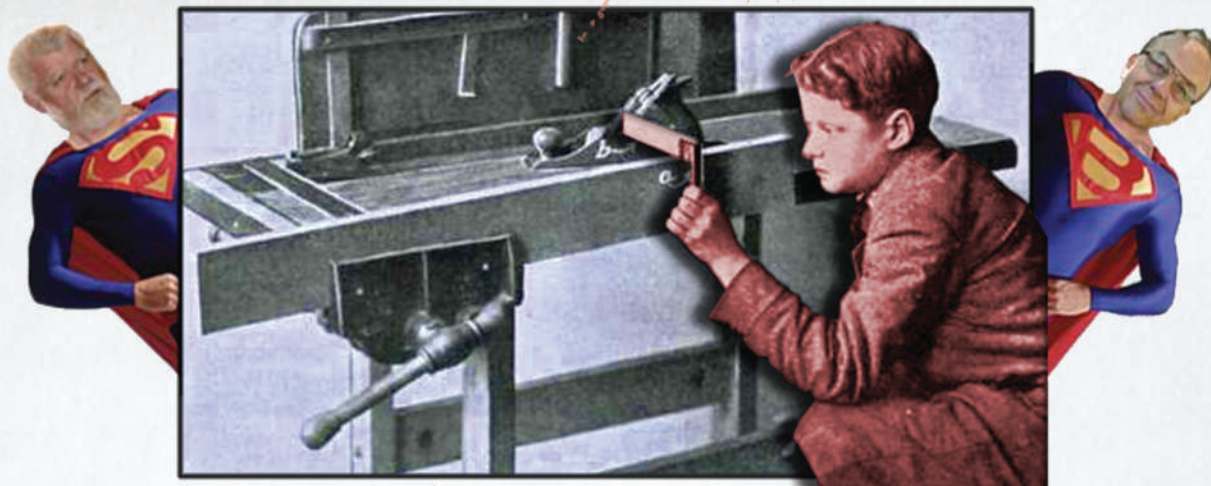




BIOMATERIÁLY A JEJICH POVRCHY XIII.

Herbertov, Horní Mlýn, 15.-18.9.2020





Biomateriály a jejich povrchy XIII.

Tomáš Suchý, Lucie Vištejnová, Radek Sedláček, Zdeněk Tolde

ISBN 978-80-01-06754-3

Vydalo: České vysoké učení technické v Praze

Zpracovala: Fakulta strojní

Kontaktní adresa:

Tomáš Suchý

Tel.: 266 009 287

Tisk: POLYPRESS, s.r.o.

Adresa tiskárny: Truhlářská 486/15, 360 17 Karlovy Vary - Stará Role

Počet stran: 86

Náklad: 100

Pořadí vydání: 1.

Praha 2020

ÚTERÝ 15. 9. 2020

ZAHÁJENÍ XIII. ROČNÍKU SEMINÁŘE

úterý 13:13

AKTUALITA & BIODEGRADABILNÍ KOVY

úterý 13:40

David Chvátil

Využití mikrotronu MT 25 v době koronavirové

8

úterý 14:00

Karel Tesař, Anežka Jančová, Zbyněk Sucharda a Karel Balík

Tenké hořčíkové dráty pro bioaplikace: vývoj, příprava a problémy

9

úterý 14:20 (S)

Anežka Jančová, Karel Tesař, Zbyněk Sucharda a Karel Balík

Optimalizace procesů potahování tenkých hořčíkových drátů biodegradabilními polymery

9

úterý 14:40 (S)

Klára Hosová, Jiří Kubásek, Jaroslav Čapek a kol.

Nové biodegradovatelné slitiny Zn-Mg-Ca

10

DISKUSE

COFFEE BREAK (15:30-16:00)

BUŇKY & POLYESTERY

úterý 16:00

Jana Musílková, Antonín Sedlář, Martina Trávníčková a kol.

Diferenciace kmenových buněk ASC a výběr vhodného scaffoldu pro účely tkáňového bioinženýrství

11

úterý 16:20 (S)

Markéta Klíčová, Jakub Erben, Andrea Klápšťová a kol.

Polyesterová nanovláknna pro nové aplikace v regenerativní medicíně

12

úterý 16:40 (S)

Kristýna Havlíčková, Šárka Hauzerová, Vít Novotný a kol.

Povrchová enzymatická modifikace polyesterových mikro/nanovlákných tkáňových scaffoldů

13

úterý 17:00 (S)

Šárka Hauzerová, Kristýna Havlíčková, Vít Novotný a kol.

Adsorpce proteinů na biodegradabilní polyesterové vlákenné nosiče

15

DISKUSE

VEČEŘE (18:00-19:30)

PRASE!

úterý 19:30

Miroslav Rozkot

Prasata ve vědě

16

POSTEROVÁ SEKCE

úterý 20:00 - 21:30

55

POSTEROVÁ SEKCE

Antonín Brož, Malgorzata Swietek, Vitalii Patsula a kol. Magnetické kompozitní biomateriály pro dynamickou kultivaci buněk <i>in vitro</i>	56
Jana Brtníková, Lenka Michlovská, Eva Klapková a kol. Bakteriostatické účinky fosfátového cementu s nízkou koncentrací vankomycinu	56
Veronika Hefka Blahnová, Karolína Vocetková, Andrej Litvinec a kol. Dediferenciace chondrocytů z aurikulární chrupavky králíka	58
Jan Hujer, Tomáš Kořínek a Klaus Zimmerman Silový účinek kavitáčních bublin na přilehlé povrchy a jeho měření pomocí PVDF senzorů	59
Vojtěch Hybášek, Eva Jablonská, Karolína Vocetková a kol. Elektrochemický monitoring rozvoje buněčné kultury na kovovém biomateriálu	60
Adelia Kashimbetova, Mariano Casas-Luna, Serhii Tkachehko et al. Enhancement of <i>in vitro</i> mineralization of titanium by alkali-based surface treatment	61
Jan Krčil, Vladimír Mára a Vojtěch Zástava Vliv krystalografické orientace na oxidaci β titanových slitin	62
Nikola Křivánková, Kristýna Valová, Jana Brtníková a kol. Využití modrého světla pro přípravu hybridních hydrogelových sítí s uplatněním v medicíně	63
Ján Kužma, Lukáš Horný, Tomáš Suchý a kol. Popis štruktúrnych vlastností elektrostaticky zvláknovaných kolagénnych vrstiev	64
Věra Lukášová, Radmila Kudláčková, Michala Rampichová a Eva Filová Podpora osteoklastogeneze v <i>in vitro</i> podmínkách bisfosfonátem určeným pro léčbu osteoporózy	65
Katarína Mendová, Matej Daniel, Kristína Eleršič-Filipič a kol. Vplyv lipozómov na súčiniteľ trenia v synoviálnych kĺboch	66
Lenka Michlovská, Jana Brtníková, Katarína Kacvinská a kol. Hydrolytická stabilita a morfologie lyofilizovaných biopolymerních pěn připravených v různých koncentrovaných solích	68
Václav Olšanský, Carlos Granja, Cristina Oancea a kol. Využití protonové radiografie zaznamenané pomocí pixelového detektoru Timepix3	69
Petr Písařík, Jan Remsa a Jan Mikšovský Úprava povrchu 3D-tištěných vzorků pomocí tenkých vrstev	71
Štěpán Podzimek, Taťjana Janatová, Lucie Himmlová a kol. Stanovení hypersenzitivity na kovy testem MELISA® - follow-up studie	73
Michala Rampichová, Matěj Buzgo, Věra Lukášová a kol. Optimalizace rozpouštědlového systému pro PCL/HAP nanovlákná s řízeným uvolňováním látek	73
Jitka Říhová, Tomáš Suchý, Lucie Vištejnová a kol. Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách	74
Radek Sedláček, Tomáš Suchý, Šárka Laxová a kol. Analýza ohybové tuhosti páteře po intervertebrální fúzi	75
Věra Sovková, Věra Lukášová, Lucie Wlfofová a kol. Nosiče pro řešení kostních defektů	76
Lucy Vojtová, Katarína Kacvinská, Šárka Kobzová a kol. Kolagen/celulózové kožní kryty obohacené antimikrobiálními enzybiotiky a jejich účinek na epidemiologicky relevantní kmeny <i>S. aureus</i>	77
Radka Vrbová, Štěpán Podzimek, Lucie Himmlová a kol. Klinické ověření přínosu testu MELISA® u pacientů s hypersenzitivitou na kovy	78
Anna Zavadakova, Dagmar Bilikova, Lucie Vistejnova and Peter R. Mouton Absolute cell number determination in 3D collagen hydrogel scaffolds	79
Jíra Aleš, Řehounek Luboš, Javorská Gabriela a Denk František Stěnová porézní struktura jako základ implantátů	81
Lucie Vištejnová a Pavel Klein Různé proměnné zvířecích modelů během testování kostních a kloubních náhrad, aneb co všechno nás ještě může překvapit	82

KOLAGEN

středa 8:30

Tomáš Suchý a Monika Šupová

Aplikace nativního kolagenu - prohraná bitva?

19

středa 8:50

Monika Šupová, Tomáš Suchý, Šárka Rýglová a kol.

Problematika stability a degradace kolagenů

20

středa 9:10

Martin Braun, Šárka Rýglová, Monika Šupová a kol.

Možnosti a omezení analytických metod pro chemickou charakterizaci biomateriálů na bázi kolagenu

20

středa 9:30 (S)

Vendula Karbánová, Tomáš Suchý, Lukáš Horný a Monika Šupová

Mechanické a strukturní vlastnosti směsných kolagen/PCL nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách

22

DISKUSE

COFFEE BREAK (10:00-10:20)

BIOMECHANICKÉ ASPEKTY

středa 10:20

František Denk, Aleš Jíra, František Denk a kol.

Nové zevní fixační zařízení s permanentní regulací novotvorby kostní tkáně

23

středa 10:40 (S)

Kristýna Kubášová, Radek Sedláček, Lucie Vištejnová a kol.

Vliv fixace dlahou na mechanické vlastnosti žeber při tříbodovém ohybu

26

středa 11:00 (S)

Luboš Řehounek, Aleš Jíra, Gabriela Javorská a Daniel Bodlák

Statické zatěžovací zkoušky a numerické porovnání rozdělení napětí dentálních implantátů s externím a interním připojením abutmentu

27

středa 11:20 (S)

Alena Škubníková a Petr Písařík

Tribologické a povrchové vlastnosti kontaktních čoček

28

DISKUSE

OBĚD (12:00-14:00)

STŘEDA 16. 9. 2019 | ODPOLEDNE

DYNAMIKA BUNĚČNÉHO CHOVÁNÍ

středa 13:30

Vítězslav Březina

Dynamika chování buněk v různých i nezvyklých prostředích

29

středa 13:50

Vítězslav Březina a Zdeněk Hubač

Hodnocení lokomoce živých buněk *in vitro*

30

středa 14:10

Vítězslav Březina a Ivan Jirka

Interakce živých buněk a krystalů silikalitu

31

DISKUSE

COFFEE BREAK (15:40-16:00)

KOVY & METODY JEJICH CHARAKTERIZACE

středa 16:00

Jaroslav Fojt, Vojtěch Hybášek, Luděk Joska a kol.

Detekce změn pH pomocí modifikovaných povrchů titanu

31

středa 16:20

Jitřenka Jírů, Eva Průchová, Vojtěch Hybášek a Jaroslav Fojt

Elektrochemický monitoring formování biofilmu a G^+ a G^- bakterií

32

středa 16:40

Lukáš Vacek, Martin Šorm, Filip Růžička a kol.

***In vitro* testování laserem mikrostrukturovaných povrchů slitiny Ti6Al4V z hlediska bakteriální adheze**

33

středa 17:00 (S)

Lucie Košinová, Petr Písařík, Zdeněk Tolde a Jan Brajer

Modifikace vlastností materiálů používaných na moderní endoprotézu kyčelního kloubu

34

středa 17:20

Petr Vlčák, Jaroslav Fojt a Jan Drahokoupil

Charakterizace povrchu titanu po mechanickém leštění, chemickém, elektrochemickém a iontovém leptání

36

středa 17:40 (S)

Denisa Svobodová a Zdeněk Tolde

3D tisk beta titanových slitin

37

DISKUSE

RAUT & SPOLEČENSKÝ VEČER

středa 19:00 - 24:00

ČTVRTEK 17. 9. 2020

POKROČILÉ MATERIÁLY & ANALÝZY

čtvrtek 9:00

Timothy E.L. Douglas

Whey Protein Isolate hydrogels as biomaterials

40

čtvrtek 9:20

Martin Bartoš

Augmentační materiály v dentální implantologii

41

čtvrtek 9:40 (S)

Dagmar Poláková, Iva Víchová, Markéta Schaabová a kol.

Kombinované nosiče na bázi silk fibroinu a hydroxyapatitu pro ortopedické aplikace

41

COFFEE BREAK (10:00-10:20)

čtvrtek 10:20

Edgar B. Montufar, Mariano Casas-Luna, Adelia Kashimbetova et al.

Additive manufacturing technologies for bone tissue engineering scaffolds

42

čtvrtek 10:40

Martin Vltavský, Radek Sedláček, Tomáš Suchý a kol.

Analýza mechanických vlastností porézních keramických pěn při akcelerované degradaci

44

DISKUSE

OBĚD (11:30-13:00)

VOLNÉ ODPOLEDNE

PÁTEK 18. 9. 2020

NANO

pátek 9:00

David Lukáš, Eva Kuželová Košťáková, Věra Jenčová a kol.

Termoreverzibilní gely pro přípravu chirurgických nití obsahujících nanovlákná

47

pátek 9:20

Věra Jenčová, Barbora Kopřivová, Maxim Lisnenko a kol.

Nanovláknenné materiály založené na polyvinylalkoholu pro inkorporaci proteinů

48

pátek 9:40

Eva Kuželová Košťáková, Šárka Hauzerová, Kristýna Havlíčková a kol.

Smáčení vláknenných materiálů pro medicínské aplikace

50

COFFEE BREAK (10:00-10:30)

pátek 10:30

Eduard Brynda, Johanka Kučerová a Tomáš Riedel

Biokompatibilita kardiovaskulárních náhrad

51

pátek 10:50

Elena Filová, Andreu Blanquer, Tomáš Suchý a kol.

Growth of adipose tissue-derived stem cells in collagen gels reinforced with collagen particles/nanofibers and stimulated by growth factors or by platelet lysate released from PVA nanomats for vascular tissue engineering

52

pátek 11:10

Eva Filová, Matej Buzgo and Amir Fahmi

Nanofibers with osteoinductive supplements for bone regeneration

54

DISKUSE

pátek 12:13

Ukončení semináře a vyhlášení výsledků studentské soutěže

OBĚD (12:30-14:30)

ODJEZD



15.9.2020

ÚTERÝ

**David Chvátíl****Využití mikrotronu MT 25 v době koronavirové**

Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i., Řež 130, 250 68 Řež

chvatil@ujf.cas.cz

Cyklický urychlovač Mikrotron MT 25 slouží jako zdroj relativistických elektronů (primární elektronový svazek), sekundárních fotonových svazků (brzdné záření) a neutronů z jaderných reakcí. Urychluje elektrony na energie v rozsahu 6 – 25 MeV. V době krize kvůli koronaviru nabídl Ústav jaderné fyziky AVČR využití mikrotronu pro sterilizaci zdravotnických potřeb zdarma. Radiační sterilizace má v porovnání s jinými metodami, které se nyní pro tento účel používají, jako je například teplo, pára pod tlakem či chemické plyny, mnoho výhod. Vysoká schopnost záření pronikat látkou způsobuje efektivní hubení zárodků na předmětech různých tvarů, tloušťky, materiálového složení a konzistence, a to stejnoměrně ve všech vrstvách. Sterilizace nezpůsobuje radioaktivitu ozařovaných předmětů, její využití je tedy ideální pro lékařské výrobky pro jedno použití zhotovené z plastických hmot, textilií, pryže, buničiny. Výhodou urychlovače je také rychlost, sterilizační dávka je tu dosažena v průběhu několika minut.

**Obr. 1** Sterilizace na mikrotronu MT 25.

**úterý 14:00****Karel Tesař^{1,2}, Anežka Jančová², Zbyněk Sucharda³ a Karel Balík³****Tenké hořčíkové dráty pro bioaplikace: vývoj, příprava a problémy**¹Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Oddělení dielektrik, Na Slovance 1999/2, 182 21 Praha²České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra materiálů, Trojanova 13, 120 00 Praha³Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v. v. i., Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, V Holešovičkách 94/41, 182 09 Prahatesarkar@fzu.cz

Hořčík je spolu se svými slitinami perspektivní materiál pro širokou škálu možných aplikací. Mg je biogenním prvkem, jenž má zásadní roli pro správnou činnost lidského metabolismu. V implantologii má tedy využití Mg jednoznačnou výhodu v tom, že existují tělu přirozené procesy jeho zpracování a vyloučení při jeho vyšších koncentracích. Hořčík v lidském těle podléhá korozi a řadí se tedy k látkám, které nazýváme biodegradabilní. Biodegradabilita hořčíku spolu s jeho nízkou cytotoxicitou i ve vysokých koncentracích poskytuje zajímavý materiál pro implantáty, které po určité době plně degradují. Doposud není Mg příliš používán pro malé implantáty, jelikož není podrobně popsán mechanismus lokální koroze, která může ohrozit strukturní integritu implantátu před plánovaným okamžikem degradace. Je nicméně žádoucí tento problém řešit, neboť by poté bylo možné použít Mg také pro externí cévní fixaci, stenty a další podobné aplikace, které vyžadují implantáty s rozměry v řádu desetin až jednotek milimetrů alespoň v jednom směru.

V současné době probíhá ve spolupráci FzÚ AV ČR, ÚSMH AV ČR a FJFI ČVUT v Praze výzkum a vývoj tenkého Mg a Mg-0.4Zn drátu, který by byl vhodný jako biodegradabilní drát pro fixaci sternu při mediální stereotomii u dětských pacientů. Tento příspěvek přiblíží pozitivní i negativní vlastnosti hořčíku a popíše metodu přípravy tenkého Mg drátu pomocí přímé extruze s extrémním redukčním poměrem. Výsledný drát bude diskutován z hlediska svých geometrických, mikrostrukturních, mechanických a korozních vlastností. Bude vysvětleno, proč je takto připravený drát odolný v ohybu a jaké jsou překážky, které je třeba překonat pro jeho úspěšné využití v implantologii.

úterý 14:20 (S)**Anežka Jančová¹, Karel Tesař¹, Zbyněk Sucharda² a Karel Balík²****Optimalizace procesů potahování tenkých hořčíkových drátů biodegradabilními polymery**¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra materiálů, Praha.²Akademie věd České republiky, v.v.i., Ústav struktury a mechaniky hornin, Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Praha.jancoane@fjfi.cvut.cz

Tenké hořčíkové dráty do budoucna představují alternativu k ocelovým či nitinolovým drátům, které se dnes používají pro fixaci porušených kostí, například hrudní kosti po operaci srdce. Hořčíkové dráty v lidském těle postupně korodují a jsou nahrazovány hojící se tkání, proto odpadá



potřeba dalšího operativního zákroku při jejich odstraňování. Dosavadní výzkum ukazuje, že rychlost degradace samotných hořčíkových drátů v prostředí lidského těla je příliš vysoká a je třeba hledat metody pro její snížení. Nadějnou možností se jeví potahování hořčíkových drátů biodegradabilními polymery. Budou přiblíženy metody nanášení polymerů na bázi PLA a PLC na tenké dráty a některé dílčí problémy, které se s tím pojí, jako je úprava povrchu drátů před nanášením, metody pro analýzu tloušťky vrstvy polymeru nebo některé problémy pojící se s interakcí polymeru s hořčíkem v korozním prostředí.

úterý 14:40 (S)

**Klára Hosová¹, Jiří Kubásek¹, Jaroslav Čapek², Jan Pinc¹
a Dalibor Vojtěch¹**

Nové biodegradovatelné slitiny Zn-Mg-Ca

¹Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, Praha

²FZU – Fyzikální ústav AV ČR, Akademie věd České republiky, Praha

hosovak@vscht.cz

Slitiny zinku se řadí společně s materiály na bázi hořčíku, či železa do skupiny biodegradovatelných kovů. Tyto materiály se zdají být velice perspektivní v oblasti medicíny. Mohou být použity jako dočasné implantáty. Materiál v takovém případě nahradí poškozenou tkáň, postupně se vstřebá do organismu a pacient se vyhne dalšímu zásahu do těla, kdy musí být implantát reoperován. Biodegradovatelné hořčíkové materiály jsou schváleny pro aplikace jako stenty nebo šrouby. Zinkové materiály však mají oproti hořčíkovým jisté výhody. Hlavní výhodou je korozní proces, při kterém nedochází k vývoji vodíku. S vodíkem se pojí komplikace v podobě hromadění a tvorby vodíkových kapes, což zpomaluje hojení okolní tkáně. Koroze zinku je obecně pomalejší a relativně rovnoměrná v porovnání s materiály na bázi hořčíku. Na biomateriály jsou všeobecně kladeny velmi vysoké požadavky na mechanické, korozní i biologické vlastnosti. Proto musí být zinek vhodně legován dalšími prvky jako např. Mg a Ca. Jako perspektivní materiály se tedy jeví např. slitiny Zn-Mg-Ca. V rámci této práce byla připravena slitina Zn-Mg-Ca kombinací postupů lití, tepelného a termomechanického zpracování. Vhodnou kombinací parametrů přípravy byly připraveny materiály s pevností vyšší než 300 MPa a tažností až 15 %.

Tato práce byla finančně podpořena v rámci projektu č. 18-06110S poskytovaném agenturou GAČR.



**Jana Musílková¹, Antonín Sedlář¹, Martina Trávníčková¹, Miloš Beran²,
Zdena Kolská³, Petr Slepíčka⁴ a Lucie Bačáková¹**

**Diferenciace kmenových buněk ASC a výběr vhodného scaffoldu pro
účely tkáňového bioinženýrství**

¹Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

²Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař

³Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Pasteurova 3544/1, 400 96 Ústí nad Labem

⁴Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

jana.musilkova@fgu.cas.cz

Mezenchymální kmenové buňky jsou přítomny prakticky ve všech tkáních u všech živočišných druhů. Slouží k reparaci těchto tkání a k obnově živého organismu. Jsou tedy přirozeným zdrojem pro tvorbu tkáňových náhrad, jejichž složkou by byly živé, diferencované buňky, umožňující v těle samovolnou regeneraci tkáňové náhrady. Tím by se snížila nebo ideálně odpadla nutnost opakovaných chirurgických zákroků u pacienta. Díky nízké imunogenicitě mezenchymálních kmenových buněk a schopnosti diferencovat do mnoha buněčných typů mohou být použity ke tvorbě autologních náhrad obsahujících buněčnou složku. Vhodným zdrojem může být kostní dřev, tuková tkáň, Whartonův roztok z pupečnickové šňůry nebo zubní dřev. V současné době využíváme kmenové buňky izolované z tukové tkáně (ASC, adipose-derived stem cells), které jsou díky své lokalizaci v tukové tkáni také relativně snadno dostupné. Jsou prekurzorem adipocytů a jsou tedy také vhodným zdrojem pro diferenciaci na tento buněčný typ. Také jsou vhodné pro diferenciaci směrem k dalším buněčným typům mesenchymálního původu, jakými jsou osteoblasty vhodné pro tvorbu kostních náhrad, nebo buňky hladkého svalstva pro účely cévních náhrad. Sledujeme v současné době jejich diferenciaci směrem k hladkému svalstvu a tukové tkáni pomocí vhodných diferenciačních médií ve statickém i dynamickém systému.

Důležitou složkou tkáňových náhrad je také nosič, který je buňkami osazována, tzv. scaffold. Scaffold nahrazuje mimobuněčnou hmotu, která má svůj tvar, strukturu a vlastnosti dané dle toho, jakou tkáň nebo orgán nahrazuje. Může být na bázi biologické, nebo syntetické. Pokud je scaffold co nejvíce podobný původní tkáni, může zajistit pro buňky dobrou adhezi, proliferaci a přísun látek. V našich současných experimentech testujeme a charakterizujeme nosiče z polymerních. Polymerní nanovlákná umožňují napodobit architekturu přirozené extracelulární matrix. Zabýváme výběrem a charakterizací syntetických scaffoldů vytvářených metodou centrifugačního spinningu, která umožňuje tvorbu 3D struktury vhodné pro tukové a kostní náhrady. Testujeme polymery na bázi PLLA, PHB, PCL a PBS, pro zlepšení mechanických vlastností také jejich kopolymery. Scaffoldy jsou podrobeny různým typům sterilizace, jsou charakterizovány metodou BET a BJH pro stanovení velikosti povrchu a porozity vzorků. K zobrazení struktury nanovláken byla použita metoda SEM. V růstových pokusech po osazení buňkami ASC sledujeme viabilitu a metabolickou aktivitu buněk, dále po vizualizaci buněk imunofluorescenčním barvením za použití konfokální mikroskopie také migraci buněk do vnitřní struktury scaffoldu. Paralelně probíhá diferenciace buněk směrem k vhodnému buněčnému typu. Později se zaměříme na vaskularizaci vytvářené tkáňové náhrady, která by umožnila dlouhodobou funkčnost vytvářené tkáňové náhrady.



Z dosavadních pokusů vyplývá, že vhodným materiálem jak z hlediska růstu buněk, tak stability materiálu je PLA a některé jeho kopolymery. Preinkubací materiálu podkladu s kultivačním médiem obsahujícím fetální sérum lze zlepšit adhezi příliš hydrofobních materiálů.

Podpořeno grantem Ministerstva zdravotnictví České Republiky (grant No. NU20-08-00208).

úterý 16:20 (S)

**Markéta Klíčová¹, Jakub Erben¹, Andrea Klápšťová¹, Václav Liška²,
Jáchym Rosendorf², Richard Pálek², Donald E. Ingber³, Richard Novak³,
Elisabeth Calamari³, Di Feng³ and Jana Horáková¹**

Polyesterová nanovláknina pro nové aplikace v regenerativní medicíně

¹Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů, Fakulta textilní, Technická univerzita v Liberci

²Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

³Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University, Boston, MA 02115

marketa.klicova@tul.cz

Syntetické polyestery jako poly- ϵ -kaprolakton, polydioxanon, polylaktid a polyglykolid patří mezi hojně využívané polymery pro tkáňové inženýrství. Mezi jejich hlavní výhody patří biodegradabilita, dostupnost a dobrá znalost jejich vlastností. Navíc na trhu již existují produkty na bázi polyesterů, které byly schváleny FDA pro medicínské aplikace. V závislosti na dané aplikaci může být naopak nevýhodou jejich přílišná hydrofobicita, uvolňování kyselých produktů degradace do organismu a také časná ztráta mechanických vlastností v *in vivo* prostředí. V příspěvku budou představeny aplikace polyesterových vláken, kterým se autoři příspěvku věnují. Jedná se především o použití nanovláknenných vrstev na bázi poly- ϵ -kaprolaktonu pro prevenci nežádoucích pooperačních adhezí v gastrointestinální chirurgii. Bude představena biokompatibilní úprava vrstev pomocí hexamethyldisiloxanu metodou plazmaticky asistované chemické depozice z plynné fáze (CVD). Dle prvotních *in vitro* testů se prokázala cytokompatibilita takto upravených vrstev. Navíc mechanické testování *ex vivo* na střevní tkáni prasete prokázalo antiadhezivní chování upravených vrstev. Další významnou aplikací je inkorporace vláknenných planárních vrstev do modelu lidského orgánu na čipu (*organ-on-chip*). Biodegradabilní nanovláknenná vrstva má potenciál nahradit nedegradabilní silikonovou membránu, která se doposud v čípech používá jako substrát pro kultivaci buněk. Vzhledem k vyšší porositě nanovláknenných vrstev se předpokládá, že by náhradou došlo ke zvýšení permeability mezi jednotlivými částmi čipu a efektivní simulaci nativního lidského prostředí, jelikož nanovláknenná vrstva dobře napodobuje mezibuněčnou hmotu. Navíc membrána je biodegradabilní a v čipu se – na rozdíl od silikonové membrány – rozpadne. V příspěvku budou prezentovány úskalí dosavadní práce a prozatímní výsledky projektů.

Práce byla podpořena projektem MZ ČR AZV NU20J-08-00009 Prevence střevního anastomotického leaku a pooperačních adhezí pomocí nanovláknenných biodegradabilních materiálů.

**úterý 16:40 (S)**

**Kristýna Havlíčková¹, Šárka Hauzerová¹, Vít Novotný², Luboš Běhálek³,
Jana Müllerová¹, Eva Kuželová-Košťáková¹ a Věra Jenčová¹**

**Povrchová enzymatická modifikace polyesterových
mikro/nanovlákených tkáňových scaffoldů**

¹Technická univerzita v Liberci, Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, Katedra chemie, Oddělení bioinženýrství, Třebízského 1244/2, 460 01 Liberec

²Technická univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, Oddělení environmentální chemie, Bendlova 1409/7, 460 01 Liberec

³Technická univerzita v Liberci, Fakulta strojní, Katedra strojírenské technologie, Studentská 1402/2 461 17 Liberec

kristyna.havlickova@tul.cz

Úvod

Adheze buněk je primárně ovlivněna strukturou a chemií povrchu vláknenných scaffoldů. Vhodná modifikace vláknenného povrchu by proto mohla být prospěšná pro adhezi buněk. Tato studie tedy byla zaměřena na modifikaci mikro/nanovláknenného povrchu planárních vrstev (scaffoldů) připravených z biodegradovatelných alifatických polyesterů částečnou degradací. Cílem bylo porovnat chování testovaných materiálů z hlediska enzymatické degradace a pozitivně ovlivnit interakci těchto vláknenných tkáňových nosičů s buňkami.

Metody

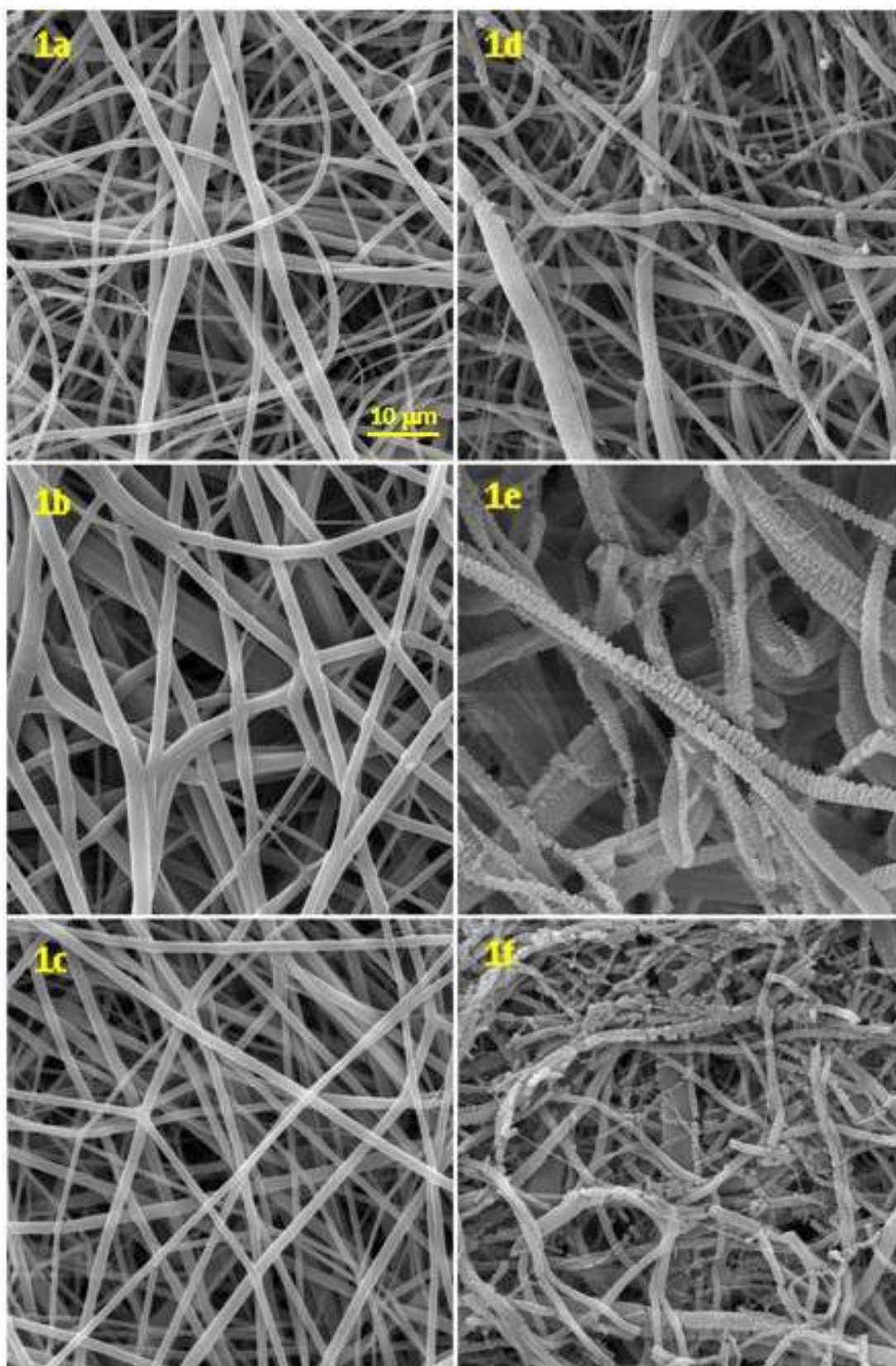
Vláknenné vrstvy byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním (technologie Nanospider™) PCL, PLCL a směsí obou polymerů v poměru 1:1. Morfologie povrchu byla modifikována enzymaticky katalyzovanou hydrolýzou. Použité enzymy byly zodpovědné za hydrolytické štěpení polymerních řetězců výše uvedených polymerů. Degradace byla katalyzována dvěma enzymy. Lipáza byla použita k štěpení PCL, proteináza K byla použita k štěpení PLCL a blendu. Degradací experiment trval dva dny. U všech materiálů byla provedena povrchová analýza a charakterizace morfologie (SEM), analýza změny molekulové hmotnosti (GPC), analýza změny krystalinity (DSC), strukturní charakterizace (FTIR analýza) a v neposlední řadě analýza smáčivosti materiálů. Materiály byly také podrobeny *in vitro* testování s myšími fibroblasty 3T3.

