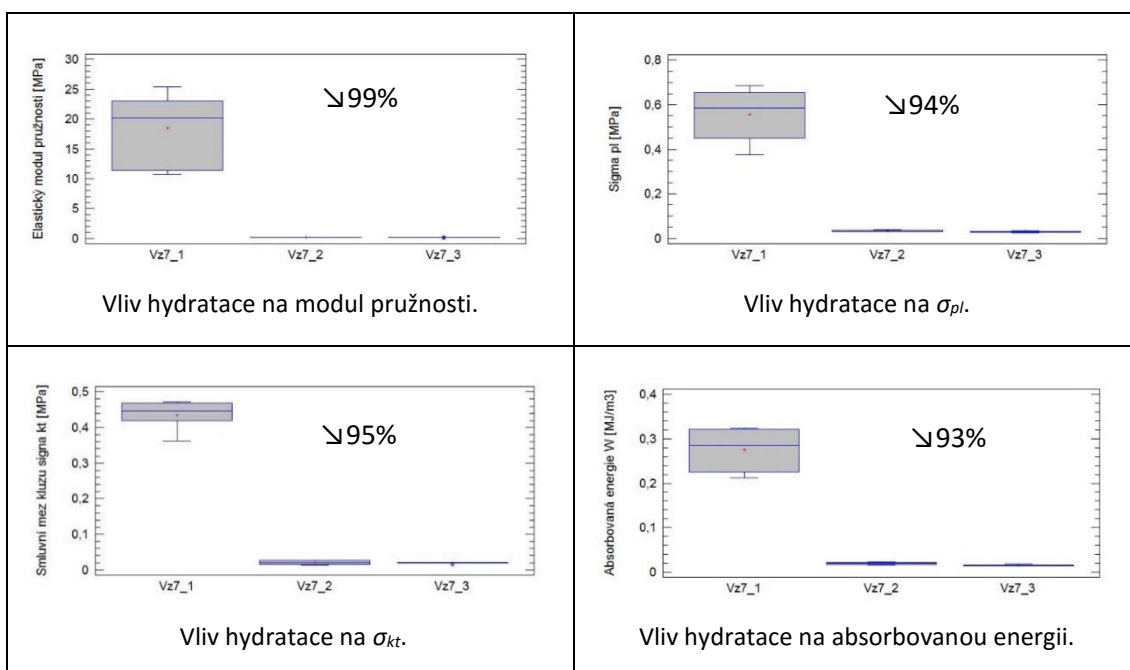
Obr. 4.19 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 4.



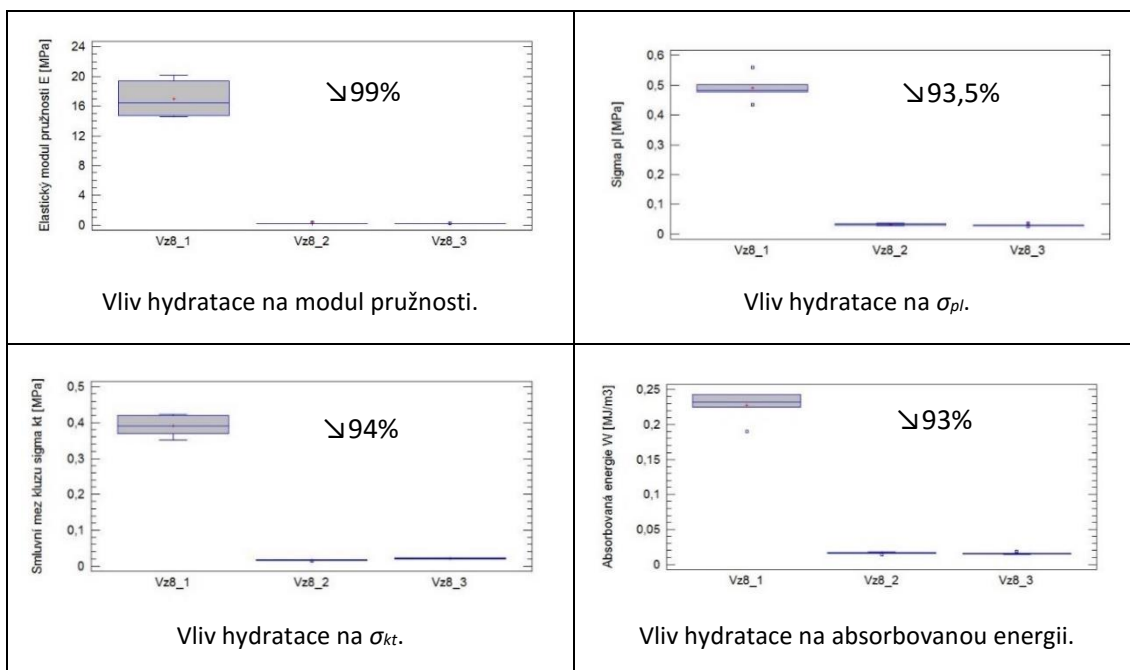
Obr. 4.20 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 5.



