



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA STROJNÍ**

ÚSTAV MECHANIKY, BIOMECHANIKY A MECHATRONIKY
ODBOR BIOMECHANIKY ČLOVĚKA
OBOR BIOMECHANIKA A LÉKAŘSKÉ PŘÍSTROJE

Diplomová práce

**VLIV RŮZNÝCH SIMULOVANÝCH TĚLESNÝCH TEKUTIN
NA MECHANICKÉ VLASTNOSTI TKÁŇOVÝCH NOSIČŮ**

Praha 2019

Autor: Bc. Kristian Koča


Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou práci zpracoval sám s přispěním vedoucího práce a používal jsem pouze literaturu uvedenou v závěrečném seznamu. Dále prohlašuji, že nemám námitek proti půjčování nebo zveřejňování mé práce, nebo její části se souhlasem ústavu.

Datum:

.....16.8.2019.....

podpis studenta



Anotační list

Jméno autora:	Bc. Kristian Koča
Název DP:	Vliv různých simulovaných tělesných tekutin na mechanické vlastnosti tkáňových nosičů
Anglický název:	The Effect of Different Simulated Body Fluids on the Mechanical Properties of Tissue Engineering Scaffolds
Akademický rok:	2018/2019
Obor studia:	Biomechanika a lékařské přístroje
Ústav/Odbor:	Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky / Odbor biomechaniky člověka
Vedoucí DP:	Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
Konzultant:	Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
Klíčová slova:	kolagenní nosiče, simulovaná tělní tekutina, fosfátový pufr, krevní plasma
Keywords:	collagen scaffolds, simulated body fluid, phosphate buffered saline, blood plasma

Anotace:

Diplomová práce pojednává o vlivu různých degradačních médií, simulujících prostředí lidského těla, na mechanické vlastnosti kolagenních nosičů. K tomuto účelů byla vybrána tři degradační média: lidská plazma, simulovaná tělní tekutina (SBF) a fosfátový pufr (PBS). Cílem provedeného experimentu bylo zjistit, zda jejich aplikací bude dosaženo stejného degradačního efektu, či nikoli. Experiment byl proveden na nosičích z kolagenu typu I chemicky zesíťovaných roztokem 95% ethanolu, N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) / N-hydroxysukcinimidu (NHS). V první části experimentu byly nosiče naloženy do příslušného média a ponechány jeho působení po zvolené časové intervaly: 0 dnů (vzorky byly hydratovány 10 minut před mechanickým testem), 7 dní a 14 dní. Mechanické vlastnosti byly vyhodnoceny axiální tlakovou zkouškou. Druhá část experimentu byla zaměřena na posouzení hmotnostního úbytku kolagenních nosičů. Nosiče byly působení roztoků vystaveny opět po 7 a 14 dní. I přesto, že roztoky simulují stejné prostředí a s krevní plasmou mají podobnou iontovou koncentraci, ukázalo se, že každý z použitých roztoků má odlišný vliv na vývoj mechanických vlastností i na hmotnostní úbytek.

Abstract:

Thesis discusses the topic of collagen scaffolds degradation, particularly the influence of different degradation media, simulating the human body environment, on mechanical properties of collagen scaffolds. There were three degradation media used: human plasma, Simulated Body Fluid (SBF) and Phosphate Buffered Saline (PBS). The aim of the following experiment was to determine whether the degradation effect of the media will be the same for all used media, or not. Scaffolds were composed of collagen type I isolated from calf skin and were chemically crosslinked with the solution of 95% ethanol, N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS). In the first part of the experiment, scaffolds were subjected to the degradation effect of given media for selected time periods: 0 days (samples were hydrated 10 minutes before mechanical test), 7 days and 14 days. Mechanical properties were examined by axial compression test. The second part of the experiment focused on the determination of the scaffold weight loss. Samples were exposed to the media for 7 and 14 days. Although the solutions simulate the same environment and have a similar ionic concentration as blood plasma, it has been shown that each of the solutions used has a different effect on the development of mechanical properties and on weight loss.

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Mechanismus chemického, fyzikálního a enzymatického zesíťování výztuže. 1) A. chemický činitel vytvoří vazbu s polymerním řetězcem, B. Po skončení síťovacího procesu, chemický činitel opouští výztuž. 2) fyzikální činitel tvořící nekovalentní vazbu mezi polymerními řetězci, 3) Enzymatická síťovací metoda [7]	15
Obrázek 2: Aplikace dehydrotermální metody způsobí formaci vazby mezi přilehlými karboxylovými.....	16
Obrázek 3: Příklad použití polymerních materiálů pro výrobu implantátů [13]	19
Obrázek 4: Schematické znázornění chemické struktury chitosanu.....	21
Obrázek 5: SEM obraz řezu nosiče zhotoveného z čistého chitosanu [14]	21
Obrázek 6: Chemická struktura PLA [15].....	22
Obrázek 7: Ukázka využití PLA: a) Pletená PLA vaskulární protéza, b) pletená struktura náhrady šlachy [15]	24
Obrázek 8: SEM snímek vzorku Pellethanu 80A po 49 dnech v nálevu s makrofágy [36]	26
Obrázek 9: a) znázornění polymeru se silnou základní C-C strukturou; znázornění vazeb náchylných k hydrolyze: b) vazba amidová, c) vazba esterová, d) vazba anhydritová [32].....	27
Obrázek 10: Schematické znázornění materiálové eroze: a) proces objemové degradace; b) povrchová degradace: Enzymy nemohou proniknout skrze těsnou povrchovou strukturu a tak enzymatická reakce nastane na rozhraní polymer enzym. Povrch je postupně narušován, což zvyšuje plochu pro působení enzymů [9] [31].	29
Obrázek 11: a) Průběh objemové degradace: Úbytek mechanické pevnosti je oproti poklesu molekulární hmotnosti opožděn, ovšem předchází poklesu celkové hmotnosti, b) Průběh povrchové degradace: Mechanická pevnost i molekulární hmotnost má relativně nízký pokles (křivky splývají). Celková hmotnost oproti tomu vykazuje pokles značný [31]. .	29
Obrázek 12: Množství uloženého HA na povrchu testovaných vzorků dle studie [53]. Vyznačené odchylky značí intervaly s 95% pravděpodobností.	33
Obrázek 13: a) pláty surového kolagenu, b) nastříhaný kolagen před přimícháním destilované vody	37
Obrázek 14: Postup úpravy surového kolagenu: a) nastříhaný kolagen naložený v destilované vodě, b) kolagenní směs ve válcových formách průměru 12mm, c) uložení naplněných forem do suchého ledu, d) rozmrazení a vysušení vzorků v lyofilizátoru, e) vysušené kolagenní vzorky, f) chemické zesíťování vzorků, g) příprava naložené vzorků do DM, h) vzorky v menším objemu DM ve vakuové komoře	38
Obrázek 16: a) použitá krevní plazma s faktorem Rh (D) pozitivní i negativní, b) antibiotikum (penicilin streptomycin).....	39
Obrázek 15: Příprava SBF: Rozpouštění přísad v ohříváné destilované vodě při současném měření pH.....	39
Obrázek 17: Křivka napětí- deformace pro stanovení charakteristických hodnot ze zkoušky.....	41
Obrázek 18: a) Kvazi-elastický gradient a smluvní napětí v tlaku; b) Elastický gradient a smluvní mez kluzu v tlaku [62].....	41
Obrázek 19: Provedení experimentu: a) vyjmutí vzorků z nálevu a přiřazení pořadového čísla,	43
Obrázek 20: a) axiální zatížení vzorku v příslušném nálevu, b) zatížení suchého vzorku	43
Obrázek 21: Ukázka pracovního diagramu vzorku po 7 dnech v roztoku plazmy.....	44
Obrázek 22: Sečna vnořené hysterezní smyčky	45

- Obrázek 23:** Grafické srovnání vypočtených hodnot v rámci jednoho roztoku: a) elastický gradient, 49
- Obrázek 24:** Grafické srovnání vypočtených hodnot mezi roztoky: a) elastický gradient, b) hladina stabilního napětí σ_{pl} , c) absorbovaná energie W , d) účinnost absorbované energie We ; * označuje statisticky významný rozdíl (Mann-Whitney, 0,01666; LSD, 0,05) 49
- Obrázek 25:** Hmotnostní úbytek: srovnání statistické významnosti rozdílů pro jeden roztok v čase .50
- Obrázek 26:** Hmotnostní úbytek: srovnání statistické významnosti rozdílů mezi roztoky navzájem .50
- Obrázek 27:** a) vzorky degradované 14 dní v krevní plasmě, b) vzorky degradované 14 dní v SBF .51

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Výhody a nevýhody použití fyzikálních, enzymatických a chemických činitelů [4].....	15
Tabulka 2: Srovnání výhod a nevýhod vybraných enzymatických činitelů [4][8].....	17
Tabulka 3: Srovnání vlastností čistého kolagenu	20
Tabulka 4: Shrnutí základních vlastností [24].....	22
Tabulka 5: Mechanické vlastnosti PLA [24].....	24
Tabulka 6: Vyhodnocení degradace scaffoldu	30
Tabulka 7: Přísady pro přípravu SBF [57]	39
Tabulka 8: Charakteristická forma zaznamenaných dat.....	44
Tabulka 9: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 10min před zkouškou.....	46
Tabulka 10: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 7 dní	46
Tabulka 11: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 14 dní	46
Tabulka 12: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 10min před zkouškou	46
Tabulka 13: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 7 dní	47
Tabulka 14: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 14 dní	47
Tabulka 15: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 10min před zkouškou	47
Tabulka 16: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 7 dní	47
Tabulka 17: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 14 dní	47
Tabulka 18: Průměrné hodnoty hmotnostních úbytků pro příslušné roztoky.....	48
Tabulka 19: Vyhodnocení normality pro roztok plazmy dle Shapiro-Wilk testu (0,05) nelze zamítnout; A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení	58
Tabulka 20: Vyhodnocení shody rozptylů pro roztok plazmy dle Levenova testu (0,05) ; A= rozptyl není statisticky významný, N= rozptyl je statisticky významný	58
Tabulka 21: Vyhodnocení statistické významnosti podílů pro dané intervaly pomocí Mann-Whitneyovy W s korekcí (0,01666) a Fischerovy LSD (*) analýzy (0,05) pro roztok krevní plazmy; A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl	58
Tabulka 22: Vyhodnocení normality pro SBF dle Shapiro-Wilk testu (0,05).....	59
Tabulka 23: Vyhodnocení shody rozptylů pro SBF dle Levenova testu (0,05) ; A= rozptyl není statisticky významný	59
Tabulka 24: Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů pro daný interval pomocí t testu (0,05); A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl	59
Tabulka 25: Vyhodnocení normality pro PBS dle Shapiro-Wilk testu (0,05) ; A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení	59
Tabulka 26: Vyhodnocení shody rozptylů pro PBS dle Levenova testu (0,05); A= rozptyl není statisticky významný	59
Tabulka 27: Vyhodnocení statistické významnosti podílů pro dané intervaly pomocí Mann-Whitneyovy W (0,01666) a Fischerovy LSD (*) analýzy (0,05) pro PBS;	60
Tabulka 28: Kontrola shody rozptylů; A= rozptyl není statisticky významný, N= rozptyl je statisticky významný.....	60

Tabulka 29: Srovnání významnosti rozdílů mezi roztoky pomocí Mann-Whitneyovy W^* (0,01666) a Fischerovy LSD (0,05) analýzy; A= statisticky významný rozdíl, N= bez stat. významného rozdílu.....	60
Tabulka 30: Vyhodnocení normality dle Shapiro-Wilk testu (0,05); A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení	61
Tabulka 31: Vyhodnocení shody rozptylů dle Lavenova testu (0,05); A= rozptyl není statisticky významný.....	61
Tabulka 32: Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů pomocí t testu (0,05); pro roztok plasmy bylo použito neparametrické Mann-Whitney W (0,05) metody (*); A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl	61
Tabulka 33: Vyhodnocení shody rozptylů dle Levenova testu ($p \geq 0,05$); A= shodné rozptyly.....	61
Tabulka 34: Srovnání významnosti rozdílů hmotnostních úbytků mezi roztoky pomocí Mann-Whitneyovy W (*) a Fischerovy LSD analýzy (0,05); A= statisticky významný rozdíl	61
Tabulka 35: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 10 min před zátěžovou zkouškou	62
Tabulka 36: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu SBF po 10 min před zátěžovou zkouškou.....	63
Tabulka 37: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 10 min před zátěžovou zkouškou.....	64
Tabulka 38: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 7 dní před zátěžovou zkouškou	65
Tabulka 39: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu SBF po 7 dní před zátěžovou zkouškou.....	66
Tabulka 40: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 7 dní před zátěžovou zkouškou; z důvodu pokročilé degradace bylo možné pracovat pouze se třemi vzorky	67
Tabulka 41: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 14 dní před zátěžovou zkouškou	68
Tabulka 42: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 14 dní před zátěžovou zkouškou; z důvodu pokročilé degradace bylo možné pracovat pouze s pěti vzorky.....	69
Tabulka 43: Data hmotnostního úbytku získaná po 14 dnech v příslušném roztoku	70
Tabulka 44: Data hmotnostního úbytku získaná po 7 dnech v příslušném roztoku	70

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Koča** Jméno: **Kristian** Osobní číslo: **419954**
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:

Vliv různých simulovaných tělních tekutin na mechanické vlastnosti tkáňových nosičů

Název diplomové práce anglicky:

The Effect of Various Simulated Body Fluids on the Mechanical Properties of Tissue Engineering Scaffolds

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma tkáňových nosičů a využití simulovaných tělních podmínek k hodnocení degračních procesů.
2. Navrhněte metodiku a realizujte experimentální analýzu mechanických vlastností nosičů v hydratovaném stavu.
3. Analyzujte vliv použité simulované tělní tekutiny na mechanické a strukturní vlastnosti tkáňových nosičů při degradaci.
4. Zpracujte a interpretujte získané výsledky, formulujte závěry.

Seznam doporučené literatury:

1. Zhang D., et al. The development of collagen composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 2017.
2. Suchý T., Sedláček R., et al. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds—an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials*, 2015.
3. Zhao W., Lemaitre J., Bowen P. A comparative study of simulated body fluids in the presence of proteins. *Acta Biomaterialia*. 53, 2017.
4. Suchý T. et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states? *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 29, 2018.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

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


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


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


Datum zadání diplomové práce: **15.04.2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **16.08.2019**

Platnost zadání diplomové práce: _____


Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce



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


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

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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.

30. 4. 2019
Datum převzetí zadání


Podpis studenta

Použité symboly a zkratky:

σ_{pl}	[MPa]	stabilní hladina napětí
σ_0	[MPa]	napětí v tlaku na horní mezi stlačení
σ_t	[MPa]	napětí v tahu
ε	[%]	deformace
ε_0	[%]	horní mez stlačení
E	[MPa]	elastický gradient (modul pružnosti)
W	[MJ/m ³]	absorbovaná energie při 50% deformaci
W_e	[%]	účinnost absorbování energie
V	[%]	relativní obsah vody
D	[%]	degradační stupeň
p	[-]	hladina významnosti
ρ	[g/cm ³]	hustota
T_g	[°C]	teplota skelného přechodu
T_m	[°C]	teplota tání
a	-	hladina významnosti
m	-	počet provedených porovnání
pK_a		pufrovací kapacita
GA		glutaraldehyd
EDC		1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
NHS		n-hydroxysuccinimid
HCl		kyselina chlorovodíková
CO ₂		oxid uhličitý
PS		polystyren
PVC		polyvinylchlorid
PMMA		polymethylmethakrylát
PET		polyester
PLA		polymléčná kyselina (<i>polylactic acid</i>)
SEM		skenovací elektronové mikroskopie
STR		simulovaný tělní roztok
BS		bovinné sérum
DM		degradační médium
SBF		simulovaná tělní tekutina (<i>simulated body fluid</i>)
PBS		fosfátový pufr (<i>phosphate buffer saline</i>)

OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	13
2.2 BIODEGRADACE NOSIČŮ	14
2.3 METODY SÍŤOVÁNÍ	15
2.3.1 Chemické síťování.....	16
2.3.2 Fyzikální síťování.....	16
2.4 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	18
2.4.1 Přírodní polymery.....	19
2.4.2 Syntetické polymery	21
2.5 DEGRADACE POLYMERŮ	25
2.5.1 Proces degradace.....	26
2.5.2 Vyhodnocení degradace polymerů.....	30
2.6 ROZTOKY SIMULUJÍCÍ BIOLOGICKÉ PROSTŘEDÍ	32
2.6.1 Simulované tělní roztoky.....	32
2.6.2 Pufrovací roztoky.....	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1 ÚVOD DO EXPERIMENTU	36
3.2 PŘÍPRAVA KOMPOZITNÍCH VZORKŮ.....	37
3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	39
3.4 METODIKA TESTOVÁNÍ PORÉZNÍCH VZORKŮ.....	40
3.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	42
3.6 PROVEDENÍ EXPERIMENTU	43
4. VÝSLEDKY	44
4.1 NAMĚŘENÁ DATA	44
4.1.1 Charakteristický datový záznam a jeho zpracování.....	44
4.1.2 Mechanické vlastnosti zjištěné zkouškou v tlaku	46
4.1.3 Výsledné hodnoty hmotnostních úbytků.....	48
4.2 STATISTICKÁ VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT	48
4.2.1 Vyhodnocení mechanických vlastností zjištěných zkouškou v tlaku	49
4.2.2 Vyhodnocení hmotnostního úbytku	50
5. DISKUSE.....	51
6. ZÁVĚR.....	53
7. BIBLIOGRAFIE.....	54
8. PŘÍLOHA.....	58
8.1 VYHODNOCENÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ ZJIŠTĚNÝCH ZKOUŠKOU V TLAKU	58

1. Úvod

Tkáňové nosiče jsou uměle vyrobené porézní struktury zastupující původní extracelulární matici příslušné tkáně. Představují alternativu k biologickým tkáňovým štěpům, které slouží k nahrazení chybějící tkáně při vážných poraněních. Nosiče jsou především určeny k přímé implantaci do lidského těla, a proto musí splňovat řadu podmínek, jakými jsou například biokompatibilita a biodegradabilita. Biokompatibilita zaručuje, že materiál nebude svou přítomností negativně ovlivňovat blízké okolí implantace a nevzbudí negativní imunitní odezvu. Biodegradabilita zaručuje rozklad materiálu biologickou aktivitou. Schopnost řídit tuto degradaci, ve smyslu nastavení míry degradace v čase tak, aby nosič setrval na implantovaném místě po optimální dobu, představuje pro tkáňové inženýrství výzvu. V případě, že nelze využít *in vivo* zkoušek, jsou degradační zkoušky prováděny *in vitro* v médiích simulující tělní prostředí. Tato média mohou simulovat působení různého druhu buněk pomocí jednoduchých, nebo více druhových ko-kultur, případně mohou simulovat pouze vliv samotných tělních tekutin pomocí roztoků s podobnou iontovou koncentrací a pH. V této práci bude dále zpracovávána pouze tematika simulovaných tělesných tekutin, nikoli buněčných ko-kultur.