Výsledky

Na SEM snímcích lze jasně vidět významné změny v morfologii vláknitých vrstev, způsobené enzymatickou degradací (obr. 1). Změny u materiálů jsou podpořeny analýzami GPC, DSC i FTIR. Taktéž analýzou smáčivosti. Je důležité poukázat na velmi odlišné chování vláknitých vrstev u jednotlivých polymerů. Interakce vláknenných nosičů s buňkami byla rovněž ovlivněna typem materiálu.

Diskuse a závěr

Proces částečné enzymatické degradace, která je řízena přesným loadingem jednotek enzymu v poměru k hmotnosti substrátu, kdy vlivem enzymu dochází ke štěpení polymerních řetězců pouze z povrchu vláknenných vrstev, může ovlivnit morfologii vláken. Tato cílená modifikace může spolu s vhodným typem polymeru nebo polymerního blendu poskytnout příznivé podmínky pro interakci podpůrných vláknenných scaffoldů s buňkami.



Obr. 1: Snímky z elektronové skenovací mikroskopie (SEM) vrstev PCL (a), PLCL (b), blendu PCL:PLCL 1:1 (c) bez enzymatické modifikace – relevantní negativní kontroly a snímky vrstev PCL (d), PLCL (e), blendu PCL:PLCL 1:1 (f) po částečné dvoudenní enzymatické degradaci (1d-f).

PODĚKOVÁNÍ: Autoři by tímto rádi poděkovali projektu Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (č. projektu NV 18-01-00332) a projektu SGS-2019-4085 při Technické univerzitě v Liberci za finanční podporu.

**úterý 17:00 (S)**

**Šárka Hauzerová¹, Kristýna Havlíčková¹, Vít Novotný², Jana Karpíšková²,
Veronika Voláková³ a Věra Jenčová¹**

Adsorpce proteinů na biodegradabilní polyesterové vláknenné nosiče

¹Technická univerzita v Liberci, Fakulta Přírodovědně-humanitní a pedagogická, Katedra chemie, Univerzitní nám. 1410/1, 461 17 Liberec

²Technická univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, Bendlova 1409/7, 460 01 Liberec

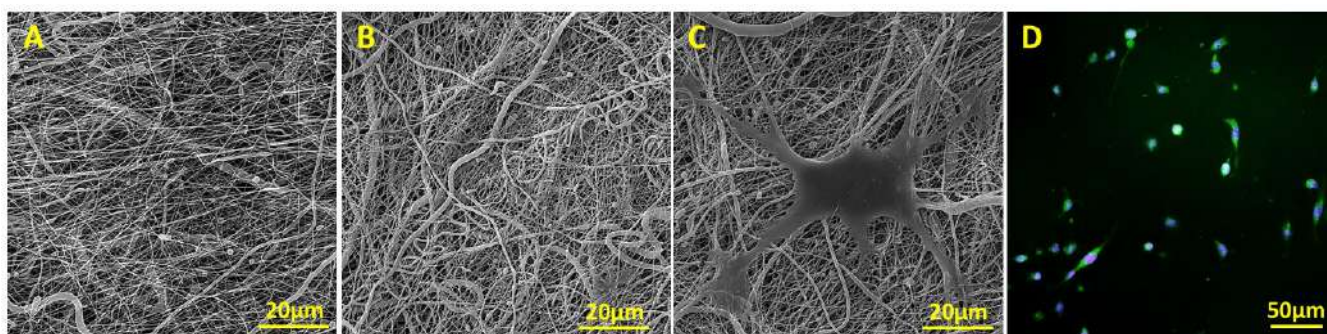
³Technická univerzita v Liberci, Fakulta Textilní, Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů, Studentská 1402/2 staré město, 461 17 Liberec

sarka.hauzerova@tul.cz

Obecně adsorpce proteinů významně ovlivňuje vlastnosti materiálů, které jim dávají tzv. biologickou identitu. Tato práce byla zaměřena na vliv chemického složení a morfologii různých polyesterových nanovláknenných materiálů na proces adsorpce proteinů na jejich povrch. Byla hodnocena interakce materiálů s BSA a lidskou plazmou, následně pak interakce materiálu s buňkami.

Různé biodegradabilní polyesterové nanovláknenné materiály byly připraveny pomocí elektrostatického zvlákňování (Nanospider™). Morfologie vláknenných vrstev byla hodnocena skenovací elektronovou mikroskopií (SEM), byl sledován specifický povrch (BET analýza) a smáčivost materiálů (Krüss). Proteiny z lidské plazmy nebo hovězí sérový albumin (BSA) byly adsorbovány na povrch materiálů. A desorpce proteinu byla prováděna pomocí 1% SDS v PBS. Množství adsorbovaných (desorbovaných) proteinů bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE a spektrofotometrie. Hodnocení buněčné adheze a proliferace buněčné linie 3T3 myších fibroblastů bylo provedeno pomocí metabolického testu (test cck-8), fluorescenční mikroskopií a SEM.

Nanovláknenné vrstvy vyrobené z vybraných polyesterů měly srovnatelnou morfologii (průměrný průměr vláken 800 až 900 nm) s výjimkou PCL45 s nižším průměrem vlákna (550 nm). Specifický povrch materiálu PCL byl dvakrát vyšší než PLCL. Nejvyšší smáčivost vykazoval materiál PLA a nejméně smáčivý byl pak materiál PCL45. Výsledky adsorpce proteinů ukazují, že PCL45 adsorbuje na povrch materiálu méně proteinů než PCL80, nejvíce proteinů na svůj povrch však váže materiál PLA. Výsledky experimentu in vitro ukázaly, že PLA měla nejvyšší adhezi buněk a následnou buněčnou proliferaci, naopak nejnižší vykazoval materiál PCL80.



Obr. 1: SEM snímky nanovláknenné vrstvy polykaprolaktonu po výrobě (A), proteinové adsorpci (B) a buněčné adhezi (C) a fluorescenční snímek po buněčné adhezi (D).



Výsledky testování naznačují, že chemické složení a morfologie nanovláknenných materiálů může významně ovlivňovat jak adsorpci proteinů, tak adhezi a proliferaci buněk. Z výsledků je patrné, že vliv na silně vázané proteiny má chemická struktura. Na adhezi buněk mají pak dominantní vliv silně vázané proteiny než ty slabě vázané. U polyesterů, množství silně vázaných proteinů pravděpodobně souvisí s „hustotou esterové vazby“, kdy u PLA je patrná vyšší „hustota esterové vazby“ i vyšší adsorpce proteinů oproti PCL. Dále je patrný vliv morfologie materiálů, který byl pozorován u materiálu PCL, kdy PCL45 (nižší průměr vláken) byl téměř nesmáčivý a adsorpce proteinů byla nižší oproti PCL80. Buněčná adheze je patrně ovlivněna spíše silně vázanými proteiny, což je patrné u PLA oproti kopolymeru PLCL. Materiál PLCL vykazoval vyšší adsorpci slabě vázaných ale nižší silně vázaných proteinů oproti PLA.

Autoři tímto děkují finanční podpoře MZ ČR, projekt číslo NV18-01-00332 a SGS-2019-4085.

úterý 19:30

Miroslav Rozkot Prasata ve vědě

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves, Oddělení chovu prasat v Kostelci nad Orlicí

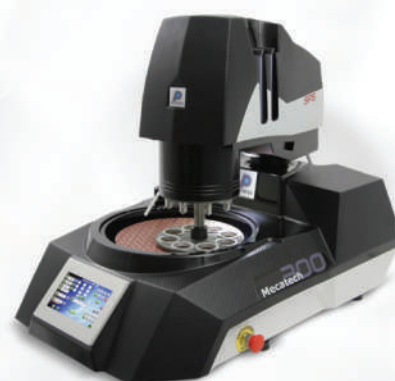
rozkot.miroslav@vuzv.cz

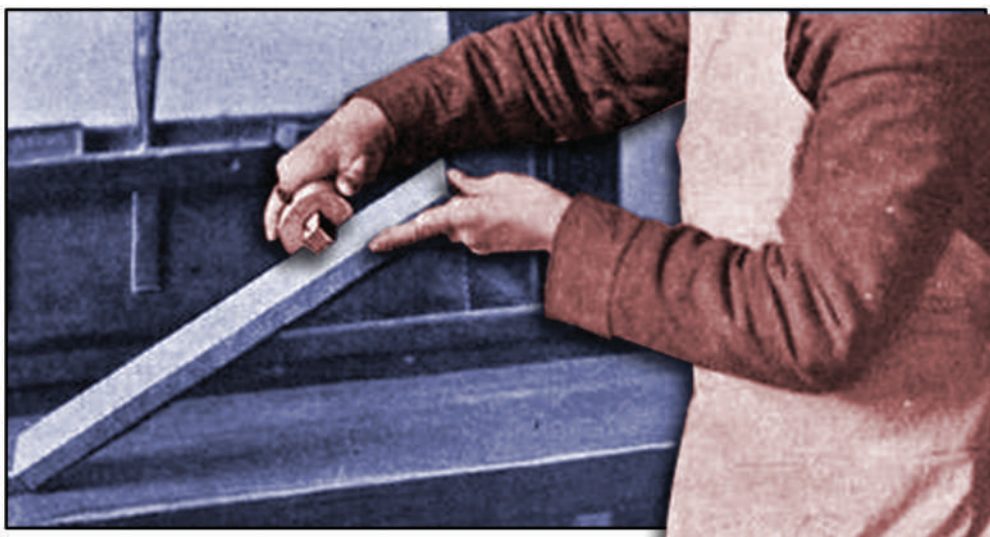
Mini prasata jsou důležitými laboratorními zvířaty. Je to nejen z důvodu jejich podobnosti s člověkem, ale i proto, že mají jako laboratorní zvířata několik významných výhod. Oproti normálním prasatům jsou menší, takže i manipulace s nimi je mnohem snadnější, a zároveň i velikostí a hmotností odpovídají více rozměrům a hmotnosti člověka. Rovněž požadavky na krmiva, prostor a dokonce i farmakologické výrobky nebo anestetika jsou nižší než u obyčejných prasat. Miniaturní prasata mají vhodnou velikost těla pro chirurgické zákroky a vzhledem k jejich anatomické podobnosti s lidmi, zejména pokud jde o kůži, kostru, zuby, gastrointestinální trakt, pankreas, játra, ledviny, plíce ale např. i imunitní systém, jsou často využívány jako model v humánní medicíně. Na druhé straně se využití pokusných zvířat setkává s problémy etickými. Problémy mohou být i s aktivitami různých ochránců zvířat, kteří se většinou neřídí rozumem, ale spíše až přehnanou empatií. Proto by i výzkumníci měli být vybaveni argumenty, znalostmi o vlastnostech a zejména odlišnostech těchto zvířat, se kterými pracují, a měli by být i připraveni tomu všemu čelit.

Příspěvek vznikl za podpory MZe RO 0718.

Optická mikroskopie a metalografie

pro life science a průmysl



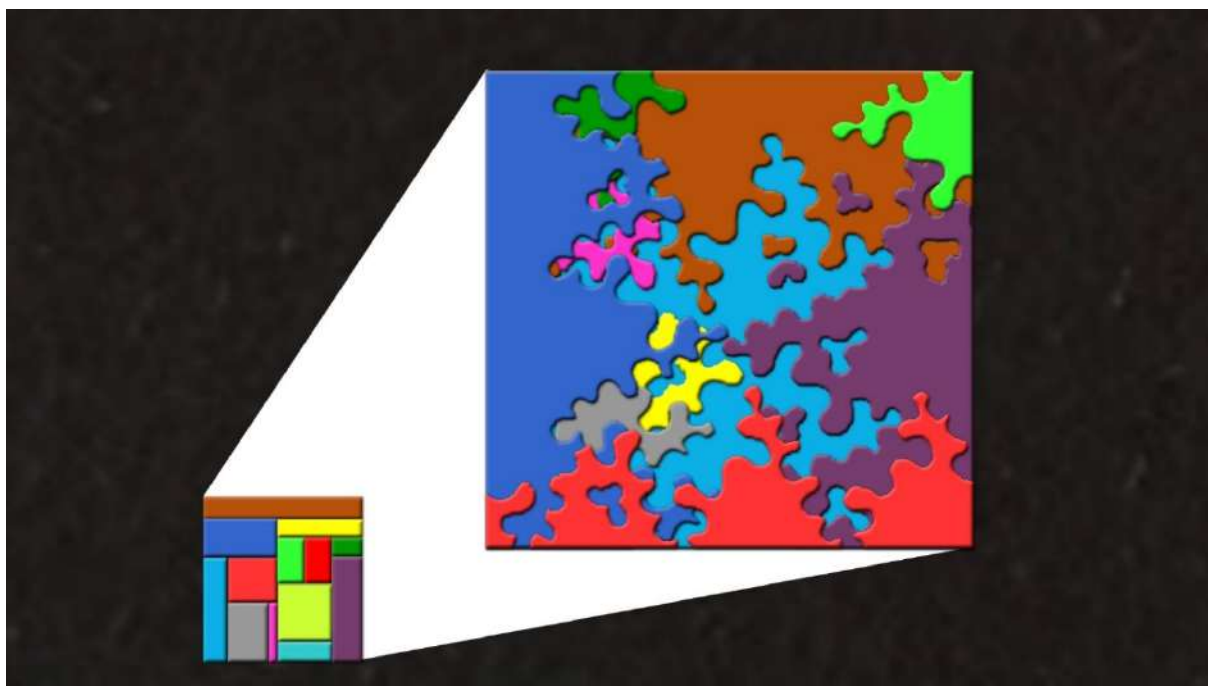


16.9.2020

STŘEDA

**Tomáš Suchý^{1,2} a Monika Šupová¹****Aplikace nativního kolagenu - prohraná bitva?**¹Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i, Praha²ČVUT v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Prahasuchy@irms.cas.cz

Důležitým a limitujícím faktorem při aplikaci kolagenu je jeho zpracování. To často představuje kompromis mezi zachováním a narušením jeho přirozené struktury a přímo souvisí s biologickými funkcemi výsledného materiálu. Kolagen může být izolován z různých druhů tkání a lze jej zpracovat do celé řady forem, například porézních pěn, vláken, filmů, sítěk, trubiček, prášku, membrán, kompozitů nebo injektovatelných disperzí či roztoků atd. V současné době prakticky neexistuje neinvasivní metoda zpracování, která by dokázala plně ochránit jeho přirozené vlastnosti. S jistou mírou nadsázky lze také říct, že neexistuje nebo není standardizována ani metoda, která by dokázala jednoznačně kvantifikovat míru poškození kolagenu. Kolagenové izoláty se v závislosti na použité metodě izolace, typu tkáně a historii užitého zdroje mohou výrazně lišit. Při popisu vlastností výsledného izolátu můžeme využít celou řadu metod a získat mnoho poznatků o jeho poškození nebo čistotě. Míra jejich zobecnění na skutečnost na základě omezeného výběru a možnost opakovatelnosti je však diskutabilní, a je jí potřeba věnovat pozornost (Obr. 1). Tento příspěvek shrnuje naše zkušenosti s izolací, zpracováním a charakterizací kolagenu a kolagenových kompozitních materiálů.



Obr. 1 Experiment lze definovat jako řadu činností umožňujících systematické pozorování nebo působení na zkoumaný objekt s cílem odhalit či poznat zákonitosti jeho chování. Zjištění, která plynou z experimentu, využíváme k popisu skutečnosti, a to na základě omezeného výběru. Složení našeho výběrového souboru známe přesně, přičemž základní soubor, do kterého dílčí výsledky převádíme, zůstává neznámý. V případě materiálů s biologickým původem je situace ještě složitější, a to především s ohledem na jejich vysokou variabilitu.

Poděkování: Práce je finančně podpořena MZČR (projekt č. NU20-02-00368)

**středa 8:50**

Monika Šupová¹, Tomáš Suchý^{1,2}, Šárka Rýglová¹, Martin Braun¹, Zbyněk Sucharda¹ a Margit Žaloudková¹

Problematika stability a degradace kolagenů

¹Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i, Praha

²ČVUT v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Praha

supova@irms.cas.cz

Při kardiovaskulárních operacích jsou často používány cévní náhrady a tkáňové záplaty. Alogenní nebo umělé materiály jsou často trombogenní a proto nejvhodnějším v tomto ohledu jsou autologní tkáně, jichž je ovšem často nedostatek. Jednou z materiálových možností degradabilních kolagenních gelů vyztužených nano/mikro vlákny jež mohou být odlity do potřebného tvaru spolu s kmenovými buňkami.

Základním problémem je samotná stabilita kolagenních materiálů a sklony k degradaci za určitých podmínek. Stabilita je závislá na mnoha faktorech kolagenu jako jeho aminokyselinové složení, obsah nekolagenních proteinů a dalších molekul a v neposlední řadě jeho sekundární struktura. Degradaci mohou vyvolat vnější faktory jako typ rozpouštědlového systému, pH a teplota prostředí či přítomnost záření. Pro studium složení a struktury kolagenů se využívá celá škála analytických metod, jako analýzy obsahů tuků, jednotlivých aminokyselin se zaměřením na koncentraci hydroxyprolinu, dále analýza obsahu glykosaminoglykanů pomocí HPLC a analýza sekundární struktury kolagenních materiálů pomocí FTIR.

Tato přednáška shrnuje dosavadní poznatky o stabilitě kolagenních materiálů a zkušenosti s využitím jednotlivých analytických metod pro stanovení stability a míry případné degradace těchto materiálů a to ať už po samotné izolaci, dále jeho následného zpracování či aplikaci různých sterilizačních způsobů.

Poděkování: Práce je finančně podpořena MZ ČR (projekt AZV č. NV19-02-00068).

středa 9:10

**Martin Braun¹, Šárka Rýglová¹, Monika Šupová¹, Margit Žaloudková¹
Martina Křížková¹ a Tomáš Suchý^{1,2}**

Možnosti a omezení analytických metod pro chemickou charakterizaci biomateriálů na bázi kolagenu

¹Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i, Praha

²ČVUT v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Praha

braun@irms.cas.cz

Současné instrumentální metody chemické analýzy nabízí díky značnému rozvoji elektroniky široké možnosti sledování obsahu řady komponent tvořících pokročilé kompozitní biomateriály. Nicméně v případě charakterizace obzvláště senzitivních biomateriálů, mezi něž lze počítat i kolagen (jako nejvíce zastoupený skleroprotein v těle člověka a jiných obratlovců), často naráží



stanovení nikoli na citlivost moderní měřící techniky, nýbrž na limity dané vlastní povahou izolovaného biologického materiálu určeného pro analýzu.

Tyto překážky, objevující se často při snaze o současné kvantitativní stanovení více složek biokompozitních materiálů během jediné analýzy (vyplývající z fyzikálně-chemických vlastností přítomných proteinů či dalších sledovaných látek ve vzorku), lze obvykle překonat zejména kombinováním více analytických přístupů a metod pro charakterizaci biopolymerů založených na odlišných principech – tj. např. použití kapalinové chromatografie (HPLC), elektroforézy (SDS-PAGE) a infračervené spektroskopie (FTIR).

Problémy nastávají hlavně v případě malého množství dostupného biomateriálu pro analýzu, když je obsah sledovaného analytu v materiálu velmi nízký či jsou-li hledané látky v roztocích v zanedbatelných koncentracích. Poblíž meze stanovitelnosti již totiž hrozí velká nepřesnost měření a značné odchylky u paralelních stanovení. Pak vzniká také otázka, jak vhodně interpretovat výsledky, nelze-li zajistit dostatek homogenního materiálu pro větší počet paralelních stanovení (nutný pro řádné statistické zpracování experimentálních dat). Již v počáteční, preanalytické fázi, lze tedy narazit na potíže s nehomogenitou vzorku a otázky výběru dostatečného množství reprezentativního vzorku. Metody chemické analýzy lze rozdělit na destruktivní a nedestruktivní. Z důvodu úspory obtížně dostupných vzorků má proto velkou důležitost pořadí postupů a návaznost metod uplatněných při zpracování a komplexní analýze materiálu. Již před vlastní analýzou jsou běžné komplikace spojené s odběrem, navažováním, resp. pipetováním či filtrací velmi malých a těžko rozpustných vzorků, v úvahu je nutné brát také nestabilitu, resp. biodegradabilitu biomateriálu za různých experimentálních podmínek (typicky teplotní intolerance, chemická či fyzikální denaturace, působení vzdušné oxidace, bakteriální rozklad biologického materiálu apod.).

V řadě případů při stanovení dochází také k rušení signálu analytů díky přítomnosti jiných složek ve vzorku, které by měly být předem odseparovány, nebo nevhodné volbě rozpouštědla. I při vlastní analýze (chromatografie, elektroforéza aj.) se lze proto setkat např. s vysrážením bílkovin, koelucí jiných látek obdobných fyzikálně-chemických vlastností apod. Kromě purifikace vzorku (např. pomocí extrakce na pevné fázi, SPE) lze ke zvýšení selektivity a citlivosti detekce použít mj. derivatizaci vzorku, při níž jsou sledované látky převedeny na deriváty poskytující vyšší odezvu signálu ve vybrané části spektra.

Příspěvek shrnuje na příkladech vybraných stanovení látek (kolagen a jeho podsložky, vč. aminokyselin a kolagenních kroslinek, glykosaminoglykany navázané na kolagen aj.) technické možnosti a limity nejběžnějších instrumentálních metod využívaných při analýze biopolymerů a jejich fragmentů (HPLC, SPE, SDS-PAGE, FTIR). V rámci prezentace budou zmíněny nejen principy, selektivita a citlivost jednotlivých metod, ale i aspekty spojené s požadavky kladenými na jednotlivé typy vzorků a způsoby jejich šetrného zpracování, aby byly v maximální možné míře zachovány jejich nativní vlastnosti a analýzy poskytly co nejvíce relevantních výsledků přispívajících k lepší chemické charakterizaci testovaných biomateriálů.

Tato práce je podpořena GAČR (grant č. 20-11186S) a projektem RVO č. 67985891.

**středa 9:30 (S)****Vendula Karbánová¹, Tomáš Suchý^{1,2}, Lukáš Horný¹ a Monika Šupová²****Mechanické a strukturní vlastnosti směsných kolagen/PCL nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách**

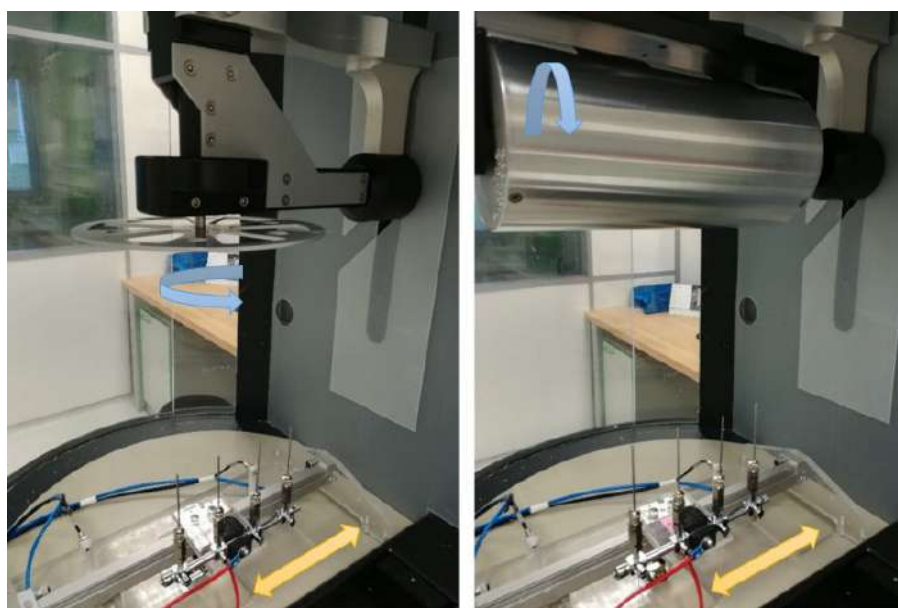
¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6

²Ústav struktury a mechaniky hornin AVČR, v.v.i., V Holešovičkách 41, 182 09 Praha 8

Vendula.Karbanova@fs.cvut.cz

Príspevek se zabývá výzkumem mechanických a strukturních vlastností směsných kolagen/PCL nanovláknenných vrstev v podmínkách simulujících tělní prostředí. Testované vzorky byly připraveny metodou elektrostatického zvlákňování s využitím dvou různých kolektorů (viz obr. 1). Experimentální analýza byla zaměřena na změny vlastností v závislosti na době vystavení kultivačnímu médiu a na parametrech vlákňování. Základem kultivačního média bylo MEM (Minimum Essential Medium) Alpha Eagle, které bylo následně doplněno o 10 % fetálního bovinního séra a 40 µg/ml gentamicinu. Takto připravené médium se běžně používá ke kultivaci buněk při *in vitro* testech.

Změny mechanických vlastností byly zaznamenány díky jednoosé tahové zkoušce. Struktura vzorků byla popsána na základě infračervené spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Bylo zjištěno, že delší expozice v kultivačním médiu má negativní dopad na mechanické vlastnosti. Infračervená spektroskopie odhalila, že v druhém vzorku je nerovnoměrně rozložen kolagen a na určitých místech zcela chybí. Kolagen je více náchylný na vlhké fyziologické prostředí, kde se hydratuje a rychleji degraduje. Můžeme předpokládat, že absence kolagenu ve druhém vzorku byla důvodem lepších výsledků z tahových zkoušek v porovnání se vzorkem prvním. Ze snímků z elektronové mikroskopie vyplývá, že po zesíťování a expozici vzorků v médiu proběhly nežádoucí změny ve struktuře materiálu. Průměry vláken se viditelně zvětšily a přibýlo větší množství precipitátů.



Obrázek 1: Použité kolektory



**František Denk ml.¹, Aleš Jíra¹, František Denk², Tomáš Goldmann³
a Zdeněk Čejka⁴**

Nové zevní fixační zařízení s permanentní regulací novotvorby kostní tkáně

¹ČVUT v Praze, Fakulta stavební, Katedra mechaniky, Thákurova 7, 166 07 Praha 6

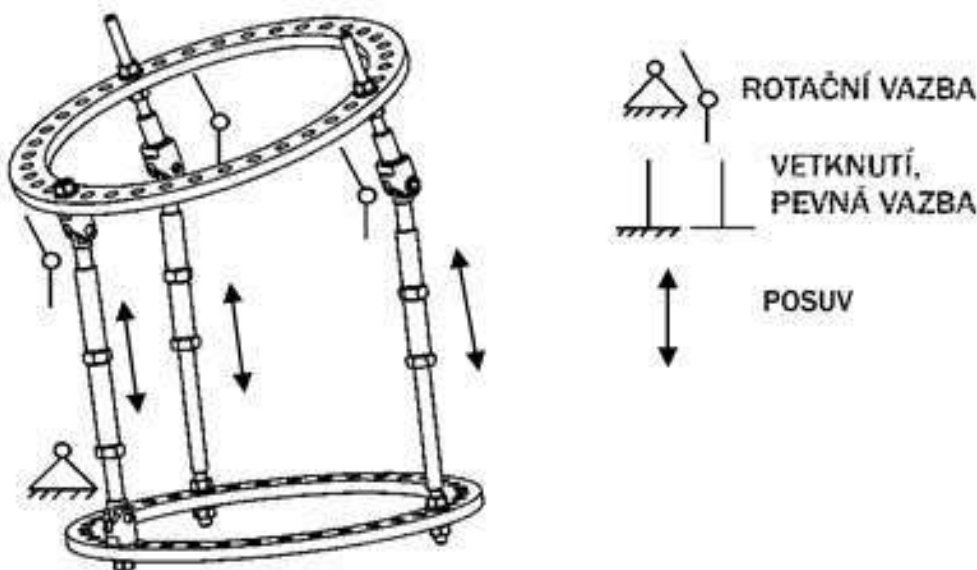
²ČVUT v Praze, Fakulta strojní, Ústav materiálového inženýrství, Technická 4, 166 07 Praha 6

³ČVUT v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6

⁵Prospan, spol. s r. o. Jiřího Voskovce 3206, 27201 Kladno

frantisek.denk@fsv.cvut.cz

Projekt řeší návrh a vývoj nového kruhového zevního fixačního aparátu (princip Ilizarov), který umožňuje prostřednictvím elektronicky řízených pohonných jednotek distrakci při prodlužování dlouhých kostí a současně regulaci syntézy a novotvorby kostní tkáně. Schéma kompletní sestavy a princip pohybu je patrný níže, viz Obr. 1. Fixační aparát zjednodušeně sestává ze dvou nosných kruhů a tří posuvníků.



Obr. 1 Kinematické schéma nového kruhového zevního fixačního aparátu

Cílem prezentovaného příspěvku je prezentace návrhu, vývoje a testování jednoho z posuvníků, které tvoří hlavní nosnou i kinematickou součást fixačního aparátu. Hnací člen posuvníku je pohybový šroub s maticí, planetovou převodovkou a motorem Faulhaber, který je ovládán elektronickou řídicí jednotkou. Posuvník (Obr. 2) je dále tvořen následujícími prvky.

Tělo posuvníku je vyrobeno z nerezové Cr – Ni oceli a jeho primární funkcí je zajistit posuvný pohyb generovaný otáčením pohybového šroubu. Posuvný pohyb je zajištěn pomocí pohybové matice, která je s posuvníkem spojena třemi šrouby, a otvorem pro pohyb jezdce umístěného na konci pohybového šroubu. Na posuvníku jsou dále provedeny rovinné plošky pro umístění tenzometrů a otvory pro vedení vodičů od tenzometrů.

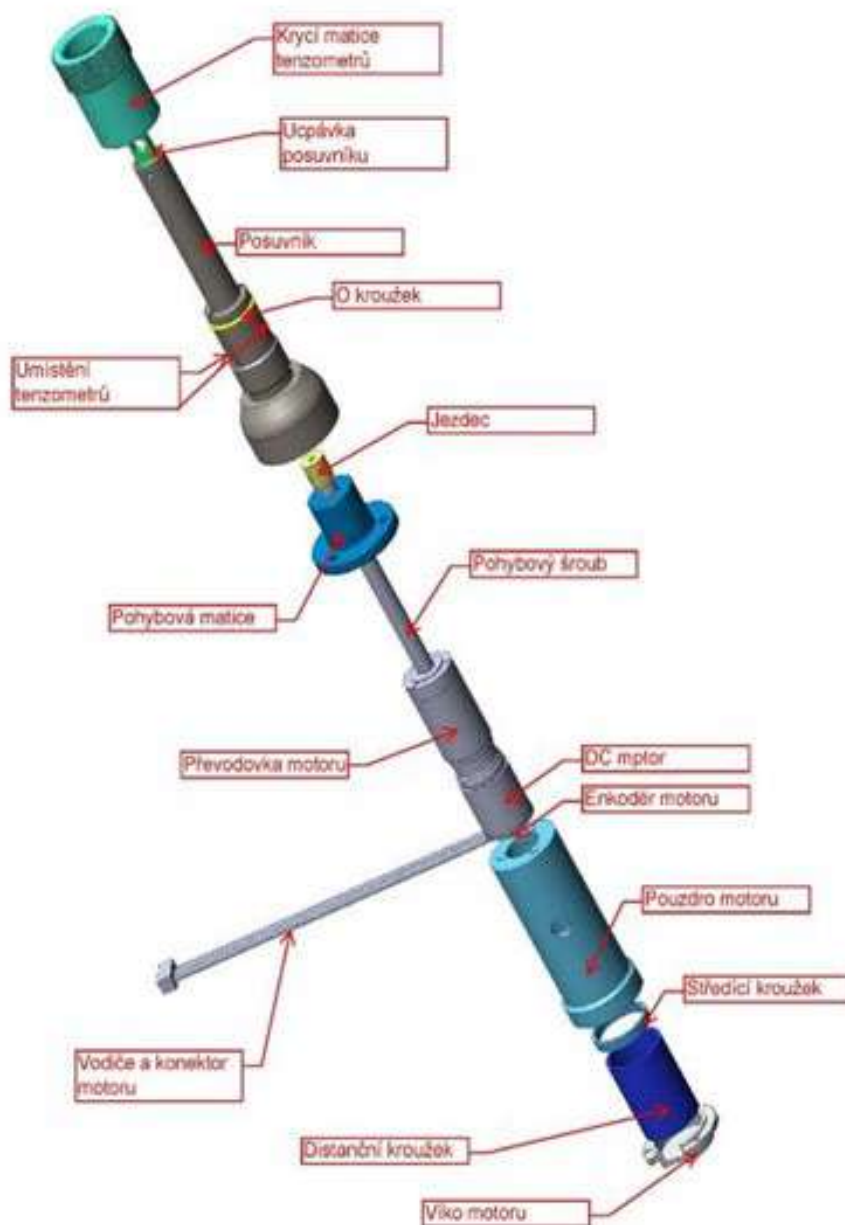


Krycí matice tenzometrů je vyrobena z nerezové Cr – Ni oceli a její funkcí je ochrana tenzometrů nalepených na posuvníku proti vlivům vnějšího prostředí.