Obr. 4.21 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 6.



Obr. 4.22 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 7.

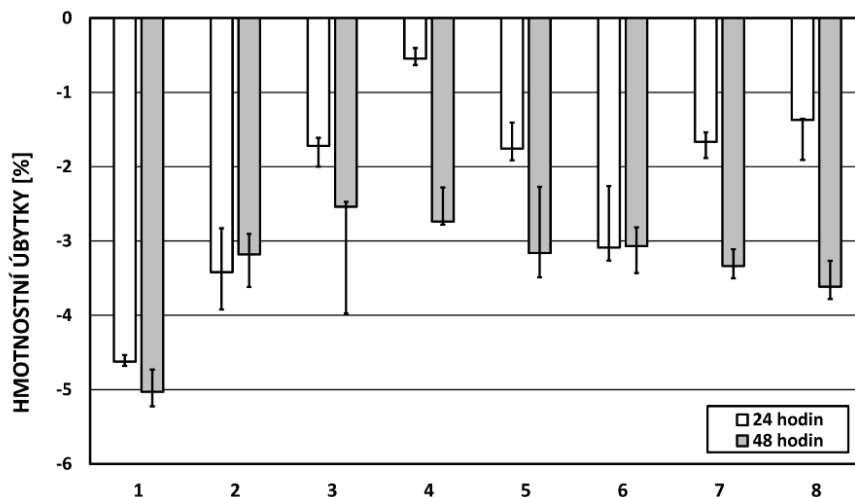


Obr. 4.23 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 8.

#### 4.2.3 Degradace scaffoldů během kultivace

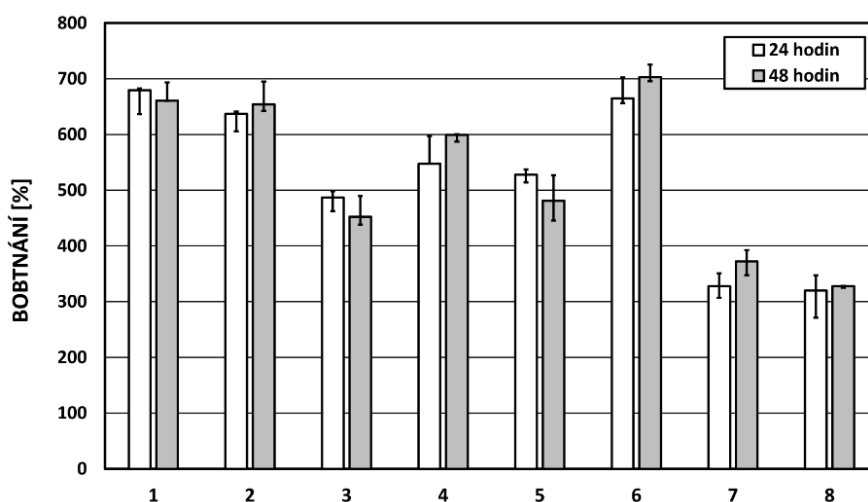
Cílem experimentu bylo ověřit možné změny ve vnitřní struktuře scaffoldů způsobené degradací v simulovaném tělním prostředí, resp. v prostředí kterému budou scaffoldy vystaveny během kultivace. Na Obr. 4.24 jsou přehledně zobrazeny výsledné hodnoty hmotnostních úbytků po jednotlivých dobách expozice scaffoldů v médiu. Vliv hydratace byl dále charakterizován pomocí stanovení míry bobtnání.