Z provedené literární rešerše nebylo zjištěno, jak se mezi sebou roztoky liší ve svém účinku, tedy zda volba roztoku ovlivní naměřené mechanické vlastnosti. Byl navržen experiment o dvou fázích, který měl za úkol ověřit následující hypotézu: Vzhledem k tomu, že roztoky mají za úkol simulovat stejné prostředí, bude jejich degradační efekt na nosiče stejný a na volbě simulačního roztoku nezáleží.

První fáze se zabývala porovnáním účinků třech roztoků, simulující tělní prostředí, na mechanické vlastnosti nosičů z kolagenu typu I ve třech časových intervalech (0,7 a 14 dní). Z mechanických vlastností byly vyhodnocovány: elastický gradient - reprezentující modul pružnosti, stabilní hladina napětí - zastupující pevnost materiálu, absorbovaná energie a účinnost absorbované energie. Druhá fáze spočívala v porovnání vlivu roztoků na hmotnostní úbytek nosičů. Porovnávání proběhlo mezi roztoky: lidská plazma, simulovaná tělesná tekutina (SBF) a fosfátový pufr (PBS). Experiment odhalil, že každý z uvažovaných simulačních roztoků má rozdílný účinek na mechanické vlastnosti i na hmotnostní úbytek. Předem stanovená hypotéza byla tak vyvrácena.

2. Teoretická část

2.1 Kostní tkáňové inženýrství

V lidském těle mají kosti významnou úlohu v přenášení mechanického napětí a udržování iontové rovnováhy. Kostní tkáňové inženýrství nachází uplatnění při léčbě poruch kosti vzniklých onemocněním (např. osteosarkom), zánětem, zlomeninou nebo operačním zákrokem [1] [2]. Nejčastěji je používáno autologních¹ či alogenních² kostních štěpů. Nevýhodou těchto způsobů léčby je především riziko infekce a zamítnutí imunitním systémem [2] [3]. Alternativou lidské kostní tkáně jsou štěpy zhotovené z polymerů či keramiky [4]. Obzvláště polymerům je přisuzován značný potenciál. Díky flexibilitě jejich chemického složení umožňují docílit širšího spektra fyzikálních i mechanických vlastností výsledného produktu [5] (blíže diskutováno v kapitole 4. Biodegradabilní polymery).

Ideální materiál pro náhradu kostní tkáně by měl být biodegradabilní s netoxickými produkty degradace a kompatibilní s imunitním systémem jedince. Dále by měl vytvářet prostředí vhodné pro formaci nové kostní tkáně tedy podporovat dělení, růst a přiléhavost okolních buněk [2] [6]. Pro imitaci kostní extracelulární matrice je používáno nano-kompozitních nosičů v anglické literatuře zvaných *scaffolds* [1] [2].

Nosiče jsou struktury s definovanou porozitou a jasně danými chemickofyzikálními vlastnostmi. Před implantací do těla mohou být do nosičů vpraveny buňky požadovaného typu, popřípadě mohou být obohaceny antibiotiky a látkami podporujícími buněčnou aktivitu. Polymery bývají na výrobu nosičů používány díky svému snadnému zpracování a cenové dostupnosti. Díky své biokompatibilitě je v současnosti pro výrobu nosičů hojně používán kolagen. Sám o sobě tento materiál přináší značná omezení. V roztocích bobtná³, struktura není stabilní a je málo odolná enzymatické degradaci. Vlastnosti kolagenu a dalších polymerních materiálů je možné upravit pomocí zesíťování polymerních řetězců. Zesíťování je možné provést různými způsoby. V případě chemického síťování jsou využívány drobné molekuly zvané síťující činitele (*crosslinking agents*). Tyto molekuly zapříčiní vznik chemických nebo fyzických příčných vazeb mezi polymerními řetězci, čímž dojde k dosažení požadovaných vlastností [1] [2] [7] [8].

¹ transplantuje se tkáň pocházející z téhož jedince

² transplantuje se tkáň pocházející z jedince s co možná nejbližší genetickou výbavou

³ zvýšené bobtnání snižuje adsorpci buněk, a tedy snižuje adhezi proteinů k povrchu [8]

2.2 Biodegradace nosičů

Postupný řízený rozklad materiálu vlivem biologické aktivity, tedy biodegradace, je jednou z důležitých vlastností navrhovaných nosičů [9]. Nosiče totiž nejsou zamýšlené jako permanentní implantáty, naopak, měly by být časem metabolizovány a měly by umožnit průnik okolních buněk do své struktury [7] [4]. Zesíťování materiálů vede ke zlepšení jejich mechanických vlastností i k prodloužení jejich biodegradčního času. Čím více je však nosič zesíťován, tím déle trvá jeho metabolizace organismem. Příliš vysoký stupeň zesíťování proto vede k rezistenci materiálu vůči degradaci a může tak dojít až k jeho trvalému zapouzdření v tkáni. Takovýto nosič může v daném místě vyvolávat chronické záněty. Pokud je nosič naopak nedostatečně zesíťován, jeho struktura bude metabolizována dříve, než bude tkáň zhojena. Takovýto případ by vedl k selhání léčby [7] [8].

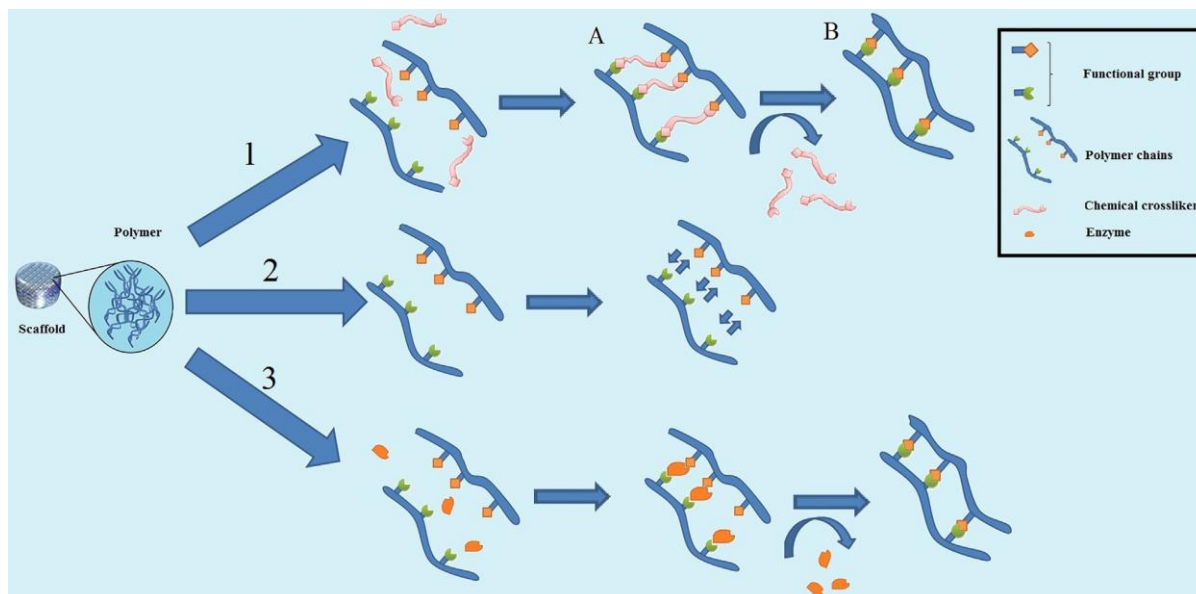
Vhodnou volbou materiálu, metody síťování a síťovacího činitele lze navrhnout nosič na míru daného případu a pro konkrétní místa poranění. Například výztuž pro regeneraci fraktur v oblasti obličeje a čelistí by měla být degradována v intervalu 3-6ti měsíců. Oproti tomu nosiče určené pro páteřní obratle by měly být degradovány až po devíti měsících [7]. Zároveň by měl materiál zajistit vhodné prostředí pro růst nových buněk [9].

Produkty degradačního procesu ovšem mohou zapříčinit změnu v iontové koncentraci i výkyvy pH v blízkém okolí implantátu⁴. V důsledku toho, pak může být ovlivněna vitalita osteoblastů a tedy celková regenerace tkáně [4] [8]. Pokud je materiál biodegradabilní, riziko spojené s dlouhodobou přítomností cizího materiálu v těle by mělo být minimalizováno [9].

⁴ Problém se například týká syntetických polymerů [6].

2.3 Metody síťování

K dosažení konkrétních biochemických a degradačních vlastností polymerních nosičů, je používáno množství technik, které lze rozdělit do tří hlavních skupin: 1) chemické, 2) fyzikální, 3) enzymatické (vizte Obrázek 1 a Tabulka 1).



Obrázek 1: Mechanismus chemického, fyzikálního a enzymatického zesíťování výztuže. 1)A. chemický činitel vytvoří vazbu s polymerním řetězcem, B. Po skončení síťovacího procesu, chemický činitel opouští výztuž. 2) fyzikální činitel tvoří nekovalentní vazbu mezi polymerními řetězci, 3) Enzymatická síťovací metoda [7]

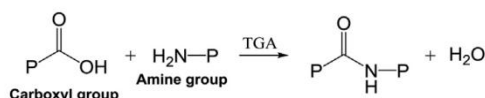
Tabulka 1: Výhody a nevýhody použití fyzikálních, enzymatických a chemických činitelů [4]

Síťovací metoda	Výhody	Nevýhody
Fyzikální	<ul style="list-style-type: none"> • bezpečnost • méně toxické pro buňky oproti chemickému procesu • proces není nákladný • minimální odezva tkáně 	<ul style="list-style-type: none"> • vzniklé vazby jsou slabší než u chemického procesu • časově více náročné • nedostatečná kontrola nad reakční kinetikou procesu • menší stupeň zasíťování
Enzymatické	<ul style="list-style-type: none"> • na rozdíl od chemických činitelů, nevyšší aktivity je dosaženo ve vodných podmínkách • proces lze řídit změnou teploty, pH 	<ul style="list-style-type: none"> • finančně nejnáročnější
Chemické	<ul style="list-style-type: none"> • tvoří velmi silné vazby 	<ul style="list-style-type: none"> • pro buňky na hranici toxicity • produkt vyžaduje oplach pro odstranění přebytečného roztoku a vedlejších produktů procesu • finančně náročnější oproti fyzikální metodě

2.3.1 Chemické síťování

Chemické zesíťování je považováno za nejvíce efektivní a v současné době je jeho použití široce rozšířeno. Rozlišují se metody dehydrotermální a plazmové [7] [8].

Dehydrotermální metoda je často používána na polymerní výztuže a spočívá v odběru molekul vody za vysoké teploty [7].



Obrázek 2: Aplikace dehydrotermální metody způsobí formaci vazby mezi přilehlými karboxylovými a aminovými skupinami kondenzační reakcí, čímž dojde k odstranění molekul vody [7].

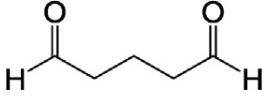
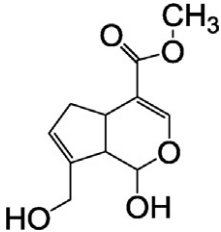
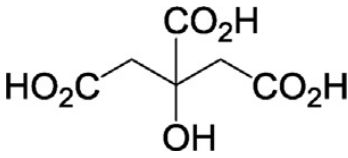
Plazmová metoda využívá vysokoenergetických zdrojů ke generaci plynových výbojů. Energie z výbojů způsobí vznik volných radikálů, kteří odstartují tvorbu kovalentních vazeb. Její nevýhodou je, že plasma nedokáže proniknout hlouběji do vzorku. Je vhodná k povrchové modifikaci [7].

2.3.2 Fyzikální síťování

Ozařovací metoda je založena na vysokoenergetickém ionizujícím záření. Při ozáření materiálu UV paprsky dojde ke spuštění dvou procesů: denaturace a zesíťování. K docílení optimálních mechanických i biodegradabilních vlastností je důležitý poměr mezi těmito procesy. Metoda je převážně používána pro síťování kolagenních výztuží [7].

2.3.2.1 Chemická činidla

Tabulka 2: Srovnání výhod a nevýhod vybraných enzymatických činidel [7] [8]

Činidlo	Výhody	Nevýhody	Chemická struktura
Glutaraldehyd (GA)	<ul style="list-style-type: none"> – nižší cena – výborný stupeň zesíťování – snižuje imunogenicitu výztuže – použití vhodné pro širokou řadu polymerů – dobrá rozpustnost ve vodných roztocích 	<ul style="list-style-type: none"> – buněčná toxicita – po dokončení procesu nutný oplach – změna barvy výztuže 	
Genipin	<ul style="list-style-type: none"> – biokompatibilní – ze všech enzymů nejméně toxický – postačující stupeň zesíťování 	<ul style="list-style-type: none"> – velmi finančně náročný – změna barvy výztuže 	
Kyselina citronová	<ul style="list-style-type: none"> – biokompatibilní – lehce dostupná – postačující stupeň zesíťování 	<ul style="list-style-type: none"> – ke spuštění reakce je nutný katalyzátor – proces musí probíhat při vysoké teplotě, ta však může změnit vlastnosti daného polymeru 	

Genipin

Je jednou z hlavních složek plodů rostliny Gardénie jasmínovité. Jde o aktivní bezbarvou látku, která spontánně reaguje s aminokyselinami. V tradiční Čínské medicíně bývá s ostatními ingrediencemi používán k léčbě cukrovky. V oblasti přírodních činidel patří, společně s kyselinou citronovou, k činidelům nejvíce zkoumaným. Genipin vyniká nízkou cytotoxicitou a genotoxicitou. Zatím není klinicky používán [1] [7].

Karboimidové činitelé EDC/ NHS

Modifikace vlastností kolagenu pro výrobu bioaktivních materiálů je často realizována činiteli z karboimidové skupiny. V současnosti je využívána kombinace 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidu (EDC) a N-hydroxysuccinimidu (NHS). Vedlejším produktem karboimidů je močovina, která vykazuje mírnou cytotoxicitu. Z tohoto důvodu je nutné přebytečný roztok z pórů nosiče odstranit opakovaným oplachem [8] [10] [7]. EDC je ve vodě rozpustný činitel s nízkou cytotoxicitou [8] [10] [7]. Jeho optimální síťovací aktivita je dosažena při pH 4.5 za použití pufovacího roztoku bez cizích karboxilových skupin [7]. Samotný EDC však vykazuje příliš rychlý a silný proces zesíťování. Pro zefektivnění procesu bývá EDC používáno v kombinaci s NHS, který reakční čas zpomalí, sníží tvorbu vedlejších produktů a zvýší odolnost proti hydrolyze [7]. Kolagenní nosiče zesíťované kombinací EDC/NHS jsou cytotokompatibilní strukturálně stabilní po dobu 3 měsíců.

2.4 Biodegradabilní polymery

Po druhé světové válce bylo produkováno mnoho syntetických polymerů, například polystyren (PS), polyvinylchlorid (PVC), polymethylmethakrylát (PMMA) a polyester (PET). Polymery podléhající hydrolyze nebyly považovány za potřebné [11]. Nástup nových biomedicínských technologií, zahrnujících tkáňové inženýrství, regenerativní medicínu, genovou terapii, kontrolované uvolňování léčiv a bionanotechnologii, však vyvolal poptávku po materiálech nových [12]. Zvýšená pozornost začala být věnována především jedné z vlastností - biodegradabilitě. Biodegradabilní polymery podléhají časovanému rozkladu vlivem biologické aktivity. Důsledkem je absence povinnosti operativního odstranění implantátu po dokončení léčby. Materiál se postupně sám kompletně rozloží [5]. V polovině šedesátých let tak vnikly první návrhy na využití kyseliny polymléčné pro degradabilní chirurgické implantáty [11].

Biopolymery lze dělit dle způsobu degradace na hydrolytické a enzymatické degradabilní biopolymery. Vzhledem k širší uplatnění polymerních biomateriálů, neexistuje pouze jeden systém, který by byl považován za materiálový ideál. Využívá se různých materiálů tak, aby byly splněny požadavky individuální aplikace [12]. Biodegradabilní polymery jsou nejčastěji používány na velké implantáty (kostní šrouby, kostní destičky, antikoncepční rezervoáry), malé implantáty (svorky, nitě), pletiva a porézní struktury - scaffoldy [12] (vizte Obrázek 3).



Obrázek 3: Příklad použití polymerních materiálů pro výrobu implantátů [13]

2.4.1 Přírodní polymery

Společně s rostoucími obavami o životní prostředí a povědomím o problematice recyklace odpadu, vzrůstá zájem o využití přírodních polymerů [14]. Tyto polymery jsou produkovány živými organismy, jsou biodegradabilní, biokompatibilní a lze je získat z obnovitelných zdrojů [14] [15]. Mají však i své nevýhody - jejich fyzikální vlastnosti nejsou dostačující. Podléhají rychlé degradaci a vyžadují důkladné pročištění z důvodu zabránění přenosu infekce [16]. Jsou děleny do třech skupin: polysacharidy, proteiny, polynukleotidy.

2.4.1.1 *Kolagen*

V lidském těle je kolagen nejhojněji se vyskytujícím proteinem [12]. Je součástí mezibuněčné hmoty tkání, kterým poskytuje mechanickou oporu [16]. Rozeznáváme okolo třiceti druhů kolagenu, avšak v uvedených tkáních je nejvíce zastoupen kolagen typu I, II a III [8]. Kolagen typu I se vyskytuje v pokožce, kostech, šlachách a zubech. Kolagen typu II je přítomen ve chrupavkách. Typ III. je kolagenem embryonálního vývoje, který je později nahrazen typem I [17].

Použití

Díky svým vlastnostem (vizte Tabulka 3), které lze upravit metodou síťování, je kolagen jedním z nejpoužívanějších biomateriálů [18]. Především typ I nachází uplatnění v řadě oblastí počínaje ortopedickými aplikacemi na tuhých tkáních přes aplikace na tkáních měkkých v kardiologii, chirurgii, oftalmologii, dermatologii, urologii a dalších oblastech v podobě bioprostetických implantátů, cévních náhrad, obvazů ran i nervové regenerace. Využíván je i při kosmetických zákrocích [8] [18].