Pohon Faulhaber s řídicí jednotkou se skládá z pohybového šroubu a pohybové matice. Pohybový šroub je poháněn planetovou převodovkou, která je napojena přímo na vlastní stejnosměrný elektrický motor řízený enkodérem.

Pouzdro motoru, středící kroužek, distanční kroužek a víko motoru slouží k zapouzdření motoru a jeho uchycení ke spodnímu kruhu, umožňuje pomocí zámku motoru s kruhem zprostředkovat buď rotační nebo pevnou vazbu. Všechny tyto komponenty jsou vyrobeny z Duralu EN AW-5182.

Jezdec tvoří kluznou dvojici s posuvníkem, vytváří tak hlavní posuvný pohyb celého mechanismu, vyroben je z PEEKu.



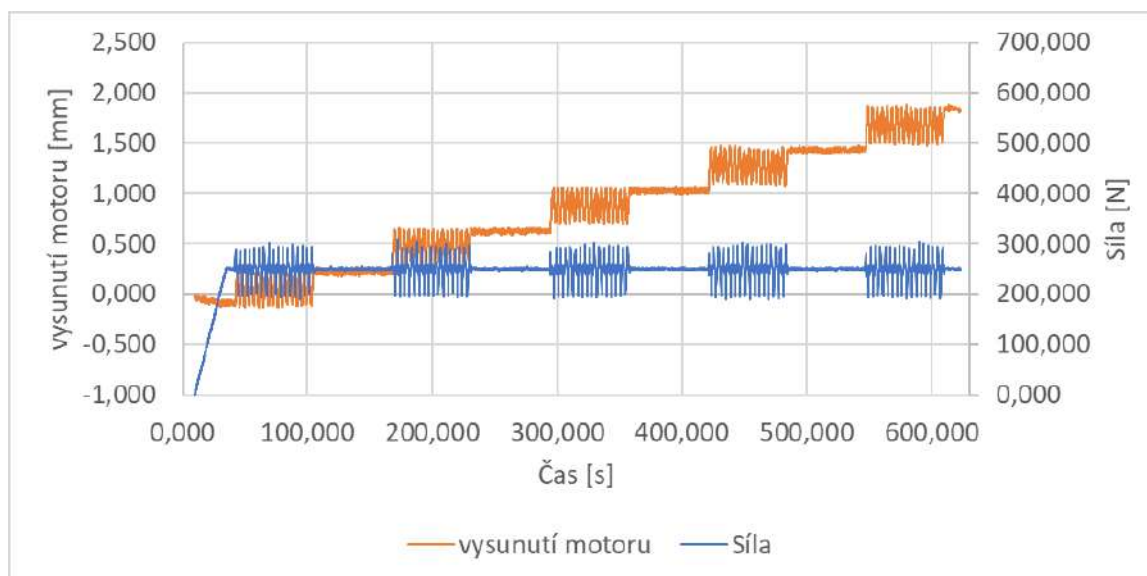
Obr. 2 Sestava posuvníku s popisem jednotlivých dílů a součástí



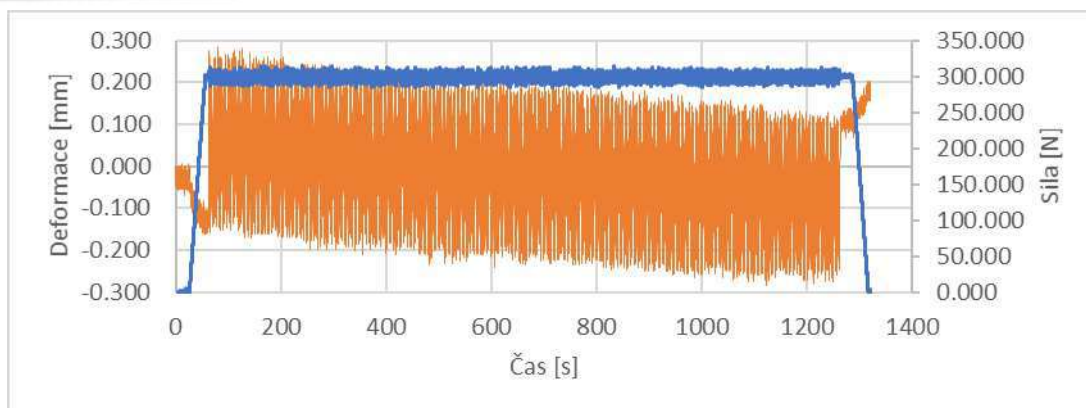
Posuvník byl v rámci řešeného projektu podroben mechanickému testování s cílem ověřit zejména stabilitu šroubového vedení motoru a jeho odezvu na přiměřené i extrémní zatížení. Testy byly prováděny na únavovém zatěžovacím stroji LITEM VDC-A-6 s pneumatickým systémem řízení síly/deformace (Obr. 3). V rámci experimentu byla nejprve provedena cyklická zatěžování s krátkodobým působením a následně střednědobé zatěžování s vyšší hladinou síly. Zatěžování bylo provedeno pro síly velikostí 0N, 100N, 150N, 200N, 250N a 300N. Výsledky vybraných cyklů jsou prezentovány v grafech, viz Obr. 4 a Obr. 5.



Obr. 3 Testování posuvníku ve stroji LITEM VDC-A-6



Obr. 4 Graf vývoje cyklického vysouvání motoru při konstantní síle velikosti 250 N. Cyklus 4: zatížení 250 N, amplituda cyklování motoru 400 μ m, časový režim: 60 s cyklování – 60 s pauza – 5 opakování.



Obr. 5 Graf vývoje cyklického vysouvání motoru při konstantní síle velikosti 300 N a době zatěžování 20 minut.

Z provedených opakovaných cyklických testů není patrný žádný negativní vliv krátkodobého zatěžování. Všechny zatěžovací cykly shodně dosáhly stanovené horní hranice výsuvu 2 mm a lze tedy konstatovat, že způsob uchycení motoru, únosnost závitové tyče a celého systému je pro daný postup dostatečný. Extrémní zatížení ukázalo mírný pokles celkového výsuvu motoru, došlo k mírnému zatlačení závitové tyče do nitra motoru a mírnému zatlačení motoru do pouzdra. Z grafu je patrné, že tento pokles výsuvu není nijak zásadní, finální rozdíl v maximální výšce výsuvu na začátku a na konci měření činí 0,18 mm.

Poděkování: Tento příspěvek vznikl na základě podpory grantu TAČR TH02020199.

středa 10:40 (S)

Kristýna Kubášová¹, Radek Sedláček¹, Lucie Vištejnová², Maria Štěpánková³ a Pavel Klein²

Vliv fixace dlahou na mechanické vlastnosti žeber při tříbodovém ohybu

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 00 Praha 6

²Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Biomedicínské centrum, alej Svobody 1655/76 301 00 Plzeň,

³Klinik für Thoraxchirurgie, Fachkliniken Wangen, Am Vogelherd 14, 88239 Wangen im Allgäu

Kristyna.Kubasova@fs.cvut.cz

Tato práce se zabývá vlivem fixace dlahou na mechanické vlastnosti zlomených žeber při tříbodovém ohybu. Metodika experimentu byla založena na stanovení maximální síly a maximálního ohybového napětí potřebného pro zlomení žebra ve tříbodovém ohybu. V rámci experimentu byly vyhodnoceny další parametry (tuhost v ohybu, maximální ohybová moment, maximální průhyb atd.). Celkem bylo testováno 9 vzorků od 4 experimentálních zvířat. Analýza byla zaměřena na porovnání parametrů vyhodnocených z naměřených dat pro žebra ošetřena dlahou a pro žebra bez fixace dlahou. Takto naměřená a vyhodnocená data byla dále statisticky analyzována.



Obr. 1 Silový snímač, speciální přípravek pro tříbodový ohyb a vzorek Z3_2

středa 11:00 (S)

Luboš Řehounek¹, Aleš Jíra¹, Gabriela Javorská¹ a Daniel Bodlák²

Statické zatěžovací zkoušky a numerické porovnání rozdělení napětí dentálních implantátů s externím a interním připojením abutmentu

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta stavební, Katedra mechaniky, Thákurova 7
166 29 Praha 6

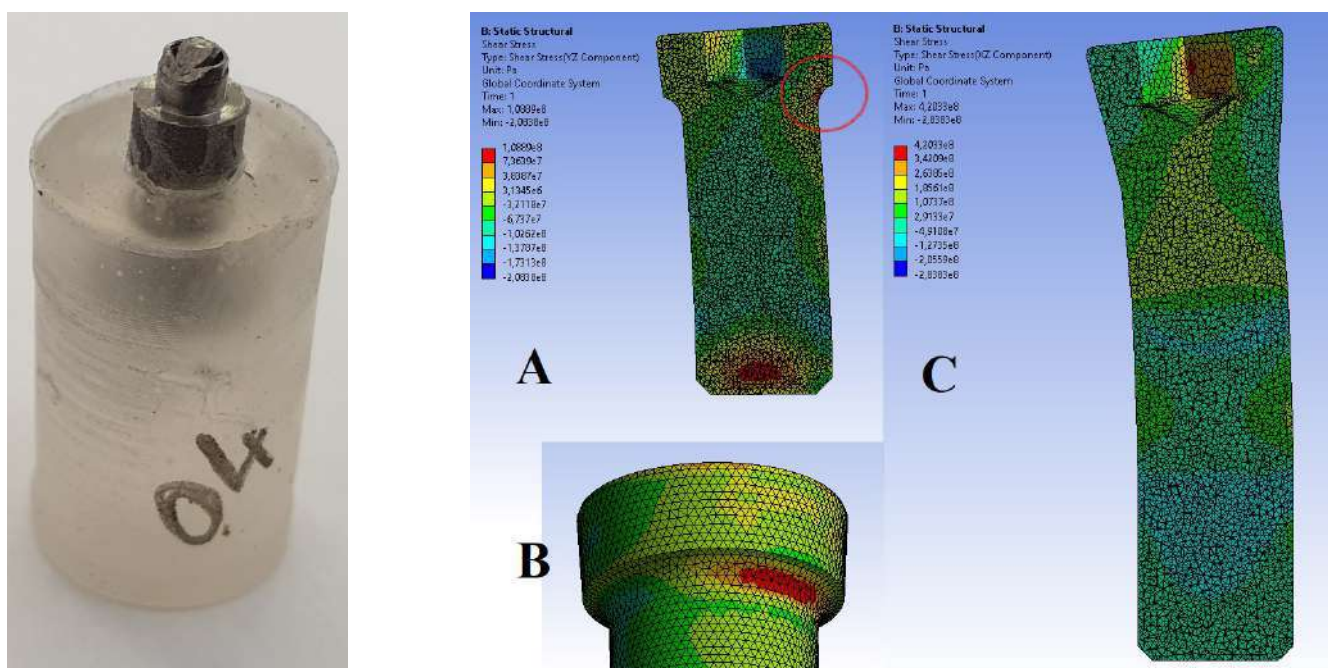
²ProSpon spo. s.r.o., Jiřího Voskovce 3206, 272 01 Kladno

lubos.rehounek@fsv.cvut.cz

Většina moderních dentálních implantátů se dělí dle svého připojení abutmentu a nitrokostní části na 2 kategorie – s vnější či s vnitřní fixací. Motivace přecházet ze systému vnější fixace, jež byl použit u prvních dentálních implantátů, na systémy s vnitřní fixací může být např. zmenšení úbytku kosti v okolí implantátu, zlepšení antiotační stability, mechanického působení, zmenšení micromotionu či zmenšení mikromezer, které vznikají mezi abutmentem a nitrokostní částí při použití systému externí fixace a mohou vést ke kolonizaci bakteriemi a následnému vytvoření nežádoucího biofilmu. Provedli jsme mechanické testy dentálních implantátů z materiálu Ti-6Al-4V s vnější fixací dle normy ČSN EN ISO 14801 na 6 vzorcích na stroji LiTeM metodou řízené deformace a zjistili jsme, že selhání všech implantátů proběhlo formou ustříhnutí šroubu



spojujícího abutment a nitrokostní část těsně pod jeho hlavičkou. Pro zlepšení stávající geometrie jsme provedli numerickou analýzu této mechanické zkoušky dle normy a po verifikaci modelu jsme provedli další analýzu na nové variantě s vnitřním připojením abutmentu. Zjistili jsme, že distribuce napětí je na nové variantě příznivější, neboť nedochází ke koncentraci napětí v zúženém krčku šroubu pod jeho hlavičkou, kde je šroub nejužší a nejnáchylnější na smykové porušení – ustříhnutí. Pro dokončení výzkumu zbývá nově navrženou a numericky porovnanou variantu dentálního implantátu s vnitřním připojením vyrobít a podrobit mechanickým zkouškám, aby mohla být potvrzena původní hypotéza, že implantát s vnitřním připojením bude díky zmenšenému ramenu síly vzhledem k tělu implantátu méně namáhán a přenesení tak větší zatížení a nebude limitován šroubkem spojujícím abutment a tělo implantátu, jež byl u varianty s externím připojením nejslabším místem nebo bude daná maximální síla potřebná pro destrukci šroubu navýšena.



Obr. 1 Vlevo – vzorek implantátu s externím připojením zničený při mechanické zkoušce dle normy ČSN EN 14801. Vpravo – 3 obrázky s isoliniemi smykového napětí, jež bylo příčinou destrukce vzorku. A – původní externí připojení, B – detail kritického místa v „A“, C – nový implantát s vnitřním spojením abutmentu a nitrokostní části bez koncentrací smykového napětí.

středa 11:20 (S)

Alena Škubníková¹ a Petr Písařík¹

Tribologické a povrchové vlastnosti kontaktních čoček

ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno

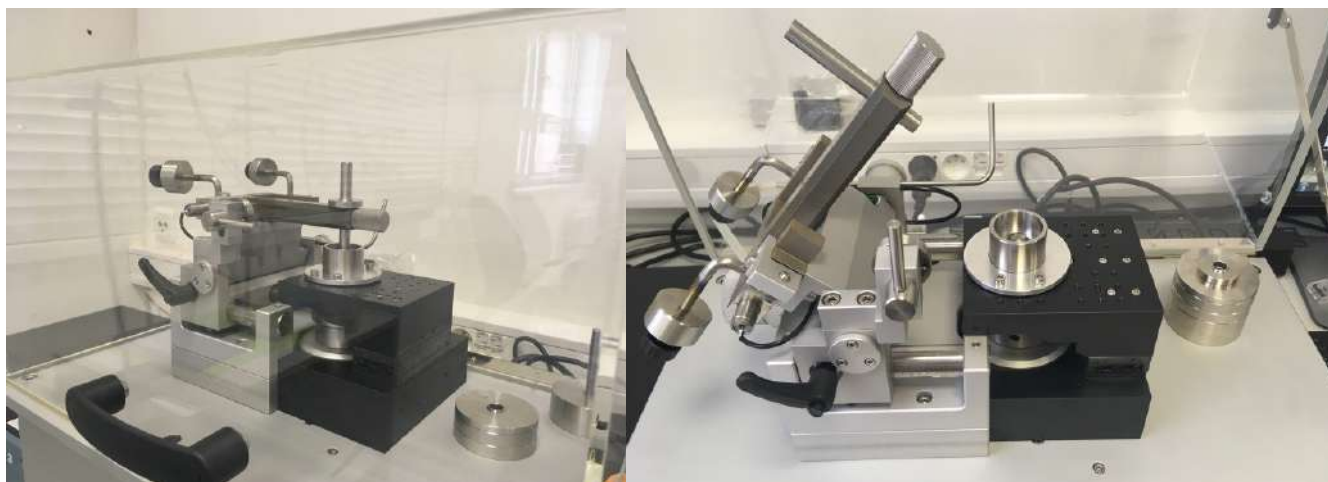
skubnale@fbmi.cvut.cz

Článek hovoří o tribologických a povrchových vlastnostech kontaktních čoček, zejména se jedná o koeficienty tření a kontaktní úhly čoček. Měření jsou prováděna na dvou typech materiálu kontaktních čoček – hydrogelové a silikon-hydrogelové. Tribologické vlastnosti jsou měřeny na přístroji tribometr Pin-on-Disk TRB³ od firmy Anton Paar, který je znázorněn na obrázku 1. Pro měření kontaktního úhlu byl použit přístroj DSA100 od firmy Krüss GmbH. K tribometru musel být vyroben speciální držák na kontaktní čočky, aby měření byla proveditelná.



Během testování byly používány dva případy experimentálních podmínek. V prvním případě jsme zvyšovali působící zatížení od 0,25 N až po 0,75 N a ve druhém případě jsme měnili rychlost pohybující se pinu z 0,2 cm/s až po 0,3 cm/s. Průměrná rychlost mrkání byla odhadnuta na 12 cm/s, kdyby byla zachována tato rychlost během experimentu, výsledky by nebyly použitelné, neboť by docházelo k deformaci zkoumaných čoček. Tudíž byla zvolena nižší rychlost. Pro zachování hydratace čoček byly během experimentu čočky neustále hydratovány pomocí fyziologického roztoku.

Se zvyšujícím zatížením i zvyšující se rychlostí se muselo více dbát na neporušenost kontaktních čoček. V prezentaci budou představeny výsledky měření kontaktních čoček.



Obr. 1: Tribometr použitý na měření koeficientu tření

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem Studentské grantové soutěže ČVUT číslo SGS19/134/OHK4/2T/17.

středa 13:30

Vítězslav Březina

Dynamika chování buněk v různých i nezvyklých prostředích

Ústav komplexních systémů, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zámek 136, 373 33 Nové Hradce

brezinavita@gmail.com

Milí spolubadatelé,

na minulém „Biomateriálním“ sedánku jsem měl několik poznámek ke vztahu

„STRUKTURA – FUNKCE – POHYB“

Někteří z nás si to kreslí jako trojúhelník, a tak se nakonec dopátrají, že se ty části navzájem skutečně ovlivňují, když trochu zaexperimentují s materiálem a svou myslí. Pro nás, kteří hodláme systematicky bádát v materiálním světě, platí ještě mimo Platónova nazírání ještě nazírání Kantovo, totiž:

„NAŠE VĚDĚNÍ NEPŘEKRAČUJE TO, CO JE OVĚŘITELNÉ NAŠIMI SMYSLY“

Což je vlastně vztah mezi smyslovou (materiální) a duševní stránkou lidské bytosti.



Na dnešním setkání biomaterialistů nám laskaví pořadatelé věnovali poněkud více času a sice, na „učené hádání“ o dynamice buněčného chování což znamená, že můžeme snad dost detailně probrat vztah živé buňky k materiálu a vztah živých buněk mezi sebou pod vlivem materiálu, za materiál můžeme samozřejmě pokládat i materiál „živý“, anebo pocházející z živého organismu. A také jak uzpůsobit techniku, abychom chování buněk mohli vnímat. To je jistě věc názorů, jen je vhodné uvažovat v toku dosavadních vědomostí, jinak řečeno, není to nic nového, spíš chceme společně probrat principiální a primitivní vztahy buněk k materiálu a jejich projevů, a snad se dopídit nových myšlenek, které mohou naplnit obsah příštích výzkumů. Například zda je technicky možné učinit modelově prostředí, které bude blízké takové matrix, aspoň tak, jak si ji představujeme. Víte asi, že naše parta tkáňových kulturistů v Nových Hradech se výrazně specializuje na vztah živých buněk a různých materiálů, namátkou jen vlákna, či nanovlákna (Liberec Věra), kovových implantátů (Brno Jiří), kompositů (Praha Tomáš), kolagenů (Plzeň Lucka) a mohli bychom jmenovat celou řadu dalších. Naše parta totiž pořádá tak zvané „kooperativní workshopy“ kde se zúčastnění seznámí s našimi mikrokinematografickými metodami a my se seznámíme s problémy a úskalími při tvorbě materiálů. A také k nám jezdí i studenti ze spřátelených pracovišť, aby u nás zpracovali kousek diplomové, nebo disertační práce. Máme na to vše nejenom podmínky, ale i vůli nadřízených. A navazujeme další spolupráce, jsme i nadále otevření. V té souvislosti bych si dovilil ještě jednu myšlenku dosti neznámého filosofa Hanse von Balthasara: „VŠE ZKOUMEJTE, A CO JE DOBRÉ, TOHO SE DRŽTE“.

středa 13:50

Vítězslav Březina a Zdeněk Hubač

Hodnocení lokomoce živých buněk in vitro

Ústav komplexních systémů, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

[**brezinavita@gmail.com**](mailto:brezinavita@gmail.com)

První, co na mikrokinematografických snímcích buněk in vitro zaujme je jejich pohyb po substrátu, známý jako lokomoce. Pozorovat takový pohyb je sice strhující, ale je třeba lokomoci nějak kvantifikovat. To proto, abychom mohli srovnávat pohyby buněk na různých substrátech, nebo v různých prostředích, třeba prostorově vrstvených. Tady jde většinou o střet dvou povrchů, chcete-li interakci mezi dvěma povrchy. A také o adhesivní mechanismy živých buněk, které adherují na podložku, ta může být jak neživá, tak živá.

Tak jsme analyzovali dráhy, které buňky urazí během celého buněčného cyklu, srovnali jsme délky drah sesterských buněk, a provedli analýzu kratších úseků drah během cyklu. Buňky jsme užili L 929, což je heteronukleární buněčná linie odvozená z myši a chová se jako fibroblast. Zatím jsme provedli pokusy na rovinném substrátu, tedy na podložce dna kultivační lahve, anebo povlaku z PPY a PANI, získané z Baťovy fakulty ve Zlíně laskavostí doc. Humpolíčka. Dalším krokem byla analýza lokomoce ve výluzích (macerát) z rostliny Impatiens (Svízel).

Závěr je jednoznačný: abychom charakterizovali lokomoční potenciál, postačí „stopovat“ šest buněk v jednom zorném poli kamery po dobu dvou hodin a ve dvacetiminutových intervalech. Přitom jsou měřeny vzdálenosti v jednotlivých úsecích, vzdálenosti od počáteční polohy buňky ke každé aktuální poloze stejné buňky, pokud jde o dráhy a potom totéž, pokud jde o úhly. Vzdálenosti jsou měřeny v pixelech, pochopitelně s převodem na mikrometry. Užita je statistická



metoda analýzy variance, která hodnotí, zda jsou rozptyly podobné v rámci nějaké pravděpodobnosti, ale nehodnotí, zda průměry mohou patřit do stejného základního souboru (t – test). To ovšem je pro takovou analýzu vyhovující. Analytický měřicí program zhotovil a poskytl Ing. Petr Císař, Ph.D. z FROV JČU.

středa 14:10**Vítězslav Březina¹ a Ivan Jirka²****Interakce živých buněk a krystalů silikalitu**

¹Ústav komplexních systémů, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

²Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, v.v.i., Dolejškova 3 182 00 Praha 8

brezinavita@gmail.com

Krystaly silikalitu mají pravidelnou strukturu a mohou být užity jako povlaky specializovaných implantačních materiálů. Některé zeolity jsou z různých příčin velmi cytotoxické, my jsme studovali jeden druh zeolitů: silikalit, o kterém se v literatuře tvrdí, že cytotoxický není. Jsou biokompatibilní ve smyslu že nepůsobí toxicky a jejich vztah k živým buňkám je obvykle neutrální. Mohou být užity jako vrstva na povrchu nějaké hmoty, anebo jako volná suspenze v tekutém prostředí. V obou variantách byla interakce podrobena analýze v prostředí *in vitro*. Jako vrstva na materiálech byla hodnocena schopnost růstu na upraveném povrchu pomocí kinetické studie způsobu kolonizace ve třídní kultivaci buněk MG63. Byl zjištěn rozdíl obsazené plochy povrchu, který závisel na užitém podkladovém materiálu. Vlastní vzájemné dotyky byly analyzovány pomocí SEM, kdy povrchové membrány buněk často obklopují krystal. Byla pozorována větší frekvence tvorby filopodií jako jedné formy výběžků cytoplasmy předcházející tvorbu adhesivních okrsků membránové struktury. Jako suspenze krystalů v živném médiu DMEM (minimální živné médium) byla pozorována reakce, kdy byly krystaly buňkami zachyceny a sunuty povrchovými membránami buněk v rozmanitých směrech, anebo byly buňkami pohlceny, pak byl směr jejich pohybu obvykle přímočarý s cílem do okolí buněčného jádra. Pokud šlo o pohlcení krystalu buňkou pak se to děje výhradně v prostoru akce undulující membrány za pokračující lokomoce buňky. Toto bylo dokumentováno pomocí sběrné mikrokinematografie a záznamy jsou k dispozici v prezentaci.

středa 16:00**Jaroslav Fojt, Vojtěch Hybášek, Luděk Joska, David Nečas a Jitřenka Jířů****Detekce změn pH pomocí modifikovaných povrchů titanu**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, Technická 5, 166 28 Praha 6

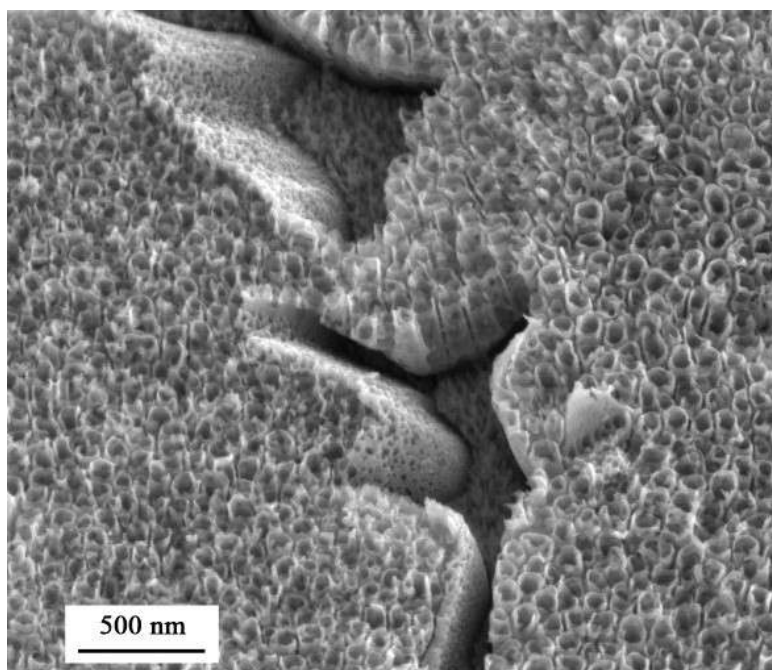
fojtj@vscht.cz

Jednou z komplikací, ke kterým může dojít po aplikaci implantátu, je vznik infekce v místě jeho uložení, kterou provází zvýšení oxidační schopnosti prostředí a pokles pH. Oxidy kovů na změnu pH reagují změnou ve svých elektrochemických vlastnostech, a ačkoliv tento mechanismus stále



nebyl přesvědčivě vysvětlen u všech materiálů, využívají se některé z nich pro detekci pH. Povrch titanových implantátů, ať už broušený či nanostrukturovaný, je těmito oxidy tvořen také a nabízí se tedy možnost detekovat infekci pomocí čipu, který by na bázi dvoelektrodového zapojení měřil vybrané veličiny přímo na povrchu implantátu. Referentní elektrodu by v takovém případě tvořilo samotné tělo implantátu a senzitivní elektrodu malý terčik na povrchu s případnou modifikací povrchu v podobě nanostruktury. Ta poskytuje výhodu velkého povrchu a mohla by tak být zvýšena citlivost senzoru. V rámci přednášky budou prezentovány dosavadní výsledky měření detekce změn pH pomocí oxidů vytvořených na slitině TiAlV. Porovnány budou povrchy nanostrukturované, kompaktní a nativní. Dále bude diskutována využitelnost jednotlivých elektrochemických technik pro detekci změn prostředí.

Práce byla podpořena Agenturou pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví ČR v rámci projektu NU20-06-00424 - Implantabilní senzory pro včasnou detekci zánětu a bakteriální kolonizace.



Obr. 1 Nanostrukturovaný povrch slitiny Ti-6Al-4V.

středa 16:20

Jitřenka Jírů, Eva Průchová, Vojtěch Hybášek a Jaroslav Fojt
Elektrochemický monitoring formování biofilmu G+ a G- bakterií

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství,
Technická 5, 166 28 Praha 6

jiruj@vscht.cz

Infekce spojené s ortopedickými implantáty představují závažné komplikace častokrát s významným dopadem na kvalitu života pacientů. Může se jednat o oddálení hojení, které může vést k trvalé funkční ztrátě nebo dokonce amputaci postižené končetiny. Zhruba 5 % všech implantovaných zařízení je kontaminováno patogeny, které následně způsobují rozsáhlé infekce. Přítomnost cizího materiálu v těle pacienta navíc výrazně zvyšuje náchylnost k infekci, protože



osteosyntetické materiály bývají přednostním místem pro adhezi bakterií. Z těchto důvodů se jeví jako efektivní kotvit antibakteriální látky přímo na povrch takového biomateriálu. Na titanu a jeho slitinách lze anodickou oxidací v prostředí fluoridových iontů vytvořit nanostrukturu v oxidu základního kovu a tuto plochu lze následně využít pro kotvení antibakteriálních látek, například stříbra, které působí inhibičně na celou škálu mikrobů.

Elektrochemické metody umožňují detekovat změny na fázovém rozhraní. V rámci výzkumu bylo reálné rozhraní implantát – okolní tkáň simulováno kovovým (Ti, Ag) pinem – gelovitým agarem. V závislosti na tvrzeních o odlišné sensitivitě grampozitivních a gramnegativních bakterií bylo cílem práce vhodně optimalizovat monitorující metodu formování biofilmu jak pro G^+ (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) tak i pro G^- (*Staphylococcus aureus*) druhy bakterií. Obecně mají G^+ i G^- bakterie jiné nutriční požadavky, vyžadují odlišná kultivační média a také doba jejich kultivace může být jiná.

Záznam OCP, Rp a EIS umožnil *in-situ* monitoring formování biofilmu a porovnání různých vývojových stádií patogenů na odlišných povrchových modifikacích testovaných vzorků. Po zafixování biofilmu byly kovové piny také pozorovány elektronovým mikroskopem, kde bylo zřetelně vidět pokrytí povrchu kolonizujícími bakteriemi.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2020).

středa 16:40

**Lukáš Vacek¹, Martin Šorm², Filip Růžička¹, Pavel Kožmín², Pavel Zeman³
a Libor Dvořák⁴**

***In vitro* testování laserem mikrostrukturovaných povrchů slitiny Ti6Al4V z hlediska bakteriální adheze**

¹Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Pekařská 53, 656 91 Brno

²Hofmeister s.r.o., Daimlerova 9, 301 00 Plzeň

³Ústav výrobních strojů a zařízení (RCMT) při ČVUT, Horská 3, 128 00 Praha 2 – Albertov

⁴VÚTS, a.s., Svárovská 619, Liberec XI – Růžodol I, 460 01 Liberec

sorm@hofmeister.cz

Současné laserové technologie umožňují vytvářet mikrostrukturované 2D i 3D povrchy, které mohou výrazně pozměnit jejich optické chování, tribologické vlastnosti či ovlivnit interakci mezi buňkami nebo bakteriemi a povrchem samotným. Na rozdíl od např. chemických metod úprav povrchů je možné takové struktury vyrábět lokálně pouze v místech, kde je požadována změna vlastností, a navíc s plně kontrolovanou vzájemnou orientací struktury a vzorku.

V této práci bylo hlavním motivem vytvořit takové struktury na povrchu titanové slitiny Ti6Al4V, které by ovlivnily míru bakteriální adheze a usnadnily čištění povrchů ať už za pomoci jednoduchého oplachu nebo ultrazvukové čističky. Při použití laserové stanice s ultrakrátkou délkou pulzu 240fs (tzv. femtosekundový laser) bylo vytvořeno několik typů struktur, kde rozměry opakujících se entit byly od stovek nanometrů až po desítky mikrometrů. Podoba struktur byla



tedy navržena s ohledem na výše zmíněné technické parametry laserového zdroje s cílem dosažení co nejlepších výsledků zmíněných vlastností. Následně byla testována míra adherence buněk druhů *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* k vytvořeným povrchovým strukturám. Testované vzorky byly ponořeny do bakteriální suspenze po dobu dvou hodin za mírného třepání. Poté byly opláchnuty dvěma různými způsoby, a to jemně ve fosfátovém pufru a pomocí sonikace v ultrazvukové lázni. Dále byly barveny fluorescenčním barvivem SYBR Green I. Vzorky byly nasnímány fluorescenčním mikroskopem s CCD kamerou při celkovém zvětšení 100x, 200x a 400x. Poté byly vyhodnoceny počty a rozmístění adheovaných bakteriálních buněk. Výsledky, které budou představeny v rámci prezentace, mají potenciál nalézt uplatnění jak v průmyslových aplikacích, tak v medicíně např. při návrhu pokročilých implantátů nebo různých druhů antibakteriálních povrchů a krytí.