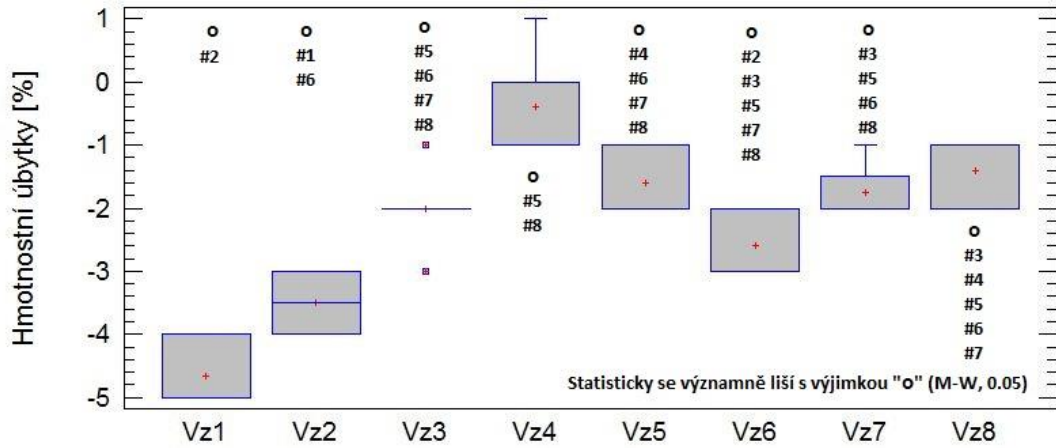
Obr. 4.24 Degradace kompozitních scaffoldů v α MEM médiu vyjádřená jako hmotnostní úbytky (medián, IQR).

Vliv hydratace byl dále charakterizován pomocí stanovení míry bobtnání. Na Obr. 4.25 jsou přehledně zobrazeny výsledné hodnoty míry bobtnání po jednotlivých dobách expozice scaffoldů v médiu. U všech osmi typů dochází již během 24 hodin k nasáknutí tekutiny v rozmezí tří až sedmi násobku původní hmotnosti. Během další 24 hodin se tato hodnota již výrazně nemění.

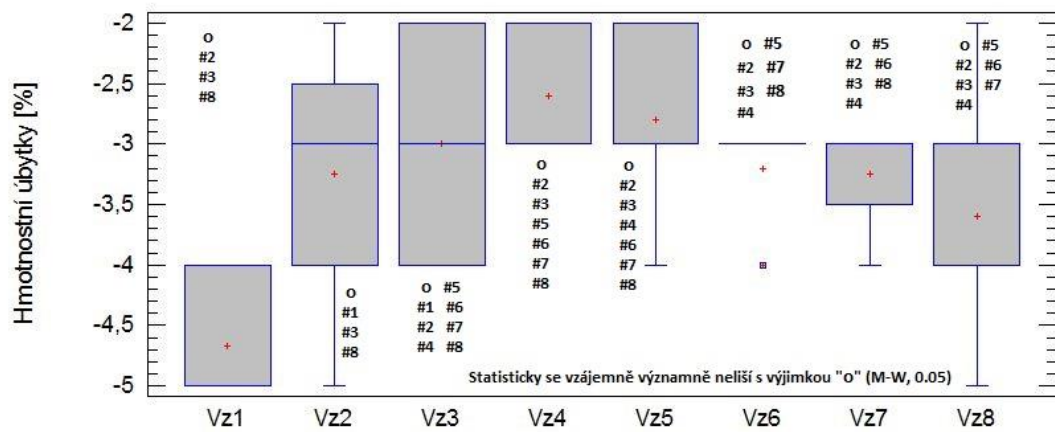


Obr. 4.25 Míra bobtnání kompozitních scaffoldů v α MEM médiu po 24 a 48 hodinách (medián a mezikvartilové rozpětí).