Tabulka 3: Srovnání vlastností čistého kolagenu

Klady	Zápory
výborná biodegradace	nedostatečná mechanická pevnost
slabá antigenicita	tvarová nestabilita vlivem degradace
biokompatibilita	velká nasákavost
umožnění vazby s okolními buňkami	

Obecné vlastnosti

I přes široké pole uplatnění disponuje laboratorně izolovaný kolagen jistými vlastnostmi, které jeho využití limitují. Vzhledem k hydrofilicitě jsou kolagenní výrobky tvarově nestálé, mají nízkou elasticitu i mechanickou pevnost a podléhají nekontrolovatelné enzymatické degradaci. Některé tyto nedostatky lze vylepšit metodou síťování- crosslinking podrobněji diskutované v kapitole 3. Metody síťování. Tato úprava však s sebou nese riziko vyvolání akutního zánětu při kontaktu okolních tkání se zbytkovými síťovacími činidly v implantovaném scaffoldu [8] [18] [16]. Nevýhodou je i vysoká pořizovací cena kolagenu odvíjející se od dostupnosti tkáně, ze které je získán. Kolagen je získáván ze zvířecích zdrojů (kůže ryb, prasat, skotu). Aby bylo minimalizováno riziko přenosu infekce, jsou nezbytné kontroly nakažové situace v chovu i veterinární vyšetření zvířete [17]. Riziko imunitní odezvy vůči stopovým nečistotám však přetrvává [8]. Kolagen je distribuován v různých formách, například v podobě prášku, vláken, gelu, porézních struktur; lze jej mísit s ostatními polymery a ve spojení s keramikou lze vytvořit kompozitní materiál [18].

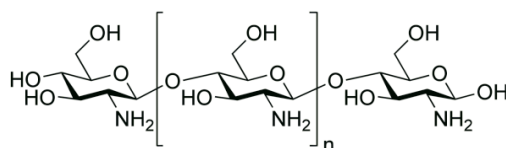
Degradace kolagenu

Kolagen je při fyziologických podmínkách, ve své původní neupravené formě, výjimečně odolný a může být celkově rozložen pouze určitým druhem enzymů [8]. Tyto enzymy jsou vyplaveny při vzniku lokálních zánětů po provedené implantaci a svou činností naruší kolagenní strukturu. Narušením struktury je spuštěna sekrece kolagenázy, která má schopnost přerušit peptidické vazby v kolagenu [19]. Enzymy pepsin, trypsin a kolagenázy nacházejí uplatnění zvláště při degračních testech posuzující množství degradovaného nosiče a jeho strukturu [8] [20] [21]. Odolnost proti působení těchto enzymů je značně zlepšena použitím některé ze síťovacích metod [20] [21]. Kolagenáza je dále používána při výrobě tzv. decelularizovaných nosičů. Tímto nosičem se stává vnější matrice tkáně, z níž byly fyzikálními, chemickými, nebo enzymatickými činiteli odstraněny všechny buňky a

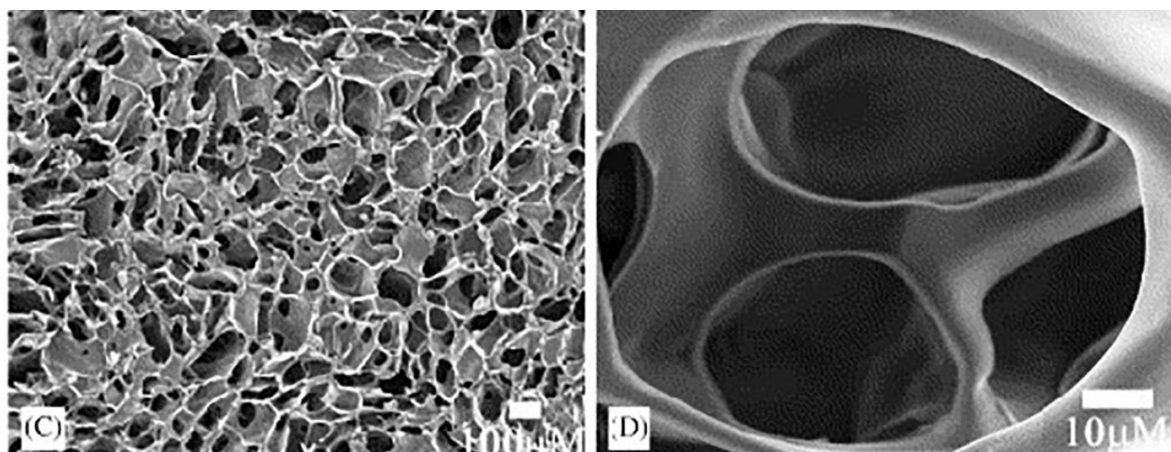
jejich pozůstatky. Očištěním je minimalizována imunitní odezva a riziko přenosu chorob [20].

2.4.1.2 Chitosan

Jde o biokompatibilní a biodegradabilní polysacharid (vizte Obrázek 4) [22]. Je získáván z chitinu, který se vyskytuje v exoskeletonu krunýřovců i v buněčné stěně hub [14]. Je rozpustný v kyselém vodném prostředí. Bývá používán k výrobě hydrogelů, vláken i kapslí k postupnému uvolňování léčiv. Nachází však uplatnění i v zemědělství (zapouzdření semen, postupné uvolňování hnojiva) a kosmetice (redukce statické elektřiny vlasů, léčba akné) [22].



Obrázek 4: Schematické znázornění chemické struktury chitosanu



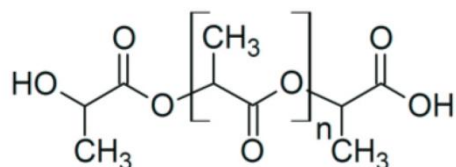
Obrázek 5: SEM obraz řezu nosiče zhotoveného z čistého chitosanu [14]

2.4.2 Syntetické polymery

Výrobě scaffoldů ze syntetických polymerů je v posledních létech věnována zvýšená pozornost. Syntetické polymery jsou většinou inertní a jejich vlastnosti (porozita, degradační čas, mechanické charakteristiky) jsou i při sériové výrobě předvídatelnější a lze je přizpůsobit konkrétnímu použití [12]. Mimoto jsou snadno zpracovatelné do požadovaného tvaru [23]. Riziko přenosu infekce a imunitní odezvy je u syntetických polymerů nižší, než u polymerů přírodních [16]. V následující části budou představeni někteří zástupci těchto polymerů.

2.4.2.1 Polymléčná kyselina - polylactic acid (PLA)

PLA je termoplastický polymer patřící do skupiny biodegradabilních polyesterů. Je získáván například z kukuřice, brambor a jiných přírodních surovin [15]. Jedná se o významný materiál, který díky svým vlastnostem (vizte Tabulka 4) nachází uplatnění v řadě medicínských i průmyslových aplikacích, kde nahrazuje konvenční ropné produkty [24].



Obrázek 6: Chemická struktura PLA [15]

Tabulka 4: Shrnutí základních vlastností [24]

Výhody PLA	
šetrnost k životnímu prostředí	- PLA je biodegradabilní a recyklovatelný - monomery jsou získávány z obnovitelných přírodních surovin
biokompatibilita	- produkty degradace nemají negativní vliv na regeneraci tkání
zpracovatelnost	- PLA může být zpracována řadou způsobů, například umožňuje tlakové lití, tvorbu folií i vláken
energeticky náročná výroba	- při její výrobě vyžaduje o 25-55% méně energie oproti polymerům na bázi ropy
Nevýhody PLA	
nízká tuhost	- PLA je křehkým materiálem schopným pouze 10% prodloužení
pomalá rychlost degradace	- PLA degraduje procesem hydrolýzy a odvíjí především od míry krystalinity - životnost implantátů <i>in vivo</i> se pohybuje mezi 2-8 lety
hydrofobicita	- tato vlastnost vede k nižší buněčné přilnavosti

Obecné vlastnosti

Vlastnosti PLA závisí především na molekulární hmotnosti polymeru, jeho dílčích isomerech, teplotě jeho zpracování i případného žihání [24] [25]. Podstatnou charakteristikou, na kterou mají zmíněné faktory přímý vliv, je krystalinita, tedy množství oblastí s uspořádanými makromolekulami [26]. Krystalinita polymerů určuje jejich základní vlastnosti včetně tvrdosti, modulu, síly v tahu, tuhosti a bodu tání. Obecně platí, že čím vyšší je stupeň krystalinity, tím vyšší je například i pevnost daného polymeru [24].

PLA degraduje především hydrolytickým procesem objemové eroze. Dochází k náhodnému štěpení řetězců esterových skupin a poklesu molekulární hmotnosti. Produktem je kyselina mléčná, která je snadno metabolizovatelná lidským organizmem [12] [24] [27].

Vzhledem k tomu, že PLA má vysokou molekulární hmotnost, degraduje velmi pomalu. Celkové rozložení okolním prostředím trvá 2-8 let. Pro nosiče léků a scaffoldy tkáňového inženýrství jsou tak často voleny kopolymery, které mají nižší molekulární hmotnost a jejich absorpce se pohybuje v nižším časovém intervalu [12] .

Mechanické vlastnosti PLA

Svémi mechanickými vlastnostmi (vizte Tabulka 5) se blíží některým syntetickým polymerům (PP, PET) avšak má výhodu v hojnosti výskytu a nižší ceny. Volba semikrystalické PLA vzhledem k vyššímu stupni krytalinity je upřednostňována při potřebě vyšší pevnosti [15]. Kyselina mléčná má dva stereoisomery: kyselinu L- a D- mléčnou [28]. Polymerizací těchto izomerů, například fermentací cukru či kukuřičného škrobu, vznikají polymery poly-L-mléčná kyselina (PLLA) a poly-D-mléčná kyselina (PDLA) případně jejich směs [29] [24] [12]. PLLA je pomalu degradující polymer s dobrou pevností v tahu, nízkým protažením a modulem v rozsahu 2,7-4,14 GPa. Jeho krystalinita se pohybuje okolo 37 %. Teplota skelného přechodu je v rozmezí 55-65°C a teplota tání v rozmezí 170-200°C.

Tabulka 5: Mechanické vlastnosti PLA [24]

Vlastnost	Typ polymeru		
	PLA	PLLA	PDLLLA
hustota polymeru ρ [g/cm ³]	1,21-1,25	1,24-1,30	1,25-1,27
napětí v tahu σ [MPa]	21-60	15,5-150	27,6-50
modul v tahu E [GPa]	0,35-3,5	2,7-4,14	1-3,45
deformace ε [%]	2,5-6	3,0-10,0	2,0-10,0
teplota skelného přechodu T_g [°C]	45-60	55-65	50-60
teplota tání T_m [°C]	150-162	170-200	amorfní

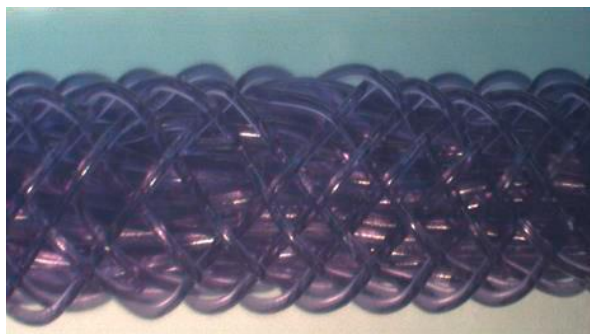
Použití

PLA nachází uplatnění při nosných aplikacích například k výrobě ortopedických fixačních nástrojů, chirurgických nití, destiček a šroubů ke stabilizaci kostních zlomenin případně k vyplnění jiných kostních defektů, nosiče léčiv [24] [15] [12]. Umožňuje i výrobu pevnostních vláken s možným uplatněním při výrobě scaffoldů pro náhradu šlach případně pletených vaskulárních protéz (vizte Obrázek 7).

a)



b)



Obrázek 7: Ukázka využití PLA: a) Pletená PLA vaskulární protéza, b) pletená struktura náhrady šlachy [15]

2.5 Degradace polymerů

V úvodu je dobré zdůraznit, že každý polymer podléhá degradačnímu procesu bez ohledu na stanovené kategorie *degradabilní* a *nedegradabilní*. Pro rozlišení kategorií je především zapotřebí uvážit časové měřítko degradace. Přívlastkem *degradabilní* rozumíme polymer degradující v průběhu své aplikace, nebo ihned po ní. *Nedegradabilním* polymerem rozumíme polymer vyžadující podstatně delší čas k degradaci, tedy čas převyšující trvání samotné aplikace [30]. Degradaci nazýváme proces štěpení polymerních řetězců na oligomery a dále na jednotlivé monomery. V jejím průběhu dochází k erozi, tedy ke ztrátě materiálu vlivem odchodu monomerů a oligomerů z polymerní struktury a změnám mechanických vlastností [31]. K základním degradačním procesům řadíme degradaci termální, mechanickou, chemickou a radiační. Poslední z uvedených je společná všem polymerům, například v důsledku působení UV nebo γ -záření, avšak pro biomateriály není tento typ příliš podstatný. Daleko důležitější je degradace chemická, protože každý z biodegradabilních polymerů je tvořen hydrolyzovatelnými vazbami. Hydrolytický proces může být spuštěn působením molekul vody, nebo příslušných enzymů. U polymerů používaných v klinické medicíně hovoříme o degradaci jako o *bio*-degradaci, aby došlo ke zdůraznění, že degradace je alespoň částečně řízena biologickým systémem [30] [32].

Degradace *in vivo*

Lidský organizmus představuje pro materiály velmi agresivní prostředí. Po implantaci je materiál obklopen tekutinami solného roztoku s množstvím buněk, enzymů, bakterií a dalších biologicky aktivních komponent. Pro úspěšnost léčby je proto nezbytné, aby materiál byl schopen v požadovaném časovém intervalu zachovat svou funkci, aniž by došlo k nekontrolovatelné degradaci a negativnímu ovlivnění okolní tkáně jejími produkty [33] [9]. Na polymerech volených pro výrobu stálých implantátů (kyčelní klouby, izolace kardiostimulátoru, srdeční chlopně, cévní výztuhy) je požadována stabilita i po mnoho let. V některých případech je však degradace žádoucí, dokonce nezbytnou vlastností materiálu. Například v aplikacích týkajících se postupného uvolňování léčiv, absorbovatelných chirurgických nití, scaffoldů pro tkáňové inženýrství je degradace vyžadována v řádu dnů [34] [33].

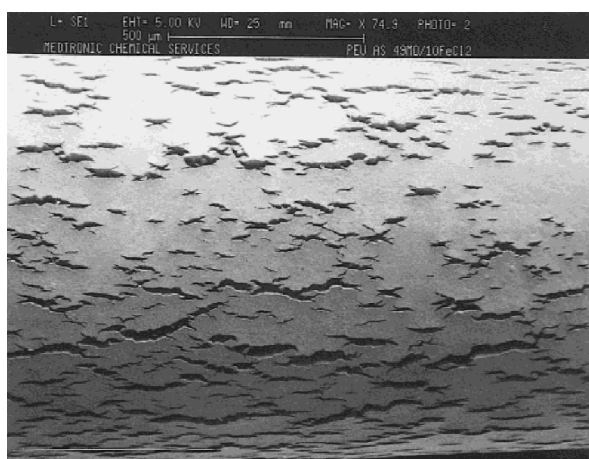
2.5.1 Proces degradace

Biodegradabilní polymery jsou materiály s časovanou životností. Po vystavení pracovnímu prostředí v lidském těle postupně degradují a uvolňují produkty odbouratelné tělním metabolismem. Uvolněné produkty však mohou ovlivnit lokální pH a vyvolat zánětlivou odezvu narušující buněčný růst a regeneraci [34]. Rozlišujeme čtyři základní mechanizmy degradace: hydrolýza (reakce vody a polymeru), oxidace, enzymatická degradace, fyzikální degradace (bobtnání, mechanická zátěž, otěr). I přesto, že polymery mohou být degradovány termálně a fyzikálně, následující část se bude zabývat pouze oxidací a hydrolýzou.

2.5.1.1 Chemická a enzymatická oxidace

Buňky imunitního systému, převážně leukocyty a makrofágové, reagují na přítomnost cizího tělesa vyvoláním zánětu. Proces vylučování vysoce reaktivních kyslíkatých molekul (peroxid vodíku, oxid dusnatý) je připisován především buněčným makrofágům. Tyto molekuly spustí oxidační proces oddělením atomu vodíku z labilní části polymeru. Dochází tak k iniciaci štěpení polymerního řetězce, které se následně šíří celým materiálem. Polymerní řetězce se zkracují až do stádia, kdy se stanou rozpustnými v okolním médiu. Vzhledem k tomu, že toto stádium nastává až po několikanásobném rozštěpení, zhoršení mechanických vlastností předchází samotnému úbytku materiálu [9] [35] [34] [33].

Studie Casase a kol. [36] se zabývala degradací polyetherurethanu. Jedním z pozorovaných oxidačních procesů *in vivo* byla tvorba lokálních přetvořených zón, tedy popraskání povrchu vystavenému tkáním (vizte Obrázek 8).

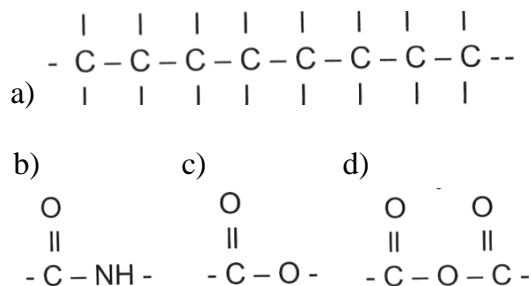


Obrázek 8: SEM snímek vzorku Pellethanu 80A po 49 dnech v nálevu s makrofágy [36]

2.5.1.2 *Hydrolýza a její vliv na polymer*

U polymerních materiálů jde o nejdůležitější degradační proces. Dochází zde k reakci vodních molekul s polymerními vazbami, jejich narušení a k následnému štěpení na menší řetězce oligomerů a monomerů [34] [31] [9]. Rychlost hydrolytického procesu je ovlivněna typem chemické vazby, pH, skladbou kopolymeru i příjmem vody [30].

Polymery degradující ve vodném prostředí musejí mít takové meziatomární a mezimolekulární vazby, které jsou v tomto prostředí narušeny. Polymery se silnou kovalentní vazbou v základní struktuře (např. C-C) jsou obvykle stabilní a jejich narušení termální nebo chemickou energií vyžaduje delší degradační čas. Na druhou stranu existuje mnoho typů vazeb, které tomuto energetickému působení snadno podlehnou. Místo v polymerním řetězci obsazené karboxylovou vazbou se stává náchylné k biodegradaci, tak je tomu i v případě esterových a amidových struktur [32] [9].



Obrázek 9: a) znázornění polymeru se silnou základní C-C strukturou; znázornění vazeb náchylných k hydrolýze: b) vazba amidová, c) vazba esterová, d) vazba anhydritová [32]

Každý z biodegradabilních polymerů proto obsahuje vazby hydrolyzovatelné. Změny pH v blízkém okolí polymeru mohou zapříčinit urychlení degradace. Ovšem ne pro každý polymer je efekt stejný. Například pevnost chirurgických nití z kyseliny polyglykolové, jak uvádí studie A. Göpfericha [30], byla nejvyšší při neutrálním pH a výrazně snížena při vysokém i nízkém pH. Oproti tomu poly(ortho estry) jsou rezistentní vůči bazickému pH a degradace je urychlena až v kyselé oblasti pH. Ovlivněním pH okolo polymeru lze tak efektivně ovlivnit míru degradačního procesu. Jako obecné pravidlo platí, že hydrolytický proces organických látek probíhá minimálně při neutrálním pH (cca 7,0) a naopak dochází k jeho urychlení při posunu do kyselé oblasti (nízké pH) i alkalické oblasti (vysoké pH) [32].