Tato práce vznikala za podpory projektu: „Laserové technologie pro mikrostrukturování bionických a funkčních povrchů pokročilých materiálů“, identifikační kód projektu FV30265, poskytovatel Ministerstvo průmyslu a obchodu.

středa 17:00 (S)

Lucie Košinová¹, Petr Písařík¹, Zdeněk Tolde² a Jan Brajer³

Modifikace vlastností materiálů používaných na moderní endoprotézu kyčelního kloubu

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Sítňá 3105, 272 01 Kladno

²České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Karlovo náměstí 13, 121 35 Praha 2

³HiLASE Centrum, Fyzikální ústav, Akademie věd České Republiky, Za Radnicí 828, 252 41 Dolní Břežany

kosinluc@fbmi.cvut.cz

V ortopedické aplikaci je nevyhnutelná totální náhrada kyčelního kloubu pro zlepšení kvality života pacienta trpícího artritidou. Zatímco náhrada kloubů představuje úspěchy v oblasti ortopedické chirurgie, udržování implantátu po dlouhou dobu je stále výzvou. Průměrná životnost náhrady kyčelního kloubu je asi 15 let.

V začátcích byly jako biomateriály používány na základě pokusů a omylů různé druhy přírodních materiálů (jako je dřevo, lepidlo, guma, železo, zlato a zinek). Biomateriály mají fyziologicky přijatelným způsobem nahradit část těla nebo jeho funkci. Pro kyčelní kloub je důležité, aby byl chemicky inertní a měl dobré mechanické vlastnosti.

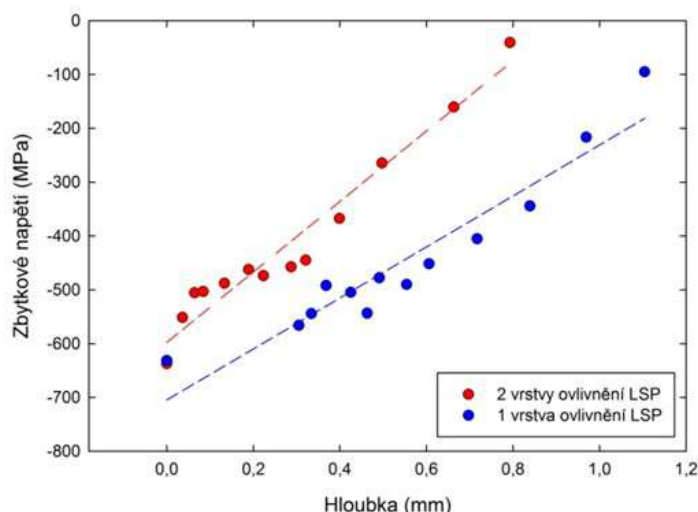
V 21. století je lékařské inženýrství důležitou oblastí technologického rozvoje. Návrh, vývoj a výroba lékařských implantátů, které nahrazují poškozené funkce těla nebo orgánů, jsou pro stárnoucí populaci velmi důležité.

Hlavním omezením totální náhrady kyčelního kloubu je její životnost, která není uspokojivá pro pacienty mladší 60 let. Selhání implantátu může být způsobeno uvolněním opotřebovaných částic z nosného povrchu implantátu. Prodloužení délky života implantátu si tak vyžaduje větší pozornost. Cílem vývoje alternativního materiálu je vytvořit kloub se sníženou mírou tření a opotřebení, ale se zvýšenou pevností.

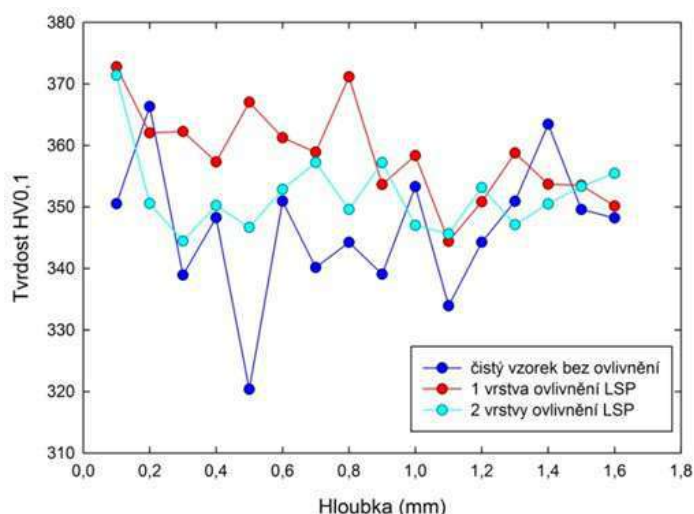


Laser Shock Peening (LSP), neboli vytvrzování povrchu materiálu rázovou vlnou vyvolanou laserem, je velmi moderní a progresivní technologií, která umožňuje výrazné zvýšení únavové životnosti cyklicky namáhaných součástí. Laserový paprsek generuje v povrchové vrstvě zpracovávaného materiálu tlaková zbytková napětí, která významně zlepšují únavové vlastnosti materiálu. Toto měření bylo provedeno pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD) a hodnoty byly vyneseny do grafu 1. Měřením byl zjištěn průběh zbytkového napětí u vzorků ovlivněných metodou LSP. Tlakové zbytkové napětí dosahuje velmi velké hodnoty hlavně v podpovrchové vrstvě. Toto napětí se pohybuje kolem 600 MPa a sahá do hloubky přibližně 0,4 mm. Ve větší hloubce materiálu dochází k postupnému poklesu zbytkového napětí až na nulovou hodnotu v hloubce okolo 1 mm.

Tvrдость je významnou mechanickou vlastností materiálů. Lze ji definovat jako odolnost materiálu či povrchu materiálu v měřené lokalitě proti místní deformaci vyvolané konkrétním zatěžovacím tělesem. Vrypové zkoušky se používají pro tvrdé a křehké materiály. Na grafu 2 je měření tvrdosti HV_{0,1} v příčném řezu materiálu, aby bylo možné lépe zachytit i malé změny tvrdosti od povrchu směrem do materiálu. Každá hodnota se skládá z průměru 3 naměřených hodnot v dané hloubce po 0,1 mm až do hloubky 1,6 mm. Z naměřených hodnot v každé hloubce byl vypočítán aritmetický průměr.



Graf 1: Závislost zbytkových napětí na hloubce změřena metodou elektrolytického odleptávání na vzorku Ti6Al4V ovlivněného metodou.



Graf 2: Závislost tvrdosti materiálu HV 0,1 na vzdálenosti od povrchu vzorku Ti6Al4V zpracovaného technologií LSP.



V obou případech ovlivnění vrstvou 1 a 2 (graf 2) byl změřen nárůst tvrdosti v povrchové vrstvě. Zvýšení tvrdosti přibližně odpovídalo 8 % z celkové tvrdosti bez ovlivnění a dosahovalo do hloubky 1 mm.

Metoda LSP ovlivňuje integritu povrchu. Po zpracování mírně vzrůstá tvrdost a mění se i struktura povrchové a podpovrchové vrstvy, a proto je na opracovávání implantátů vhodná.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem Studentské grantové soutěže ČVUT číslo SGS19/134/OHK4/2T/17

středa 17:20

Petr Vlčák¹, Jaroslav Fojt², Jan Drahokoupil¹, Josef Šepitka¹, Vítězslav Březina¹, Jan Mikšovský³ a Michal Haubner¹

Charakterizace povrchu titanu po mechanickém leštění, chemickém, elektrochemickém a iontovém leptání

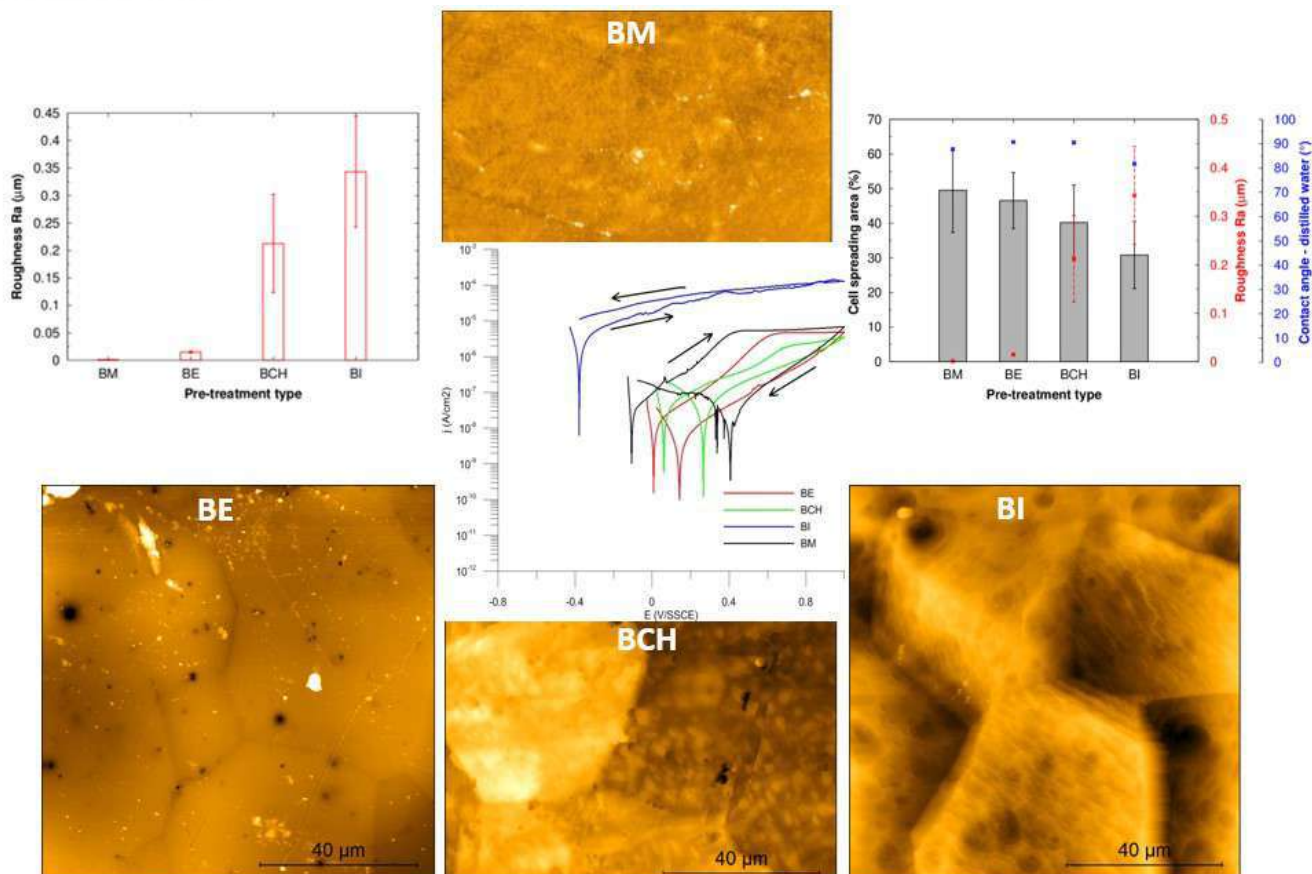
¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Technická 4, 16607 Praha 6

²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, Technická 5, 166 28 Praha 6

³České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno

petr.vlcak@fs.cvut.cz

V povrchovém inženýrství titanových materiálů hrají předúpravy povrchu klíčovou roli pro úspěch povlakovacích procesů a povrchových modifikací v širokém rozsahu aplikací od letectví po biomedicínu. Byl studován dopad čtyř technik předúprav na povrchové vlastnosti, korozní odolnost a kolonizaci buněk MG-63. Povrch komerčně čistého titanu grade II (A) a slitiny TiNbZrTa (B) byl mechanicky leštěn (BM), chemicky leptán (BCH), elektrochemicky leptán (BE) a iontově rozprašován (BI). Povrchy vykazovali specifické morfologické znaky v makro i mikro měřítku odrážející povahu úběru povrchové vrstvy. Výrazné zdrsnění povrchu a charakteristická mikrotopografie se projevila po chemickém leptání a iontovém odprašování jako důsledek vlivu orientace zrn. Experiment ukázal, že úběr vrstvy materiálů o tloušťce 5 μm se projeví změnou zbytkového pnutí a povrchové tvrdosti. Studované techniky předúprav ovlivnily složení pasivační vrstvy nativních oxidů TiO, TiO₂ a Ti₂O₃. To se projevilo na smáčivosti a korozní odolnosti. Korozní odolnost titanového povrchu ve fyziologickém roztoku byla významně snížena iontovým odprašováním. Buňkami kolonizovaná plocha zaujímala klesající trend s klesající korozní odolností testovaných povrchů.



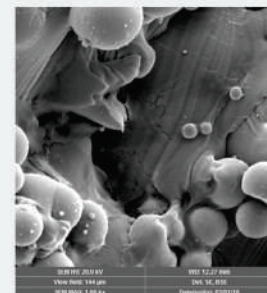
středa 17:40 (S)

Denisa Svobodová, Zdeněk Tolde 3D tisk beta titanových slitin

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav materiálového inženýrství. Technická 4, 166 07 Praha 6

Denisa.Svobodova@fs.cvut.cz

Využití klasických slitin pro biomedicínu zejména slitiny Ti6Al4V už nestačí z důvodu jejich toxicity, negativnímu vlivu na organismus a jejich vysokému modulu pružnosti, a proto je nutné hledat jiné možnosti využití slitin titanu, a to zejména beta slitin, které vykazují mnohem lepší vlastnosti než již výše zmíněná slitina Ti6Al4V. 3D tisk je perspektivní technologie v biomedicíně, a proto je práce věnována 3D tisku beta titanové slitiny Ti25Nb4Ta8Sn. Cíle práce bylo porovnat prášky slitiny titanu Ti6Al4V a beta titanové slitiny Ti25Nb4Ta8Sn, jejich chemické složení, zda odpovídá předepsané slitině. Dále byla hodnocena struktura a povrchové vlastnosti slitiny Ti25Nb4Ta8Sn po prvních pokusech 3D tisku.



růst kostních buněk na povrch
3D tištěného vzorku



náhrada části čelisti s vrstvou DLC



krátký dřík s plně porézním povrchem



podpůrná dlaho pro jamku kyčelního kloubu



jamka kyčelního kloubu s integrovaným porézním povrchem

3D tisk z titanových slitin

- bionické řešení kloubních náhrad
- přímá výroba individuálních implantátů i nástrojů
- 25 let na trhu
- aditivní SLM technologie 3D tisku z práškového materiálu Ti6Al4V a Ti



17.9.2020

ČTVRTEK
Č. a. De. H.



Timothy E.L. Douglas Whey Protein Isolate hydrogels as biomaterials

Engineering Department, Lancaster University, Lancaster, United Kingdom
Materials Science Institute (MSI), Lancaster University, Lancaster, United Kingdom

t.douglas@lancaster.ac.uk

Whey Protein Isolate (WPI) is a byproduct from the dairy industry whose main component is beta-lactoglobulin (β -LG). When added to cell culture medium, WPI has stimulated the proliferation and osteogenic differentiation of human-derived adipose stem cells and also osteoblastic cell lines.

Hence, we hypothesized that biomaterials fabricated from WPI would support cell growth. Upon heating of a WPI solution, hydrogels form thanks to formation of crosslinks between β -LG molecules. Importantly, these hydrogels can be sterilized by autoclaving, an important practical advantage.

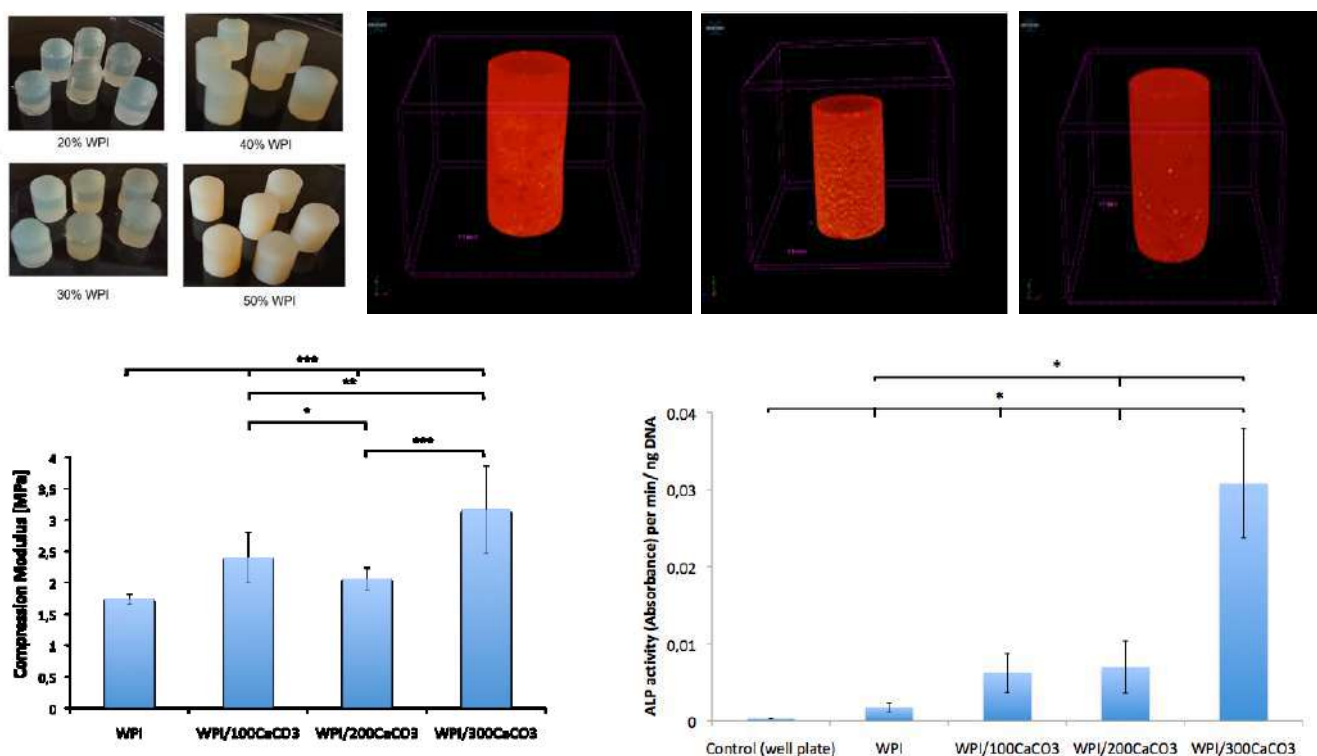


Fig. 1 Top left: WPI hydrogels containing 20-50% WPI after autoclaving. Top right: Micro-CT images of 40% WPI hydrogels containing (left to right) 10, 20 and 30% aragonite. Bottom left: effect of addition of 10% aragonite (WPI/100CaCO₃), 20% aragonite (WPI/200CaCO₃) and 30% aragonite (WPI/300CaCO₃) to compressive modulus of WPI hydrogels. Bottom right: effect of addition of aragonite on ALP activity of MG-63 osteoblast-like cells. P values: *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$

A range of cells have been successfully cultivated on WPI hydrogels in the concentration range 20-50% (w/v). Furthermore, it is possible to improve the biological performance of WPI hydrogels by incorporation of a mineral phase, e.g. by addition of particles of aragonite (Figure 1) or alpha-tricalcium phosphate (α -TCP). By adding other particles, such as carbon nanotubes, it is possible to impart antibacterial activity. Furthermore, it is possible to solubilize hydrophobic molecules



with biological activity (e.g. polyphenols) within the WPI hydrogel network to endow hydrogels with antimicrobial activity.

This presentation will highlight a few of the aforementioned strategies.

čtvrtek 9:20

Martin Bartoš^{1,2}

Augmentační materiály v dentální implantologii

¹Stomatologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova

²Anatomický ústav, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova

martin.bartos@lf1.cuni.cz

Ošetření dentálními implantáty dnes představuje běžný způsob terapie ztráty zubu (např. v důsledku kazu, traumatu či selhání zachovného ošetření). Jednou z podmínek implantace je dostatečné množství kostní tkáně, které zajistí osseointegraci implantátu. S rozvojem dentální implantologie a s narůstajícím zájmem o toto ošetření se též zvyšuje počet pacientů, jejichž kostní nabídka není pro implantaci dostatečná. Takovou situaci lze většinou řešit využitím augmentačních postupů a materiálů různého složení. Jedná se o klinicky užívané postupy s vysokou úspěšností. Přesto však doposud není objasněna řada základních otázek: jaká tkáň v místě augmentace vzniká, jaká je dlouhodobá stabilita, jaké klinické postupy jsou v dané indikaci výhodné a které nikoliv, jaké materiály použít. Z pohledu evidence based medicine se jedná o oblast nedostatečně probádanou. Příspěvek má za cíl stručně uvést tuto problematiku z klinického pohledu.

Podpořeno projektem Progres Q29/LF1.

čtvrtek 9:40 (S)

Dagmar Poláková^{1,2}, Iva Víchová¹, Markéta Schaabová¹, Lenka Martinová³ a Alena Ševců¹

Kombinované nosiče na bázi silk fibroinu a hydroxyapatitu pro ortopedické aplikace

¹Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, Technická univerzita v Liberci, Bendlova 7, 460 01 Liberec

²Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, Technická univerzita v Liberci, Studentská 2, 460 01 Liberec

³Fakulta textilní, Technická univerzita v Liberci, Studentská 2, 46001 Liberec

dagmar.polakova@tul.cz

Silk fibroin (SF) je přírodní protein izolovaný z kokonů bource morušového, tradičně využívaný především v textilním průmyslu. Zároveň však SF vykazuje kompatibilitu vůči lidským buněčným liniím, biodegradabilitu a nízkou míru imunogenicity. Cílem naší práce bylo vytvoření výplňového



materiálu o vhodné morfologii, který by umožňoval spojení unikátních vlastností SF a nanočástic hydroxyapatitu (HA) jako přirozené součásti kosti. V rámci profylaxe vzniku postoperativní bakteriální infekce byly kombinované částice doplněny také o gentamicin sulfát, antibiotikum se širokým spektrem účinku.

Metodou vkapávání vodného roztoku SF s příměsí HA a modelového antibiotika do tekutého dusíku byly vytvořeny kombinované sférické částice o průměru 2-3 mm ve škále hmotnostního poměru hydroxyapatitu vůči silk fibroinu od 0 do 50%.

Kompatibilita vzniklých nosičů byla testována na buněčné linii lidských osteoblastů (MG63), kdy ani jeden z připravených materiálů nevykazoval cytotoxický efekt. Morfologie nosičů byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Příměs antibiotika výrazně ovlivnila růst modelových kmenů grampozitivních i gramnegativních bakterií při přímém kontaktu s nosiči, zároveň však výrazně nenarušovala jejich kompaktnost ani morfologii. V budoucnosti bude nezbytné doplnit výsledky také studií v *in vivo* podmínkách.

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2020, dále Technologickou agenturou ČR grantem TH03020281 a MŠMT v rámci programu Operační program a Výzkum a vzdělávání projektem Hybridní materiály pro hierarchické struktury CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000843.

čtvrtek 10:20

Edgar B. Montufar, Mariano Casas-Luna, Adelia Kashimbetova, Karel Slámečka, Serhii Tkachenko, Tomáš Zikmund, Ladislav Čelko and Jozef Kaiser

Additive manufacturing technologies for bone tissue engineering scaffolds

Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkyňova 123, 612 00 Brno

eb.montufar@ceitec.vutbr.cz

Additive manufacturing offers valuable advantages in front to traditional moulding or subtracting manufacture approaches, including 1) large and small production of extremely complex shapes, 2) fast prototyping of reliable implants without the fabrication of new moulds or dies, 3) customize the implant design to patient-specific demands, 4) combine the advantages of material intrinsic properties with the structural design, which results in superior and reproducible mechanical and biological properties, 5) rapidly spread of optimized designs and 6) all at competitive costs with less waste. This contribution provides the current state of the art in additive manufacturing technologies for bone tissue engineering scaffolds, with particular attention in the processing of osteogenic calcium phosphate scaffolds by the robotic-assisted deposition method, which is also called direct ink writing, robocasting, microextrusion or 3D plotting. The technique is based on the automated deposition of extruded rods following an *in silico* design pattern. After the first layer of the scaffold is printed, the extrusion nozzle is raised to deposit the next layer and the process is repeated until completion of the 3D structure. This simple process allows to design and



create scaffolds in a variety of shapes and sizes, controlling the porosity, pore size and pore geometry by setting the *in silico* deposition pattern that is followed to build each layer. The successful outcome of robocasting depends on the rheological optimization of the extruded material and proper selection of the extrusion conditions. The ideal material for robocasting should be pseudoplastic with a distinct yield point and fast recovery of storage modulus after extrusion, which provides shape retention of the printed rod and yet allows the deposition of the material due to shear-thinning behaviour when subjected to shear forces within the printing nozzle. Commonly, the green scaffold is dried, debound and finally a sintering processes is carried out to consolidate it [1], but also biomimetic consolidation methods that result in more similar composition and microstructure than bone can be performed [2]. Moreover, robocasting allows to extrude cell-loaded hydrogels to printing biological tissues (bioprinting), obtaining benefit from the computer-aided design [3]. The structural design variables such as the diameter of the rod, the distance between rods, overlapping between layers, geometric pattern, rotation and possible shifting between layers, together with the processing parameters and material's properties, dictate the dimensional accuracy, the mechanical performance and the biological properties of robocast scaffolds [4, 5].

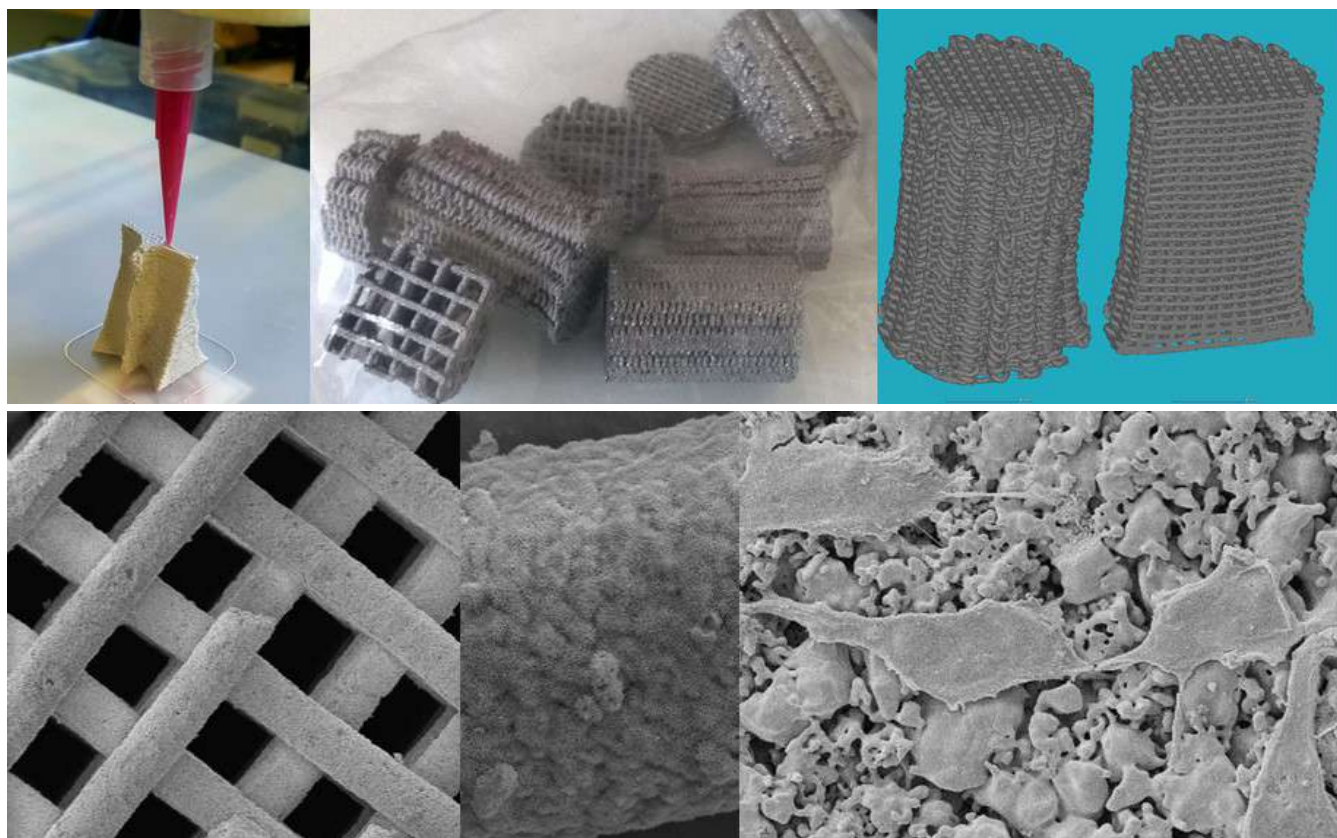


Fig. 1 Robocasting process, examples of the structure of robocast scaffolds, and cells growing on the rods.

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant 19-22662S).

1. M. Casas-Luna, et al. Enhancement of mechanical properties of 3D-plotted tricalcium phosphate scaffolds by rapid sintering. *Journal of the European Ceramic Society* 2019, 39, 4366–4374.
2. S. Raymond, et al. Accelerated hardening of nanotextured 3D-plotted self-setting calcium phosphate inks. *Acta Biomaterialia* 2018, 75: 451–462.



3. L.G. Hernández-Tapia, et al. Effects of cryopreservation on cell metabolic activity and function of biofabricated structures laden with osteoblasts. *Materials* 2020, 13, 1966.
4. E.B. Montufar, et al. Factors governing the dimensional accuracy and fracture modes under compression of regular and shifted orthogonal scaffolds. *Journal of the European Ceramic Society*, in press.
5. P. Skalka, et al. Estimation of the effective elastic constants of bone scaffolds fabricated by direct ink writing. *Journal of the European Ceramic Society* 2019, 39: 1586-1594.

čtvrtek 10:40

Martin Vltavský¹, Radek Sedláček¹, Tomáš Suchý², Martin Bartoš³, Lucy Vojtová⁴, Kristýna Valová⁴ a Klára Lysáková³

Analýza mechanických vlastností porézních keramických pěn při akcelerované degradaci

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6

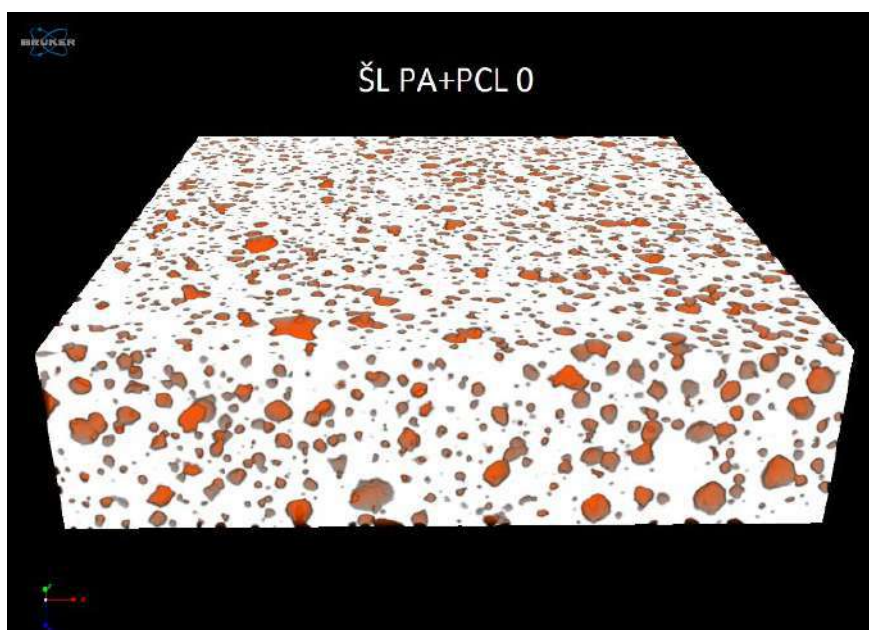
²Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i, Praha

³Stomatologická klinika, 1. lékařská fakulta University Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

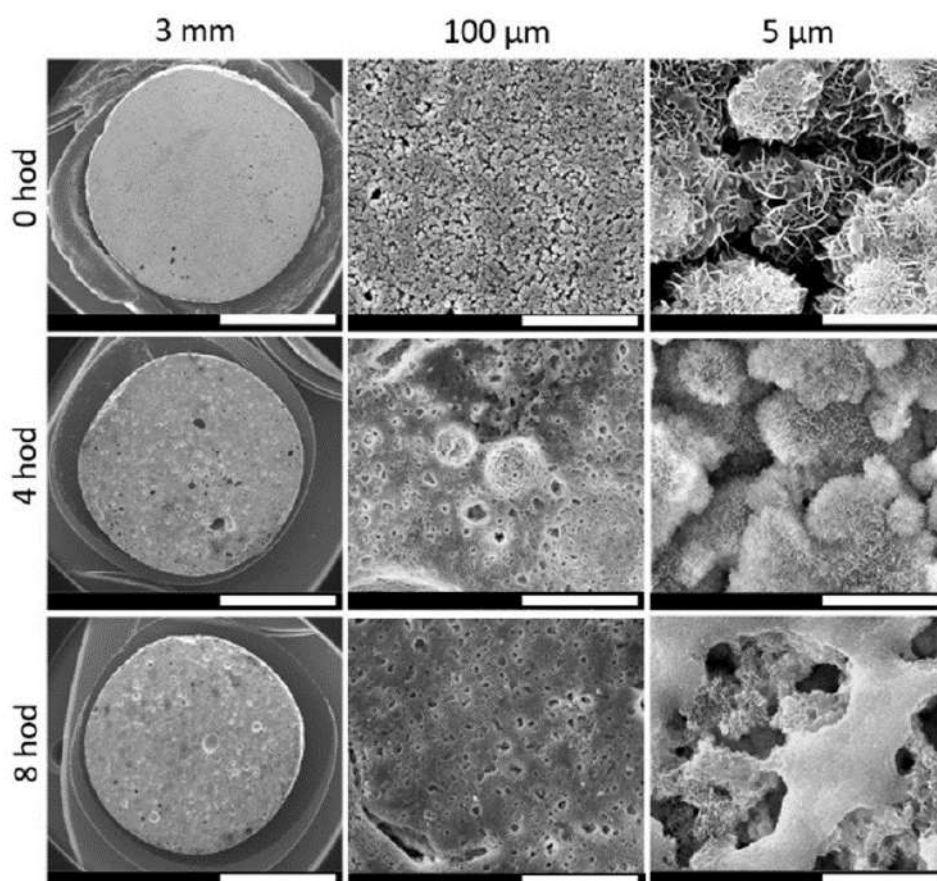
⁴Středoevropský technologický institut (CEITEC), Pokročilé biomateriály, VUT v Brně, Brno

martin.vltavsky@fs.cvut.cz

Cílem prezentovaného příspěvku byla analýza mechanických vlastností porézních keramických pěn pro náhrady kostní tkáně při akcelerované degradaci. Již od svého vynalezení přitahují kalcium fosfátové cementy velkou pozornost pro vývoj kostních implantátů. Navzdory výborné biokompatibilitě a dalším biologickým parametrům kalcium fosfátových cementů, jsou právě mechanické vlastnosti limitující jejich použití v klinické praxi pouze na nezatížené nebo mírně zatížené části kostí. Pro správnou funkci implantátů je také nutné znát jeho mechanické vlastnosti nejen v suchém stavu, ale zejména v podmínkách v jakých bude vystaven *in vivo*. Pro tyto účely byla navržena metodika, pomocí níž lze zvolené mechanické vlastnosti klasifikovat. Experiment se skládal z tlakové zkoušky kalcium fosfátových vzorků exponovaných v médiu simulující osteoklastickou degradaci po dobu 10 min, 4 hod a 8 hod a doplněn o testování hmotnostních úbytků, mikroskopickou analýzu, stanovení koncentrace volných vápenatých iontů a měření pH média. Vyhodnocovanými parametry mechanických vlastností byly mez pevnosti, elastický gradient, absorbovaná energie, účinnost absorbování energie a práce do destrukce. Využitím statistických metod byla analyzována statistická významnost zjištěných odlišností. Celkem bylo testováno šest typů materiálů lišících se jak složením, tak i způsobem šlehání. První dva typy se skládaly ze směsi α -TCP a PLGA-PEG-PLGA, přičemž první byl smíchán ručně a druhý elektrickým šlehačem. Druhý a třetí typ byl vyztužen PLC vlákny a způsob přípravy byl totožný jako v předchozím případě. Do pátého byl přidán derivovaný amin a byl šlehan ručně. Šestý typ obsahoval jak PCL vlákna, tak i derivovaný amin a byl šlehaný elektrickým šlehačem. Na následujících obrázcích (vizte Obr. 1 a Obr. 2) je zobrazena vnitřní struktura a topografie povrchu šestého typu materiálu.