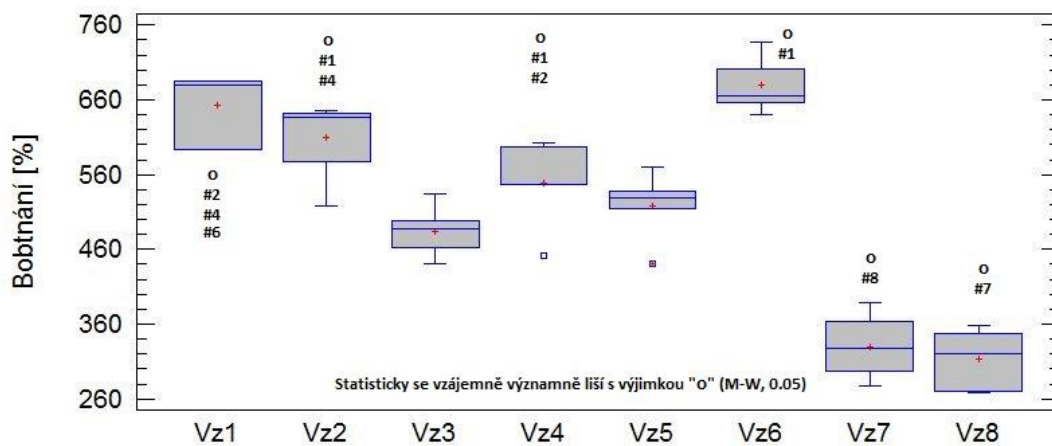
Míra hmotnostního úbytku a bobtnání jsou statisticky vyjádřeny na následujících obrázcích.



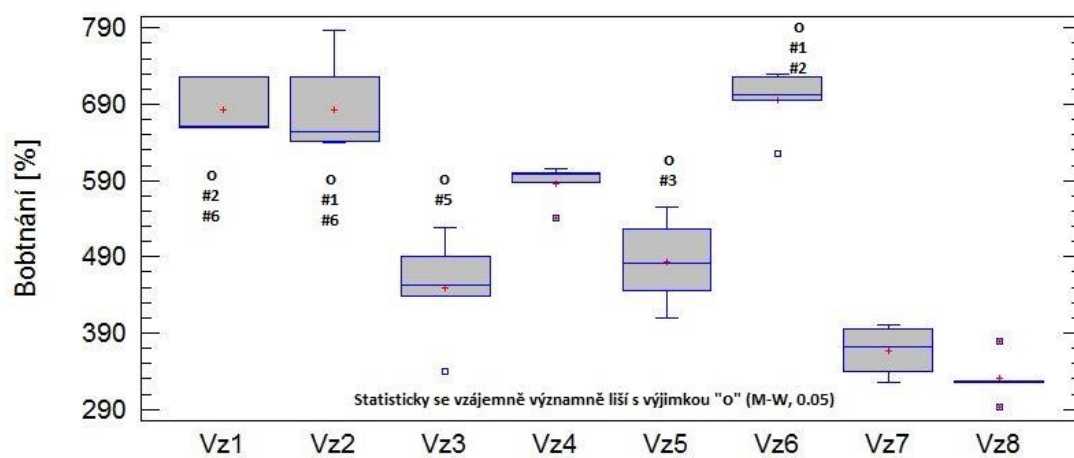
Obr. 4.26 Hmotnostní úbytky po 24 hodinách. Soubory dat se vzájemně statisticky významně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.27 Hmotnostní úbytky po 48 hodinách. Soubory dat se vzájemně statisticky významně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.28 Míra bobtnání po 24 hodinách. Soubory dat se vzájemně statisticky významně liší kromě "o" (M-W, 0,05).



Obr. 4.29 Míra bobtnání po 48 hodinách. Soubory dat se vzájemně statisticky významně liší kromě "o" (M-W, 0,05).

## 5 Diskuze

### Porozita

Z výsledků je patrné, že vzorky s většími póry a ucelenější strukturou jsou ty, které obsahují větší množství kolagenu. To je způsobeno tím, že kolagen váže vodu a tedy čím více je v materiálu kolagenu, tím více vody dokáže nosič pohltit. Po zmražení a lyofilizaci pak vzniknou větší a pravidelnější póry.

Vyhodnocování porozity ručním měřením v software ImageJ je poměrně nepřesné, neboť záleží na schopnosti uživatele přesně odhadnout hranice pórů. V mnoha případech to z mikroskopického snímku ani nelze přesně odhadnout. Zásadní je i způsob pořízení SEM snímků – v jaké rovině jsou vzorky řezány nebo jestli jsou nařezány jen v jedné nebo více rovinách. Tato metoda byla použita pro její jednoduchost, technickou nenáročnost a snadnější dostupnost. Na rozdíl od metody vyhodnocování pomocí  $\mu$ CT, která je velmi přesná a umožňuje získat detailní informace z trojrozměrného prostředí, avšak je technicky a finančně náročná.