U implantovatelných polymerů je kontakt s vodným prostředím více než očekávatelný. Absorpce vody se tak stává podstatným faktorem rozhodujícím o mechanických vlastnostech materiálu. Absorpcí vody dochází například k poklesu teploty skelného přechodu. Tento efekt je obzvláště pozorovatelný u polyamidů, polyurethanů a epoxidů, v jejichž struktuře hrají důležitou roli vodíkové vazby. Modul pružnosti v tahu může

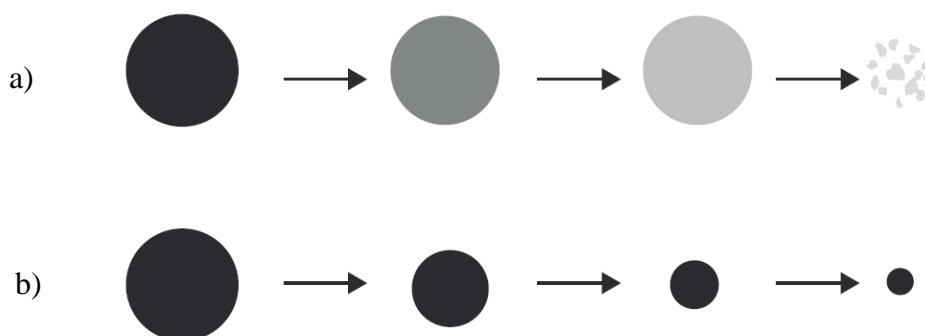
být v porovnání se suchým vzorkem snižen až o 50%, klesá tak i tuhost a odolnost vůči tečení. U polyamidu 66 byl tento strmý pokles tahového modulu zaznamenán již po vystavení vzduchu se zvýšenou vlhkostí [34]. Hydrolýza může být spuštěna i činností enzymů. Enzymy fungují jako katalyzátory reakcí v živém organismu. Hydroláza je třídou enzymů, vyskytujících se například v gastrointestinálním ústrojí, kde usnadňuje štěpení. Do této třídy patří například amyláza, lipáza fosfatáza. Je pravděpodobné, že některé enzymy této třídy se mohou podílet na štěpení a následné degradaci do těla implantovaného biomateriálu [9].

2.5.1.3 *Posloupnost degradačních stadií*

V rané fázi je hlavním procesem postupná difúze vodního roztoku do polymerní matrice. Dochází k menší změně v molekulární i celkové hmotnosti a následně i v tahové pevnosti. K hlavním změnám dochází na povrchu polymeru, na kterém je pozorováno zhrubnutí i chemické změny způsobené hydrolýzou. Pro druhou fázi je charakteristické snížení molekulové hmotnosti polymeru v důsledku štěpení řetězce a difúzí degradačních produktů do okolního roztoku. To vede k zvýšení pórovitosti matrice a ztrátě pevnosti v tahu. Pokročilá stadia degradace jsou charakterizována zhroucením polymerní matrice, dramatickým poklesem v molekulové hmotnosti a nárůstu ve ztrátě celkové váhy. Dochází ke ztrátě krystalinity k výraznému poklesu v mechanických vlastnostech [9] [32].

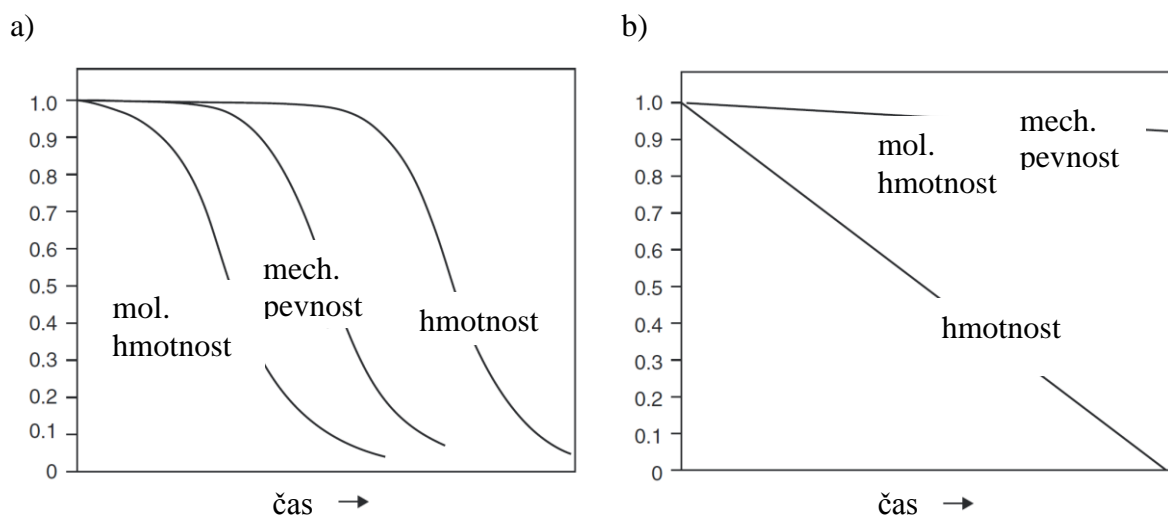
2.5.1.4 *Eroze polymeru*

V důsledku degradace, dochází u polymerů k materiálové erozi (vizte Obrázek 10). Jedná se o přestup degradačních produktů do okolního média a tím způsobenou ztrátu hmotnosti. U polymerů rozeznáváme dva způsoby průběhu eroze: povrchovou a objemovou [30]. O tom, jaký způsob eroze nastane, rozhodne především míra difúze vody do struktury polymeru. Polymer, který je odolný proti absorpci vody, nedává hydrolýze dostatečné pole působnosti. Nastává tak degradace povrchová [32]. Charakteristická je postupnou, výhradně povrchovou, ztrátou materiálu. Setkáváme se s ní u polymerních biomateriálů s vysokou krystalinitou a hydrofobicitou. V průběhu povrchové eroze dochází ke změně rozměru i hmotnosti výrobku. Molekulární hmotnost však zůstává zachována. Scaffoldy s tímto typem eroze se tedy během procesu zmenšují, avšak jejich původní geometrický tvar zůstává a nemění se ani mechanické vlastnosti [31] [30]. Tento jev může být využit při potřebě konstantního přenášení molekul při zachování strukturní integrity materiálu v průběhu degradace (například při doručování léčiv) [9].



Obrázek 10: Schematické znázornění materiálové eroze: a) proces objemové degradace; b) povrchová degradace: Enzymy nemohou proniknout skrze těsnou povrchovou strukturu a tak enzymatická reakce nastane na rozhraní polymer enzym. Povrch je postupně narušován, což zvyšuje plochu pro působení enzymů [9] [31].

Většina polymerních materiálů však podléhá erozi objemové [37]. Po průniku malého množství vody do polymeru dochází nejprve k rozvolňování esterových vazeb. Absorbují více vody a tak štěpení řetězců probíhá v celé struktuře vzorku [32] [31]. Mnohdy tento proces vede k vytvoření prázdne skořepiny [9]. Pokles molekulární hmotnosti je znatelný ihned po zahájení degradačního procesu, nicméně prozatím nemá na mechanické vlastnosti výrobku vliv. Ty jsou zachovávány zesíťováním a krystalinitou polymeru. Se stoupajícím množstvím degradačních produktů se však urychluje proces hydrolyzy a ve chvíli, kdy se produkty degradace stanou rozpustnými ve vodě, dojde i k poklesu hmotnosti. Původní rozměr zůstává zachován po značnou dobu, tedy až do kritické chvíle, kdy dojde k zhroucení celé struktury [31]. K zobrazení průběhu objemové a povrchové degradace slouží Obrázek 11.



Obrázek 11: a) Průběh objemové degradace: Úbytek mechanické pevnosti je oproti poklesu molekulární hmotnosti opožděn, ovšem předchází poklesu celkové hmotnosti, b) Průběh povrchové degradace: Mechanická pevnost i molekulární hmotnost má relativně nízký pokles (křivky splývají). Celková hmotnost oproti tomu vykazuje pokles značný [31].

Vliv výrobního procesu na degradaci polymeru

Implantáty z biopolymerů jsou často vyráběny pomocí vstřikování a vytlačování. Tyto způsoby vedou k částečné orientaci materiálu na povrchu výrobku. Vlivem rozdílu v materiálové orientaci může docházet k odlišné míře degradace povrchu a jádra. Riziko mohou představovat i aditiva pro usnadnění výrobního procesu (plastifikátory, lubrikanty, stabilizátory) [9].

Vliv mechanické zátěže na degradaci polymeru

Mechanické napětí může být v polymeru vyvoláno v průběhu pracovní zátěže, ale může do něj být zaneseno již výrobním procesem v podobě zbytkového napětí. Literatura uvádí, že vzorky podrobené zatížení vykazují vyšší degradaci než vzorky nezatížené [33].

2.5.2 Vyhodnocení degradace polymerů

Po implantaci prochází polymery degradačními procesy výše popsanými. Dochází ke změnám fyzikálních i chemických vlastností. K vyhodnocení a charakterizování těchto změn slouží degradační zkoušky, jejíž základní přehled je uveden v [9]. Zkoušky lze rozdělit na povrchové a objemové. Mezi povrchové zkoušky jsou řazeny spektroskopické metody, vhodné spíše k vyhodnocení prvotních fází degradace. Objemové zkoušky zahrnují měření molekulární i celkové hmotnosti, posouzení vlivu teploty i mechanické zkoušky. K základním zkoumaným charakteristikám patří:

Tabulka 6: Vyhodnocení degradace scaffoldu

kategorie	způsob vyhodnocení
vyhodnocení mechanických vlastností	zkouška pevnosti v tlaku
určení hmotnosti	zhodnocení hmotnostního úbytku
měření porozity	tok plynu skrze strukturu průnikem rtuti do struktury
zhodnocení biokompatibility	tvorba vrstvy apatitu v SBF kontakt s buňkami aktivita po implantaci
měření pH	měření pH v okolí scaffoldu
zhodnocení iontové koncentrace	plasmová spektrometrie

Absorpce roztoku

Měřením příjmu vody, případně jiného roztoku, lze do jisté míry určit hydrofobii / hydrofilii testovaného materiálu a tedy předpovědět jeho náchylnost k degradaci hydrolýzou

[9]. Metoda spočívá v ponoření vzorku do roztoku, nejlépe při konstantní teplotě (obvykle 37°C). Po uplynutí zvoleného času jsou vzorky vyjmuty a po odstranění přebytečného roztoku zváženy. Relativní obsah vody je následně určen dle rovnice (2.1) [38]. Roztokem pro absorpční test může být voda [39], PBS [40] nebo SBF [41].

$$V [\%] = \frac{m_{\text{mokrý}} - m_{\text{suchý}}}{m_{\text{suchý}}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

Hmotnostní úbytek

V průběhu degradace v daném roztoku může vzorek měnit svou hmotnost. Tato změna je běžně určena výpočtem procentuelní ztráty podle vztahu (2.2) [39] [42] [43].

$$D [\%] = \frac{m_i - m}{m_i} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Molekulární hmotnost

Zjištění molekulární hmotnosti patří k jednomu z nejdůležitějších analýz degradačního mechanismu polymerických biomateriálů. Je používáno chromatografie gelové prostupnosti a viskozimetru [9] [44].

Morfologie

Míra změny tvaru a velikosti je podstatným parametrem. V mnohých aplikacích (kostní cement, fixační implantáty) by změna těchto parametru mohla vést k narušení makroskopických vlastností implantátu [9]. K vizualizaci povrchových změn (například průměru vláken, jejich orientace, míra propletení [45]) je nejčastěji používáno metody skenovací elektronové mikroskopie (SEM) [46] [45]. SEM využívá paprsku elektronů o průměru ~5nm a s energií v řádu stovek až tisíců eV. Paprsek je veden po povrchu měřeného vzorku. Odražené elektrony a fotony jsou použity k sestavení zvětšeného obrazu povrchu [47]. V případě polymerních struktur je pro použití této metody nutné povrch učinit elektricky vodivý například povrchovým nástřikem zlata [45].

Mechanické vlastnosti

Mezi mechanické vlastnosti patří: pevnost v tahu, prodloužení, modul pružnosti v tahu, vrubová houževnatost, pevnost v ohybu, modul pružnosti v ohybu, pevnost v tlaku, modul pružnosti v tlaku a dynamický koeficient tření [48]. V literatuře se k vyhodnocení mechanických vlastností polymerů vystavených různým způsobům degradace nejčastěji používá tlakových [49] [50], tahových zkoušek [47] [44] a mikroindentace [51] [52].

2.6 Roztoky simulující biologické prostředí

Rapidní vývoj nových materiálů s potenciálním využitím v oblasti implantátů, klade nároky i na vývoj nových metod pro rychlé vyhodnocení daného materiálu [53] [4]. Již od roku 1970 jsou bioaktivní skla (45S5) známá svou schopností bezprostřední vazby na živé tkáně [54]. Mezi jejich povrchem a okolní kostí byla pozorována formace tenké vrstvy apatitu, která umožní vznik společné chemické vazby. Na základě pozorování bylo vyvozeno, že tato vrstva je klíčovým požadavkem pro osteointegraci umělého materiálu s živou tkání [53]. Studie T. Kokuba a kol. [3] navrhla metodu, reprodukcí formaci vrstvy apatitu mimo tělo pomocí simulované tělní tekutiny. Tento roztok simuluje anorganické složení lidské krevní plasmu a slouží k nahrazení testování materiálů *in vivo*. Je tvořen anorganickými ionty a jeho pH se blíží biologickým tekutinám [4]. Pokud po ponoření materiálu do nálevu dojde k formaci vrstvy apatitu lze předpokládat, že materiál je dostatečně bioaktivní k vytvoření vazby v těle [53]. I přesto, že je metoda pro vyhodnocení bioaktivity materiálu široce rozšířena, má svá omezení. Korelaci, mezi schopností materiálu formovat vrstvu apatitu mimo tělo a potenciální pevností vazby s kostí, je totiž velmi obtížné určit. Vyšší formace apatitu ještě nemusí znamenat silnější vazbu s kostí. S velkou kritikou se shledává i fakt, že složení nálevu neobsahuje organické složky, obzvláště proteiny, které se v lidské plasmě vyskytují v množství cca 70g/l. Proteiny jsou známé svou adsorpcí k různým povrchům, tudíž lze předpokládat, že tento děj může mít vliv na biomineralizační proces [53] [4].

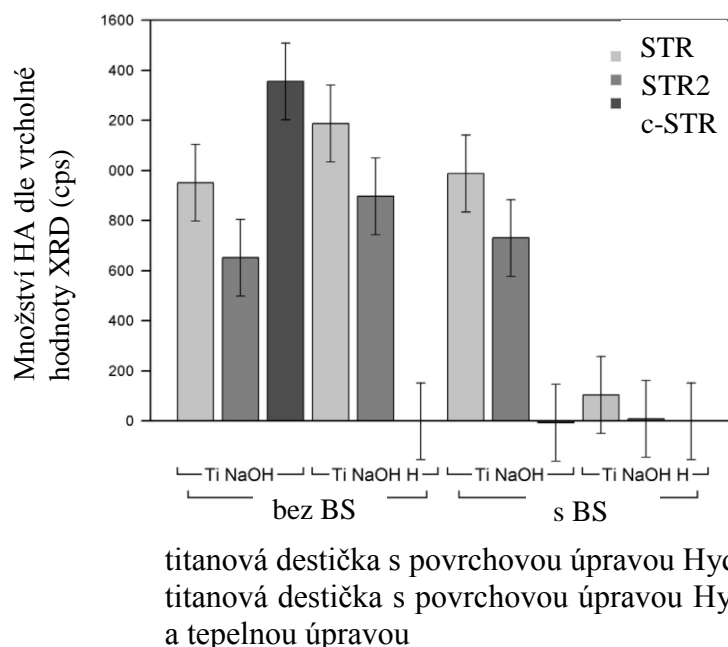
Samotná osteointegrace znamená komplexní proces zahrnující aktivaci krevních destiček a migraci osteogenních buněk. Kostní formace a její vazby pak závisí především na aktivitě osteoblastů řízených množstvím organických a anorganických faktorů. Pevnost vazby mezi kostí a implantátem do značné míry závisí i na mechanických vlastnostech povrchu (adheze k poréznímu povrchu, drsnost povrchu) [53] [4]. Z výše uvedených důvodů, nabádá studie Pana a kol. [4] při posuzování bioaktivity podle formace vrstvy apatitu v simulované tělní tekutině k obezřetnosti.

2.6.1 Simulované tělní roztoky

Roztok, který má simulovat tělní prostředí, musí splňovat následující požadavky:

- pH roztoku se musí blížit fyziologickému pH 7,40 a jeho pufrovací kapacita musí být dostatečná pro zachování pH v průběhu experimentu
- v roztoku by nemělo docházet k precipitaci apatitu před ponořením testovaného materiálu
- k formaci apatitu by nemělo docházet na inertních materiálech (např. leštěný titan)

Jak již bylo zmíněno, původní složení simulovaného tělního roztoku (STR, navržené v literatuře [3]) je kritizováno pro absenci proteinů [53]. Složení tohoto nálevu je však kritizováno i kvůli použití pufru Tris k pufraci pH. Tato látka se v lidské plasmě nevyskytuje a může ovlivnit nukleaci fosfátů. V krvi je pufrace zajištěna rovnováhou mezi uhličitany a 5% parciálním tlakem CO₂ v krevním séru [53]. Studie [53] mezi sebou porovnávala tři STR (vizte Obrázek 12) a sledovala vliv proteinů na formaci vrstvy apatitu na povrchu titanových destiček před a po přidání bovinného séra (vizte Obrázek 12). Oproti tradiční STR bylo místo pufru Tris použito HCl. Je patrné, že přítomnost proteinů v roztoku má závažný vliv na formaci apatitu. Efekt patrný na Obrázek 12 nastal po přidání 1g/L bovinného séra (BS). Po zvýšení dávky séra na 5 g/L došlo k úplnému potlačení formace vrstvy apatitu. Připomeňme, že v lidská plasma obsahuje 70 g/l proteinů. Zahnutí proteinů do STR by proto měla být věnována větší pozornost [53].



Ti NaOH
Ti NaOH H

titanová destička s povrchovou úpravou Hydroxidem sodným
titanová destička s povrchovou úpravou Hydroxidem sodným
a tepelnou úpravou

Obrázek 12: Množství uloženého HA na povrchu testovaných vzorků dle studie [53]. Vyznačené odchylky značí intervaly s 95% pravděpodobností.