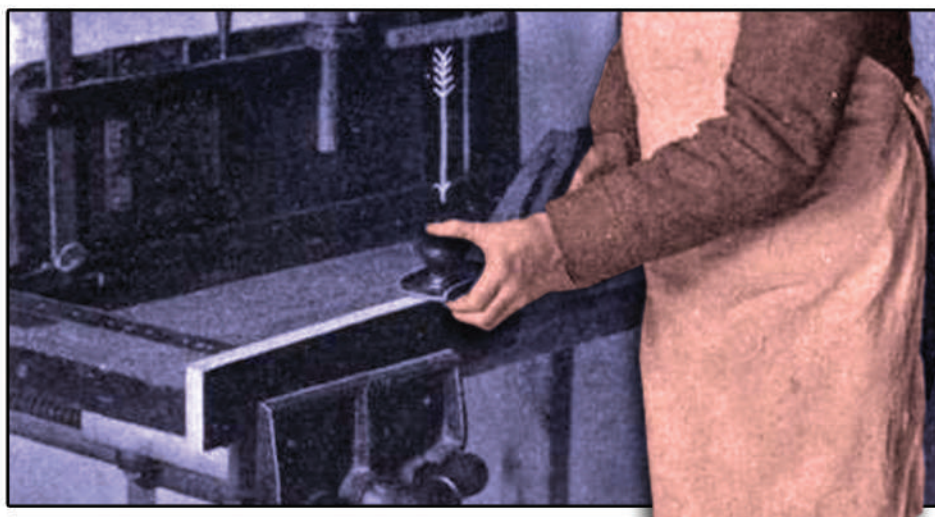


Obr. 1 Vnitřní architektura materiálu s PCL vlákny a derivovaným aminem zobrazující porézní strukturu.



Obr. 2 Makroskopické snímky povrchu vzorku skupiny ŠL PA+ALL po 0, 4 a 8 hod degradace v měřítku 3 mm (vlevo), 100 μm (uprostřed), 5 μm (vpravo) pořízené SEM

Tato studie byla podpořena grantovým projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky (označení NV18-05-00379) s názvem Vývoj a komplexní hodnocení nové injekčně aplikovatelné, resorbovatelné, porézní kostní náhrady s řízeným uvolňováním antimikrobiálních látek.



18.9.2020

PATEK
SALT



**Eva Kuželová Košťáková¹, Věra Jenčová¹, Manikandan Sivan²,
Divyabharathi Madheswaran², Juan Pablo Pérez Aguilera²
a David Lukáš¹**

Termoreverzibilní gely pro přípravu chirurgických nití obsahujících nanovlákná

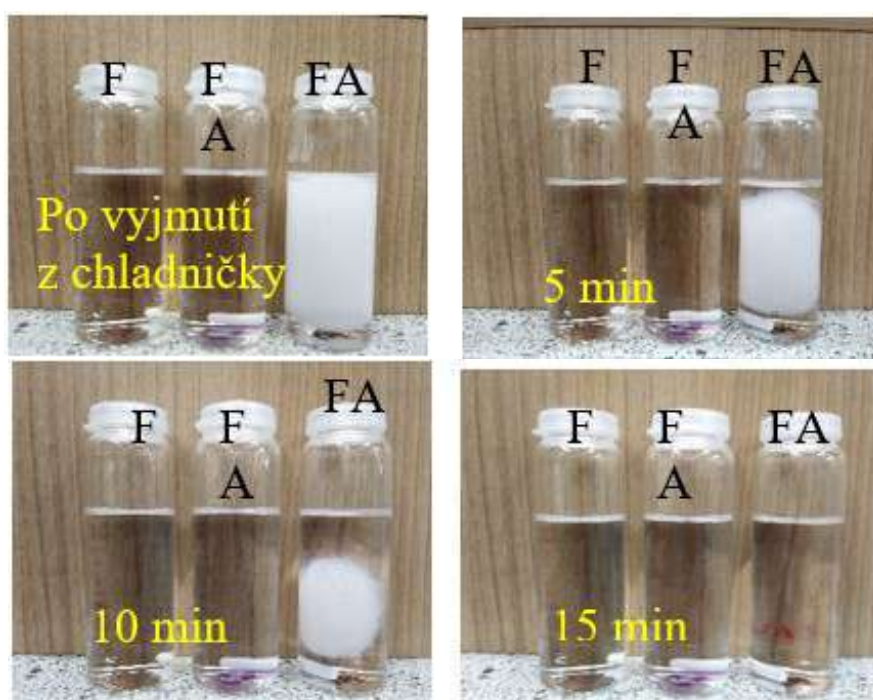
¹Technická univerzita v Liberci, Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, Katedra chemie, odd. Bioinženýrství. Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

²Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní, Katedra netkaných textilií. Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

david.lukas@tul.cz

Pro funkcionalizované plně biodegradabilní chirurgické nitě složené z kompozitních nanovláknenných přízí je významné studovat degradaci (hydrolýzu) polykaprolaktonu (PCL) v roztocích obsahujících karboxylové kyseliny. Degradace byla studována metodou molekulově vylučovací chromatografie (Size exclusion chromatography (SEC)), viz obr. 1. Polykaprolakton (PCL) (80 kDa a 40 kDa) byl dodán od společnosti Sigma Aldrich. Kyselina mravenčí, kyselina octová a aceton byly dodány společností Penta. Tetrahydrofuran (THF) použitý pro chromatografickou analýzu byl dodán od Sigma Aldrich. Polymerní roztok PCL 10% (w/w) byl připraven rozpuštěním PCL ve třech různých rozpouštědlových systémech. Roztoky byly připravovány při pokojové teplotě 22° C.

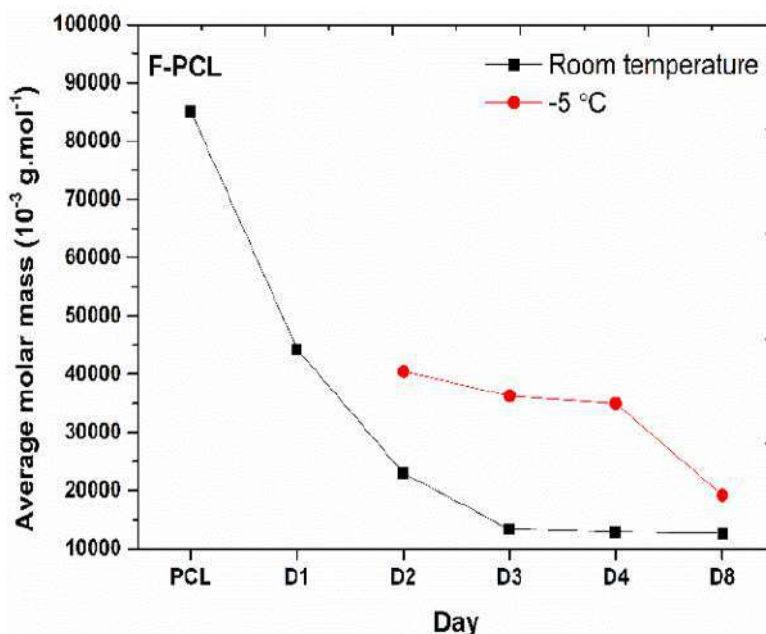
1. kyselina mravenčí (označení roztoku F-PCL),
2. směs kyselina mravenčí / kyselině octová (v poměru 1/1 (w/w)) (označení roztoku FA-PCL)
3. směs kyselina mravenčí / kyselina octová / aceton (v poměru 1/1/1 (w/w)) (označení roztoku FAA-PCL).



Obr. 1: Roztoky F-PCL, FA-PCL a FAA-PCL o objemu 5 ml byly zchlazeny na 0° C a poté vystaveny pokojové teplotě. Roztok FAA-PCL jako jediný vytvořil při zchlazení termo-reverzibilní gel. Na snímcích je uveden čas po vyjmutí z chladničky.



S připravenými roztoky byl proveden i experiment dokumentující tvorbu termo-reverzibilního gelu, které blokují degradaci PCL. Roztoky o objemu 5 ml byly zchlazeny na 0° C a poté vystaveny pokojové teplotě, viz obr. 2. Z obrázku je patrné, že roztok FAA-PCL jako jediný vytvořil při zchlazení termo-reverzibilní gel.



Obr. 2: Záznam experimentu molekulové vylučovací chromatografie vzorku roztoku F-PCL uchovávaných za pokojové teploty a za teploty 5° C. Vzorky byly odebírány ihned po přípravě a dále po dobu 8 dní. Byly rozpuštěny v THF s koncentrací přibližně 2 mg ml⁻¹. Připravené roztoky byly filtrovány přes 0,45 μm PTFE filtry. THF byl použit jako mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml min⁻¹.

Poděkování: Tato práce byla podpořena Grantovým programem PURE Technické univerzity v Liberci v rámci projektu č. PURE-2020-4007

pátek 9:20

**Věra Jenčová¹; Barbora Kopřivová¹; Maxim Lisnenko¹; Eva Kuželová
Košťáková¹; Š. Hauzerová¹; K. Havlíčková¹; R. Procházková^{2,3}; D. Lukáš¹,
J. Valtera⁴; Andreu Blanquer⁵ a Elena Filová⁵**

Nanovláknenné materiály založené na polyvinylalkoholu pro inkorporaci proteinů

¹Technická univerzita v Liberci, Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, Katedra chemie, odd. Bioinženýrství, Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

²Krajská nemocnice v Liberci, Transfúzní oddělení, Husova 10, 460 01 Liberec

³Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií, Studentská 1402/2, 460 01 Liberec

⁴Technická univerzita v Liberci, Fakulta strojní, Studentská 2, 461 17 Liberec

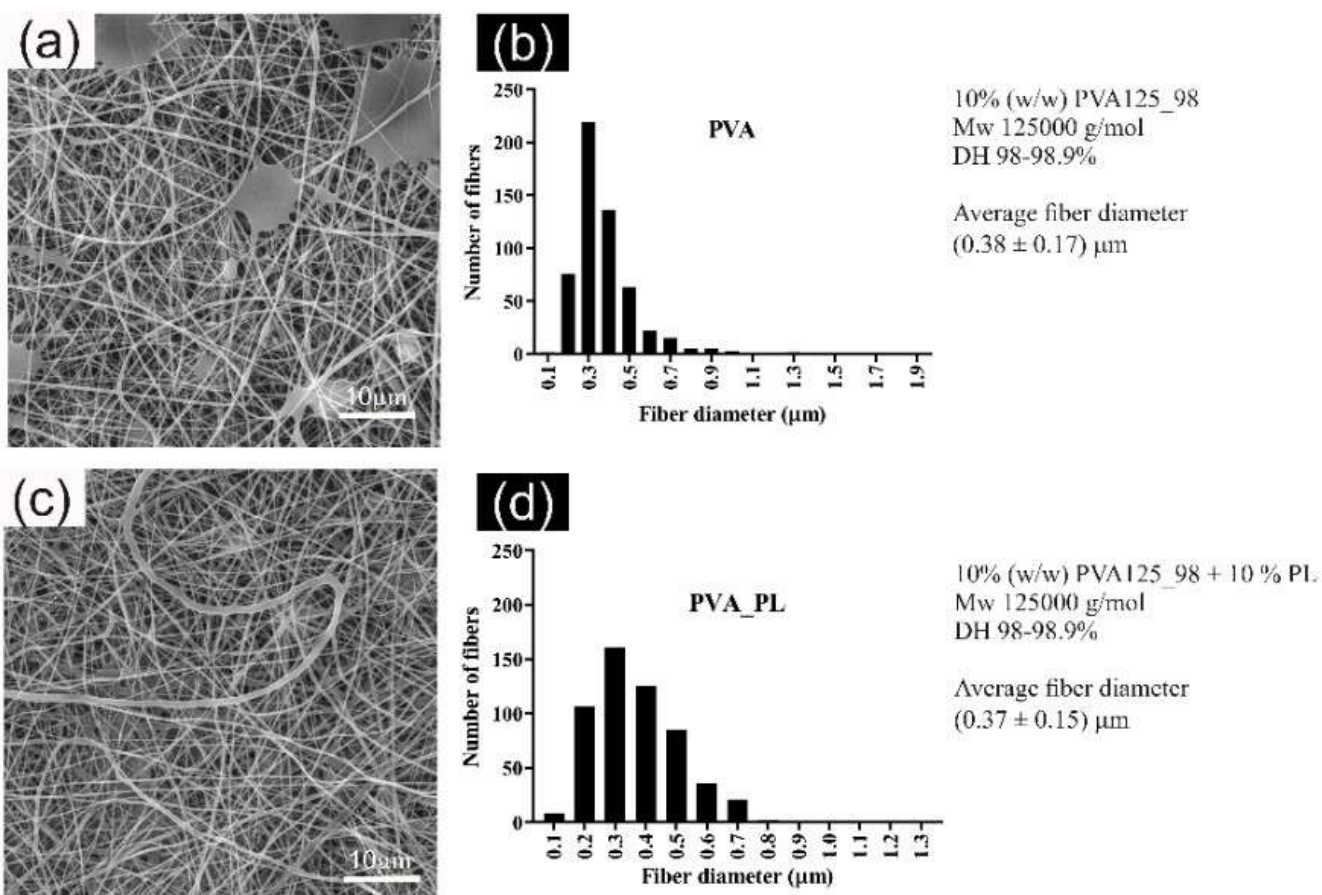
⁵Fyziologický ústav Akademie věd, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4

vera.jencova@tul.cz

Nanovláknenné materiály mají díky své struktuře připomínající extracelulární hmotu velký potenciál pro použití v tkáňovém inženýrství a zvýšení jejich biologické aktivity je v současné době cílem vývoje těchto materiálů. Z hlediska podpory hojení a regenerace tkání je nadějně použití plasmu



bohaté na trombocyty, která obsahuje stovky biologicky aktivních molekul schopných podporovat buněčnou adhezi, proliferaci a případně diferenciaci. Příspěvek se zabývá přípravou nanovláknenného materiálu založeném na PVA s obsahem nativních proteinů pocházejících z plasmy bohaté na trombocyty (PRP), které jsou postupně uvolňovány. Byl optimalizován postup přípravy materiálu pomocí technologie AC a DC elektrospinningu. Proces zvláknování neovlivňuje aktivitu inkorporovaných proteinů a výsledný nanovláknenný materiál je možné vyrobit ve velkém měřítku s efektivitou loadingu 0,64%. Úzká distribuce průměrů vláken (370 ± 150 nm) a malý výskyt defektů zajišťují homogenní inkorporaci proteinů. Díky použití PVA s vysokou molekulovou hmotností a vysokým stupněm hydrolýzy bylo dosaženo snížení rozpustnosti PVA o 40% bez nutnosti dodatečného kovalentního síťování. Snížení rozpustnosti PVA způsobuje postupné uvolňování proteinů, kdy po počátečním rychlém uvolnění 90% proteinů je 10% postupně uvolňováno v průběhu dalších nejméně 7mi dní. In-vitro hodnocení materiálů s HSVEC a HaCaT buněčnými liniemi prokázalo pozitivní efekt inkorporovaných růstových faktorů na metabolickou aktivitu obou typů buněk. U HSVEC buněk PVA nanovláknena s inkorporovaným trombocytárním lyzátem přidaná do kultivačního média zvýšila jejich produkci von Willebrandova faktoru, markeru jejich diferenciaci. Na základě dosažených výsledků se domníváme, že materiál má potenciál pro použití např. v hojení velkých a chronických kožních poranění.



Obř. 1 Snímky z elektronové mikroskopie a analýza průměrů vláken materiálů: z PVA (a,b) a PVA s inkorporovanými proteiny (c,d)

Poděkování: Tato práce byla provedena díky finanční podpoře MZ ČR, projekt číslo NV18-01-00332



**Eva Kuželová Košťáková¹, Šárka Hauzerová¹, Kristýna Havlíčková¹,
Sumit Agarwal², Věra Jenčová¹ a David Lukáš¹**

Smáčení vláknenných materiálů pro medicínské aplikace

¹Technická univerzita v Liberci, Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, Katedra chemie, odd. Bioinženýrství, Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

²Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní, Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů, Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

eva.kostakova@tul.cz

Hodnocení smáčení materiálů určených pro medicínské aplikace vodou nebo kapalinami založenými na vodě umožňuje předvídat chování materiálů po jejich vložení do reálného prostředí těla. Toto testování souvisí s povrchem materiálů a obvykle je používána metoda měření rovnovážného kontaktního úhlu (statická označovaná jako metoda přisedlé kapky) nebo metoda měření hystereze kontaktního úhlu tedy postupujícího a ustupujícího kontaktního úhlu (dynamický kontaktní úhel) s následným odhadem povrchové energie pevného materiálu. Jedná se o relativně nenáročné měření, avšak standardní optické metody a Wilhelmyho metoda se stávají obtížnými nebo nemožnými při použití porézních či botnajících materiálů. Pro testování mikro a nanovláknenných materiálů jsou tedy metody měření kontaktních úhlů nevhodné zejména s ohledem na hrubost takových povrchů a na jejich porozitu. Jsou-li tyto materiály navíc kapalinou smáčivé, pak je toto testování či jeho interpretace ještě náročnější. Je totiž zřejmé, že při aplikaci kapky na vláknenný smáčivý materiál bude kapka do materiálu pronikat a v průběhu pronikání se kontaktní úhel může měnit (viz. Obr. 1).



Obr. 1: Příklad vývoje změny kontaktního úhlu kapky vody obarvené metylenovou modří na elektricky zvlákněném nanovláknenném materiálu z PCL (nahore) a fotografie z měření vztlínání vody do elektricky zvlákněného materiálu z PCL pomocí mikrotensiometru.

Vedle testování pomocí měření kontaktních úhlů je možné pro smáčivé porézní materiály použít Washburnovu metodu založenou na vyhodnocování sorpce či vztlínání kapaliny do porézního vláknenného materiálu (viz. Obr. 2). Touto metodou lze reprodukovatelně hodnotit vláknenné materiály jak smáčivé na povrchu tak i botnající. Komplexní popis chování vláknenných materiálů vytvořených pomocí elektrického zvláknění stejnosměrným proudem a napětí založený na testování vztlínání vody do vzorků umožňuje zejména porovnávat sady vzorků a rozpoznávat jejich



povrchové rozdíly či změny, které mohou být způsobeny nejen použitím různých polymerních materiálů ale i materiálovými či procesními podmínkami při procesu zvláknění a procesem skladování či manipulace s vyrobenými materiály. V tomto příspěvku bude představeno porovnání různých polymerních materiálů PCL, PLA, PLCL, PA6, PVA; různých plošných hmotností (respektive tloušťky); stáří vyrobených vrstev či změny průměrů vláken s ohledem na proces smáčení. Výsledky testování vztlínání kapalin do elektricky zvlákněných nanovlákněných materiálů budou v prezentaci detailně představeny.

Poděkování: Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky s číslem NU20-02-00368.

pátek 10:30

Eduard Brynda, Johanka Kučerová a Tomáš Riedel

Biokompatibilita kardiovaskulárních náhrad

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i. Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6

brynda@imc.cas.cz

V místě kontaktu krve s jakýmkoliv povrchem, který není zdravým endotelem, okamžitě dochází k adhezi, aktivaci a agregaci trombocytů a aktivaci kaskády reakcí mezi plasmatickými koagulačními faktory, jejímž výsledkem je přeměna fibrinogenu z cirkulující krve na fibrin a následná tvorba fibrinového gelu. Po poranění cévy vedou tyto procesy k rychlému zastavení krvácení (hemostáza) překrytím poškozeného endotelu krevní sraženinou (trombus – fibrinový gel obsahující agregáty trombocytů, leukocyty a erytrocyty). V následující zánětlivé fázi je iniciována migrace leukocytů do místa poranění prostřednictvím cytokinů uvolněných z aktivovaných trombocytů a z poškozených buněk původní tkáně. Růstové faktory a cytokiny uvolňované z aktivovaných destiček a leukocytů aktivují fibroblasty a endoteliální buňky, které vytvářejí provizorní granulační tkáň prorostlou krevními kapilárami (granulační fáze). Oprava cévy je dokončena obnovou střední vrstvy cévní stěny z hladkých svalových buněk a mezibuněčné hmoty a regenerací cévního endotelu uvnitř. Po implantaci kardiovaskulární náhrady reaguje krev na kontakt s chirurgicky poškozeným endotelem a podobně na kontakt s cizím povrchem náhrady rychlou tvorbou krevní sraženiny. I když tvorba fibrinu během operace a několik dní po operaci je omezena přidáváním antikoagulantu heparinu do krevního oběhu, plasmatické proteiny z krve se adsorbují na povrch implantátu a podporují adhezi a aktivaci trombocytů. Působením koagulačních faktorů, které se uvolňují z aktivovaných trombocytů nebo jsou přinášeny krví a aktivovány interakcí s některými adsorbovanými proteiny, se u povrchu implantátu tvoří fibrin. Tromby vznikající u povrchu se mohou uvolnit a způsobit embolii v různých částech krevního oběhu. Akutní trombóza může zastavit průtok krve cévní protézou nebo v místě implantovaného stentu. Další integrace umělé náhrady do krevního oběhu zahrnuje fáze podobající se fázím hojení poraněné cévy, které jsou však silně narušeny přítomností cizího tělesa a materiálu. Průběh integrace závisí na typu implantované náhrady, ale podstatnou příčinou selhání jakékoliv náhrady bývá sekvence vzájemně propojených procesů zahrnující tvorbu trombů, zánětlivé reakce, špatný vývoj granulační tkáně a následně nedokonalá endotelizace vnitřního povrchu náhrady, které přetrvávají dlouho po implantaci. Trubice z tkaných nebo pletených polyetylentereftalátových vláken (PET céva) nebo z expandovaného polytetrafluorethylenu (ePTFE céva) jsou standardně používány pro náhradu nebo přemostění (bypass) nefunkčních velkých cév, avšak selhávají při



náhradě cév o malém průměru (< 6 mm). Povrch chemicky inertní a minimálně porézní ePTFE cévy se ihned po implantaci pokryje monovrstvou plasmatických proteinů adsorbovaných z protékající krve a dále se na něm již netvoří granulační tkáň a dlouhodobě jen sporadicky vznikají ostrůvky endotelu z progenitorových endoteliálních buněk přináššených krví. Tvorba fibrinové sítě a adheze trombocytů aktivovaná adsorbovanými proteiny však občas vyvolává vznik trombů na endotelem nepokrytém povrchu. Znatelně vyšší trombogenita PET cév patrně souvisí s trombocyty a leukocyty pronikajícími mezi vlákna stěny protézy, při jejichž aktivaci jsou uvolňovány faktory napomáhající vzniku trombů na povrchu. Jiným typem kardiovaskulárních implantátů jsou kovové stenty z NiTi drátěného pletiva standardně používané po zprůchodnění blokové koronární cévy. Mezi pooperační komplikace patří akutní trombóza uvnitř stentu krátce po jeho implantaci, embolie způsobené pokračující tvorbou trombů a chronické zánětlivé reakce vyvolávané v místech kontaktu cévy s drátěným pletivem stentu, které brání překrytí stentu neointimou z granulační tkáně lemované funkčním endotelem. Z dlouhodobého hlediska je hlavní příčinou selhání implantovaných stentů zastavení průtoku krve nárůstem neointimy, který je způsoben hyperproliferační hladkých svalových buněk z cévní stěny permanentně drážděné stentem.

V přednášce jsou prezentovány fibrinové povlaky s navázaným heparinem a růstovými faktory, které v *in vitro* experimentech bránily koagulaci krve u povrchu ePTFE cévy a stentů pro neurovaskulární intervenci. Povlaky současně podporovaly *in vitro* endotelizaci ePTFE cévy a v experimentech na králících zlepšovaly biokompatibilitu implantovaných stentů.

Výzkum je podporován grantem GA ČR 18-03435S.

pátek 10:50

**Elena Filová¹, Andreu Blanquer¹, Tomáš Suchý², Monika Šupová²,
Barbora Kopřivová³, Renata Procházková^{4,5}, Maxim Lisnenko³, Věra
Jenčová³, Helena Chmelová⁶, Zuzana Burdíkova⁷ and Lucie Bačáková¹**

**Growth of adipose tissue-derived stem cells in collagen gels reinforced
with collagen particles/nanofibers and stimulated by growth factors or
by platelet lysate released from PVA nanomats for vascular tissue
engineering**

¹Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague 4

²Department of Composites and Carbon Materials, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague 8

³Technical University of Liberec, Faculty of Science, Humanities and Education

⁴Regional Hospital in Liberec, Liberec

⁵Technical University of Liberec, Faculty of Health Studies, Liberec, Czech Republic

⁶Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague

⁷Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 00 Prague 2

elena.filova@fgu.cas.cz

Introduction

Collagen is a natural extracellular matrix protein that can be used in a form of gel, nanofibers or particles in composite scaffolds for tissue engineering of soft tissues. Adipose tissue derived stem cells (ASCs) can be isolated as autologous and they are able to differentiate into smooth muscle



cells. The aim of the study was to evaluate effect of reinforcement of the collagen gel with insoluble collagen fibers and collagen particles onto growth and differentiation of ASCs in different cell culture media. Cell culture medium was supplemented with either growth factors or with platelet lysate (PL) released from polyvinyl alcohol (PVA) nanomats.

Materials and methods

ASCs were embedded in collagen gel prepared from porcine skin (3 mg/mL) at the density of 500,000 cells per mL in EGM-2 medium (Promocell) or in DMEM medium supplemented with 2% of FS and with TGF β 1+BMP4 (both 2.5 ng/mL) or with added (PVA) or PVA_PL nanomats (2cm² per well) and cultured for 7-14 days. 16 mg of collagen particles, which were prepared from collagen nanofibers, were added into gel samples during their preparation, and collagen nanomats (1 cm²) were placed on the top of the gel. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for alpha-actin (days 7 and 14), calponin (day 7) or fibronectin (day 14). Images were taken under DragonFly system or by Light sheet Z.1 microscope (Zeiss) and 3D projections were made using Arivis Vision4D 3.1.3. or Imaris software.

Results

Gel shrinkage: Collagen gels with ASCs cultured in DMEM supplemented with TGF β 1+BMP4 showed extreme gel shrinkage. Gels with PVA or PVA_PL in DMEM and gels in pure DMEM showed moderate shrinkage. EGM-2 medium reduced shrinkage to minimum and both particles and fibers added into collagen gel prevented shrinkage entirely. Cell morphology: On days 1-7, ASCs spread and were elongated in gels in DMEM and received high densities due to gel shrinkage. However, ASCs were round and reached lower densities when cultured in EGM-2 medium, except for pure collagen gel on day 14, where ASCs were elongated and created an interconnected net. In collagen gels with particles or with fibers, ASCs adhered to the particles or fibers or grew in the gel. Cell differentiation towards smooth muscle cells: In DMEM medium the high portion of calponin-positive cells even on day 7 was in gels with ASCs cultured with TGF+BMP4, lower, with PVA+PL nanomats, and the lowest, with PVA and in pure DMEM. In EGM-2 medium only a few calponin-positive cells were present on day 7, but their number increased on day 14. More calponin-positive cells were observed in collagen with added collagen particles or with collagen fibers. ECM proteins production: On day 14, in EGM-2 medium, staining of fibronectin was weaker and localized on cells surface and around them in gels with particles. However, it was stronger and better organized into agglomerates in pure collagen gel and in gel with added fibers.

Conclusions

A combination of gel reinforcement and suitable cell culture medium could optimize gel shrinkage, ASCs growth, their differentiation into smooth muscle cells, and gel remodeling.

Supported by the Czech Health Research Council, projects No. NV19-02-00068 and NV18-01-00332.

**Eva Filová¹, Matej Buzgo² and Amir Fahmi³****Nanofibers with osteoinductive supplements for bone regeneration**

¹Institute of Experimental medicine of the Czech Academy of Sciences, Department of Tissue Engineering, Vídeňská 1083, 14220 Prague

²Inocure, s.r.o., Klimentská 1652/36, 110 00 Prague

³Rhine-Waal University of Applied Sciences, Marie Curie Strasse 1, 47533 Kleve, Germany

eva.filova@iem.cas.cz

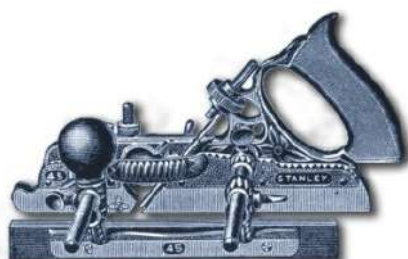
The structure of poly-ε-caprolactone (PCL) nanofibers is similar to structure of extracellular proteins. PCL is biocompatible and widely used in tissue engineering applications. Hydroxyapatite is a natural mineral component in bone. In this study we tested the osteoinductive properties of composite PCLHA nanofibrous scaffolds.

Nanofibers from polycaprolactone/hydroxyapatite (PCLHA) were electrospun. Hydroxyapatite powder of different size (9, 41, 45 nm) was used. PCL was used as a control. The scaffolds structure was evaluated using SEM. The scaffolds were seeded with human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow (hMSC) at a density of 183.8×10^3 cells/cm² and cultured in alpha MEM medium, supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 mM beta-glycerophosphate, and 40 µg/mL ascorbate-2-phosphate for 14 days. MTS and dsDNA analysis were evaluated on day 1, 3, 7, and 14. Osteogenic differentiation was tested by alkaline phosphatase (ALP) activity assay on day 3 and 7, type I collagen staining and visualization using confocal microscope on day 7 and 14.

MSCs showed good proliferation on all scaffolds. Significantly increased metabolic activity was observed on all PCLHA scaffolds compared to PCL on day 3. ALP activity increased in all scaffolds from day 3 to 7. No significant changes were found in ALP activity among scaffolds. On day 7, more intense collagen type I staining was observed on PCLHA9 and PCLHA41 scaffolds compared to PCLHA45 and PCL. On day 14, increased collagen type I staining was observed on all PCLHA scaffolds compared to PCL on day 14.

Composite PCLHA nanofibers showed good cell proliferation, and ALP activity. Collagen synthesis was enhanced on PCL9 and PCL41 scaffolds which are potential scaffolds for bone regeneration.

Acknowledgements: Project was supported by EU Horizon 2020 MSCA-RISE-2018 – Research and Innovation Staff Exchange programme project IP Osteo "Induced pluripotent stem cell for bone and cartilage defects" under grant agreement 824007, and by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project No. LO1508.





POSTERY

**úterý 20:00-21:30**

**Antonín Brož¹, Malgorzata Swietek², Vitalii Patsula², Beata Zasonska²,
Daniel Horák² a Lucie Bačáková¹**

Magnetické kompozitní biomateriály pro dynamickou kultivaci buněk *in vitro*.