V případě tohoto experimentu je z Obr. 4.3 a Obr. 4.5 zřejmé, že u obou měření je tendence porozity velmi podobná. Hodnoty se liší přibližně o 50 – 200  $\mu$ m, což je způsobeno vlivem nepřesnosti ručního měření a množstvím dostupných snímaných řezů.

Pomocí  $\mu$ CT byla vyhodnocena otevřenost porozity, která je potřebná pro kultivaci buněk a jejich vzájemnou látkovou výměnu. U všech vzorků tato hodnota přesahuje 80%.

### Mechanické vlastnosti

Z Obr. 4.8 je zřejmé, že změna materiálového složení a struktura materiálu má významný vliv na mechanické vlastnosti, pro které platí princip synergického efektu kompozitních materiálů. Vzorky s obsahem kolagenu 30-40 % (vzorky 3-8), mají výrazně vyšší hodnoty Youngova elastického modulu pružnosti než vzorky 1 a 2, kde se obsah kolagenu pohybuje mezi 10-20 %. Stejná tendence platí rovněž pro parametry  $\sigma_{pl}$ , smluvní mez kluzu  $\sigma_{kt}$  a absorbovanou energii  $W$ , jak je zřejmé z Obr. 4.9, Obr. 4.10 a Obr. 4.11. Vzorky s vyšším obsahem kolagenu vytváří hustší a pravidelnější strukturu, což způsobuje zvýšení mechanických vlastností.

Ačkoliv kolagen sám o sobě má mechanické vlastnosti spíše nižší, srovnatelné s polymerními materiály - v literatuře se uvádí hodnoty Youngova modulu pružnosti kolagenu získaného

různými způsoby v rozmezí 2 - 10 GPa, v tomto experimentu se jeví jako velmi důležitý prvek. Tento jev lze vidět na Obr. 4.8, ačkoliv vzorek 1 obsahuje vysoké procento hydroxyapatitu, v literatuře uváděn Youngův modul pružnosti 20 až 390 GPa a pevnost v tlaku 0,9 až 3,9 GPa, jeho mechanické vlastnosti vykazují nejnižší hodnotu ze všech vzorků, neboť dochází k rozpadu materiálu, protože neobsahuje dostatečné množství kolagenu, který by ho držel pohromadě, jelikož kolagen má v tomto kompozitním materiálu stmelovací funkci a plní roli „lepidla“ jednotlivých látek.

Cílem experimentu bylo zjistit, jak se chovají vzorky v suchém stavu a ve stavu hydratovaném a tyto stavy mezi sebou porovnat. Z vyhodnocení je patrné, že mechanické vlastnosti se mezi oběma stavy výrazně liší. Pokles mechanických vlastností je dán působením hydratace, které je popsáno níže. Dále byly vzájemně porovnány mechanické vlastnosti v hydratovaném stavu po dobu 24 a 48 hodin. Tyto hodnoty ukazují, že mechanické vlastnosti nezávisí na délce doby hydratace, protože se po její dobu už výrazně nemění. Pro zvýšení mechanických vlastností se provádí síťování materiálu, které zvyšuje stabilitu scaffoldů a tedy i jejich mechanické vlastnosti.

Při analýze degradace byl zkoumán hmotnostní úbytek a bobtnání scaffoldů. Z výsledků je patrné, že během sledovaných period nedošlo k úbytku materiálu. Všechny typy vzorků vykazují ve sledovaných intervalech naopak nárůst hmotnosti, jenž je možné vysvětlit absorpcí proteinů nebo solí z kultivačního média. Během 48 hodinové hydratace tedy nedochází k degradaci a jejím vlivem k možnému negativnímu ovlivnění mechanických vlastností. Jediné, co způsobuje pokles mechanických vlastností je právě hydratace. Proces bobtnání u scaffoldů je žádoucí, protože médium v nosiči umožňuje látkovou výměnu mezi buňkami a podporuje jejich kultivaci. Na druhou stranu vlivem bobtnání dochází k výraznému snížení mechanických vlastností. Z Obr. 4.28, Obr. 4.29 je patrné, že míra bobtnání je nejvýraznější během prvních 24 hodin hydratace. V delším časovém intervalu už k dalšímu bobtnání v podstatě nedochází. Při bobtnání může docházet ke změně struktury materiálu a k porušení chemických vazeb mezi jednotlivými složkami kompozitních scaffoldů. Na tento proces má vliv také materiálové složení, jak je zjevné z Obr. 4.28. V porovnání s hydroxyapatitem mají vlákna PDLLA a kolagen větší schopnost absorbovat kultivační médium, což způsobuje to, že tyto vzorky s větším obsahem PDLLA a kolagenu (vzorky 1-6) jsou více náchylné k bobtnání. Kolagen navíc vlivem bobtnání ztrácí pro scaffold stmelovací funkce a dochází tak ke snížení jeho mechanických vlastností.