2.6.2 Pufrovací roztoky

Pufry jsou směsi slabých kyselin a jejich konjugovaných bází, solí [55]. Pufrované roztoky jsou schopné i po přidání kyseliny nebo zásady udržet relativně stabilní pH a zabránit tak denaturaci enzymů. Důležitým požadavkem je, aby pufrovací roztok nebyl reaktivní s ostatními složkami roztoku, ideálně by měl být inertní [56] [57] [58]. Základním vztahem pro výpočet pH pufrovacího roztoku je Henderson-Hasselbalchova rovnice (2.3).

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2.3)$$

HA... molární koncentrace slabé kyseliny
A... molární koncentrace konjugované báze
pK_a... disociační konstanta kyseliny

Tris

Jde často používaný pufr při biologických experimentech. Cenově je velmi dostupný, volně rozpustný ve vodě, inertní v mnoha enzymatických systémech a má vysokou pufrovací kapacitu. Má však i značné nevýhody. Jeho vlastnosti jsou podstatně ovlivněny teplotou okolí, je značně reaktivní a má vysoký stupeň rozpustnosti tuků. Může tedy proniknout biologickými membránami. Pro mnoho buněk je proto toxický [58] [57].

Fosfátový pufr

Tento pufr byl pokládán za standard fyziologického pH. V mnoha situacích však jeho použití není ideální. Fosfát může zapříčinit útlum enzymatických procesů [59].

Kyselina uhličitá

Mezi přírodní pufry patří kyselina uhličitá H₂CO₃, která udržuje stabilní pH krve. Jde o slabou kyselinu vznikající rozpuštěním oxidu uhličitého ve vodě. pH výsledného pufrovacího roztoku se pohybuje v rozmezí 3,9-6,97 a je výsledkem souhry koncentrace bikarbonátu (HCO₃), kyseliny uhličitě a parciálního tlaku oxidu uhličitého nad roztokem. Při dané teplotě je složení čistého roztoku určeno výhradně parciálním tlakem oxidu uhličitého. Nejvyšší pufrovací kapacity je dosaženo při pK_a (~6,4) oproti tomu při hodnotě pH pod 5,5 není dosaženo téměř žádné kapacity. Možnou nevýhodou tohoto roztoku je, že s postupným uvolňováním rozpuštěného oxidu uhličitého do okolí dochází k rapidnímu nárůstu pH. Tuto termodynamickou nestabilitu je možné minimalizovat těsnícím uzávěrem případně opětovným dodáváním CO₂ do roztoku [60]. Požadavky pro biologické pufry [58] jsou uvedeny na následující stránce.

a) Rozpustnost

Pufir by měl být volně rozpustný ve vodě a hůře rozpustný v ostatních rozpouštědlech.

Čím vyšší je rozpustnost, tím jednodušší je příprava koncentrátů.

b) Permeabilita

Pufir by neměl být schopen proniknout biologickými membránami, aby nedošlo k ovlivnění koncentrací uvnitř buněk a organel.

c) Ionická síla

Pufir by neměl ovlivnit koncentraci iontů v roztoku. Fyziologická ionická koncentrace chloridu draselného (NaCl) se pohybuje v rozmezí 100-200mM. Při změně této koncentrace dochází k ovlivnění činnosti enzymů

d) Závislost disociační konstanty pK_a

Hodnota pK_a by měla být co nejméně ovlivněna koncentrací, teplotou a ionickou koncentrací média.

e) Formace sraženin

Pokud pufir reaguje s ionty kovu, dochází k uvolnění protonů a nastává pokles pH. Některé enzymy však ionty kovu potřebují ke své činnosti. V případě jejich reakce iontů s pufrem je činnost těchto enzymů potlačena.

f) Inertnost

Pufir by neměl ovlivňovat činnost enzymů a neměl by reagovat s metabolity a ostatními složkami roztoku. Pufir by tedy měl být inertní.

g) Absorpce UV záření

Vzhledem k tomu, že většina spektrometrických analýz je prováděna na úrovni vlnové délky 230nm, pufiry by neměly absorbovat žádné vlnové délky přesahující tuto hodnotu.

h) Čistota

Pufiry by měli být snadno vyrobitelné a očistitelné. Kontaminace například těžkými kovy by zapříčinila ovlivnění biologického systému.

i) Cena

Během očišťujícího procesu proteinů jsou testovány vzorky pufru o různém objemu. Rozpočet experimentu je tedy do značné míry ovlivněn cenou použitého materiálu.

3. Experimentální část

3.1 Úvod do experimentu

Z provedené rešerše vyplývá, že scaffoldy do značné míry řeší problém nedostatku kostních štěpů pro léčbu kostních defektů a onemocnění. Výběr materiálu k jejich zhotovení podléhá řadě přísných kritérií, bez jejichž splnění není zaručena úspěšná regenerace příslušné tkáně. V předešlých kapitolách byly představeny některé z fyzikálních a mechanických vlastností v současnosti nejčastěji používaných materiálů - biodegradabilních polymerů. Degradace, její rychlost, charakter a vliv na původní mechanické vlastnosti, je právě jedním z podstatných faktorů, který rozhodne o materiálové volbě.

Pro úspěšnou předpověď chování scaffoldu v lidském těle je nezbytné materiál vystavit simulovanému pracovnímu prostředí. Vzhledem k značné rozmanitosti a specifčnosti systémů lidského těla je však pestrý i způsob simulace. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.6. Roztoky, prostředí lidského těla je možné napodobit prostřednictvím roztoků. Zde se v odborné literatuře setkáváme s nejednotností. Není stanoveno, kdy jaký roztok použít a nakolik se změní charakter degradace zvoleného materiálu při volbě roztoku A oproti roztoku B. Cílem této práce je vybrat a porovnat roztoky simulující prostředí lidského těla a vyhodnotit jejich vliv na polymerní scaffold.

V první fázi experimentu byly zvoleny tři roztoky simulující prostředí *in vivo*: pufovací roztok PBS (*phosphate buffer solution*), simulovaná tělní tekutina SBF (*simulated body fluid*) a lidská krevní plazma. Celkový počet vzorků (90) byl rozdělen na devět skupin po desíti. Každé skupině byl přiřazen příslušný roztok a časový interval, po který byla skupina vystavena jeho působení. Intervaly působení byly zvoleny: 0, 7 a 14 dní. V prvním intervalu 0 dní byly vzorky hydratovány 10 minut před mechanickým testem. Po uplynutí daného času byly vzorky podrobeny zkoušce v tlaku a ze získaných dat byly vyjádřeny mechanické vlastnosti. Druhá fáze experimentu byla zaměřena na posouzení hmotnostního úbytku vzorků. Do stejných roztoků byly zvláště naloženy vzorky po dobu 7 a 14 dní. Hmotnostní ztráta byla posouzena podle vztahu (2.2).

3.2 Příprava kompozitních vzorků

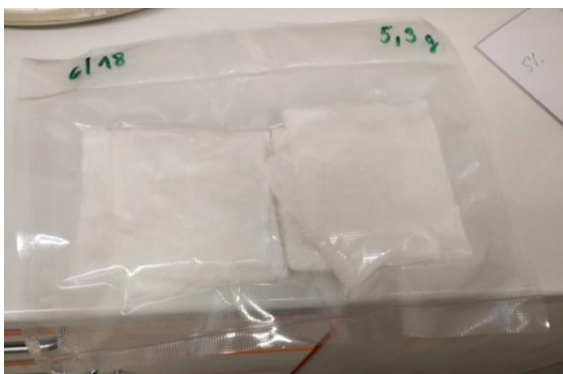
Příprava vzorků probíhala v laboratoři Ústavu struktury a mechaniky hornin, AV ČR v.v.i pod dohledem Ing. Tomáše Suchého, Ph.D. K jejich zhotovení byl použit kolagen z telecích kůží od firmy VUP Medical. Postup přípravy byl zdokumentován sérií snímků níže.

Postup přípravy:

Kolagen dodávaný ve formě čtvercových plátů byl nejprve nastříhán na drobné díly a následně rozpuštěn v destilované vodě tak, aby bylo dosaženo 5% kolagenní disperze. Hrubá směs byla po dobu 1h uchována při konstantní teplotě a následně rozmixována. V tomto stavu byla směs přelita do válcovitých forem o poloměru 12 mm, které byly uloženy po dobu 3h do suchého ledu. Zmražením je docíleno vzniku drobných ledových krystalů uvnitř kolagenního vzorku. Sublimací těchto krystalů v lyofilizátoru je získána jemná porézní struktura. Pro zajištění dostatečných mechanických vlastností získaných vzorků, bylo využito chemického crosslinkování v roztoku připraveného z 95% lihu, NHS a EDC od firmy Sigma-Aldrich.

Po dokončení procesu zesíťování byly vzorky zbaveny přebytku chemického činidla, vysušeny a naloženy do degradačních médií (DM). Postupu přípravy DM je věnována příští kapitola. Vzhledem k porózitě vzorků a pomalé rychlosti difúze média do struktury však vzorky po vložení do DM plovají. K urychlení procesu nasáknutí médiem byly vzorky nejprve přelity menším množstvím média a zajištěny sítkou, aby došlo ponoru celého povrchu vzorků. V tomto stavu byly vzorky vloženy do vakuové komory a za periodického míchání byly vystaveny sníženému tlaku. Po 1h byly vzorky přesunuty do 0,5l DM za teploty 37°C uloženy do inkubátoru.

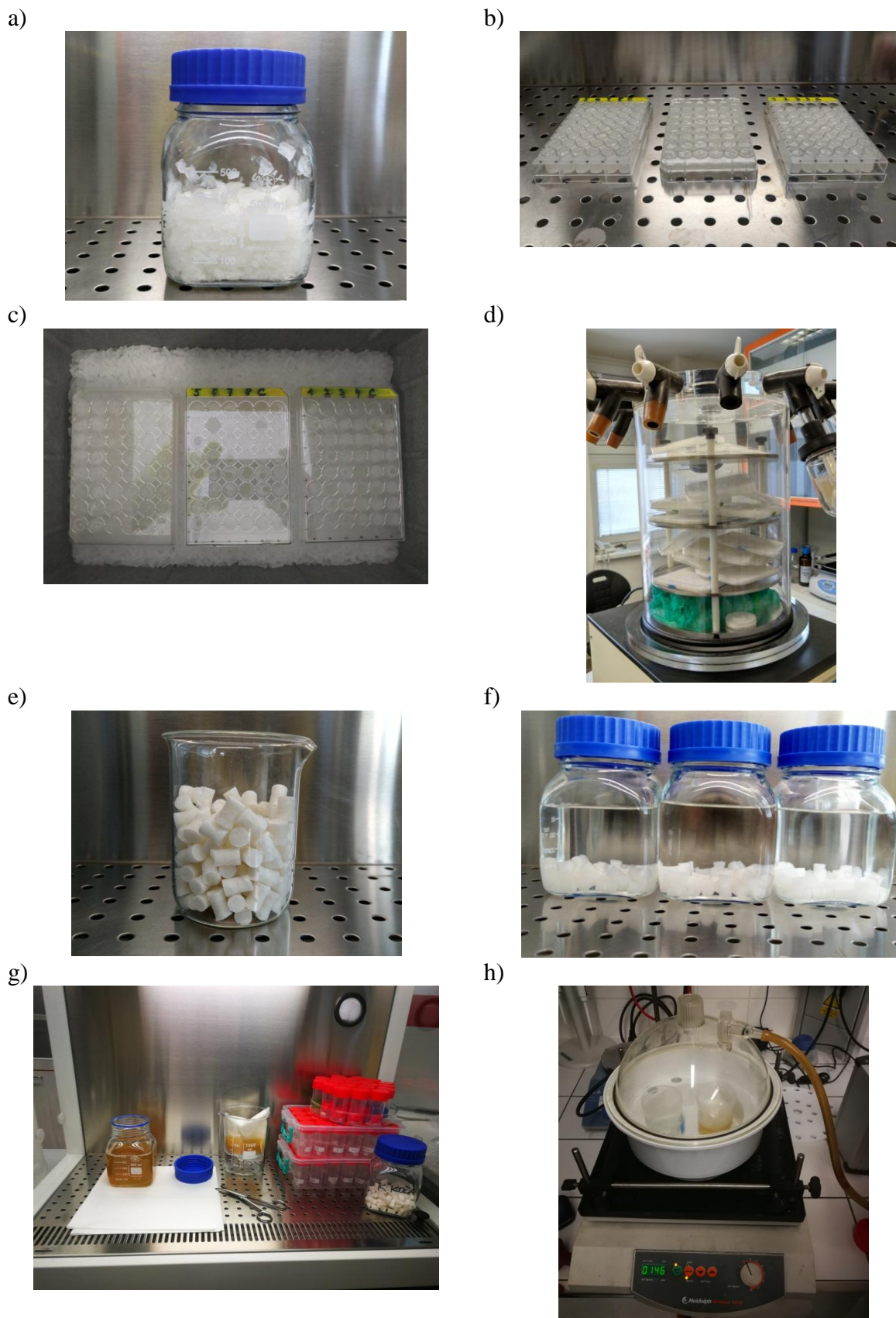
a)



b)



Obrázek 13: a) pláty surového kolagenu, b) nastříhaný kolagen před přimícháním destilované vody



Obrázek 14: Postup úpravy surového kolagenu: a) nastříhaný kolagen naložený v destilované vodě, b) kolagenní směs ve válcových formách průměru 12mm, c) uložení naplněných forem do suchého ledu, d) rozmrazení a vysušení vzorků v lyofilizátoru, e) vysušené kolagenní vzorky, f) chemické zesítěvání vzorků, g) příprava naložené vzorků do DM, h) vzorky v menším objemu DM ve vakuové komoře

3.3 Příprava roztoků

SBF byla připravena dle postupu uveřejněného v publikaci [61] (vizte Tabulka 7). Příprava byla zachycena na obrázku (vizte Obrázek 15).

Tabulka 7: Přísady pro přípravu SBF [61]

pořadí	složka	množství
0	destilovaná voda	2000 ml
1	NaCl	16,070 g
2	NaHCO ₃	0,710 g
3	KCl	0,450 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,462 g
5	MgCl ₂	0,352 g
6	1.0M-HCl	39 ml
7	CaCl ₂	0,584 g
8	Na ₂ SO ₄	0,144 g
9	Tris	12,236 g
10	1.0M-HCl	0-5ml



Obrázek 15: Příprava SBF: Rozpuštění přísad v ohříváné destilované vodě při současném měření pH

K přípravě PBS byly použity tablety dodávané firmou Sigma-Algrich. Posledním použitým roztokem byla lidská plazma (vizte Obrázek 16a). Po jejím rozmrazení bylo do 0,5l přidáno 5ml antibiotika (vizte Obrázek 16b).



Obrázek 16: a) použitá krevní plazma s faktorem Rh (D) pozitivní i negativní, b) antibiotikum (penicilin streptomycin)

3.4 Metodika testování porézních vzorků

Princip provedené zkoušky byl přejet z normy ČSN ISO 13314: Mechanické zkoušení kovů - Zkoušení tvářítnosti - Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem. Norma pojednává o zkoušení porézních kovů, postup pro stanovení mechanických vlastností však lze aplikovat i na porézní kompozitní a polymerní materiály.

Princip:

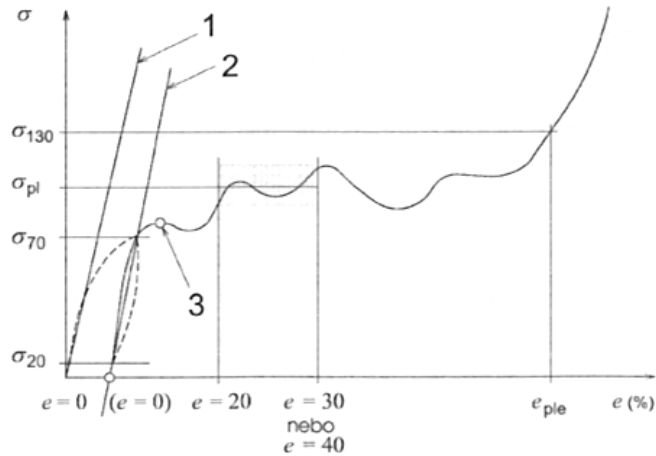
Ke zkoušce tlakem je použito systému MTS Mini Bionix 858.02 (metrologické označení PM 00) s párem rovnoběžných tlakových desek. Každý z testovaných vzorků je vložen mezi tyto desky a zatěžován konstantní tlakovou silou. V průběhu zkoušky je zaznamenávána křivka zátěžné síly / posuvu [62].

Postup zkoušky:

- stanovení geometrie vzorku: přeměření vzorku je normou doporučeno na třech místech
- vložení vzorku mezi zatěžovací desky
- zatížení odlehčovací smyčkou s konstantní rychlostí posuvu do požadované deformace větší než 50 %
- záznam axiálního posuvu a tlakové síly
- vyhodnocení

Pro každý vzorek jsou vyhodnoceny následující parametry:

- pracovní diagram napětí / deformace
- stabilní hladina napětí σ_{pl} [MPa] (*plateau stress*): zastupuje pevnost materiálu; jde o průměrné napětí, stanovené mezi 20 % a 30 % deformace
- elastický gradient E [MPa] (*elastic gradient*): představuje modul pružnosti materiálu; jde o směrnici sečny z odlehčující větve smyčky
- absorbovaná energie W [MJ/m³] (*energy absorption*) je reprezentována plochou nad křivkou naměřených dat pro 50% deformaci
- účinnost absorbování energie W_e [%] (*energy absorption efficiency*)

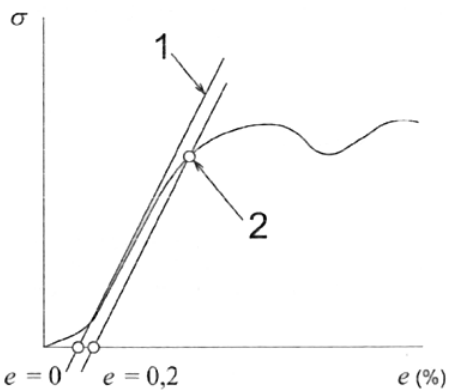


Legenda:

1. kvazi-elastický gradient
2. elastický gradient
3. první maximum pevnosti v tlaku

Obrázek 17: Křivka napětí- deformace pro stanovení charakteristických hodnot ze zkoušky porézních a pěnových materiálů tlakem [62]

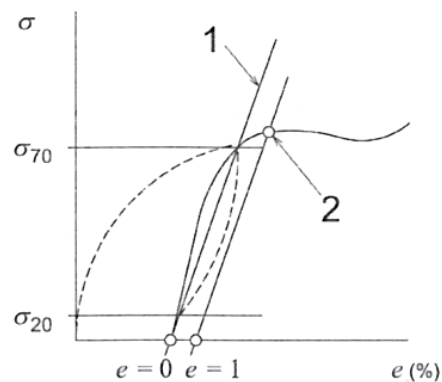
a)



Legenda:

1. kvazi-elastický gradient
2. smluvní napětí v tlaku

b)



Legenda:

1. elastický gradient
2. smluvní mez kluzu v tlaku

Obrázek 18: a) Kvazi-elastický gradient a smluvní napětí v tlaku;
b) Elastický gradient a smluvní mez kluzu v tlaku [62]

3.5 Statistické zpracování

Statistická významnost rozdílů naměřených dat byla vyšetřena převážně pomocí neparametrických metod v programu STATGRAPHICS Centurion XV, StatPoint. Každý soubor dat byl vystaven testu normality (Shapiro-Wilkův W test) a kontrole shody rozptylů (Levennův test). V případě, že data pocházela z normálního rozložení a byla splněna shoda rozptylů, k vyhodnocení bylo využito Fisherovy LSD (*least significant difference*) metody. V opačném případě bylo využito Mann-Whitneyho metody. Ta je však určena pouze pro párové porovnávání. V případě vícenásobného porovnávání je nezbytné provést Bonferroniho korekci hladiny spolehlivosti α , aby bylo sníženo riziko vzniku chyby I. řádu [63].