¹Fyziologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč

²Ústav makromolekulární chemie AVČR, Nám. Heyrovského 2, 162 06 Praha 6

antonin.broz@fgu.cas.cz

Tato práce je zaměřena na vytvoření magnetického scaffoldu pro dynamickou kultivaci lidských pojivových a kmenových buněk s možností deformace a manipulace scaffoldu magnetickým polem s cílem ovlivnit regeneraci a diferenciaci tkáně *in vitro*. Scaffoldy byly vytvořeny z polykaprolaktonu (PCL) - již známého biokompatibilního a biodegradabilního polymeru. Do polykaprolaktonové matrice byly přidány různé koncentrace magnetických nanočástic oxidu železnato-železitého (Fe₃O₄ - iron oxide nanoparticles - ION). Ty byly pro lepší disperzi v matrici funkcionalizované na svém povrchu třemi druhy mastných kyselin - kaprylovou, stearovou a palmitovou. Z takto připravené matrice pak byly vytvořeny planární vzorky nebo 3D porézní scaffoldy (metodou solvent casting - porogen leaching za využití NaCl jako porogenu). Mikrotopografie povrchu planárních vzorků byla také upravena vystavením roztoků NaOH s různou koncentrací (3M, 6M a 9M) a po dobu 24h a 48h. Takto připravené materiály byly podrobeny testům *in vitro* s výše zmíněnými buněčnými typy. Byla zkoumána viabilita a adheze buněk na těchto materiálech. Povrchová úprava PCL scaffoldů pomocí NaOH zvyšovala adhezi buněk jen nepatrně při 24h expozici 3M roztoku. Mastné kyseliny na povrchu IONs ovlivňovaly signifikantně viabilitu buněk kultivovaných na povrchu. Jakožto nejvhodnější se ukázala kyselina kaprylová, použití zbylých dvou mastných kyselin viabilitu významně snížilo.

úterý 20:00-21:30

**Jana Brtníková¹, Lenka Michlovská¹, Eva Klapková², Klára Lysáková¹,
Kristýna Valová¹, Veronika Grézlová¹, Marie Tručková³, Tatiana Fialová⁴,
Tomáš Suchý^{5,6}, Rastislav Ballay⁷ a Lucy Vojtová¹**

Bakteriostatické účinky fosfátového cementu s nízkou koncentrací vankomycinu

¹Středoevropský technologický institut (CEITEC), Pokročilé biomateriály, VUT v Brně, 612 00 Brno

²Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. LF UK a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha,

³VUT v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Purkyňova 116, 612 00 Brno

⁴Ústav chemie a biochemie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

⁵Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, ÚSMH AV ČR, v.v.i., V Holešovičkách 94/41, 182 09 Praha

⁶Laboratoř biomechaniky člověka, Fakulta strojní ČVUT v Praze, Karlovo nám. 13, 121 35 Praha

⁷I. ortopedická klinika 1. LF UK, Fakultní nemocnice v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

jana.brtnikova@ceitec.vutbr.cz

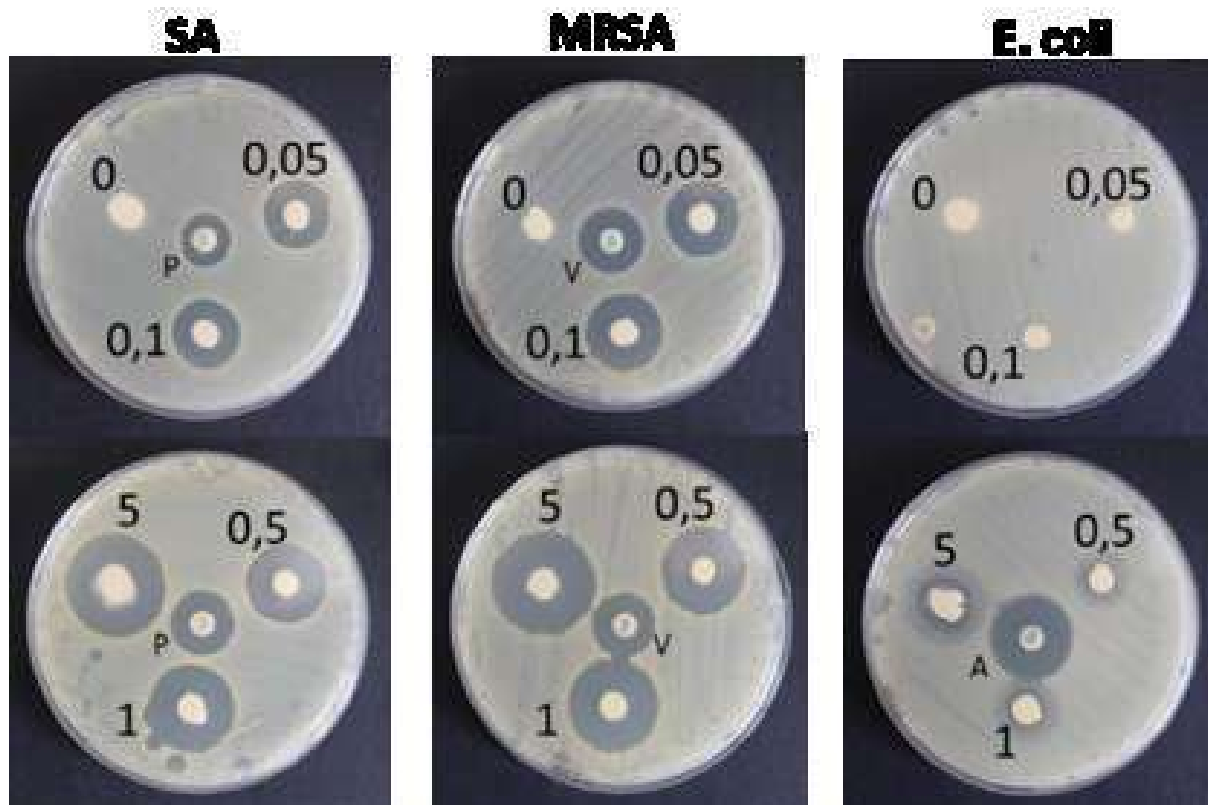
Zlomeniny a defekty kostí patří mezi nejčastější úrazy. Mezi největší komplikace spojené s jejich léčbou patří vznik infekce během hojení. V současné době na trhu chybí resorbovatelný osteoinduktivní kostní cement vhodný jako výplň defektu kosti, který by obsahoval vhodné



antibiotikum. Nejvíce používané antibiotikum vankomycin, vhodné při léčbě infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi (*Staphylococcus aureus* a *Streptococcus*), lékaři nejčastěji aplikují ve dvou formách. Buď se přímo zamíchá do plniva, síranu vápenatého (CaSO_4), nebo do polymethylmetakrylátového (PMMA) kostního cementu. Hlavní nevýhodou u CaSO_4 je jeho nízká mechanická pevnost a rychlá degradace [1], kdy dojde k rychlému uvolnění velkého množství vankomycinu, a tedy skokovému nárůstu terapeutické dávky, která může být toxická. V případě PMMA kostního cementu dochází při polymeraci k exotermní reakci a rychlému nárůstu teploty až do 100 °C [2]. Tím může dojít jak k nekróze okolní tkáně, tak i k poškození samotného antibiotika. Další nevýhodou PMMA je, že není biologicky rozložitelný, nelze zajistit postupné uvolňování vankomycinu, a často jsou zapotřebí následné operace.

Naším cílem bylo vyvinout injektovatelnou kostní pastu na bázi termocitlivého polymeru a fosforečnanu vápenatého, ze které se bude vankomycin postupně uvolňovat do infikované okolní tkáně. Tato kostní pasta je resorbovatelná a při hojení defektu se postupně nahradí dorůstající kostí.

V rámci této práce jsme sledovali vliv koncentrace vankomycinu v kostní pastě na antibakteriální vlastnosti a rychlost jeho uvolňování. Pomocí kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že se vankomycin z kostní pasty uvolňuje kinetikou prvního řádu. Antibakteriální testy byly sledovány pomocí diskové metody u gram-pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* (SA) a methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a gram-negativní *Escherichia coli* (E. coli). Bylo zjištěno, že přídavek vankomycinu i v koncentraci 0,05 hm% zajišťuje výrazné baktericidní účinky kostní pasty vůči SA a MRSA tím, že inhibuje syntézu jejich buněčné stěny (Obrázek 1).



Obrázek 1: Disková difuzní metoda: bakteriální kmeny *S. aureus* (CCM 4223) **SA** – kontrolní antibiotikum penicilin (P), methicilin rezistentní *S. aureus* (CCM 7110) **MRSA** – kontrolní antibiotikum vankomycin (V) a *E. coli* (CCM 3954) – kontrolní antibiotikum amoxycilin (A). Na misky s bakteriální kulturou byly vzorky pasty s koncentrací vankomycinu 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 5 hm% aplikovány injekční stříkačkou a následně upraveny do požadovaného tvaru disku. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C 18 h.



Poděkování: Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky v rámci projektu č. NV18-05-00379.

[1] MURARIU, Marius, BONNAUD, Leila, YOANN et al. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010. Vol. 95, no. 3p. 374-381. DOI 10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.032.

[2] WEGENER, Bernd, ZOLYNIÁK, Nicole, GÜLECYÜZ et al. *International Orthopaedics* [online]. 2012. Vol. 36, no. 5p. 1025-1030. DOI 10.1007/s00264-011-1382-8.

úterý 20:00-21:30

Veronika Hefka Blahnová^{1,2}, Karolína Vocetková³, Andrej Litvinec³, Lucie Wolfová³ a Eva Filová³

Dediferenciace chondrocytů z aurikulární chrupavky králíka

¹Ústav experimentální medicíny AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

²Ústav biofyziky 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 15006 Praha 5

³Ústav experimentální medicíny AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

veronika.blahnova@iem.cas.cz

Dediferenciace primárních chondrocytů je častou komplikací jejich *in vitro* expanze. Do určité míry se jedná o jev vratný přidáním suplementů (TGF- β 1 a β 3) do kultivačního media. Nicméně je žádoucí vyhnout se dediferenciaci úplně, abychom na testované materiály nasazovali buňky s charakteristikou chondrocytů a ne například fibrochondrocyty. Prezentovaná studie měla za cíl stanovit vhodnou metodiku izolace buněk chrupavky z ucha králíka s ohledem na jejich počet, viabilitu a zachování fenotypu. V dalším kroku byly buňky nasazeny do kolagenových hydrogelů a na biomateriály potenciálně využitelné pro regeneraci chrupavky.

Králičí uši byly přepraveny v chladících boxech, kůže na povrchu byla ošetřena desinfekcí na bázi jodu a otřena do sucha. Následně byly uši zbaveny kůže a perichondria. Čistá chrupavka byla opláchnuta 70% ethanolem a PBS a vložena do odběrového media (DMEM/F-12, Gibco + 2% penicilin/streptomycin/amphotericin). V laminárním boxu byla chrupavka nastříhána na kousky o rozměrech přibližně 1x1 mm. K nastříhané chrupavce byla přidána kolagenáza. Použita byla kolagenáza typu II (Gibco, 17101-015) o koncentraci 155 U/ml a 310 U/ml, směs kolagenázy I a II (Nordmark Biochemicals, S1746502) o koncentraci 45 U/ml a 90 U/ml. Chrupavka byla inkubována s kolagenázami po dobu 18 hodin v 37°C a 5% CO₂. Po inkubaci byly buňky centrifugovány (1200 RPM/5 min), peleta byla resuspendována a přenesena do kultivační lahve. Buňky byly kultivovány v růstovém i chondrogenním mediu. Ve druhé pasáži byly buňky charakterizovány průtokovou cytometrií, byla sledována přítomnost povrchových markerů CD90 a CD271. Buňky byly nasazeny do kolagenových gelů a na nanovláknenné nosiče. K prokázání přítomnosti chrupavkové mezibuněčné hmoty byly barveny kyselé polysacharidy Alcian Blue a kolagen typu II.

Tato práce byla podpořena granty: Grantová agentura Univerzity Karlovy, grant číslo 448218.

**úterý 20:00-21:30**

Jan Hujer, Tomáš Kořínek a Klaus Zimmerman
Silový účinek kavitačních bublin na přilehlé povrchy a jeho měření pomocí PVDF senzorů

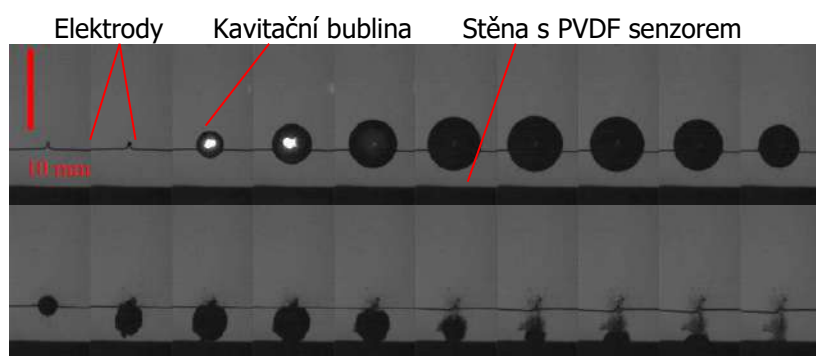
Technická univerzita v Liberci, Fakulta strojní, Katedra energetických zařízení, Studentská 1402/2, 461 17 Liberec

jan.hujer@tul.cz

Účinek kolabujících kavitačních bublin a jejich struktur přináší potenciál využití v biomedicinských aplikacích. Jedná se například o cílený transport léčiv do tkáně, či řízené narušení přilehlé tkáně. Děje se tak v důsledku tzv. doprovodných jevů při zániku (kolapsu) kavitačních bublin, kterými jsou rázová vlna a mikroproud (jet). Současným zájmem je popsat a kvantifikovat účinky zmíněných doprovodných jevů, jak z hlediska mechaniky tekutin, tak z hlediska biologie buňky. Možným přístupem je zjištění silového účinku aplikovaného na přilehlé povrchy v důsledku kolapsu.

V loňském roce bylo naším pracovištěm představeno dynamické chování osamoceně kavitační bubliny v blízkosti pružné stěny modelující lidskou tkáň. Tato práce původní dílo rozšiřuje a informuje o měření silového účinku kolabujících kavitačních bublin na přilehlé povrchy pomocí piezoelektrických PVDF senzorů. PVDF senzory mají výhodné vlastnosti pro měření velmi rychlých dějů, jakým je právě kolaps kavitační bubliny. Senzor byl použit v tloušťkovém módu a kalibrován metodou pádu kuličky. Experiment byl proveden v akváriu s destilovanou vodou, v němž byla generována teplem přechodového odporu na dotyku dvou elektrod osamocená kavitační bublina, a to o různých velikostech a v různé vzdálenosti od přilehlé stěny. Na pevné stěně byl přilepen piezoelektrický PVDF senzor překrytý ochrannou lepicí páskou, kterým byl měřen silový (impaktní) účinek kolabujících kavitačních bublin. V kapalině, v místě nad kavitační bublinou, byl dále měřen tlak jehlovým hydrofonem a celý děj byl snímán vysokorychlostní CCD kamerou stínovou metodou. Je vhodné upozornit, že v tomto experimentu nebyl zkoumán vliv existence okolních koexistujících kavitačních bublin, jak je běžné v reálných případech.

Na obrázku 1 je ukázán vývoj kavitační bubliny v čase a její účinek na přilehlý povrch. Je vidět její vznik na dotyku elektrod, následně kolaps doprovázený přiblížením bublinky ke stěně a samotné působení na stěně, kde je umístěn PVDF senzor. Na obrázku 2 je pak ukázka použitého piezoelektrického PVDF senzoru.



Obr. 1 Vývoj kavitační bubliny v čase a její účinek na přilehlý povrch



Obr. 2 PVDF senzor



Tato práce byla podpořena Studentskou grantovou soutěží Technické univerzity v Liberci v rámci projektu č. SGS-2020-5028 „Studium kavitačního kolapsu pomocí PVDF senzorů“.

[1] Brennen, Christopher E. (2003) *Cavitation in Biological and Bioengineering Contexts. In: Fifth International Symposium on Cavitation (CAV2003), 1-4 November 2003, Osaka, Japan.*

[2] Wang Q, Manmi K, Liu KK. *Cell mechanics in biomedical cavitation. Interface Focus.* 2015;5(5):20150018. doi:10.1098/rsfs.2015.0018

[3] Dollet B, Marmottant P, Garbin V. *Bubble dynamics in soft and biological matter. Annual Review of Fluid Mechanics.* 2019;51: doi: 10.1146/annurev-fluid-010518-040352

úterý 20:00-21:30

**Vojtěch Hybášek¹, Eva Jablonská², Karolína Vocetková³, Jitřenka Jířů¹
a Jaroslav Fojt¹**

Elektrochemický monitoring rozvoje buněčné kultury na kovovém biomateriálu

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, Technická 5, 166 28 Praha

²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha

³Ústav experimentální medicíny AVČR, Oddělení tkáňového inženýrství, Vídeňská 1083, 142 20 Praha

hybasekv@vscht.cz

Elektrochemické techniky jsou jedním z mála nástrojů jak efektivně průběžně sledovat a vyhodnocovat dynamiku dějů odehrávajících se v živých systémech. Rovněž tyto techniky nacházejí využití v evaluaci dějů na fázových rozhraní vodivých materiálů – typicky koroze kovů. Tématem této práce je snaha propojit oba přístupy a vytvořit metodu, která umožní charakterizaci interakce mezi kovovými biomateriály a buněčnými systémy s důrazem na detailní vývoj v čase. Používané techniky, dominantně impedanční spektroskopie, nám umožňují zároveň popis korozního chování kovů, studium adsorpce proteinů a charakterizaci buněčného systému pokrývajících povrch kovu. Experimenty probíhají v elektrochemické mikrocele, přičemž její výměnné dno je tvořeno zájmovým kovem, který je zároveň sledovanou elektrodou. Experimenty probíhají s velmi malým budícím střídavým potenciálem 10 mV. rms, který by neměl zásadně ovlivňovat měřený systém. Jako základní prostředí bylo zvoleno minimální esenciální médium a následně z důvodu minimalizace problémů řízeného složení atmosféry Leibovitzovo médium L-15, s přídavkem fetálního bovinního séra a směsi antibiotik a antimykotik. Jako testované buněčné kultury sloužily linie Saos-2 a U-2 OS. Testovanými materiály byly leštěný komerčně čistý titan a slitina kobalt-chrom-molybden. Ke srovnání získaných elektrochemických dat byla využito terminálních s vyhodnocením stavu kultury rastovací elektronovou mikroskopií. Díky parametrům nově vytvářených R-C členů umožňuje metoda hodnocení biomateriálů, jakožto vhodného substrátu pro růst buněk, skrze míru a rychlost pokrývání povrchu. Rovněž je možné touto technikou stanovit dobu od ustálení jednovrstvě pokrytého povrchu do přerůstání do vícevrstevnatých struktur.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt A2_FCHT_2020_056.



Adelia Kashimbetova, Mariano Casas-Luna, Serhii Tkachehko, Ladislav Čelko, Jozef Kaiser, Edgar B. Montufar

Enhancement of *in vitro* mineralization of titanium by alkali-based surface treatment

Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkyňova 123, 612 00 Brno

adelia.kashimbetova@ceitec.vutbr.cz

Due to unique combination of properties, such as low Young's modulus, great tensile strength, corrosion resistance and biocompatibility, titanium and its alloys have become the most widely used metallic materials in medicine (orthopaedics and dentistry). However, bioactivity and wear resistance of titanium require to be further improved in order to extend the life of medical implants. Current research efforts are focused in control the micro- and nano- porosity of the surface of titanium to direct cell orientation, cell morphology, and cytoskeleton arrangement [1], and thereby, improve the bioactive osseointegration of the implant. There are various techniques for surface modification of titanium [2]. Among them, acidic immersion treatments show many advantages like low cost, simplicity, and feasibility for large-scale manufacturing. This work suggests the alkali treatment (AT) as an alternative for the surface modification of titanium. The aim is to optimize the AT to activate the titanium surface and promote *in vitro* apatite mineralization. Heat treatment (HT) following alkali treatment is studied for the stabilization of the developed mesoscale porosity.

A typical surface activation procedure consists of soaking a titanium (cp-Ti, grade 2) disk (diameter of 12 mm) in NaOH solution (0 – 10 M) at 60 °C for 24 h and subsequent HT in the temperature range of 300 – 600 °C for 1 h [2]. The surface morphology of the disks after each step of the treatment was examined using a scanning electron microscope (SEM) equipped with electron dispersive X-Ray detector (EDX). X-ray diffraction (XRD) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to determine the elemental and phase composition of the samples treated under different conditions. *In vitro* mineralization test was performed on treated samples in according with Kokubo's methodology [3].

In Fig. 1, SEM observation showed that sample surfaces had a complex submicron porous network resulting from the AT. The HT carried out at various temperatures did not change appreciably the surface structure of the samples. The surface composition of Ti samples analysed by XPS allowed establishing that the major elements on all the surfaces were Na, O, Ti, and C. This elemental composition agrees with the expected composition of amorphous sodium titanate layer formed on titanium surface after AT [4]. XRD data showed that after each step of the treatment the most intense peaks belonged to titanium. Subsequent HT led to the formation of crystalline titanium dioxides, rutile and anatase. Moreover, with increasing temperature of HT, the intensity of their peaks also raised, which indicates an increase in the volume fraction of oxides. In addition, it is worth to note that in all the XRD patterns an amorphous halo was observed at low 2θ degrees that confirms the presence of amorphous or nanoscale structure on the samples surfaces. More precisely, the 2θ position of the halo was attributed to the sodium titanate (Na₂Ti₆O₁₃) phase. *In vitro* mineralization test showed the presence of calcium and phosphorous rich precipitates in the AT samples, with slight increment in the amount of precipitates with the increment of the HT temperature.



In conclusion, alkali-based surface activation demonstrated simple ability of formation of sodium titanate layer and submicron porosity on titanium surface, which allowed the *in vitro* mineralization of titanium. Therefore, AT titanium is hypostatised to improve the bioactive osseointegration of implants *in vivo*.

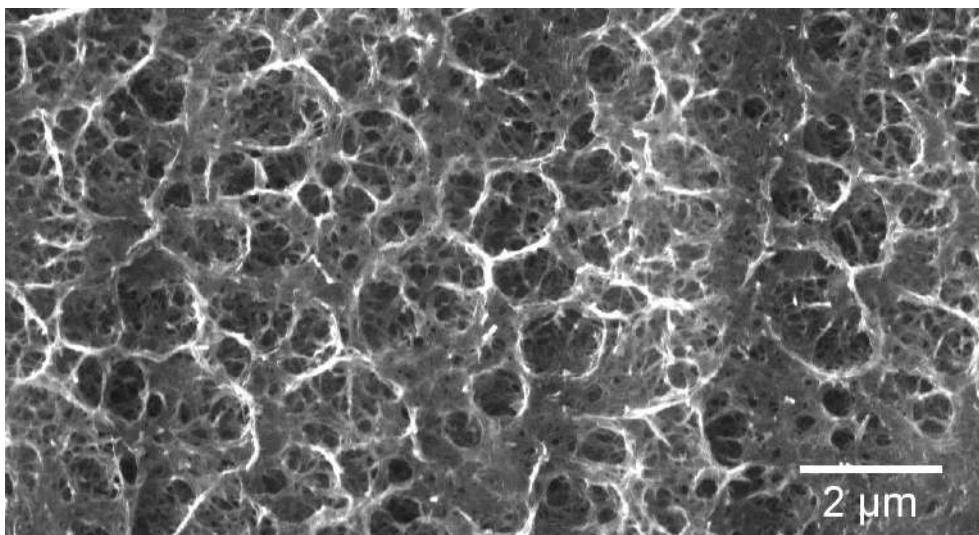


Fig. 1. Complex submicron porosity formed on sample surface after NaOH-soaking.

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant 19-22662S).

[1] Khang D. et al. *Biomaterials* 29 (2008) 970-983.

[2] Kokubo T. et al. *Surface coating and modification of metallic biomaterials*. Woodhead Publ. (2015) 219-246.

[3] Kokubo T. et al. *Biomaterials* 27.15 (2006) 2907-2915.

[4] Kim H. et al. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 341-347.

úterý 20:00-21:30

Jan Krčil, Vladimír Mára a Vojtěch Zástava

Vliv krystalografické orientace na oxidaci β titanových slitin

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav materiálového inženýrství. Karlovo náměstí 13, 120 00 Praha 2

jan.krčil@fs.cvut.cz

β -titanové slitiny (např. Ti–13Nb–13Zr, Ti–12Mo–6Zr–2Fe, Ti–15Mo–5Zr–3Al, Ti–15Mo, Ti–35Nb–7Zr–5Ta a Ti–29Nb–13Ta–4,6Zr) jsou, vzhledem ke svým vlastnostem, vhodnými nástupci současných kovových implantačních materiálů, a je prokázáno, že snižují kostní atrofii a zlepšují remodelaci kosti. Problematickou je zejména nízká únavová pevnost, která je činí nevhodnými jako dlouhodobé implantační materiály. Podstatnou vlastností (resp. charakteristikou) je ovšem také povrch implantačních materiálů, jehož možnými úpravami a modifikacemi je možné dosáhnout lepších vlastností užitých slitin.



Tato práce se zabývá vlivem orientace krystalografických zrn na tvorbu oxidické vrstvy připravené termickou oxidací na povrchu β -titanových slitin Ti–39Nb, Ti–35Nb–2Zr a Ti–25Nb–4Ta–8Sn. Neoxidované vzorky byly podrobeny analýze EBSD pro zjištění variace orientace krystalografických zrn v rámci sledovaného povrchu vzorku. Vzorky slitin byly následně termicky oxidovány při 600 °C po dobu 8 hodin v atmosferickém vzduchu. Povrch oxidovaných vzorků byl hodnocen z několika hledisek. Bylo pozorováno zbarvení povrchu a změna povrchové drsnosti. Zároveň byla také provedena analýza povrchu SEM, na kterém byla hodnocena morfologie oxidické vrstvy a charakteristika oxidů rostoucích na jednotlivých částech povrchu (a individuálních strukturních zrnech slitin). Elektronovou mikroskopií byla také hodnocena tloušťka oxidické vrstvy na příčných řezech vzorky. Pro zjištění intenzity difuze kyslíku do základního materiálu, byl u vzorků naměřen průběh tvrdosti HV 0,01.

úterý 20:00-21:30

**Nikola Křivánková¹, Kristýna Valová², Jana Brtníková²,
Lenka Michlovská² a Lucy Vojtová²**

**Využití modrého světla pro přípravu hybridních hydrogelových sítí
s uplatněním v medicíně**

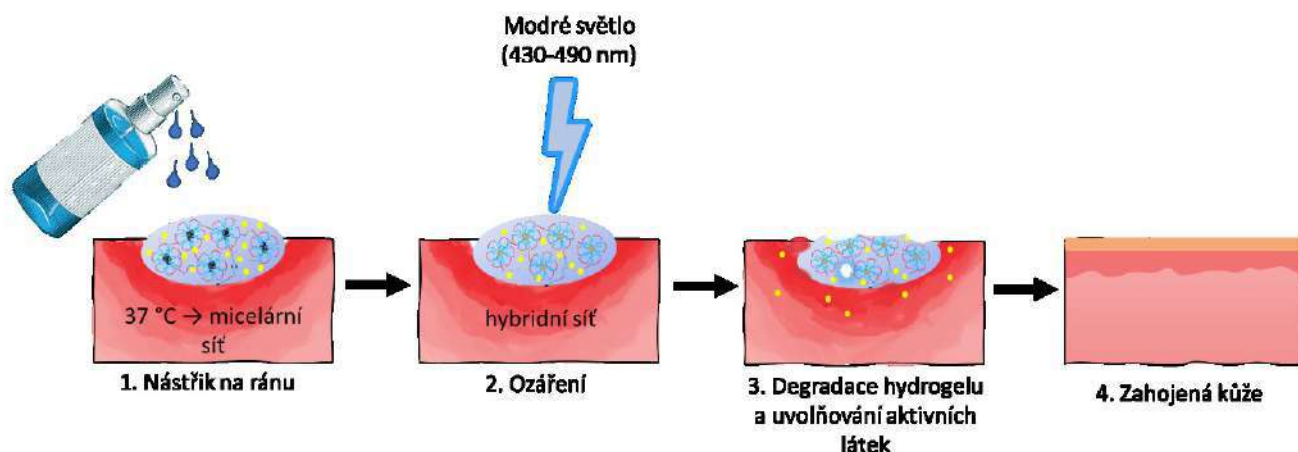
¹Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Purkyňova 116, 612 00 Brno

²Vysoké učení technické v Brně, CEITEC, Pokročilé biomateriály, Purkyňova 656/123, 612 00 Brno

xckrivankovan@vutbr.cz

Amfifilní blokové kopolymery představují vhodné materiály pro přípravu nosičů s postupným uvolňováním léčiv díky jejich schopnosti se samovolně uspořádat do micelárních struktur. Nosiče chrání obsažené léčivo před hydrolýzou a enzymatickou degradací a umožňují přenos léčiv na požadované místo a jejich postupné a řízené uvolňování¹.

Cílem předložené práce byla příprava hydrogelu s hybridní chemicko-fyzikální sítí pomocí modrého světla v přítomnosti hydrofilního netoxického fotoiniciátoru. Pro přípravu hydrogelu byl použit termocitlivý triblokový kopolymer založený na kyselině polymléčné a polyglykolové (PLGA) s polyethylenglykolem (PEG) připravený živou polymerací za otevření kruhu. Kopolymer byl následně funkcionalizován anhydridem kyseliny itakonové². Působením hydrofobních interakcí tvoří syntetizovaný kopolymer při fyziologické teplotě (37 °C) micelární síť. Přítomnost dvojných vazeb kyseliny itakonové, která je navázaná na koncích kopolymerního řetězce, navíc umožňuje fotochemické kovalentní zesíťení micel a zvýšení tak hydrolytické stability hydrogelu. Nový degradabilní hydrogel by mohl být využit jako resorbovatelný kryt ran (Obr. 1) nebo jako injektovatelný nosič. Doba uvolňování enkapsulované bioaktivní látky závisí na degradaci polymerní sítě nosiče a difuzi. Je tedy nastavitelná složením polymeru nebo stupněm chemického zesíťení³.



Obr. 2: Využití hydrogelu s hybridní sítí k léčbě poraněné kůže.

Výsledky tohoto výzkumu byly získány v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) za finančního přispění Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci účelové podpory z prostředků Národního programu udržitelnosti II.

1. RÖSLER, Annette, Guido W.M. VANDERMEULEN a Harm-Anton KLOK, 2012. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, 270-279.
2. MICHLOVSKÁ, L., L. VOJTOVÁ, O. HUMPA, J. KUČERÍK, J. ŽÍDEK a J. JANČÁŘ, 2016. Hydrolytic stability of end-linked hydrogels from PLGA–PEG–PLGA macromonomers terminated by α,ω -itaconyl groups. *RSC Advances*. 6(20), 16808-16816.
3. MICHLOVSKÁ, L. *Synthesis and Characterization of Multifunctionalized Biodegradable Copolymers*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2014. Dizertační práce. 92 p., Vedoucí: Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.

úterý 20:00-21:30

**Ján Kužma^{1,2} Lukáš Horný¹ Tomáš Suchý^{1,2} Monika Šupová²
a Zbyněk Sucharda²**

**Popis štruktúrnych vlastností elektrostaticky zvláknovaných
kolagénnych vrstiev**

¹Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze, Technická 4, Prague, 160 00

²Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České republiky, V Holešovičkách 41, Praha 8, 182 09

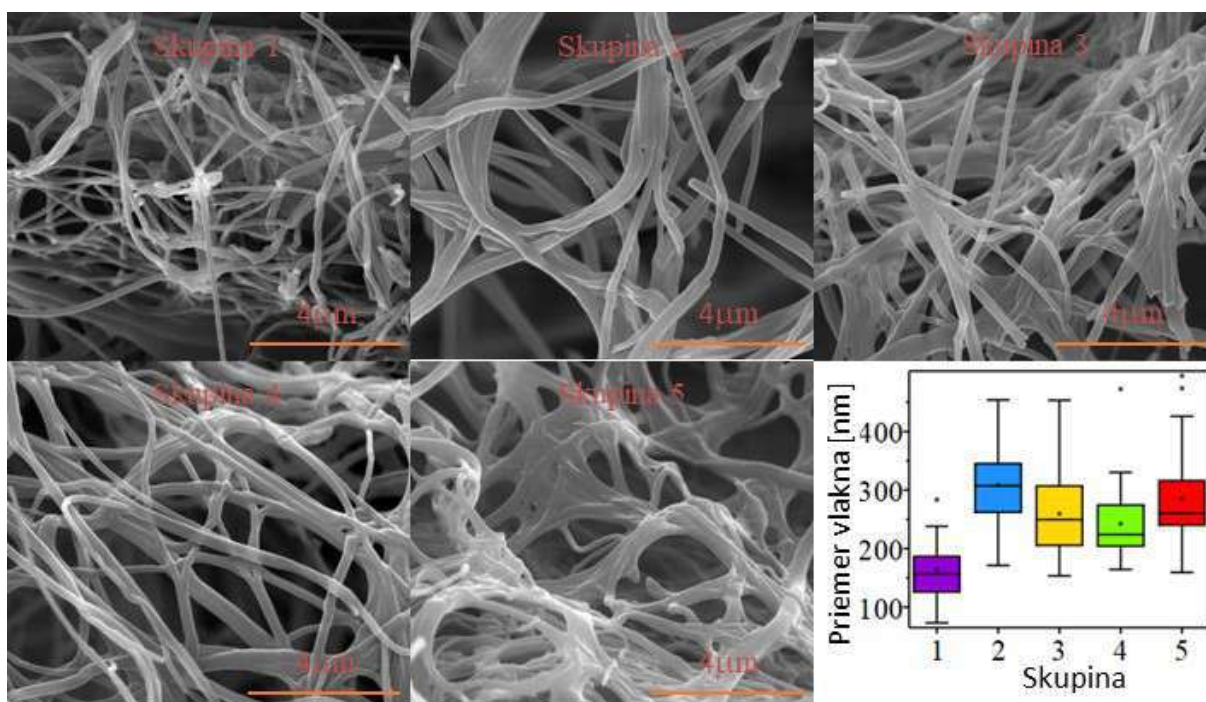
kuzma@irms.cas.cz

Účelom tejto štúdie bolo porovnať priemery kolagénnych nanovláken v nadväznosti na mechanické testovanie. Nanovláknenné vrstvy ktoré boli vyrobené pomocou elektrostatického zvláknovania. Počas celého výrobného procesu boli dodržané konštantné podmienky. To znamená, že všetky vzorky boli vyrobené z kolagénového roztoku s rovnakým chemickým zložením. Taktiež zvláknovanie prebiehalo pri rovnakých parametroch, t.j. teplota, relatívna vlhkosť, napätie a vzdialenosť medzi elektródami. Nakoniec, bol aj postup zosieťovania rovnaký pre všetky vzorky zahrnuté do tejto štúdie.