Vyhodnocování parametrů bylo také negativně ovlivněno malým počtem vzorků a tedy poměrně malým souborem dat ke statistickému vyhodnocení, neboť výroba osmi typů scaffoldů pro všechny provedené analýzy byla poměrně náročná a nákladná. Při mechanických zkouškách byly

navíc chybně odhadnuty některé hodnoty  $\sigma_{pl}$ , které pak ovlivnily hysterezní smyčku odlehčení a tedy výsledky dalších parametrů. S těmito hodnotami nebylo možné dále pracovat, protože by mohlo dojít ke zkreslení výsledků.

## 6 Závěr

V této diplomové práci byla zpracována studie kompozitních scaffoldů pro kostní tkáňové inženýrství. Bylo připraveno 8 skupin nosičů různého materiálové složení, každá skupina měla minimálně 5 vzorků, které byly následně podrobeny tlakovým mechanickým zkouškám a dalším analýzám. V rámci práce bylo provedeno měření porozity dvěma metodami, ruční měření a měření pomocí  $\mu$ CT, které byly mezi sebou vzájemně porovnány. Dále byla provedena studie degradace a bobtnání scaffoldů při hydrataci po dobu 24 a 48 hodin. Bylo zjištěno, že v průběhu této doby nedošlo k úbytku materiálu, ale naopak k jeho nárůstu, což je způsobeno možnou absorpcí proteinů a solí z kultivačního média. Během hydratace však došlo k výraznému bobtnání materiálu, které má zásadní vliv na mechanické vlastnosti scaffoldu. Při absorpci kultivačního média totiž pravděpodobně dochází k porušení chemických vazeb mezi jednotlivými látkami a tedy ke snížení mechanických vlastností materiálu. Schopnost hydratace je však velmi důležitá pro kultivaci buněk ve scaffoldu. Na bobtnání má také vliv materiálové složení. Dále byly provedeny tlakové mechanické zkoušky scaffoldů ve třech stavech – suchém a hydratovaném po dobu 24 a 48 hodin. Výsledky experimentů byly mezi sebou vzájemně porovnány a vyhodnoceny. Vzhledem k daným výsledkům se jako optimální složení scaffoldu jeví materiál blízký vzorku 7 a 8, u kterého bylo docíleno nejvyšších hodnot Youngova modulu pružnosti a dalších parametrů. U vzorků 7 a 8 dochází také k nejmenšímu a zároveň dostatečnému bobtnání materiálu. Vlivem velkého obsahu kolagenu je u těchto vzorků také zaručena postačující otevřená porozita. Cíle diplomové práce byly tedy splněny.

## 7 Seznam použité literatury

[1] BLACK, Cameron R. M., Vitali GORIAINOV, David GIBBS, Janos KANCZLER, Rahul S. TARE a Richard O. C. OREFFO. Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports* [online]. 2015, **1**(3), 132-140 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1007/s40610-015-0022-2. ISSN 2198-6428. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40610-015-0022-2>

[2] STOLTZ, J-F., C. HUSELSTEIN, D. BENSOUSSAN, N. de ISLA a V. DECOT. Tissue Engineering: From Bench to Bed Side Exemples of Applications. *Engineering* [online]. 2012, **04**(10), 43-45 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.4236/eng.2012.410B011. ISSN 1947-3931. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/eng.2012.410B011>

[3] VACANTI, Joseph. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2010, **45**(2), 291-294 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.10.063. ISSN 00223468. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346809008628>

[4] KNESER, U., D.J. SCHAEFER, B. MUNDER, C. KLEMT, C. ANDREE a G.B. STARK. Tissue engineering of bone. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* [online]. 2009, **11**(3), 107-116 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1080/136457002320174177. ISSN 1364-5706. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/136457002320174177>

[5] BOSE, Susmita, Mangal ROY a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(10), 546-554 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912001151>