Experiment, provedený v této práci, využívá třech degradačních roztoků. Zajímá nás tedy porovnání třech dvojic. Korekce spočívá v podělení α počtem provedených porovnání, vizte rovnici (3.1) [63]. V případě použití korekce je analýza rozptylu třech dvojic provedena na 95% hladině spolehlivosti (hodnoty $p < 0.01666$ byly považovány za významné).

$$\text{upravená hladina spolehlivosti} = \frac{\alpha}{m} = \frac{0,05}{3} = 0,01666 \quad (3.1)$$

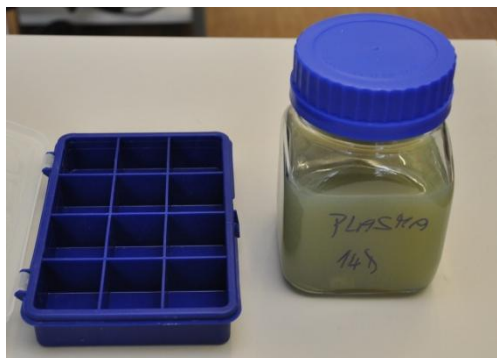
α ... hladina spolehlivosti

m ... počet provedených porovnání

3.6 Provedení experimentu

Testování vzorků bylo provedeno na fakultě Strojní ČVUT v laboratoři mechanických zkoušek pod dohledem Ing. Radka Sedláčka, Ph.D. U každého vzorku vyjmutého z roztoku byl třikrát přeměřen průměr a výška na mikrometru Mahr 40 EX PM001 (vizte Obrázek 19). V předem určeném pořadí byly vzorky přesunuty do nádoby s menším množstvím roztoku a zatíženy v axiálním směru systémem MTS Mini Bionix 858.02⁵ (vizte Obrázek 20).

a)



b)

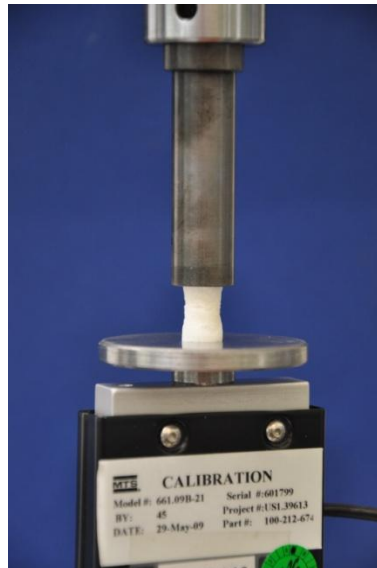


Obrázek 19: Provedení experimentu: a) vyjmutí vzorků z nálevu a přiřazení pořadového čísla, b) měření průměru a výšky

a)



b)



Obrázek 20: a) axiální zatížení vzorku v příslušném nálevu, b) zatížení suchého vzorku

⁵ Pro měření hydratovaných vzorků byl použit snímač s rozsahem zatížení 10 N (PM00/08); pro měření suchých vzorků byl použit snímač s rozsahem 100 N (PM00/16)

4. Výsledky

4.1 Naměřená data

V předchozí části byly popsány cílové parametry mechanické zkoušky. V této části bude představen princip výpočtu těchto parametrů a následně uvedeny průměrné výsledné hodnoty i statistické vyhodnocení. Kompletní výsledná data všech vzorků jsou zařazena do kapitoly 8. Příloha.

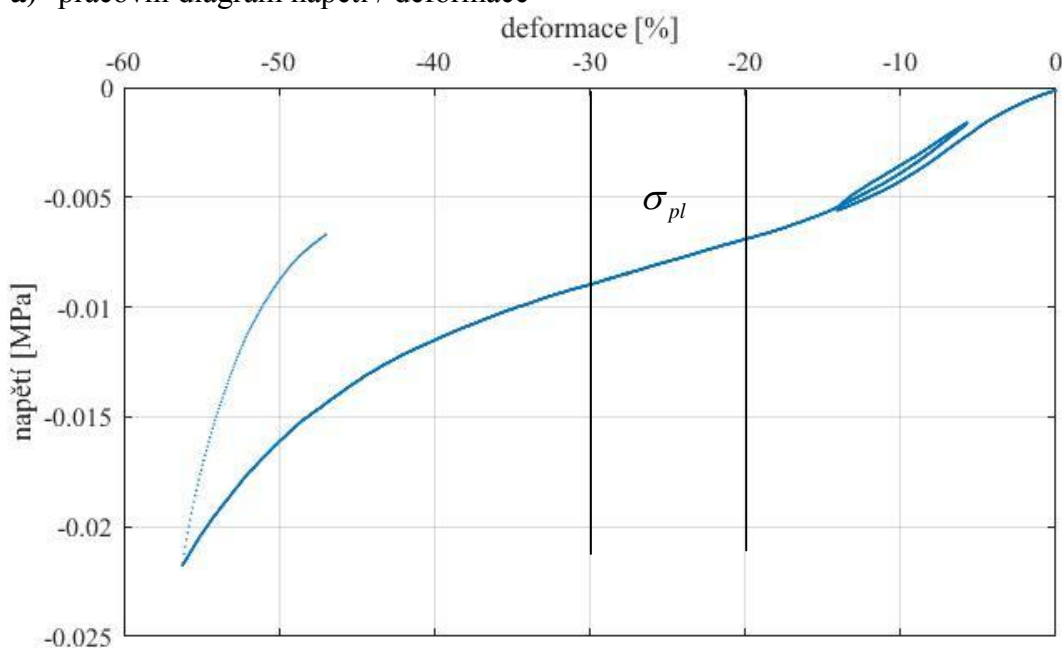
4.1.1 Charakteristický datový záznam a jeho zpracování

Pro každý vzorek byl systémem MTS Mini Bionix 858.02 zaznamenán průběh axiálního posuvu zátěžné desky, síly v tlaku a času (vizte Tabulka 8). Před zátěžovou zkouškou byl u každého vzorku třikrát přeměřen průměr a jeho výška. Pro zpracování vstupních dat byl použit výpočetní software MatLab.

Tabulka 8: Charakteristická forma zaznamenaných dat

Čas [s]	Axiální posunutí [mm]	Axiální síla [N]
...
144.3584	-8.3701668	-0.63521087
144.3916	-8.3678913	-0.63564754
144.4248	-8.3652859	-0.6333012
144.45801	-8.3626308	-0.6337803
144.49121	-8.3613052	-0.63420528
144.52441	-8.3590345	-0.63264525
144.55762	-8.3570633	-0.63429546
...

a) pracovní diagram napětí / deformace



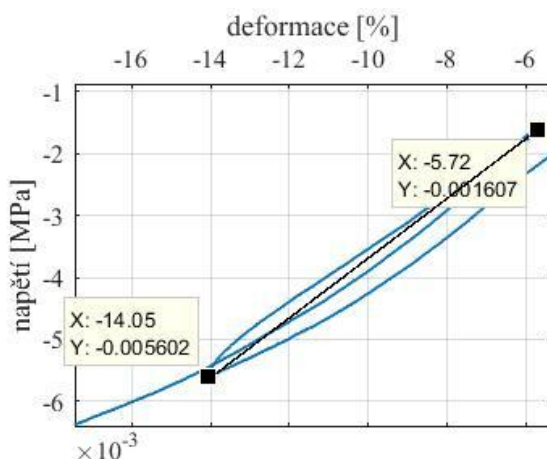
Obrázek 21: Ukázka pracovního diagramu vzorku po 7 dnech v roztoku plazmy

b) stabilní hladina napětí σ_{pl} [MPa]

Napětí σ_{pl} bylo stanoveno jako průměrná hodnota napětí pro deformační interval $\varepsilon = \langle 20,30 \rangle$ vizte Obrázek 21.

c) elastický gradient E [MPa]:

Gradient byl zjištěn z pracovního diagramu, jakožto směrnice sečny vnořené hysterezní smyčky, vizte Obrázek 22. V tomto případě sečnou rozumíme spojnici extrémů smyčky.



Obrázek 22: Sečna vnořené hysterezní smyčky

d) absorbovaná energie W [MJ/m³] a účinnost jejího absorbování W_ε do 50% deformace

Absorbovaná energie je reprezentována plochou nad křivkou naměřených dat. Pro výpočet její hodnoty platí vztah uvedený v normě [62]:

$$W = \frac{1}{100} \int_0^{\varepsilon_0} \sigma \times d\varepsilon \quad (4.1)$$

$$W_\varepsilon = \frac{W}{\sigma_0 \times \varepsilon_0} \times 10^4 \quad (4.2)$$

σ ... napětí v tlaku [MPa]

σ_0 ... napětí v tlaku na horní mezi stlačení [MPa]

ε_0 ... horní mez stlačení [MPa]

4.1.2 Mechanické vlastnosti zjištěné zkouškou v tlaku

V této sekci jsou uvedeny průměry naměřených hodnot vzorků (vizte Tabulka 9 - Tabulka 17) vystavených působení příslušného média po příslušný počet dní.

a) Lidská krevní plasma

Tabulka 9: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 10min před zkouškou

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,092	0,013
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,01005	0,00050
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,00466	0,00027
účinnost absorbování energie	We [%]	61,57	2,35

Tabulka 10: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 7 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,059	0,015
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,00903	0,00094
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,0045	0,0004
účinnost absorbování energie	We [%]	48,27	3,43

Tabulka 11: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v plasmě po 14 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,060	0,023
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,0079	0,0015
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,00383	0,00069
účinnost absorbování energie	We [%]	55,08	3,25

b) SBF

Tabulka 12: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 10min před zkouškou

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,087	0,022
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,0101	0,0010
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,0047	0,0046
účinnost absorbování energie	We [%]	61,65	4,10

Tabulka 13: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 7 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,064	0,016
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,0101	0,0020
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,0053	0,0012
účinnost absorbování energie	We [%]	44,76	2,50

Tabulka 14: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v SBF po 14 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	x	x
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	x	x
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	x	x
účinnost absorbování energie	We [%]	x	x

c) PBS

Tabulka 15: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 10min před zkouškou

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,086	0,015
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,01004	0,00056
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,00465	0,00027
účinnost absorbování energie	We [%]	63,54	2,51

Tabulka 16: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 7 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,017	0,011
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,00256	0,00099
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,00137	0,00043
účinnost absorbování energie	We [%]	53,47	10,01

Tabulka 17: Průměrné hodnoty veličin vzorků hydratovaných v PBS po 14 dní

Veličina	Označení	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
elastický gradient	E [MPa]	0,017	0,003
stabilní hladina napětí	σ_{pl} [MPa]	- 0,00331	0,00029
absorbovaná energie při 50%	W [MJ/m ³]	0,001721	0,000089
účinnost absorbování energie	We [%]	52,23	3,17

4.1.3 Výsledné hodnoty hmotnostních úbytků

Průměrné hodnoty hmotnostního úbytku jsou uvedeny níže (vizte Tabulka 18). Pro grafické znázornění společně se zdůrazněním statisticky významných rozdílů vizte Obrázek 26

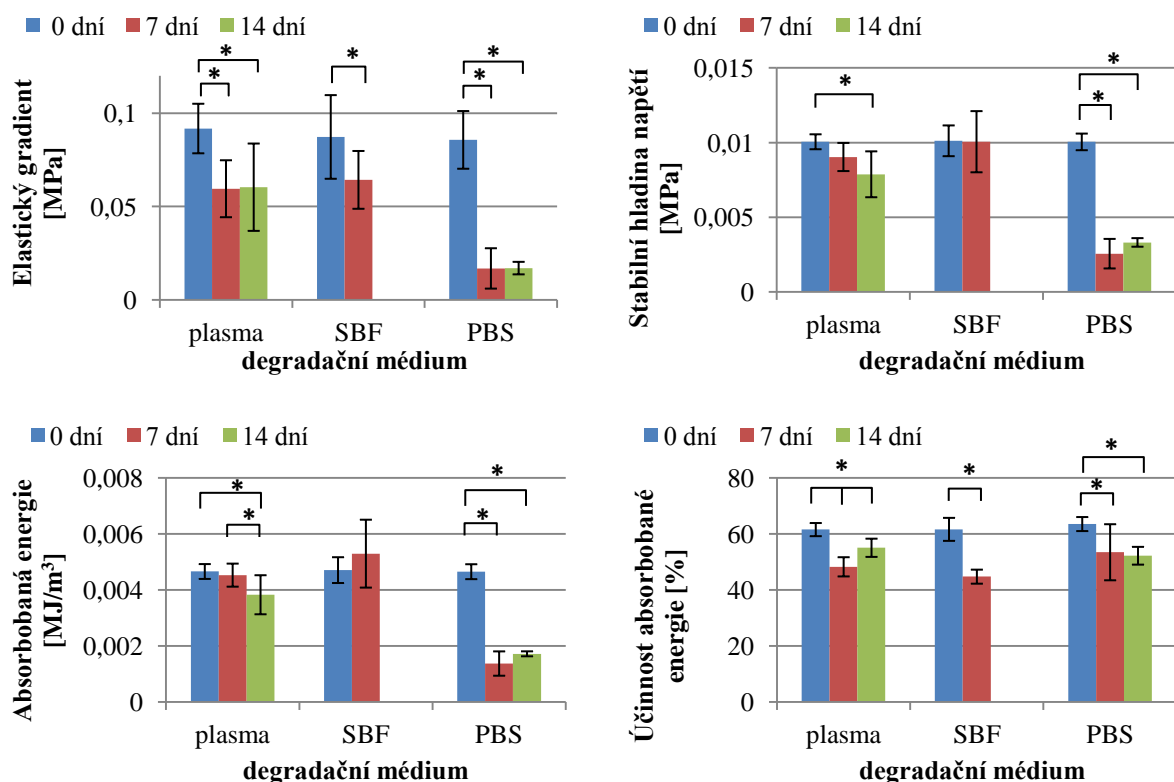
Tabulka 18: Průměrné hodnoty hmotnostních úbytků pro příslušné roztoky

časový interval	roztok	hmotnostní úbytek [%]	SD
7	plasma	-80,32	13,39
	SBF	-5,29	5,80
	PBS	48,28	24,92
14	plasma	-80,2	16,71
	SBF	-4,87	7,27
	PBS	17,89	15,85

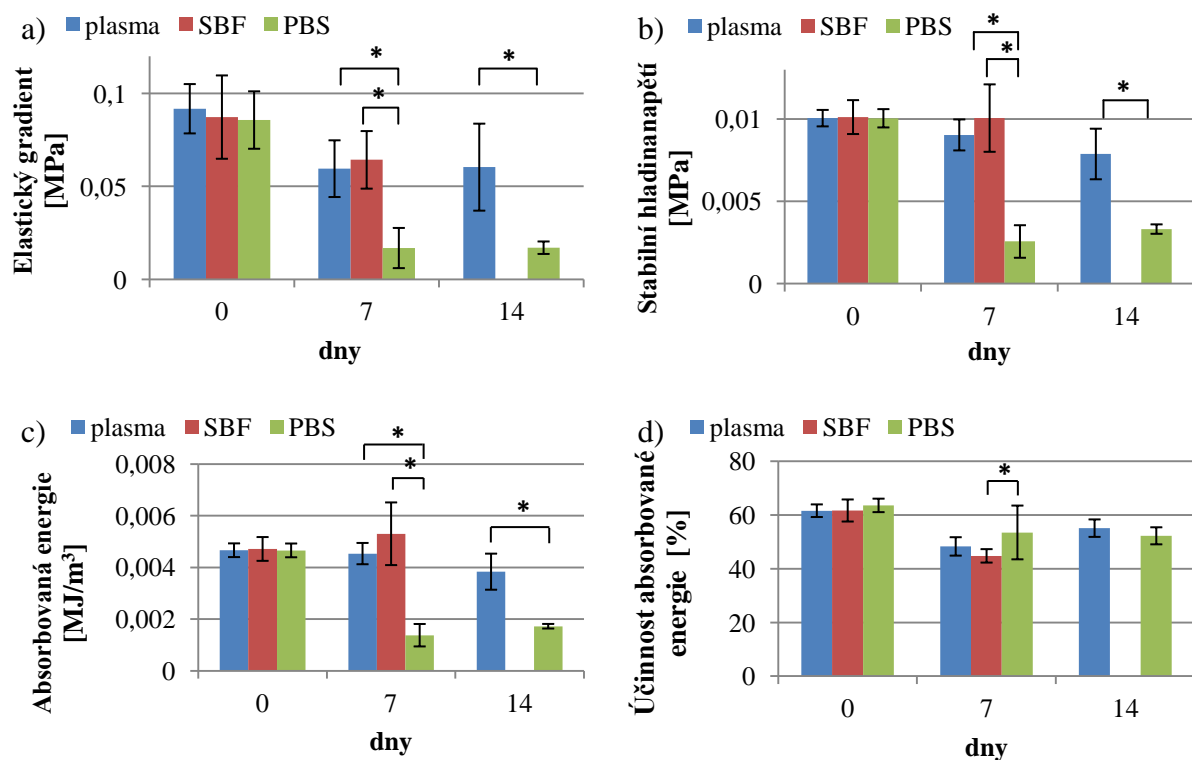
4.2 Statistická vyhodnocení získaných dat

Podle kapitoly 3.5 Statistické zpracování bylo provedeno statistické vyhodnocení naměřených dat. Výsledné hodnoty mechanických vlastností (vizte Obrázek 23 a Obrázek 24) i hodnoty hmotnostního úbytku (vizte Obrázek 25 a Obrázek 26) byly zaneseny do grafů níže. Podrobný postup statistického hodnocení je umístěn do kapitoly 8 Příloha.