Vnútna štruktúra vzoriek bola charakterizovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM; Quanta 450 Microscope, FEI, USA) vo vysokom vákuu. V každom zo šiestich mikrogrfov SEM (mag. $10\,000 \times$ a $25\,000 \times$) sa vyhodnotilo najmenej 10 vlákien pre každý typ vrstvy. Na zistenie, ktoré skupiny sa navzájom líšia, bol použitý Dunnovej post hoc test.

Panely na obrázku 1 ukazujú mikrofotografie získané pomocou mikroskopie SEM. Vlákniť štruktúra spinovaného kolagénu je jasne viditeľná. Pomocou obrazovej analýzy sa v každej skupine vykonalo 60 meraní priemeru vlákien. Výsledné dáta sú porovnané v škatuľovom grafe uvedenom v pravom dolnom rohu na obrázku 1. Výsledky jasne naznačujú, že skupina 1 sa líši od ostatných (hodnota $p < 0,001$).



Obr. 1 Reprezentatívne SEM mikrofotografie (25 000x). Škatuľový graf priemerov vlákien získaných pri analýze obrazu.

Výsledky naznačujú, že hoci boli počas prípravy vrstiev dodržané konštantne podmienky, tak existuje určitá štruktúrna variabilita ktorá by sa mohla prejaviť pravé v mechanických vlastnostiach.

úterý 20:00-21:30

**Věra Lukášová¹, Radmila Kudláčková¹, Michala Rampichová¹
a Eva Filová¹**

**Podpora osteoklastogeneze v *in vitro* podmínkách bisfosfonátem
určeným pro léčbu osteoporózy**

Akademie věd České republiky, Ústav experimentální medicíny, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

vera.lukasova@iem.cas.cz

Bisfosfonáty jsou sloučeniny, které svou strukturou připomínají pyrofosfát, díky tomu je umožněna vazba bisfosfonátů k minerální složce kosti. V průběhu resorpce kosti jsou činnosti osteoklastů bisfosfonáty uvolňovány a tím je umožněna jejich internalizace osteoklasty, kde inhibují enzymy mevalonátové dráhy. V důsledku toho nejsou osteoklasty schopny vykonávat



svou funkci, tj. resorbovat kost. Tato studie byla zaměřena na sledování účinku různých koncentrací alendronátu (ALN), který patří mezi aminobisfosfonáty. Vliv ALN byl zkoumán v průběhu 15denního *in vitro* experimentu na potkaních a lidských mononukleárních buňkách z periferní krve (PBMCS) a to v různých kultivačních podmínkách, s různými kombinacemi M-CFS a RANKL růstových faktorů, které se běžně používají pro navození osteoklastogeneze PBMCS. Cytotoxický účinek ALN byl hodnocen na základě měření metabolické aktivity a měření koncentrace dsDNA. Změna v indukci osteoklastogeneze byla hodnocena podle aktivity karbonické anhydrázy II (CA II), barvení tartrát rezistentní kyselý fosfatázy (TRAP) a barvení tvorby aktinového kruhu. ALN v koncentraci 10^{-6} M vykazoval cytotoxický efekt na PBMCS a negativně ovlivnil tvorbu aktinového prstence. Na druhé straně nízké koncentrace ALN v rozmezí 10^{-8} až 10^{-10} M podporovaly proliferaci buněk, tvorbu osteoklastů a aktivitu CA II. Tyto výsledky ukazují na pozitivní účinek ALN v nízkých koncentracích na rozdíl od jeho cytotoxického účinku při aplikaci vyšších dávek ALN. Jedním z možných vysvětlení pozitivního vlivu ALN na osteoklastogenezi může být fakt, že ALN v nízkých koncentracích působí pozitivně na uvolňování cytokinů, například IL-6, který pozitivně působí v indukci osteoklastogeneze [1].

[1] Töyräs A, Ollikainen J, Taskinen M, Mönkkönen J (2003) Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 19 (4):223-230. doi:[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00108-8)

Studie byla finančně podpořena z grantu Grantové agentury České republiky číslo 18-09306S.

úterý 20:00-21:30

**Katarína Mendová¹, Matej Daniel¹, Kristína Eleršič-Filipič¹, Martin Vrbka²
a Pavel Hilšer²**

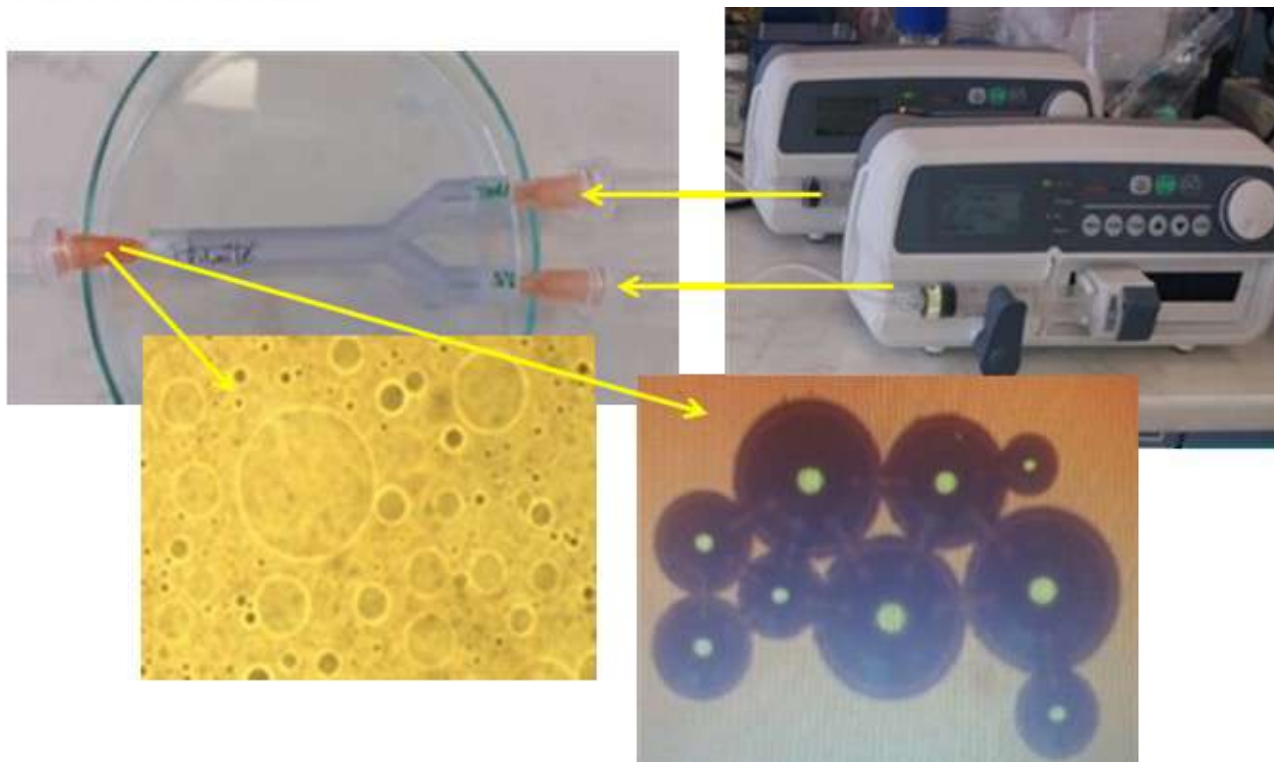
Vplyv lipozómov na súčiniteľ trenia v synoviálnych kĺboch

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky. Technická 4, 166 07 Praha 6

²Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav konstruování, Technická 2, 616 69 Brno

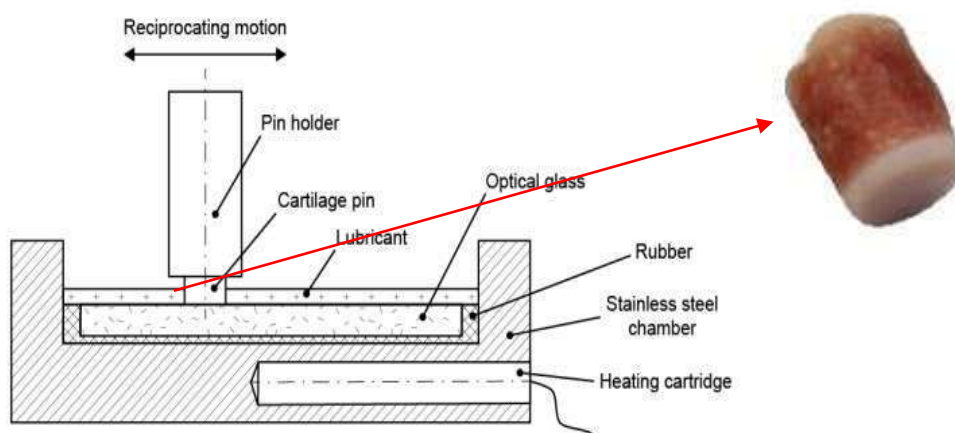
katarina.mendova@fs.cvut.cz

Cieľom nášho výskumu je skúmať vplyv nami vytvorených lipozómov obsahujúcich HA na mazanie a trenie chrupavky s dôrazom na hydratačný režim mazania. Kyselina hyalurónová (HA) tvorí základnú zložku synoviálnej tekutiny, takzvaného kĺbneho maziva. Slúži ako zdroj živín chrupavky, ktorá sa musí pravidelne obnovovať. Práve z tohto dôvodu sa kyselina hyalurónová používa, ako hlavná zložka viskózných doplnkov pri liečbe osteoartrózy. Jej hlavný cieľom je zlepšiť reológiu synoviálnych kĺbov, čo vedie k úľave od bolesti a reparácii tkaniva na úrovni kĺbovej chrupavky. Účinok HA je však krátkodobý. Jednou z ďalších zložiek synoviálnej tekutiny sú fosfolipidy. Náš doterajší výskum je zameraný na výrobu lipozómov mikrofluidným zariadením, čo nás viedlo k tomu, abysme sa zamysleli nad kombináciou kyseliny hyaluronovej, ako hlavnej zložky synoviálnej tekutiny a lipozómov tvoriacich sa z fosfolipidov. Výroba lipozómov obsahujúcich HA prebieha pomocou nami navrhnutého a vyrobeného mikrofluidného zariadenia (Obr.1).



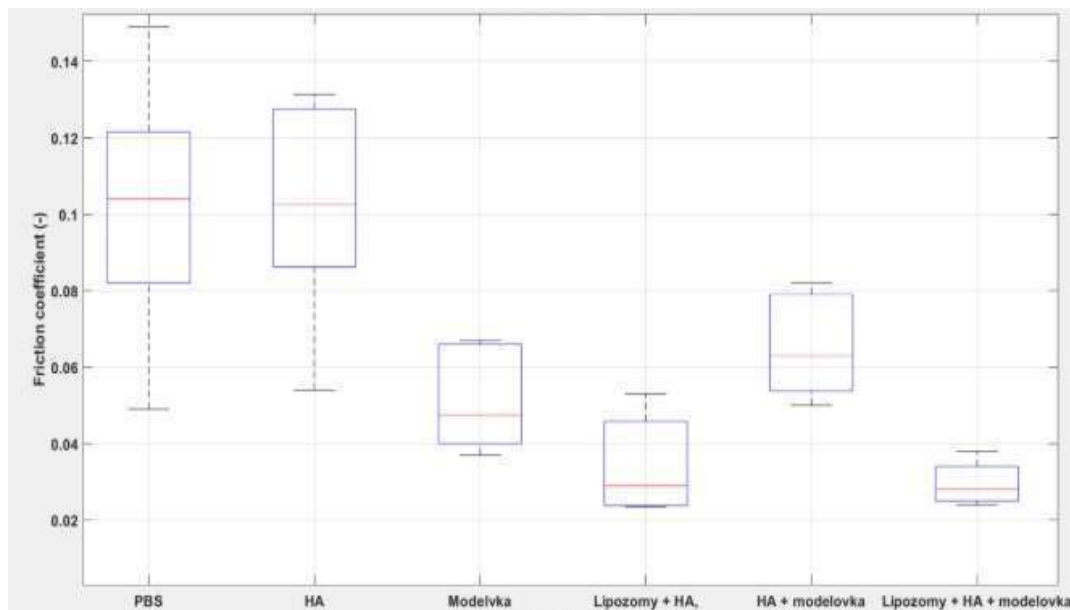
Obr. 1 Výroba lipozómov mikrofluidným zariadením

Samotné experimenty sa vykonávali v spolupráci s ústavom konštruovania na VUT v Brne a prebiehali na univerzálnom tribometri Burkert UTB Tribolab s recipročným modulom pre konfiguráciu pin-on-plate (Obr.2). Dolnú časť recipročného modulu tvorí nerezová vaňa, do ktorej sa vkladajú výhrevné regulátory slúžiace k vyvodu teploty ľudského tela v kontakte. Vo vani je umiestnená gumová podložka, na ktorej je umiestnená doštička zo skúmaného materiálu. Horná časť modulu je pohyblivá a tvorí ju objímka s chrupkovým pinom. K formovaniu mazacieho filmu je potrebné, aby sa lipozómy s HA prichytili na oboch kontaktných povrchoch – ako na pine, tak doštičke.



Obr. 2 Recipročný modul, chrupkový pin

Na základe našich experimentov môžeme tvrdiť, že lipozómy naplnené HA zmiešané s modelovou kvapalinou vykazujú významné zníženie koeficientu trenia v porovnaní so samotnou HA a modelovou kvapalinou.



Obr. 3 Graf znázorňující součinitel' trení mezi jednotlivými mazacími kvapalinami

úterý 20:00-21:30

**Lenka Michlovská¹, Jana Brtníková¹, Katarína Kacvinská¹, Martina Tertinská², Šárka Kobzová³ Lubomír Janda³, Břetislav Lipový⁴
a Lucy Vojtová¹**

Hydrolytická stabilita a morfologie lyofilizovaných biopolymerních pěn připravených v různých koncentrovaných solích

¹Středoevropský technologický institut (CEITEC), Pokročilé biomateriály, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 123, 612 00 Brno

²Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Purkyňova 116, 612 00 Brno

³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

⁴Klinika popálenin a plastické chirurgie, Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

lenka.michlovska@ceitec.vutbr.cz

Dnešní doba bývá často označována také jako tzv. doba postantibiotická. Tento název vyplývá z neustále se zvyšující rezistence řady kmenů bakterií (např. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* - MRSA) k běžně používaným antibiotikům. Je tedy stále více vyvíjen tlak na náhradu antibiotických preparátů jiným typem vhodných antimikrobiálních terapeutik. Jako jedna z možností se nabízí využití izolovaných antibakteriálních proteinů, enzymů či peptidů. Tyto antimikrobiální látky je však nutné stabilizovat pomocí vhodných podmínek. Při začlenění těchto antimikrobiálních látek do různých typů biopolymerních nosičů pro potenciální aplikace, jako antimikrobiální kožní kryty, však dochází vlivem osmoticky aktivních látek (solí) k destabilizaci a následnému rozpadu nosného biomateriálu. Je tedy nutné najít optimální nastavení vhodných solí



a jejich koncentrací, které budou na jedné straně zajišťovat dostatečnou stabilitu antibakteriálních látek a na druhé straně umožní přípravu biopolymerních nosičů s požadovanou stabilitou.

V této práci byl sledován vliv koncentrace vybraných solí na hydrolytickou stabilitu zesíťovaných a nezesíťovaných kolagen/celulózových pěn připravených metodou lyofilizace. Pro začlenění do biopolymerů byl zvolen rekombinantně upravený enzym lysostaphin (LYSSTAPH-S). Na základě řady studií *in vivo* a *in vitro* bylo ověřeno, že působí výhradně na patogenní bakterie *S. aureus* a má tedy potenciální využití při léčbě právě stafylokokových infekcí [1]. Pro stabilizaci LYSSTAPH-S se využívají směsi solí PBS/NaCl a TrisHCl/NaCl jejichž různé koncentrace a poměry (100mM/500mM, 50mM/250mM, 25mM/125mM, 10mM/50mM, 5mM/25mM a 1mM/5mM) byly testovány na přípravu biopolymerních pěn. U lyofilizovaných nezesíťovaných vzorků při použití směsi TrisHCl/NaCl bylo již při vizuálním posouzení patrné, že vysoké koncentrace této směsi solí způsobovaly zborcení vnitřní struktury materiálu, což bylo způsobeno příliš vysokým pH této soli (8,5). Zatímco tyto vzorky byly navíc na omak velmi tvrdé a během jedné hodiny se ve vodném prostředí zcela rozpadly, nezesíťované vzorky obsahující PBS/NaCl vykazovaly dobrou hydrolytickou stabilitu i stupeň bobtnání. Možné využití pro materiály s rychlou degradací by bylo v případě, kdy by bylo nutné rychlé uvolnění enzymu. Naopak se snižující se koncentrací obou testovaných směsí solí byla hydrolytická stabilita všech zesíťovaných vzorků vyhovující a měla rostoucí charakter. Nejvyšší hydrolytické stability dosahovaly vzorky obsahující koncentrace solí 5mM/25mM a 1mM/5mM, které minimálně ovlivňovaly vnitřní architekturu a velikost pórů. Tyto důležité parametry přímo ovlivňují schopnost absorpce a stabilitu materiálu ve vodném prostředí.

Poděkování: Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky v rámci projektu č. NV19-05-00214.

[1] BASTOS, Maria do Carmo de Freire, Bruna Gonçalves COUTINHO a Marcus Lívio Varela COELHO. *Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. Pharmaceuticals* [online]. 2010, 3(4), 1139-1161 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.3390/ph3041139. ISSN 1424-8247.

úterý 20:00-21:30

**Václav Olšanský¹, Carlos Granja², Cristina Oancea², Pavel Krist¹
a Jiří Bíla³**

**Využití protonové radiografie zaznamenané pomocí pixelového
detektoru Timepix3**

¹Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i., Husinec - Řež, čp. 130, 250 68 Řež

²ADVACAM s.r.o., U Pergamenky 12, 17000 Praha 7

³České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav přístrojové a řídicí techniky. Technická 4, 166 07 Praha 6

olsansky@ujf.cas.cz

Tato práce se zabývá využitím svazku nízkoenergetických protonů pro radiografii tenkých vzorků. Hlavní výhodou protonové radiografie je nižší radiační zátěž vzorků, než je tomu např. při klasické RTG radiografii. Ačkoliv je radiační účinek v biologických materiálech od protonů výrazně vyšší, nižší radiační zátěž je dána potřebou výrazně nižší intenzity ozáření. K získání úplné informace o jednom pixelu postačuje pouze jediný proton na rozdíl od fotonové radiografie, kde je třeba zachytit dostatek fotonů, aby bylo možné zkoumat pokles intenzity.

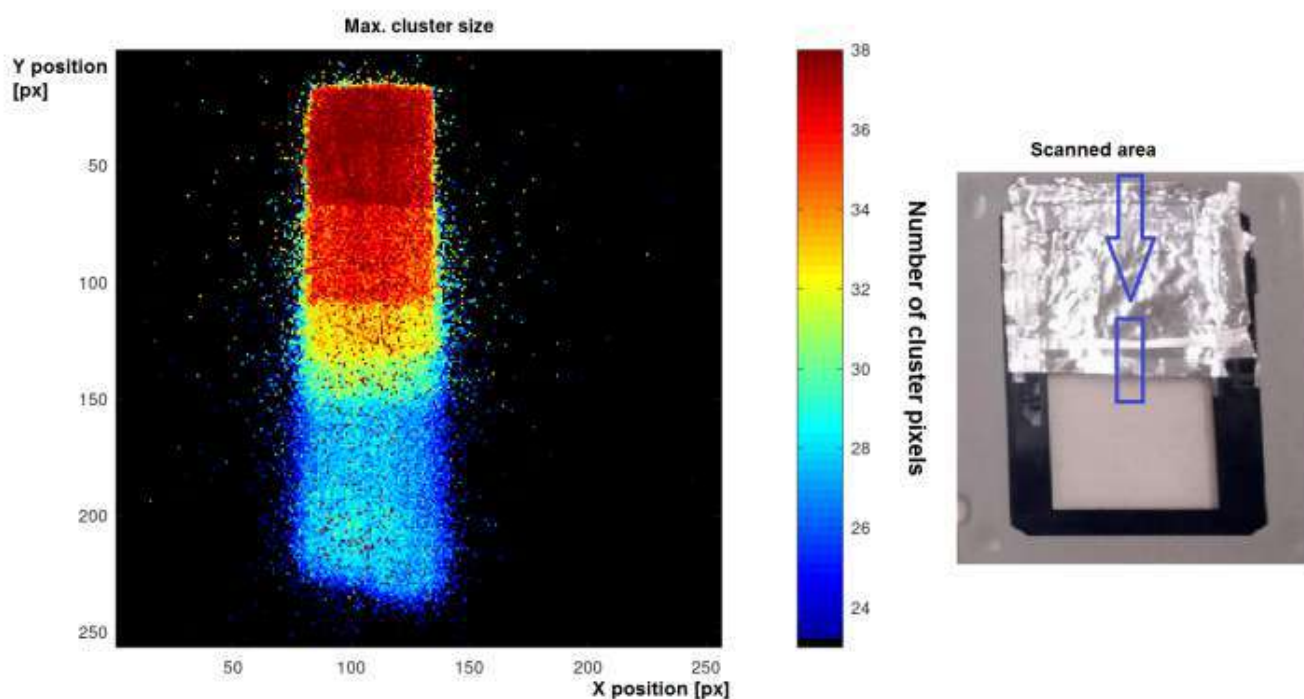


Pro tuto práci byl využit pixelový detektor Timepix3 s 500 μm tlustým křemíkovým senzorem a výstupním elektronickým rozhraním AdvaPix. Data byla pořízena na urychlovači lehkých iontů Tandetron 4130 MC, vyveden byl tenký protonový svazek s energií 3 MeV. Vzorky byly složeny z tenkých Mylarových nebo hliníkových folií.

Vzorky byly umístěny před senzor detektoru a proskenovány pomocí protonového mikrosvazku. Ozařování vzorků i kalibrace detektoru byla provedena na vzduchu. Parametry, na jejichž základě jsou vytvořeny obrázky z protonové radiografie, jsou: měření poklesu energie jednotlivých protonů po průletu vzorkem, velikost clusteru (počet pixelů, kde byla zaznamenána odezva na dopad protonu), maximální hodnota jednotlivého clusteru a další. Všechny protony se stejnou energií vytvoří v aktivní vrstvě detektoru cluster s téměř shodnými parametry. Po průletu vzorkem jsou protony rozptýleny a vytváří clustery menší. Výsledný obrázek se vytvoří na základě výše uvedených parametrů, které byly lokalizovány vždy ke konkrétnímu pixelu.

Pro rekonstrukci radiogramů byly využity jednotlivé parametry. Radiogram na Obr. 1 zobrazuje sadu překrývajících hliníkových folií o celkové tloušťce 0 (pouze vzduch), 5, 10, 25 a 30 μm . Obrázek byl rekonstruován na základě velikosti clusterů. Počet pixelů v clusteru je znázorněn barevnou škálou.

V plánu je aplikace protonové radiografie biologických vzorků a testování i na dalších protonových urychlovačích např. Cyklotron U-120M.



Obr. 1 Ukázka protonové radiografie sady překrývajících se Al folií rekonstruované pomocí parametru velikosti Clusteru (vlevo); Fotografie vzorku překrývajících se folií o celkové tloušťce 0, 5, 10, 25 a 30 μm

Výzkum byl realizován v rámci programu CANAM (Center of Accelerators and Nuclear Analytical Methods) infrastructure LM 2015056.

**Petr Písařík^{1,2}, Jan Remsa^{1,2} a Jan Mikšovský^{1,2}****Úprava povrchu 3D-tištěných vzorků pomocí tenkých vrstev**

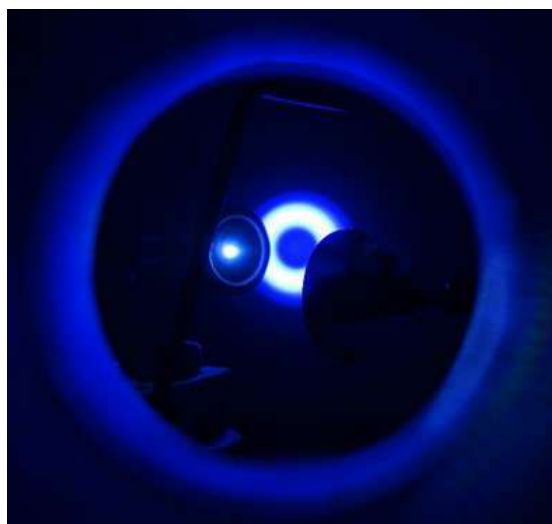
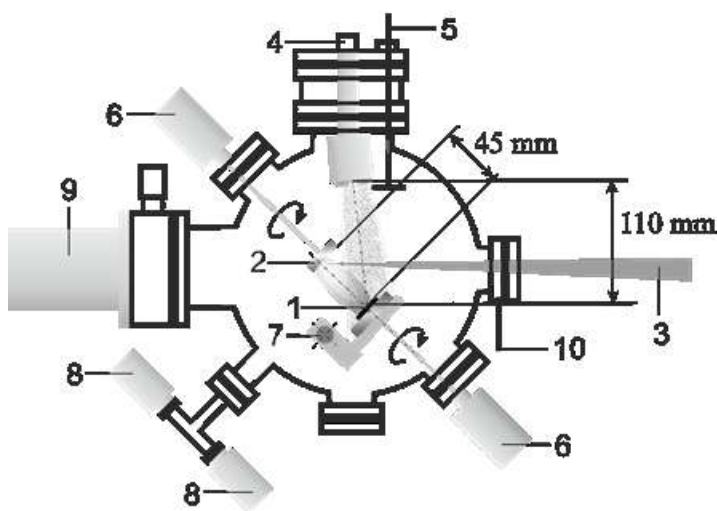
¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra přírodovědných oborů. Nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno

²Fyzikální ústav AV ČR v.v.i., Oddělení optických a biofyzikálních systémů. Na Slovance 1999/2, 182 21 Praha 8

petr.pisarik@fbmi.cvut.cz

Hlavní motivací bylo vyvinout a vyrobit povlak zabraňující nebo snižující korozi forem z 3D tištěného materiálu (DIN 200-69) v oblasti kanálů pro chladících kapalinu a povlak použitelný pro rozhraní mezi taveninou a formou. Byly vybrány tři materiály s vlastnostmi vhodnými pro aplikaci a současně připravené dostupnými metodami: diamantu podobný uhlík (DLC), oxid titaničitý (TiO_2) a yttriem stabilizovaný ZrO_2 (YSZ).

Přes nesporné výhody DLC povlaků bylo obtížné připravit DLC vrstvu o vyšší tloušťce díky vnitřnímu pnutí, které způsobilo špatnou adhezi ke kovovým podkladům. Proto byla hledána cesta jak adhezi zlepšit. Zkoumanými možnostmi byly mezivrstvy (buffer) mezi podložkou a DLC vrstvou, dotace prvek v celém objemu vrstvy nebo pomocí vytvoření gradientní (vícevrstvé) struktury. V případě gradientní vrstvy se využilo jiného materiálu s dobrou adhezí k podložce. Koncentrace tohoto materiálu se snižovala s rostoucí vrstvou, až nakonec zůstal pouze uhlíkový povrch. Z fyzikálních důvodů jsou obvyklou volbou pro zvýšení adheze kovy. Vzhledem k našim předchozím zkušenostem s titanem a chromem byly tyto kovy použity.



Obr. 1 Hybridní systém používaný pro přípravu gradientních vícevrstevných struktur. Schéma depozičního systému PLD s magnetronovým naprašováním a radiofrekvenčním výbojem: 1 - Substrát, 2 - Terč pro PLD, 3 - Laserový svazek, 4 - Magnetron, 5 - Záslepka magnetronu, 6 - Rotace, 7 - RF elektroda, 8 - Vakuová měřky, 9 - Turbomolekulární pumpa, 10 - Průtok plynu (Ar, O)

Příprava povlaků byla provedena metodami pulsní laserové depozice (PLD) a magnetronového naprašování (MS) – depoziční schéma je na obrázek 1. Využito bylo zařízení Fyzikálního ústavu: excimerový laser Compex 205 F, magnetron Kurt. J. Lesker a vakuové aparatury uzpůsobené pro fyzikální metody nanášení vrstev (včetně aplikace radiofrekvenčního (RF) výboje). V rámci experimentů byly pokryty podložky z 3D tištěného materiálu ve tvaru tyčí (průměr 6 mm) a



destiček (30×10×2 mm). DLC a YSZ vrstvy byly připraveny za normálních podmínek. Příprava TiO₂ za nízké teploty (bez zahřívání podložky) vyžadovala využití RF výboje v kyslíkové atmosféře během depozice. Gradientní struktury byly připraveny technologicky náročnější kombinací technik. V našem případě jsme zvolili magnetron jako zdroj chromu a pulsní laserovou depozici pro zdroj DLC.

Tyče (obr. 2) byly využity pro testování korozní odolnosti a destičky pro určení složení (GD-OES). Pro určení tloušťky vrstev byla využita mechanická profilometrie. Pro korozní testy byly připraveny vrstvy stejných parametrů o dvou tloušťkách pro studium vlivu tloušťky na korozi. Testování korozní odolnosti bylo prováděno na přístroji VersaSTAT 3 – 400 (Princeton Applied Research). Vyhodnocení proběhlo v programu Versa Studio 2.42.3. Pro měření bylo zvoleno potenciodynamické měření pro získání Tafelových křivek, ze kterých byly následně dopočítány korozní parametry.

Vyhodnocením došlo k eliminaci nevhodných směrů, jako například vrstev tvořených pouze čistým DLC. Tyto vrstvy byly nahrazeny gradientní vrstvou DLC dotovanou chromem. Výsledky GD-OES prokázaly gradientní změnu koncentrace chromu v DLC dle předpokladů. Korozní proud poklesl u některých povlaků až desítnásobně oproti základnímu materiálu, což mělo za následek snížení koroze. Další výzkumy gradientních vícevrstvých struktur by mohly do budoucna vést k výrobě nových odolných forem s delší životností, a tím zlevnit a zkvalitnit výrobky a posunout tento obor dopředu.



Obr. 2. Testovací tyče s povlaky: 1,2 – DLC; 3,4 – Cr:DLC; 5,6 – Gradientní Cr:DLC; 7,8 – YSZ; 9 – TiO₂ (Terč TiO₂); 10 – TiO₂ (Terč Ti)

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem TAČR číslo TK01020187 a grantem Studentské grantové soutěže ČVUT číslo SGS19/134/OHK4/2T/17.

**úterý 20:00-21:30**

Štěpán Podzimek, Tat'jana Janatová, Lucie Himmlová, Markéta Janovská, Adéla Roubíčková, Martin Bartoš, Radka Vrbová a Jana Dušková

Stanovení hypersenzitivity na kovy testem MELISA® - follow-up studie

Stomatologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta UK, Praha

stepan.podzimek@vfn.cz

Kovové materiály využívané v medicíně se uplatňují především v chirurgii, ortopedii, stomatologii a kardiologii. Jedná se o slitiny různorodého složení, mezi nejznámější patří chirurgická ocel, titan a jeho slitiny, chrom-kobaltové slitiny, amalgám, drahokovové slitiny atd. Přes deklarovanou biokompatibilitu se z těchto slitin mohou uvolňovat kovové ionty i kovové partikule do okolních tkání a odtud i do celého organismu. Kovy mohou způsobovat lokální i systémové symptomy různorodého charakteru. Diagnostikovat nežádoucí účinky kovových materiálů je možné pomocí epikutánních testů či testem MELISA®, který využíváme na našem pracovišti. Pomocí tohoto testu můžeme určit jaké konkrétní kovy nejsou pacientem tolerovány a doporučit individuálně nejvhodnější slitinu například pro sanaci v dutině ústní či pro implantaci zubního implantátu či totální endoprotézy. Této follow-up studie se zúčastnilo 42 pacientů, kteří byli vyšetřeni na našem pracovišti pro zdravotní obtíže v souvislosti s kovovou sanací chrupu, byla jim testem MELISA® potvrzena hypersenzitivita na titan a další kovy před jedním až 7 lety a bylo jim doporučeno omezit expozici těmto kovům. V roce 2019 jsme provedli jejich kontrolní vyšetření, včetně provedení testu MELISA®. V porovnání s původním vyšetřením došlo k poklesu reaktivity na všechny testované kovy, signifikantní pokles reaktivity byl zaznamenán u titanu, zinku, zlata, paládia, chrómu, železa, niklu, platiny a cínu. Omezením expozice netolerovaným kovům došlo k významnému snížení hypersenzitivity na tyto kovy.