[6] KATARI, Ravi S., Andrea PELOSO a Giuseppe ORLANDO. Tissue Engineering. *Advances in Surgery* [online]. 2014, **48**(1), 137-154 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1016/j.yasu.2014.05.007. ISSN 00653411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065341114000086>



[7] HONG, Jong Kyu a Sang Mo KWON. Application of tissue engineering in stem cell therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*[online]. 2014, **07**(02), 67-74 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.4236/jbise.2014.72010. ISSN 1937-6871. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbise.2014.72010>

[8] DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo, Aparecida Maria FONTES, Dimas Tadeu COVAS a Arnold I. CAPLAN. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2009, **20**(5-6), 419-427 [cit. 2016-07-13]. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002. ISSN 13596101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135961010900077X>

[9] HOLLISTER, Scott J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*. 2005, **4**(7), 518-524. DOI: 10.1038/nmat1421. ISSN 1476-1122. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmat1421>

[10] LIU, Xiaohua a Peter X. MA. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2004, **32**(3), 477-486 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1023/B:ABME.0000017544.36001.8e. ISSN 0090-6964. Dostupné z: <http://journals.kluweronline.com/article.asp?PIPS=482175>

[11] STEVENS, Molly M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2008, **11**(5), 18-25 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/S1369-7021(08)70086-5. ISSN 13697021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702108700865>

[12] ZOUHAROVÁ, L. *Studium vybraných modifikovaných kolagenových biomateriálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 108 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[13] CHANJUAN, Dong a Yonggang LV. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* (20734360). 2016, **8**(2), 1-20. DOI: 10.3390/polym8020042. ISSN 2073-4360.

[14] SUCHÝ, Tomáš, Monika ŠUPOVÁ, Pavla SAUEROVÁ, et al. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds—an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials* [online]. 2015, **10**(6), 065008- [cit. 2016-08-03]. DOI: 10.1088/1748-6041/10/6/065008. ISSN 1748-605x. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/1748-605X/10/i=6/a=065008?key=crossref.7fe3a803aa8a69d82fd26d4b08c81cf4>

[15] OSATHANON, Thanaphum, Michael L. LINNES, Rupak M. RAJACHAR, Buddy D. RATNER, Martha J. SOMERMAN a Cecilia M. GIACHELLI. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(30), 4091-4099 [cit. 2016-07-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.030. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208004523>

[16] VROMAN, Isabelle a Lan TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials*. 2009, **2**(2), 307-344. DOI: 10.3390/ma2020307. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307/>

[17] SLÁMA, M. Studium přípravy a vlastností biokeramických kompozitů na bázi Ca-fosfátů a ZrO<sub>2</sub>. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 66 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc.

[18] DAŘOUREK, Karel. Kompozitní materiály. *Kompozitní materiály*, 2010.

[19] SCHOOF, H., APEL, J., HESCHEL, I. and RAU, G. (2001), Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *Journal of Biomedical Materials Research*[online]. 2001, 58: 352–357 [cit. 2016-07-20]. DOI: 10.1002/jbm.1028

[20] YOSHIMOTO, H., Y.M. SHIN, H. TERAJ a J.P. VACANTI. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(12), 2077-2082 [cit. 2016-08-02]. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00635-X. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120200635X>

[21] ZAHŘÁDKOVÁ, Simona. *Příprava nanovláknenných vrstev pomocí electrospinningu* [online]. Brno, 2012 [cit. 2016-08-02]. Dostupné z: <http://www1.fs.cvut.cz/stretech/2012/sbornik/31.pdf>

[22] CIESLAR, B. *Zkušební metody kompozitních materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 37 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Josef Klement, CSc.

[23] GRIKSCHEIT, Tracy C. a Joseph P. VACANTI. The history and current status of tissue engineering: The future of pediatric surgery. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2002, **37**(3), 277-288 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1053/jpsu.2002.30802. ISSN 00223468. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346802164402>

[24] CROISIER, Florence a Christine JÉRÔME. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. 2013,**49**(4), 780-792 [cit. 2016-07-14]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305712004181>

[25] ZHONG, Shaoping, Wee Eong TEO, Xiao ZHU, Roger W. BEUERMAN, Seeram RAMAKRISHNA a Lin Yue Lanry YUNG. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects onin vitro fibroblast culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2006, **79A**(3), 456-463 [cit. 2016-07-20]. DOI: 10.1002/jbm.a.30870. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30870>

[26] PETER, Ma a Peter X. MA. Poly(alpha-hydroxyl acids) hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal of biomedical materials research*. 1999, **44**(4), 446-455. ISSN 0021-9304.