4.2.1 Vyhodnocení mechanických vlastností zjištěných zkouškou v tlaku

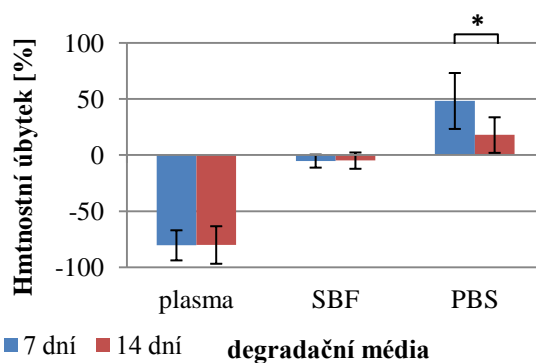


Obrázek 23: Grafické srovnání vypočtených hodnot v rámci jednoho roztoku: a) elastický gradient, b) hladina stabilního napětí σ_{pl} , c) absorbovaná energie W , d) účinnost absorbované energie We ; * označuje statisticky významný rozdíl (Mann-Whitney, 0,01666; LSD, 0,05)

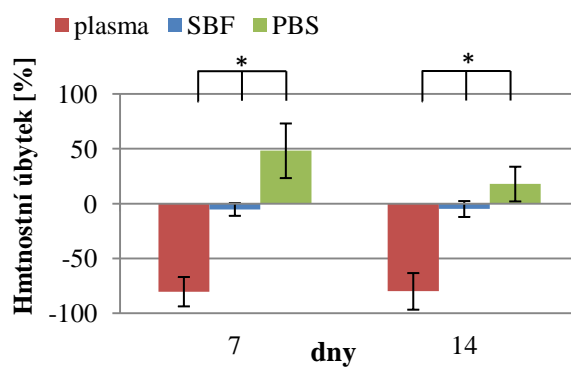


Obrázek 24: Grafické srovnání vypočtených hodnot mezi roztoky: a) elastický gradient, b) hladina stabilního napětí σ_{pl} , c) absorbovaná energie W , d) účinnost absorbované energie We ; * označuje statisticky významný rozdíl (Mann-Whitney, 0,01666; LSD, 0,05)

4.2.2 Vyhodnocení hmotnostního úbytku



Obrázek 25: Hmotnostní úbytek: srovnání statistické významnosti rozdílů pro jeden roztok v čase

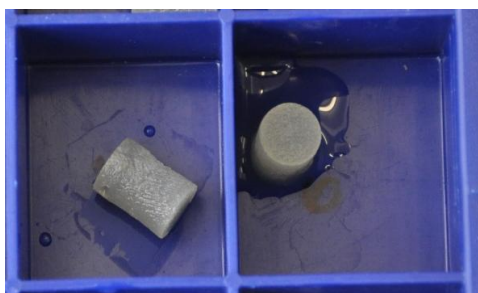


Obrázek 26: Hmotnostní úbytek: srovnání statistické významnosti rozdílů mezi roztoky navzájem

5. Diskuse

Cílem diplomové práce bylo porovnání degradačních médií simulujících tělní prostředí a posoudit, zda jejich efekt na vlastnosti kolagenních nosičů je podobný, či nikoli. Vývoj materiálových parametrů byl hodnocen v rámci jednoho roztoku (vizte Obrázek 23) i mezi roztoky navzájem (vizte Obrázek 24). Elastický gradient, který zastupuje modul pružnosti, zaznamenal u všech roztoků významný pokles již v prvním časovém intervalu. Tento pokles se v případě plasmy a PBS po uplynutí druhého degradačního intervalu dále neprohloubil. Stabilní hladina napětí, zastupující pevnost materiálu, zaznamenala změnu především v případě PBS, u kterého po sedmi dnech nastal významný pokles. Změna u SBF a plasmy nebyla po sedmi dnech statisticky významná. U SBF však po čtrnácti dnech došlo k celkové degradaci všech naložených vzorků. Významná změna mezi sedmým a čtrnáctým dnem nastala v roztoku plasmy pro absorbovanou energii a účinnost absorbované energie. Z porovnání účinků krátkodobé hydratace mezi roztoky (vizte Obrázek 24), není na vzorcích patrný žádný významný rozdíl. Ten přichází až sedmý den, a to především v případě roztoku PBS, ve kterém vzorky, oproti ostatním roztokům, zaznamenaly významný pokles v elastickém gradientu, hladině stabilního napětí a absorbované energii. Plasma a SBF byly po prvním degradačním intervalu bez rozdílu, ovšem 14. den byly vzorky v SBF natolik degradovány, že nebylo možné je vyhodnotit (vizte Obrázek 27).

a)



b)



Obrázek 27: a) vzorky degradované 14 dní v krevní plasmě, b) vzorky degradované 14 dní v SBF

Druhá část experimentu byla zaměřena na posouzení hmotnostního úbytku (vizte Obrázek 25 a Obrázek 26). V roztoku krevní plasmy došlo již při sedmém dnu k nárůstu hmotnosti vzorku o 80,32 %. Nárůst hmotnosti nastal i v případě roztoku SBF (5,29 %). Pouze v případě PBS došlo ke kladnému hmotnostnímu úbytku, tedy ke ztrátě hmotnosti o 48,28 % po sedmi dnech a o 17,89 % po čtrnácti dnech. Záznam svědčí o tom, že mezi sedmým a čtrnáctým dnem v roztoku PBS již nedocházelo k další ztrátě hmotnosti, ale naopak k významnému hmotnostnímu nárůstu.

Zajímavé je porovnání vývoje mechanických vlastností s daty hmotnostního úbytku. U vzorků z PBS, které zaznamenaly výrazný pokles hmotnosti, došlo i k významnému poklesu jejich mechanických vlastností, a to především elastického gradientu, stabilní hladiny napětí a absorbované energie. Účinnost absorbované energie byla v případě PBS po sedmém dni degradace oproti plasmě bez rozdílu a oproti SBF dosahovala vyšší hodnoty. U PBS dále došlo mezi sedmým a čtrnáctým dnem k nárůstu hmotnosti. Tento nárůst však již neměl v daném intervalu významný vliv na žádnou z uvažovaných mechanických vlastností. Hmotnostní nárůst si lze v případě PBS vyložit přítomností procesu precipitace solí z roztoku. V případě plasmy pak na nosiči nejspíše došlo k usazování bílkovin v ní obsažených.

Vzorky, degradované krevní plasmou, dosahovaly výraznějšího hmotnostního přírůstku, než vzorky degradované SBF. Sedmý den degradace však nebyl mezi plasmou a SBF statisticky významný rozdíl v žádné z uvažovaných mechanických vlastností. Jak již bylo zmíněno, čtrnáctý den podlehly vzorky v SBF totální degradaci, a tedy nebylo možné vyhodnotit jejich vlastnosti mechanické vlastnosti. Byly však zachovány zvlášť degradované vzorky pro vyhodnocení hmotnostního úbytku pro interval čtrnácti dnů. U těchto vzorků však nebyl sledován významný rozdíl hmotnostního úbytku mezi sedmým a čtrnáctým dnem.

Lze tedy říci, že pokles hmotnosti vzorku má více negativní vliv na vývoj zmíněných mechanických vlastností, než hmotnostní nárůst. Na základě hmotnostního úbytku však nelze předpokládat nárůst, nebo pokles, všech mechanických vlastností současně. Účinnost absorbované energie u PBS sedmý den narostla i přesto, že ostatní vlastnosti zaznamenaly výrazný pokles. Rozdílnost v účincích jednotlivých simulačních roztoků by měla být v degradačních studiích zohledněna. Na základě provedených experimentů nelze pro tyto studie doporučit žádné vybrané médium. Pro toto doporučení by bylo potřeba provést experiment v podmínkách *in vivo* a teprve na základě jeho výsledků vybrat médium, které nejlépe reprezentuje skutečné podmínky tělního prostředí.

6. Závěr

V úvodních kapitolách této práce byla provedena rešerše poznatků v oblasti inženýrství kostní tkáně se zaměřením na polymerní nosiče. Vzhledem k nutným *in vitro* experimentům, které ověřují požadované vlastnosti nosičů, zahrnovala rešerše i úvod do způsobů simulace tělního systému pomocí simulovaných tělních tekutin. Z použité literatury nebylo jasné, nakolik volba roztoku může ovlivnit zjištěné mechanické vlastnosti nosičů, tedy zda mají roztoky odlišný vliv na jejich degradaci. K tomuto účelu byl navržen experiment zaměřený na porovnání účinků vybraných degradačních medií (krevní plazma, SBF, PBS). Roztok SBF má stejnou iontovou koncentraci jako lidská krevní plazma. PBS má též iontovou koncentraci blízkou plasmě, avšak některé ionty neobsahuje. Výsledné hodnoty zjištěné provedeným experimentem poukazují na poznatek, že i přes podobné složení mají tyto roztoky rozdílný vliv na degradaci kolagenních nosičů. V případě vzorků degradovaných roztokem PBS byl pozorován významný pokles v čase u všech veličin kromě účinnosti absorbované energie. V porovnání s ostatními použitými roztoky, PBS vykázal vyšší degradační schopnost. Porovnání vzorků degradovaných roztokem plasmy a SBF odhalilo potenciálně významnou odlišnost v mechanických vlastnostech. Po 14 dnech došlo v případě SBF k totálnímu rozpuštění nosičů. Z porovnání účinků krevní plasmy a SBF vyplývá, že obě média mají na sledované vlastnosti kolagenových materiálů rozdílný vliv. Odlišnost se projevila i v případě hmotnostního úbytku. U krevní plasmy a SBF došlo k nárůstu hmotnosti, oproti tomu vzorky degradované roztokem PBS zaznamenaly hmotnostní pokles. Mírný hmotnostní nárůst nastal u PBS až mezi sedmým a čtrnáctým dnem. Tato událost svědčí o přítomnosti podobného procesu, který navýšil hmotnost vzorku v SBF a krevní plasmě, ovšem v omezeném rozsahu. Experiment tedy jednoznačně ukázal, že dostupné roztoky simulující tělní prostředí mají odlišný vliv na degradaci kolagenních nosičů.

7. Bibliografie

- [1] **Suchý, Tomáš et al.** The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds—an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials*. 2015, 10.
- [2] **Zhang, D. et al.** The development of collagen composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 2017, 1.
- [3] **Kokubo, Tadashi et al.** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003, 24.
- [4] **Pan, Haobo et al.** Apatite-formation ability – Predictor of “bioactivity”? *Acta Biomaterialia*. 2010, 6.
- [5] **Ulery, Bret D. et al.** Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci, Part B: Polym Phys*. 2011, 49.
- [6] **Dutta, Ranjna C.** Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 2017, 35.
- [7] **A.Oryan, et al.** Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 107.
- [8] **Rýglová, Šárka et al.** Collagen and Its Modifications—Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2017.
- [9] **Helena S. Azevedo, Rui L. Reis.** *Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate*. místo neznámé : CRC Press, 2005.
- [10] **Bax, Daniel V. et al.** Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2016, 49.
- [11] **Barbucci, Ronaldo editor.** *Integrated Biomaterials Science*. místo neznámé : Springer, Boston, MA, 2002.
- [12] **Nair, S. Lakshmi a Laurencin, Cato T.** Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32.
- [13] **Ong K, Yun M, White J.** New biomaterials for orthopedic implants. *Orthopedic Research and Reviews*. 2015, 7.
- [14] **Ahmed, Shakeel et al.** A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 116.
- [15] **Rebelo, Rita et al.** Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*. 2017, 200.
- [16] **Puppi, D. et al.** Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*. 2010, 35.
- [17] [Online] VUP medical, 2019. <http://www.vup.cz/cs/dalsi-produkty/produkty/kolagen>.
- [18] **Ferreira, Ana Marina et al.** Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2012, 9.
- [19] **Paterson, Stefan M. et al.** The synthesis and degradation of collagenase-degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogels and sponges for potential

- applications as scaffolds in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2012, 32.
- [20] **Hussein, Kamal Hany et al.** Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering C*. 2016, 67.
- [21] **Gaspar, A., et al.** Collagen-based scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Medicine and Life*. 2011, 4.
- [22] **Rinaudo, Marguerite.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006, 31.
- [23] **Zhang Lei, et al.** Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*. 2019, 84.
- [24] **Farah, Shady et al.** Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107.
- [25] **Nampoothiri, K. Madhavan et al.** An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101.
- [26] **Běhálek, Luboš.** *publi.cz*. [Učebnice] 2016. <https://publi.cz/books/180/03.html>. 978-80-88058-68-7.
- [27] **Elsawy, Moataz A. et al.** Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 79.
- [28] **Pivsa-Art, Sommai et al.** Synthesis of Poly(D-lactic acid) Using a 2-Steps Direct Polycondensation Process. *Energy Procedia*. 2013, 34.
- [29] **Alizadeh-Osgouei, Mona et al.** A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioactive Materials*. 2019, 4.
- [30] **Göpferich, Achim.** Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996, 17.
- [31] **Dijkhuizen-Radersma, Riemke van et al.** Chapter 7: Degradable polymers for tissue engineering. *Tissue Engineering*. 2008.
- [32] **Williams, David.** *Essential Biomaterials Science*. místo neznámé : Cambridge university press, 2014. ISBN: 978-0-521-89908-6.
- [33] **Williams, D. F. a Zhong, S. P.** Biodeterioration/Biodegradation of Polymeric Medical Devices In Situ. *International biodeterioration & biodegradation*. 1994, 34.
- [34] **SuPing Lyu, Darrel Untereker.** Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009.
- [35] **Sherwood, Edward R.** Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2004, 18.
- [36] **Casas, J. et al.** In vitro modulation of macrophage phenotype and inhibition of polymer degradation by dexamethasone in a human macrophage/Fe/stress system. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999, 46.
- [37] **Middleton, John C. a Tipton, Arthur J.** Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000, 21.

- [38] **Baschek, G. et al.** Effect of water absorption in polymers at low and high temperatures. *Polymer*. 1999, 40.
- [39] **Akilbekova, Dana.** Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 114.
- [40] **Felfel, Reda M. et al.** Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*. 2019, 204.
- [41] **Deb, Payel et al.** Development of bone scaffold using *Puntius conchonus* fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations. *Ceramics International*. 2019, 8.
- [42] **Filipović, Vuk V. et al.** Biocompatible and degradable scaffolds based on 2-hydroxyethyl methacrylate, gelatin and poly(beta amino ester) crosslinkers. *Polymer Testing*. 2018, 68.
- [43] **Bogaa, João C. et al.** In vitro characterization of 3D printed scaffolds aimed at bone tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018, 165.
- [44] **Resch-Fauster, Katharina et al.** Mechanical recyclability of technical biopolymers: Potential and limits. *Polymer Testing*. 2017, 64.
- [45] **Dorati, R. et al.** Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/poly(lactide-co-polycaprolactone) nanofibre blend electrospun membrane. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 199.
- [46] **Chakoli, Ali Nabipour et al.** In vitro biodegradation of poly(L-lactide) biopolymer reinforced with functionalized MWCNTs. *Materials Today: Proceedings*. 2018, 5.
- [47] **Kumar, T.S. Sampath.** Physical and chemical characterization of biomaterials. [autor knihy] Amit Bandyopadhyay a Susmita Bose. *Characterization of Biomaterials*. místo neznámé : Elsevier, 2013.
- [48] *e-konstruktor*. [Online] 2013. <https://e-konstruktor.cz/prakticka-informace/plasty-mechanicke-vlastnosti>.
- [49] **Suchý, Tomáš et al.** The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: Microstructure vs. nanostructure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, 100.
- [50] **Mohee, L. et al.** Investigation of the intrinsic permeability of ice-templated collagen scaffolds as a function of their structural and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*. 2019, 83.
- [51] **Kehail, Abdulrahman A. et al.** In Vivo and In Vitro Degradation Studies for Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Biopolymer. *Journal of Polymers and the Environment*. 2017, 25.
- [52] **Gourrier, A. et al.** Hardness testing under a different light: combining synchrotron X-ray microdiffraction and indentation techniques for polymer fibres studies. *Philosophical Magazine*. 2006, 86.
- [53] **Zaho, Weitian et al.** A comparative study of simulated body fluids in the presence of proteins. *Acta Biomaterialia*. 2017, 53, stránky 506-514.
- [54] **Huang, Li et al.** Effect of apatite formation of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) on osteoblastogenesis using simulated body fluid (SBF) with or without bovine serum albumin (BSA). *Materials Science and Engineering C*. 2016, 70.

- [55] **Ganesha, K. et al.** Dynamic approach to predict pH profiles of biologically relevant buffers. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017, 9.
- [56] **Taha, Mohamed a Lee, Ming-Jer.** Buffer interactions: Solubilities and transfer free energies of TRIS, TAPS, TAPSO, and TABS from water to aqueous ethanol solutions. *Fluid Phase Equilibria*. 2010, 289.
- [57] **Salis, Andrea et al.** Not only pH. Specific buffer effects in biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2016, 23.
- [58] **AppliChem.** Biological Buffers. 2008.
<https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf>.
- [59] **Roy, Lakshmi N. et al.** Buffer standards for the physiological pH of the zwitterionic compound of 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) from T = (278.15 to 328.15) K. *J. Chem. Thermodynamics*. 2012, 47.
- [60] **Garbacz, Grzegorz.** A dynamic system for the simulation of fasting luminal pH-gradients using hydrogen carbonate buffers for dissolution testing of ionisable compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, 51.
- [61] **Kokubo, Tadashi a Takadama, Hiroaki.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006, 27.
- [62] **UNMZ.** ČSN ISO 13314 Mechanické zkoušení kovů - Zkoušení tvářitelnosti - Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem. místo neznámé : UNMZ, 2012.
- [63] **Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity.** portal.matematickabiologie.cz.
[Online] <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickyh-a-biologickyh-dat--biostatistika-pro-matematickou-biologii--uvod-do-testovani-hypotez--poznamky-k-testovani-hypotez--problem-nasobneho-testovani-hypotez>.

8. Příloha

8.1 Vyhodnocení mechanických vlastností zjištěných zkouškou v tlaku

Plasma

Data naměřená pro roztok krevní plasmy byla převážně z normálního rozdělení (vizte Tabulka 19). Data elastického gradientu a hladiny stabilního napětí nesplnila podmínku shody rozptylů (vizte Tabulka 20) a tedy pro jejich vyhodnocení byla využita neparametrická Mann-Whitney *W* analýza s Bonferroniho korekcí⁶ (vizte Tabulka 21).

Tabulka 19: Vyhodnocení normality pro roztok plasmy dle Shapiro-Wilk testu (0,05) nelze zamítnout; A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení

interval	E	sigma PL	W	We
0	A	A	A	N
7	A	A	A	A
14	A	A	A	A

Tabulka 20: Vyhodnocení shody rozptylů pro roztok plasmy dle Levenova testu (0,05) ; A= rozptyl není statisticky významný, N= rozptyl je statisticky významný

interval	E	sigma PL	W	We
0 - 7 - 14	N	N	A	A

Tabulka 21: Vyhodnocení statistické významnosti podílů pro dané intervaly pomocí Mann-Whitneovy *W* s korekcí (0,01666) a Fischerovy LSD (*) analýzy (0,05) pro roztok krevní plazmy; A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl

intervaly	0-7	0-14	7-14
E	A	A	N
sigma_PL	N	A	N
W	N*	A*	A*
We	A	A	A

⁶ Bonferroniho korekce byla diskutována v kapitole Statistické zpracování.

SBF

Všechna data naměřená pro SBF byla z normálního rozdělení (vizte Tabulka 22) a splnila podmínku shody rozptylů (vizte Tabulka 23). Pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílů tak byla použita Fischerova LSD metoda (vizte Tabulka 24).

Tabulka 22: Vyhodnocení normality pro SBF dle Shapiro-Wilk testu (0,05)

interval	E	sigma PL	W	We
0	A	A	A	A
7	A	A	A	A
14	x	x	x	x

Tabulka 23: Vyhodnocení shody rozptylů pro SBF dle Levenova testu (0,05) ; A= rozptyl není statisticky významný

interval	E	sigma PL	W	We
0-7	A	A	A	A

Tabulka 24: Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů pro daný interval pomocí t testu (0,05); A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl

interval	0-7
E	A
sigma_PL	N
W	N
We	A

PBS

Pro rozbor normality naměřených dat pro roztok PBS vizte Tabulka 25. Všechny vypočtené veličiny splnily podmínku shody rozptylů (vizte Tabulka 26). Pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílů tak byla použita Fischerova LSD metoda (vizte Tabulka 27).

Tabulka 25: Vyhodnocení normality pro PBS dle Shapiro-Wilk testu (0,05) ; A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení

interval	E	sigma PL	W	We
0	A	N	N	A
7	A	N	A	A
14	A	A	A	A

Tabulka 26: Vyhodnocení shody rozptylů pro PBS dle Levenova testu (0,05); A= rozptyl není statisticky významný

interval	E	sigma PL	W	We
0 - 7 - 14	A	A	A	A

Tabulka 27: Vyhodnocení statistické významnosti podílů pro dané intervaly pomocí Mann-Whitneyovy W (0,01666) a Fischerovy LSD (*) analýzy (0,05) pro PBS;

intervaly	0-7	0-14	7-14
E	A*	A*	N*
sigma_PL	A	A	N
W	A	A	N
We	A*	A*	N*

Závěrečné srovnání veličin mezi použitými roztoky je provedeno v tabulce níže a je rozhodnuto, zda jsou rozdíly statisticky významné, či nikoli (vizte Tabulka 20). Samotnému porovnání předchází kontrola shody rozptylů (vizte Tabulka 28). Vzhledem k porovnávání vícera párů byla Mann-Whitneyova metoda upravena Bonferroniho korekcí.

Tabulka 28: Kontrola shody rozptylů; A= rozptyl není statisticky významný, N= rozptyl je statisticky významný

interval plasma - SBF - PBS	E	sigma PL	W	We
0	A	N	A	A
7	A	A	A	A
14	N	N	N	A

Tabulka 29: Srovnání významnosti rozdílů mezi roztoky pomocí Mann-Whitneyovy W* (0,01666) a Fischerovy LSD (0,05) analýzy; A= statisticky významný rozdíl, N= bez stat. významného rozdílu

Perioda	veličina	roztoky		
		plasma-SBF	plasma-PBS	SBF-PBS
0	E	N	N	N
	sigma_PL	N*	N*	N*
	W	N	N	N
	We	N	N	N
7	E	N	A	A
	sigma_PL	N*	A*	A*
	W	N	A	A
	We	N	N	A
14	E	x	A*	x
	sigma_PL	x	A*	x
	W	x	A*	x
	We	x	N ^c	x

a) Srovnání vývoje hmotnosti vzorku pro daný roztok

Jako v předešlém vyhodnocení, i zde je nejprve překontrolována podmínka normálnosti rozložení naměřených dat (vizte Tabulka 30) a shoda rozptylů (vizte Tabulka 31). K vyhodnocení vývoje hmotnosti vzorku pro daný roztok bylo použito t testu a metody Mann-Whitney W (porovná se pouze jeden pár a tedy není nutné použít korekci hladiny spolehlivosti). Pro grafické znázornění výsledných hodnot vizte Obrázek 25.

Tabulka 30: Vyhodnocení normality dle Shapiro-Wilk testu (0,05); A= normální rozdělení, N= jiné rozdělení

interval	7	14
plasma	A	N
SBF	A	A
PBS	A	A

Tabulka 31: Vyhodnocení shody rozptylů dle Lavenova testu (0,05); A= rozptyl není statisticky významný

interval	7-14
plasma	A
SBF	A
PBS	A

Tabulka 32: Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů pomocí t testu (0,05); pro roztok plasmy bylo použito neparametrické Mann-Whitney W (0,05) metody (*); A= statisticky významný rozdíl, N= statisticky nevýznamný rozdíl

interval	7-14
plasma	N*
SBF	N
PBS	A

b) Srovnání rozdílů hmotnostních úbytků mezi roztoky

Po kontrolu rozptylů mezi roztoky pro příslušný časový interval (vizte Tabulka 33). Pro vyhodnocení rozdílů hmotnostních úbytků mezi roztoky byla použita metoda Mann-Whitney W s Bonferroniho korekcí (vizte Tabulka 34). Pro grafické znázornění výsledných hodnot vizte Obrázek 25.

Tabulka 33: Vyhodnocení shody rozptylů dle Levenova testu ($p \geq 0,05$); A= shodné rozptyly

interval	7	14
plasma - SBF - PBS	A	A

Tabulka 34: Srovnání významnosti rozdílů hmotnostních úbytků mezi roztoky pomocí Mann-Whitneyovy W (*) a Fischerovy LSD analýzy (0,05); A= statisticky významný rozdíl

interval	veličina	roztoky		
		plasma-SBF	plasma-PBS	SBF-PBS
7	m	A	A	A
14	m	A*	A*	A*

Tabulka 35: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 10 min před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	10,218	9,826	10,321	10,122	80,463	13,928	14,196	14,087	14,070	x	-0,010	x	x
2	9,959	9,863	10,058	9,960	77,913	14,545	14,575	14,635	14,585	0,089	-0,010	0,005	63,015
3	10,146	9,816	10,373	10,112	80,304	14,561	14,184	14,375	14,373	0,097	-0,010	0,005	62,131
4	9,870	9,933	10,183	9,995	78,467	14,857	14,752	14,887	14,832	0,082	-0,010	0,004	60,662
5	11,235	10,775	10,890	10,967	94,458	14,586	14,551	14,811	14,649	0,067	-0,009	0,004	57,419
6	10,175	9,788	10,246	10,070	79,638	14,169	14,240	13,949	14,119	0,104	-0,010	0,005	62,917
7	10,080	10,250	10,440	10,257	82,623	14,515	14,481	14,461	14,486	0,096	-0,010	0,005	63,566
8	10,194	9,919	10,187	10,100	80,118	14,177	14,425	14,619	14,407	0,088	-0,010	0,005	62,577
9	9,992	9,609	10,146	9,916	77,221	14,069	14,271	14,257	14,199	0,113	-0,011	0,005	63,762
10	11,583	10,990	11,390	11,321	100,661	14,368	14,287	14,388	14,348	0,089	-0,010	0,005	58,087
Průměr										0,092	-0,01005	0,00466	61,571
SD										0,013	0,00050	0,00027	2,351

Tabulka 36: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu SBF po 10 min před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	11,037	10,943	11,241	11,074	96,310	14,842	14,536	14,507	14,628	0,062	-0,009	0,004	56,680
2	10,393	9,986	10,480	10,286	83,102	14,666	14,672	14,664	14,667	0,062	-0,009	0,004	60,384
3	11,221	10,432	10,546	10,733	90,476	14,395	14,778	15,140	14,771	0,047	-0,008	0,004	56,026
4	10,075	9,564	10,227	9,955	77,840	14,538	14,409	14,474	14,474	0,096	-0,011	0,005	63,848
5	9,964	9,932	10,252	10,049	79,317	14,155	14,006	14,186	14,116	0,110	-0,011	0,005	67,024
6	11,306	11,055	11,092	11,151	97,660	14,737	14,386	14,132	14,418	0,078	-0,010	0,005	55,605
7	10,291	10,014	10,069	10,125	80,510	14,105	14,273	14,169	14,182	0,090	-0,010	0,005	66,216
8	10,301	10,080	10,257	10,213	81,916	14,837	14,388	14,358	14,528	0,114	-0,011	0,005	65,925
9	9,962	9,666	10,097	9,908	77,107	13,977	14,239	14,188	14,135	0,109	-0,011	0,005	62,455
10	10,114	9,873	10,294	10,094	80,018	14,219	14,305	14,394	14,306	0,105	-0,011	0,005	62,348
průměr										0,087	-0,0101	0,0047	61,651
SD										0,022	0,0010	0,00046	4,10

Tabulka 37: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 10 min před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	10,251	9,999	10,044	10,098	80,087	14,614	14,627	14,518	14,586	0,096	-0,010	0,005	62,602
2	10,058	9,831	9,700	9,863	76,403	14,006	13,876	13,904	13,929	0,090	-0,011	0,005	64,464
3	11,230	10,686	11,322	11,079	96,409	14,031	14,040	14,197	14,089	0,071	-0,009	0,004	62,812
4	9,970	9,587	9,994	9,850	76,206	13,533	13,669	13,487	13,563	0,064	-0,009	0,004	61,391
5	10,987	10,646	11,060	10,898	93,273	14,423	14,447	14,501	14,457	0,096	-0,010	0,005	63,243
6	9,914	9,785	9,848	9,849	76,186	13,914	13,745	13,821	13,827	0,067	-0,009	0,004	58,731
7	10,028	9,890	9,959	9,959	77,897	13,672	13,773	14,006	13,817	0,106	-0,011	0,005	66,357
8	11,011	10,930	11,213	11,051	95,922	14,624	14,750	14,504	14,626	0,072	-0,010	0,004	62,841
9	10,082	9,872	10,358	10,104	80,182	14,357	14,322	14,324	14,334	0,098	-0,010	0,005	65,974
10	10,146	9,835	10,196	10,059	79,469	14,519	14,547	14,349	14,472	0,097	-0,011	0,005	67,029
průměr										0,086	-0,01004	0,00465	63,544
SD										0,015	0,00056	0,00027	2,51

Tabulka 38: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 7 dní před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	11,009	10,795	10,405	10,736	90,532	13,544	13,352	13,405	13,434	x	-0,012	x	x
2	10,809	11,367	11,534	11,237	99,166	14,029	14,080	14,155	14,088	0,039	-0,008	0,004	46,574
3	10,662	10,902	10,862	10,809	91,756	13,808	13,733	13,686	13,742	0,061	-0,009	0,004	49,707
4	10,010	9,805	9,887	9,901	76,987	14,275	14,305	14,162	14,247	0,061	-0,009	0,004	49,707
5	10,164	10,100	9,627	9,964	77,970	13,882	13,985	13,739	13,869	0,088	-0,011	0,005	54,512
6	11,013	10,725	11,109	10,949	94,154	13,743	13,784	13,878	13,802	0,041	-0,008	0,004	42,443
7	10,179	9,881	9,965	10,008	78,671	13,847	13,910	13,848	13,868	0,068	-0,009	0,005	48,207
8	9,915	9,753	9,630	9,766	74,907	13,439	13,625	14,293	13,786	0,048	-0,008	0,004	48,982
9	10,082	9,420	9,787	9,763	74,861	13,815	13,769	13,991	13,858	0,069	-0,010	0,005	44,805
10	9,996	9,621	9,967	9,861	76,377	13,987	13,972	13,970	13,976	0,061	-0,009	0,005	49,552
průměr										0,060	-0,00903	0,00453	48,277
SD										0,015	0,00094	0,00041	3,43

Tabulka 39: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu SBF po 7 dní před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	11,560	11,312	11,464	11,445	102,884	14,585	14,604	14,593	14,594	0,044	-0,008	0,004	45,805
2	9,876	9,925	10,114	9,972	78,095	14,137	14,522	14,239	14,299	0,098	-0,015	0,008	42,307
3	10,127	9,935	9,781	9,948	77,720	13,900	14,031	14,080	14,004	0,064	-0,009	0,005	46,901
4	10,210	9,886	9,994	10,030	79,012	14,464	14,192	14,424	14,360	0,059	-0,009	0,005	47,476
5	10,879	10,628	10,612	10,706	90,027	14,113	13,822	14,012	13,982	0,065	-0,010	0,005	44,839
6	10,068	9,606	9,722	9,799	75,409	14,040	13,846	13,962	13,949	0,073	-0,011	0,006	42,788
7	10,154	9,912	9,914	9,993	78,435	14,361	14,395	14,398	14,385	0,069	-0,012	0,006	40,336
8	9,929	9,727	10,066	9,907	77,091	13,808	13,409	13,491	13,569	0,043	-0,008	0,004	45,310
9	9,802	9,863	10,070	9,912	77,158	14,268	14,148	14,255	14,224	0,069	-0,011	0,006	43,622
10	10,094	9,860	9,942	9,965	77,996	13,824	13,894	14,162	13,960	0,059	-0,009	0,004	48,264
průměr										0,064	-0,01006	0,0053	44,765
SD										0,015	0,00205	0,0012	2,50

Tabulka 40: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 7 dní před zátěžovou zkouškou; z důvodu pokročilé degradace bylo možné pracovat pouze se třemi vzorky

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	9,675	9,457	10,05	9,727333	74,31517	14,136	13,35	13,751	13,74567	0,029	-0,004	0,002	56,754
2	9,951	9,54	9,826	9,772333	75,00435	12,337	12,065	12,983	12,46167	0,009	-0,002	0,001	61,436
3	9,682	8,959	8,534	9,058333	64,44459	12,24	11,765	12,304	12,103	0,013	-0,002	0,001	42,238
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
průměr										0,017	-0,00256	0,00137	53,476
SD										0,011	0,00099	0,00043	10,0098

Tabulka 41: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu krevní plasmy po 14 dní před zátěžovou zkouškou

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	10,615	10,443	10,994	10,684	89,65152	14,143	13,868	13,833	13,948	0,031	-0,006	0,003	50,784
2	9,899	9,613	9,996	9,836	75,98483	13,782	13,654	13,658	13,698	0,051	-0,008	0,004	53,463
3	10,79	10,62	10,972	10,794	91,50708	13,24	13,22	13,206	13,222	0,085	-0,010	0,005	53,192
4	10,105	9,515	9,918	9,846	76,13942	14,457	13,93	13,716	14,03433	0,061	-0,008	0,004	55,961
5	10,241	9,814	10,055	10,03667	79,11683	13,747	13,51	13,577	13,61133	0,080	-0,008	0,004	56,210
6	9,812	9,714	9,826	9,784	75,18354	13,539	13,413	13,495	13,48233	0,044	-0,007	0,003	54,027
7	9,773	9,573	9,764	9,703333	73,94891	14,093	13,986	14,091	14,05667	0,088	-0,010	0,005	59,639
8	9,878	9,288	10,028	9,731333	74,3763	14,176	14,046	14,033	14,085	0,032	-0,006	0,003	52,243
9	9,862	9,579	9,818	9,753	74,70787	13,916	14,025	14,023	13,988	0,089	-0,009	0,004	61,208
10	10,056	9,938	9,597	9,863667	76,4129	13,874	14,31	13,758	13,98067	0,042	-0,006	0,003	54,021
průměr										0,0604	-0,0079	0,00383	55,075
SD										0,023	0,0015	0,00070	3,25

Tabulka 42: Kompletní záznam naměřených i vyhodnocených dat pro každý vzorek vystavený degradačnímu procesu PBS po 14 dní před zátěžovou zkouškou; z důvodu pokročilé degradace bylo možné pracovat pouze s pěti vzorky

Číslo vzorku	průměr I	průměr II	průměr III	Ø	průřez	výška I	výška II	výška III	Ø	E	σ_{pl}	W	We
	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]	[MPa]	[MPa]	[MJ/m ³]	[%]
1	9,87	9,33	9,032	9,410667	69,55537	12,654	12,832	12,372	12,61933	0,015	-0,003	0,002	49,317
2	10,031	9,547	9,594	9,724	74,26425	13,584	13,483	13,626	13,56433	0,023	-0,004	0,002	57,101
3	10,147	9,146	8,743	9,345333	68,59295	13,354	13,259	13,41	13,341	0,014	-0,003	0,002	50,778
4	9,879	9,124	8,701	9,234667	66,97802	13,875	14,48	13,969	14,108	0,017	-0,003	0,002	50,266
5	9,835	9,563	8,863	9,420333	69,69834	13,635	13,182	13,3	13,37233	0,016	-0,003	0,002	53,667
6													
7													
8													
9													
10													
průměr										0,017	-0,00331	0,001721	52,226
SD										0,003	0,00029	0,000089	3,17

Tabulka 43: Data hmotnostního úbytku získaná po 14 dnech v příslušném roztoku

číslo vzorku	hmotnost/g před	hmotnost/g po	hmotnostní úbytek [%]
1	0,025	0,053	-117,707
2	0,026	0,047	-76,021
3	0,032	0,057	-79,918
4	0,027	0,047	-76,617
5	0,027	0,046	-69,573
6	0,025	0,047	-85,641
7	0,034	0,059	-72,065
8	0,034	0,056	-62,602
9	0,025	0,029	-13,998
10	0,027	0,029	-3,939
11	0,028	0,027	1,977
12	0,025	0,023	4,360
13	0,023	0,026	-13,514
14	0,027	0,030	-11,033
15	0,021	0,022	-4,332
16	0,027	0,026	1,531
17	0,030	0,027	12,120
18	0,026	0,016	38,273
19	0,025	0,024	6,449
20	0,027	0,027	3,245
21	0,032	0,018	44,323
22	0,027	0,021	21,925
23	0,027	0,023	14,232
24	0,026	0,025	2,550

Tabulka 44: Data hmotnostního úbytku získaná po 7 dnech v příslušném roztoku

číslo vzorku	hmotnost/g před	hmotnost/g po	hmotnostní úbytek [%]
25	0,017	0,035	-105,959
26	0,031	0,052	-67,619
27	0,023	0,040	-77,466
28	0,029	0,051	-77,438
29	0,026	0,044	-69,918
30	0,032	0,053	-67,378
31	0,017	0,033	-91,123
32	0,026	0,049	-85,644
33	0,033	0,033	0,789
34	0,025	0,027	-10,185
35	0,027	0,026	2,703
36	0,024	0,027	-9,403
37	0,017	0,019	-13,585
38	0,031	0,031	-0,551
39	0,027	0,029	-6,846
40	0,029	0,031	-5,207
41	0,023	0,022	6,147
42	0,026	0,008	68,093
43	0,025	0,013	48,814
44	0,027	0,008	69,948
45	0,024	0,012	50,147
46	0,027	0,015	45,777
47	0,029	0,006	77,805
48	0,032	0,026	19,507

■ krevní plasma

■ SBF

■ PBS