[27] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*[online]. 2013, **92**(2), 1262-1279 [cit. 2016-07-20]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712010478>

## Seznam obrázků

Obr. 2.1 Synergický efekt vlastností kompozitních materiálů.....	23
Obr. 2.2 Rozdělení bikompozitních materiálů. ....	23
Obr. 2.3 Teplotní křivky lyofilizace. ....	25
Obr. 2.4 Princip stroje pro zvlákňování. ....	26
Obr. 3.1 Pro snadnější přípravu disperze je lyofilizovaný kolagen nejprve nastříhán na drobné kousky. ....	286
Obr. 3.2 Homogenizovaná PDLLA vlákna.....	26
Obr. 3.3 Kalcium fosfát s hyaluronan sodný.....	26
Obr. 3.4 Kašovitá směs po homogenizaci. ....	29
Obr. 3.5 Dávkování materiálu do kultivačních jamek. ....	29
Obr. 3.6 Zaznamenávání rozměrů vzorků mikrometrem.....	34
Obr. 4.1 Ukázka mikroskopických snímků struktury scaffoldů, přibližně 100x.....	36
Obr. 4.2 Ukázka $\mu$ CT snímků struktury scaffoldů.....	37
Obr. 4.3 Krabicový graf statistických parametrů hodnot z měření porozity v software ImageJ. ....	38
Obr. 4.4 Distribuce velikosti pórů získaných z $\mu$ CT 3D analýzy .....	39
Obr. 4.5 Krabicový graf statistických parametrů hodnot z měření porozity pomocí $\mu$ CT. ....	39
Obr. 4.6 Mechanické zkoušky vzorků v roztoku.....	40
Obr. 4.7 Materiálové složení vzorků .....	40
Obr. 4.8 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v suchém stavu. ....	41
Obr. 4.9 Vliv materiálového složení na $\sigma_{pl}$ v suchém stavu.....	41
Obr. 4.10 Vliv materiálového složení na $\sigma_{kt}$ v suchém stavu. ....	41
Obr. 4.11 Vliv materiálového složení na absorbovanou energii v suchém stavu. ....	42
Obr. 4.12 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v hydratovaném stavu po dobu 24 hodin.....	42
Obr. 4.13 Vliv materiálového složení na modul pružnosti v hydratovaném stavu po dobu 48 hodin.....	43
Obr. 4.14 Vliv materiálového složení na $\sigma_{pl}$ v hydratovaném stavu po dobu 24 hodin.....	43
Obr. 4.15 Vliv materiálového složení na $\sigma_{pl}$ v hydratovaném stavu po dobu 48 hodin.....	43
Obr. 4.16 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 1.....	44
Obr. 4.17 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 2.....	45
Obr. 4.18 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 3.....	45
Obr. 4.19 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 4.....	46

Obr. 4.20 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 5.....	46
Obr. 4.21 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 6.....	47
Obr. 4.22 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 7.....	47
Obr. 4.23 Vliv hydratace na mechanické vlastnosti vzorku 8.....	48
Obr. 4.24 Degradace kompozitních scaffoldů v $\alpha$ MEM médiu.....	49
Obr. 4.25 Míra bobtnání kompozitních scaffoldů v $\alpha$ MEM médiu po 24 a 48 hodinách.....	49
Obr. 4.26 Hmotnostní úbytky po 24 hodinách.....	50
Obr. 4.27 Hmotnostní úbytky po 48 hodinách.....	50
Obr. 4.28 Míra bobtnání po 24 hodinách.....	51
Obr. 4.29 Míra bobtnání po 48 hodinách.....	51

## Seznam tabulek

Tabulka 2.1 Materiálové složení vzorků 1-8. ....	30
Tabulka 4.1 Tabulka vzorků podle obsahu kolagenu .....	37
Tabulka 4.2 Porozity a velikost pórů kompozitních scaffoldů stanovené trojrozměrnou $\mu$ CT analýzou a hodnocením dvojrozměrných SEM snímků.....	38
Tabulka 4.3 Znázornění značení jednotlivých stavů.....	44