Poděkování: Tato studie a prezentace byla podpořena projektem NV19-08-00070 (AZV, MZ ČR).

úterý 20:00-21:30

Michala Rampichová¹, Matěj Buzgo^{1,2}, Věra Lukášová¹, Radmila Kudláčková¹, Herman Novik², Aiva Siamaitė² a Eva Filová¹

Optimalizace rozpouštědlového systému pro PCL/HAp nanovlákná s řízeným uvolňováním látek

¹Akademie věd České republiky, Ústav experimentální medicíny, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

²Inocure s.r.o., Politických vězňů 935/13, 110 00 Praha 1

michala.rampichova@iem.cas.cz

Nanovláknenné a mikrovláknenné nosiče mají v aplikacích tkáňového inženýrství velký potenciál. Mezi hlavní výhody těchto nosičů patří jejich morfologie, napodobující vláknitou strukturu mezibuněčné hmoty, velký specifický povrch a vysoká porozita. Navíc je možné do vláken uzavřít aktivní látky, které se postupně uvolňují a mohou působit na okolní buňky přímo v místě defektu.



Emulzní zvlákňování představuje metodu, kterou lze připravit vlákna s velkým podílem aktivní látky. Vzhledem k obsažené aktivní látce není možné připravovaná vlákna vymývat, nebo oplachovat, protože by došlo k poklesu její koncentrace, nebo úplnému vymytí.

V této studii jsme připravovali vlákenný systém z polykaprolaktonu (PCL) a hydroxyapatitu (HAp) pro uvolňování látek *in vivo* v místě kostního defektu. Použit byl rozpouštědlový systém etanol/chloroform nebo metanol/chloroform. Jako surfaktant byly zvoleny dva druhy Pluronic. Vlákna připravovaná z rozpouštědlového systému metanol/chloroform vykazovala tvorbu morfologicky kvalitnějších vláken než ze systému etanol/chloroform. Při *in vitro* testování na buněčné linii MC3T3E1 a SaOS-2 jsme ale zjistili, že jsou vlákna cytotoxická, tudíž pro *in vivo* účely nepoužitelná. Předpokládali jsme nižší cytotoxický efekt pro rozpouštědlový systém etanol/chloroform. V tomto případě však byla cytotoxická vlákna obsahující surfaktanty. Měřenou metabolickou aktivitu buněk nadále snížila i přítomnost HAp v nosiči. Tento jev byl popsán pro linii MC3T3E1 (1).

Studie ukázala, že volba vhodné kombinace rozpouštědlového systému a surfaktantu ovlivňuje jak kvalitu vláken a kapacitu pro uzavíranou látku, tak biokompatibilitu nosiče.

(1) Shu R, McMullen R, Baumann M J, McCabe L R. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2003, 15;67(4):1196-204.

Studie byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky, projekt číslo 18-09306S.

úterý 20:00-21:30

**Jitka Říhová¹, Tomáš Suchý^{1,2,3}, Lucie Vištejnová², Monika Šupová^{2,3}
a Lukáš Horný^{2,3}**

Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových nanovláknenných vrstev v simulovaných tělních podmínkách

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6

²Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i., V Holešovičkách 41, 182 09, Praha

³Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Alej Svobody 76, 323 00, Plzeň

Jitka.Rihova@fs.cvut.cz

Jedním ze směrů výzkumu v tkáňovém inženýrství je výzkum a vývoj nových materiálů, které by mohly být využity při léčbě kostní tkáně. Jedním ze směrů je vývoj biokompatibilních a bioresorbovatelných nanovláken, které mohou být vyrobeny z různých syntetických či přírodních polymerů. Tyto nanovláknenné struktury mohou být dočasnou mechanickou a strukturní podporou pro buňky a mohou pomáhat obnovit poškozenou tkáň. Nyní se výzkum zabývá převážně materiály, které mohou být v lidském těle zcela resorbovatelné a jejich vlastnosti simulují funkci původní tkáně. [1][2]



Tento příspěvek pojednává o analýze strukturních vlastností nanovlákných kolagenových vrstev v hydratovaném stavu. Cílem tohoto výzkumu bylo především hodnocení hmotnostních úbytků a stupně degradace nanovlákných kolagenových vrstev zesíťovaných v časech 3, 6, 12 a 24 hodin. Kolagenové vrstvy byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním 8 %hm. roztoku kolagenu (typ I) ve fosfátovém pufru a ethanolu (1/1 obj.), jejich stabilita byla zvýšena zesíťováním pomocí chemického činidla na bázi karboimidu [3]. Takto připravené vrstvy byly po dobu 7 dní vystaveny vodnému prostředí. V časech 3, 6, 24 hod, 3 a 7 dní byla hodnocena degradace vrstev výpočtem hmotnostních úbytků a nasákavosti vzorků. Dále byly vrstvy hodnoceny pomocí elektronové mikroskopie.

[1] Azevedo H.S. and Reis R.L., "Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control their Degradation Rate", *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, CRC Press, Boca Raton, pp. 177-201, 2005.

[2] Williams, D.F. and Zhong, S.P., *Biodeterioration/biodegradation of polymeric medical devices in situ*, *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 95, 1994.

Podpořeno projektem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787, Centrum výzkumu infekčních onemocnění, uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR, financovaného z Evropského Fondu pro Regionální Rozvoj.

úterý 20:00-21:30

**Radek Sedláček¹, Tomáš Suchý¹, Šárka Laxová¹, Věra Lukášová²,
Michala Rampichová², Lucy Vojtová³, Milan Krტიčka⁴, Ladislav Plánka⁴,
Eduard Göpfert⁵, Martin Faldyna⁵, Martin Trunec³**

Analýza ohybové tuhosti páteře po intervertebrální fúzi

¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha 6

²České vysoké učení technické v Praze, Univerzitní centrum energeticky efektivních budov, Třinecká 1024, 273 43 Buštěhrad

³CEITEC -Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Purkyňova 656/123 612 00 Brno

⁴Klinika dětské chirurgie ortopedie a traumatologie, Lékařská fakulta MU a Fakultní nemocnice Brno, Černopolní 9, 613 00 Brno

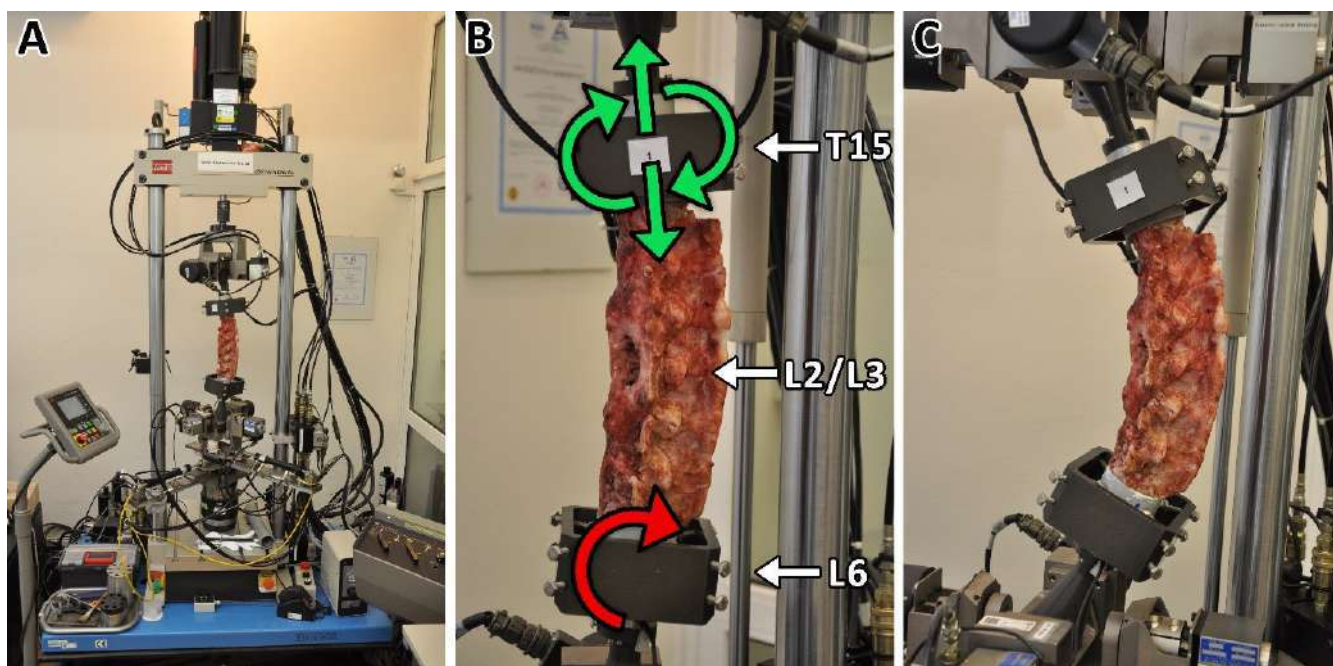
⁵Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

radek.sedlacek@fs.cvut.cz

Předmětem této experimentální studie bylo hodnocení ohybové tuhosti páteřních segmentů experimentálního modelu prasete po implantaci hybridního biodegradabilního nanokompozitního porézního implantátu (HBNPI). Nově navržený materiál implantátu představuje velmi dobrou podporu tvorby kostní fúze. Zvláště efektivní využití se nabízí v páteřní problematice, kde při poranění či degenerativním postižení je často využívána metoda tzv. intervertebrální dýzy. Experiment byl prováděn na prasečích páteřních segmentech a je součástí studie, která se zaměřuje právě na optimalizaci a zlepšení metody meziobratlové spinální fúze. Účelem je získat funkční, resorbovatelný, biomechanicky stabilní, osteoinduktivní a osteokonduktivní kostní implantát, který bude připraven pro klinické zkoušky.



Hodnocení mechanických vlastností páteřních segmentů bylo zaměřeno na stanovení parametrů, které jsou významné z hlediska přenosu mechanického zatížení. Zjišťována byla zejména tuhost páteřních vzorků při extenzi a doplňkově pak i maximální ohybový moment potřebný k destrukci páteře. Metodika spočívá v zatěžování vzorků páteřních segmentů ohybem bez parazitních osových sil, které byly testovacím systémem udržovány nulové. Tato velmi důležitá podmínka byla zajištěna využitím speciálního páteřního simulátoru a 6DOF snímače na testovacím systému MTS Mini Bionix (viz Obr. 1).



Obr. 1 Testovací systém MTS Mini Bionix (A), princip zatěžování páteřních segmentů (B), ohyb vzorku (C)

Tato studie byla podpořena agenturou AZV MZ ČR grantem č. 17-31276A.

úterý 20:00-21:30

**Věra Sovková, Věra Lukášová, Lucie Wolfová, Karolína Vocetková,
Veronika Hefka Blahnová a Eva Filová
Nosiče pro řešení kostních defektů**

Ústav experimentální medicíny AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha

vera.sovkova@iem.cas.cz

Cílem studie bylo vyvinout a *in vitro* otestovat nosiče na bázi decelularizované kostní hmoty, kolagenu a bioapatitu izolovaného z lidské kostní ECM, které by byly biokompatibilní, podporovaly osteogenní diferenciaci kmenových buněk a tím urychlily hojení kostních defektů. Byly připraveny tři typy nosičů, kolagen s bioapatitem, kolagen s namletou decelularizovanou kostní hmotou a decelularizovaná kost. Na tyto nosiče byly nasazeny primární mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně. Jako kontrola sloužily buňky na kultivačním plastu. V experimentu byla sledována proliferace, viabilita a diferenciací buněk. Všechny nosiče podporovaly viabilitu testovaných buněk, přičemž nejlepší účinek na metabolickou aktivitu měly nosiče na bázi kolagenu I. Proliferace buněk byla u nosičů s decelularizovanou kostní hmotou nejvyšší 7. den experimentu



a poté strmě klesala. U nosičů s příměsí bioapatitu proliferace buněk stagnovala v průběhu experimentu a vzrostla až mezi 21. a 28. experimentálním dnem. Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie ukázala rovnoměrně porostlé nosiče buňkami. Aktivita alkalické fosfatázy byla vyšší na nosičích s příměsí kolagenu oproti decelularizované kosti. Zjistili jsme, že nosiče jsou biokompatibilní a mohly by urychlit proces hojení v místě defektu.

Tato práce byla podpořena grantem ministerstva průmyslu a obchodu v programu MPO Aplikace, výzva č. IV Název projektu: Vývoj produktů získaných zpracováním lidské kostní tkáně pro vybrané aplikace v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, Registrační číslo projektu: CZ.01.1.02/0.0/0.0/17_107/0012524.

úterý 20:00-21:30

**Lucy Vojtová¹, Katarína Kacvinská¹, Šárka Kobzová², Břetislav Lipový^{1,3}
a Lubomír Janda²**

**Kolagen/celulózové kožní kryty obohacené antimikrobiálními
enzybiotiky a jejich účinek na epidemiologicky relevantní kmeny *S. aureus***

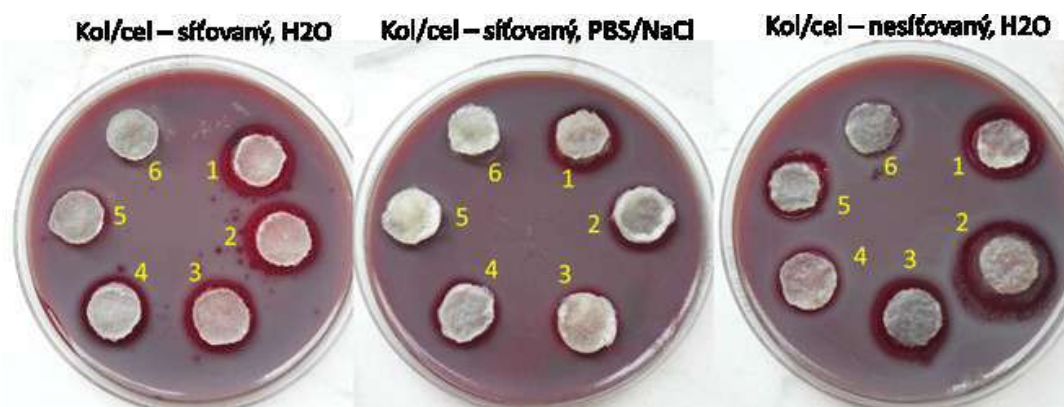
¹CEITEC -Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Purkyňova 656/123
612 00 Brno

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

³Klinika popálenin a plastické chirurgie, Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Lucy.Vojtova@ceitec.vutbr.cz

Poté, co jsme v minulém roce sledovali vliv solí na přípravu kolagen/celulózových krytů ran a určili jsme vhodné koncentrace, letos jsme přidali různé koncentrace enzybiotika LYSSTAPH-S (rekombinantní lysostaphin) a hodnotili jsme jejich účinek na dvou kmenech *S. aureus* - 244(ST8) a 5921(ST22). Lysostaphin (27 kDa) je známý jako bakteriocin třídy III, který patří k peptidoglykanovým hydrolázám, schopný štěpit síťující pentaglycinové můstky. Jedná se o antibakteriální enzym odvozený z bakterií, které mohou být baktericidním nebo bakteriostatickým dopadem účinné na podobné nebo příbuzné bakteriální kmeny. Díky své aktivitě proti pentaglycinu je lysostaphin vysoce účinným činidlem proti aktivně rostoucím i klidovým bakteriím *S. aureus* MRSA [1].



Obrázek 1: Disková difuzní metoda na krevním agaru: bakteriální kmen *S. aureus* 244(ST8). Tři typy disků kol/cel s koncentrací LYSSTAPH-S 65; 43; 26; 10; 5 a 3 µg na plochu vzorečku (označené jako 1–6) byly položeny na krevní agar. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C 24 h.



Byly připraveny kolagen/celulózové kryty nesítované i sítované ve vodě i v roztoku PBS/NaCl s inkorporovaným LYSSTAPH-S v 6-ti různých koncentracích, které byly aplikovány ve formě disku na krevní agar s nanesenou bakteriální kulturou SA, kmeny 244(ST8) (Obrázek 1) a 5921(ST22).

Bylo zjištěno, že vzorky jsou účinnější na kmen SA 244(ST8) než na kmen 5921(ST22). Sůl přidaná do sítovaných vzorků nezajistila lepší účinnost enzybiotika a nejlepší výsledky vykazovaly nesítované vzorky. Nicméně tyto se rychle rozpadaly a jsou proto použitelné pro krátkodobější účinek, kdežto sítované vzorky jsou použitelné pro cca 3-4 týdenní účinek.

Poděkování: Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky v rámci projektu č. NV19-05-00214.

úterý 20:00-21:30

**Radka Vrbová, Štěpán Podzimek, Lucie Himmlová, Tat'jana Janatová,
Markéta Janovská, Adéla Roubíčková, Martin Bartoš a Jana Dušková
Klinické ověření přínosu testu MELISA® u pacientů s hypersenzitivitou
na kovy**

Stomatologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Karlovo náměstí 32, 121 11 Praha 2

Radka.Vrbova@vfn.cz

Imunologický test MELISA® je na našem pracovišti dlouhodobě využíván pro klinické stanovení hypersenzitivity na kovové materiály. Je založen na vyhodnocení proliferace T-lymfocytů izolovaných z periferní krve pacienta *in vitro* po kultivaci s testovanými materiály. Na základě výsledků lze pacientovi doporučit nejvhodnější materiál pro implantaci, ať již dentálního implantátu nebo totální endoprotézy či navrhnout nejvhodnější slitinu pro aplikaci v dutině ústní. V rámci projektu týkajícího se preklinického testování pokročilých titanových materiálů modifikovaných iontovým svazkem s lymfocyty hypersenzitivních pacientů byl vybrán z databáze našeho pracoviště podsoubor 93 pacientů, u kterých byla v minulosti prokázána testem MELISA® hypersenzitivita na titan, a kterým bylo na základě výsledků tohoto testu vydáno doporučení směřující k eliminaci jejich zdravotních komplikací. Tito pacienti byli písemně osloveni s nabídkou účasti v projektu, souhlasilo 42 pacientů. Následně byli objednáni ke vstupnímu vyšetření, jehož součástí bylo vyplnění speciálního dotazníku zaměřeného na změny jejich zdravotního stavu od posledního vyšetření a na míru dodržení doporučených preventivních opatření. Byl jim opětovně proveden test MELISA® k potvrzení/vyloučení hypersenzitivity na titan včetně stanovení hypersenzitivity i na dalších 15 kovů zastoupených v implantačních materiálech. Vyhodnocením 38 dotazníků (4 nehodnotitelné) a vstupního klinického vyšetření bylo posuzováno, zda test MELISA® byl přínosný a došlo ke zlepšení celkového zdravotního stavu pacienta. Celkem 32 pacientů se řídilo navrženým doporučením a z tohoto počtu 30 pacientů uvedlo zlepšení svého zdravotního stavu, u zbývajících 2 ke zlepšení nedošlo. Celkem 6 pacientů se doporučením neřídilo, z tohoto počtu u 5 pacientů obtíže přetrvávaly. Byl potvrzen statisticky významný vliv testu MELISA® v diagnostice a prevenci zdravotních komplikací souvisejících s hypersenzitivitou na kovy (Fisherův exaktní test, $p = 0,0002$).

Podpořeno projektem č. NV19-08-00070 Ministerstva zdravotnictví České republiky.



**Anna Zavadakova¹, Dagmar Bilikova¹, Lucie Vistejnova¹
and Peter R. Mouton^{2,3}**

Absolute cell number determination in 3D collagen hydrogel scaffolds

¹Biomedical Center, Medical Faculty in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 76, 32300 Pilsen

²Department of Computer Sciences and Engineering, College of Engineering, University of South Florida, 4202 E Fowler Ave, Tampa, FL, USA

³SRC Biosciences, 1810 W. Kennedy Blvd, Tampa, FL, USA

anna.zavadakova@lfp.cuni.cz

Background

Quantification of cells is used widely throughout many research areas. It is needed to control cell proliferation and to enable normalization of data which are dependent on cell number. Determination of cell number in 2D cultures is a routine method of each biological lab when determination of cell number in 3D samples is not common so far. Importantly, the currently used methods based on fluorescence measurement usually do not estimate absolute (total) cell count in 3D cultures.

Aim

The aim of this work is to develop a method for total cell number determination of cells in 3D collagen hydrogel scaffolds using stereological principles for cell sampling and quantification. Here we outline an approach that can be broadly applied to quantify cells in 3D collagen hydrogel scaffolds and we compare it with standard cell counting in Bürker chamber.

Methods

Collagen hydrogel scaffolds with volume of 500 μ l were seeded with 10 000, 125 000, 250 000 or 375 000 cells. Next day, the scaffolds with incorporated cells were fixed (4% paraformaldehyde, 30 min), maintained in Triton X-100 (0.2%, 30 min) followed by BSA blocking (5%, 30 min). Nuclei of the cells in the scaffolds were stained by DAPI (1 μ g/ml, 10 min, RT). The sampling of scaffolds for counting was performed as shown in Figure 1. Microscopic images were taken by Olympus UPlanFL N 10 $\times$ /0.30 objective and the pictures of columns were saved as image sequence (*.stk file) by VisiView software. Cells (objects) in image sequences were counted with freely available Fiji software (National Institute of Health, Bethesda, USA). The number of cells was recalculated to the whole scaffold volume. The cell number was counted by two independent observers and in five different collagen scaffolds for each seeding density (n=10). For Bürker chamber part 10 000, 125 000, 250 000 and 375 000 cells in 500 μ l culture medium were counted by standard counting procedure used in our lab. The cell number was counted by two independent observers and in five different cell suspensions for each seeding density (n=10). Statistical analysis was performed by Statistica v12 (Tibco, USA).

Results

Determined cell numbers in scaffolds were equal to the seeding densities of 125 000, 250 000 and 375 000 cells in scaffold, while for 10 000 cells did not (verified by the One-sample t-test; $p < 0.05$) (Table 1). Similarly, determined cell numbers in the cell suspensions using Bürker chamber were equal to the seeding densities of 125 000, 250 000 and 375 000 cells in cell suspension, while for 10 000 cells did not (verified by the One-sample t-test; $p < 0.05$) (Table 2).



Table 1: Number of cells counted in 3D collagen hydrogel scaffolds.

NUMBER OF SEEDED CELLS	NUMBER OF COUNTED CELLS	CV (%)
10 000	14 716 ± 2 843	19
125 000	126 317 ± 7 930	6
250 000	216 073 ± 52 988	25
375 000	455 095 ± 133 195	29

Table 2: Number of cells counted in cell suspension by Bürker chamber method.

NUMBER OF SEEDED CELLS	NUMBER OF COUNTED CELLS	CV (%)
10 000	13 450 ± 2 477	18
125 000	125 400 ± 18 536	15
250 000	253 200 ± 6 197	2
375 000	349 200 ± 37 542	11

Discussion and Conclusion

Our method of the determination of cell number in 3D scaffolds is comparable with the gold standard of cell number determination in cell suspension with use of Bürker chamber. The both methods determined the equal cell number to the seeded cell number for cell densities of 125 000, 250 000 and 375 000 cells in 500 µl scaffold or culture medium, while for 10 000 cells in the same volume did not. However, since the absolute cell number is determined from selected portions of whole sample, homogenous cell distribution in the scaffolds is required as the method does not take into account reduction of scaffold diameter (a result of the cell contraction in time) and non-homogenous cell density (a result of the cell migration in time). It can be concluded that the method optimized in our lab can be used in other research areas for absolute cell number determination in 3D collagen hydrogel scaffolds with higher seeding densities of cells (125 000, 250 000 and 375 000 cells in 500 µl of scaffold).

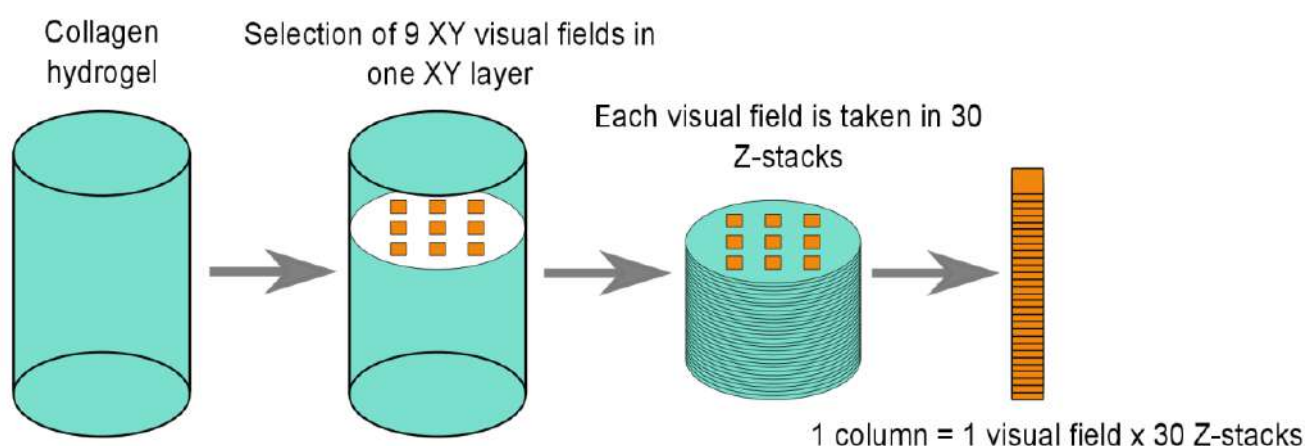


Figure 1: SAMPLING PROCEDURE FOR COUNTING IN 3D COLLAGEN HYDROGEL SCAFFOLD. 3D scaffold was sampled into 9 XY visual fields and 30 Z-stacks. Cell number was determined for each column. The number was recalculated to the whole volume of the scaffold.

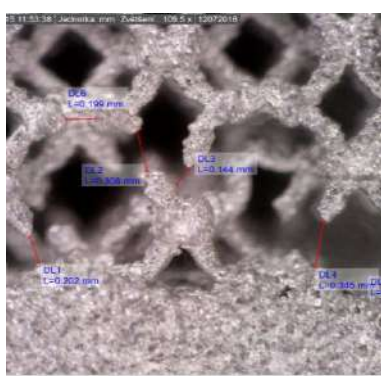
Financial Support: This study was supported by project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 „Fighting Infectious Diseases”, awarded by the MEYS CR, financed from EFRR; by Specific University Research Grant No. 260392 provided by Charles University.

**Aleš Jíra, Luboš Řehounek, Gabriela Javorská a František Denk**
Stěnová porézní struktura jako základ implantátů

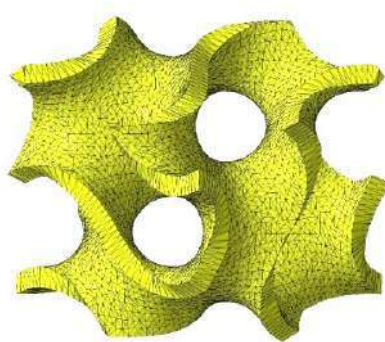
České vysoké učení technické v Praze, Fakulta stavební, Thákurova 7, 166 29 Praha

jira@fsv.cvut.cz

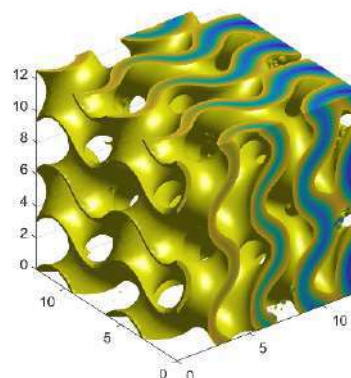
Rozvoj aditivních technologií nabízí dosud nevídané možnosti strukturování nitrokostních částí implantátů, umožňuje vytvářet rozmanité tvary a zároveň usnadňuje výrobu. Naše práce dlouhodobě spočívá v navrhování a optimalizování díků, zejména dentálních, implantátů. Pro zajištění kvalitní a dlouhodobě stabilní osteointegrace je nutné vytvořit vhodné prostředí. Toho je možné dosáhnout pomocí trabekulárních struktur, tvořících porézní vrstvu z jednotlivých trámců. Toto řešení má však velké množství negativ, kde mezi ty nejzásadnější řadíme časté nespojitosti trámců, lokální defekty a nižší pevnost (Obr. 1a). Alternativní řešení je možné najít pomocí inspirace v přírodě – gyroidní struktura (Obr. 1b) a její trojnásobně periodicky opakující se buňka (triply-periodic). Její výskyt můžeme například potvrdit v kutikulárních strukturách, jako jsou šupiny na motýlích křídlech. Chitin v této chitinové struktuře společně se vzduchem vytváří fotonický krystal, díky kterému vznikají duhové barvy na motýlích křídlech. Gyroidní struktura se řadí do ploch, nazývaných IMDS⁴. Jedná se o povrchy, které rozdělují prostor na dvě nebo tři oblasti a minimalizují mezifázovou (interfaciální) oblast. Výhody struktury spočívají zejména v eliminaci vlivu lokálních defektů způsobených 3D tiskem a výrazně vyšší pevnost v porovnání s trabekulárními strukturami při stejné densitě. Všechny dosud provedené mechanické testy prokázaly velmi dobré výsledky, ale její využití stále přináší konstrukční problémy – jako například ostré rozhraní mezi jádrem implantátu a samotnou strukturou. Proto se snažíme vytvořit strukturu vycházející ze stěnového systému gyroidu, ale s proměnou tloušťky stěn – gradientní struktura (Obr. 1c). Takový implantát by pak byl tvořen jedním tělesem s plynulým přechodem z porézní do homogenní části bez ostrých změn.



a)



b)



c)

Obr. 1 ukázky porézních struktur a) trabekulární struktura a její nespojitosti, b) základní periodická buňka gyroidu, c) jednoose gradientní změna pórovitosti u gyroidní struktury

**úterý 20:00-21:30****Lucie Vištejnová a Pavel Klein****Různé proměnné zvířecích modelů během testování kostních a kloubních náhrad, aneb co všechno nás ještě může překvapit**

Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Alej Svobody 76, 323 00 Plzeň

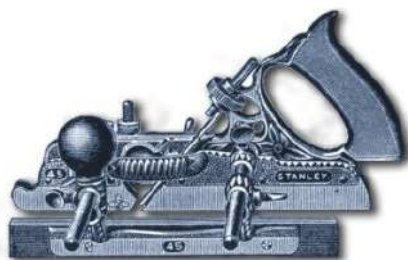
lucie.vistejnova@lfp.cuni.cz

Použití zvířecího modelu během vývoje kostních a kloubních implantátů je v současné době nezbytné. Potkan, králík a prase jsou nejběžněji využívané zvířecí druhy. Vyjmuté vzorky kostí či chrupavek jsou pak podrobovány řadě analýz zahrnující počítačově tomografické vyšetření (či jeho mikro- verzi), histologickou analýzu nebo mechanické testy.

Za poslední tři roky jsme měli možnost realizovat testy na zvířecích modelech v několika projektech zabývajících se vývojem kostních náhrad ve formě osteoinduktivních nosičů antibiotik, osteoinduktivních kostních tmelů, žebních dlah, nosičů látek pro lokální cílenou léčbu osteoporózy, nebo degradovatelných hořčkových implantátů, a dále projektu mající za cíl verifikovat vhodnost mesenchymálních kmenových buněk z pupečníků pro regeneraci defektu chrupavky.

Během řešení projektů jsme předávali odebrané vzorky kostí a chrupavek k následným analýzám. Meziproduktem interakcí mezi námi, realizátory operací a explantací vzorků, a odborníky na danou analýzu, tedy nejčastěji histology, počítačovými tomografisty, či realizátory mechanických zkoušek, se stal dotaz dotaz: „Kde je defekt, který mám analyzovat?“ Zpočátku jsme byli dotazem zaskočení, protože jsme opravdu defekt nemohli lokalizovat, zvláště při delších (3 měsíce a déle) experimentálních časových bodech, což zejména při histologické analýze činilo určité problémy. V příspěvku pomocí obrazové dokumentace (fotografie explantovaných vzorků, mikro-CT snímky, histologické snímky) shrneme naše zkušenosti s lokalizací, velikostí a prostorovou orientací studovaného defektu v závislosti na době hojení, stáří zvířete, nebo typu tkáně, do které se implantuje, a ukážeme vybrané souvislosti mezi mikro-CT a histologickými snímky.

Práce je podpořena projekty Ministerstva zdravotnictví číslo NV19-06-00355 a NU20-02-00368.



Nebojte se
odhalit



NĚCO VÍC NEŽ
SÍŤOVÁ TAŠKA



ČESKÁ
SÍŤOVKA



www.ceskasitovka.cz



Poznámky:



Poznámky:



Poznámky:



Seminář Biomateriály a jejich povrchy XIII. pořádají



Společnost pro kompozitní a uhlíkové materiály, z.s.



Fakulta strojní, ČVUT v Praze



Ústav struktury a mechaniky hornin, AV ČR, v.v.i.



Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, UK



QUALITAS - Kvalitní život ve zdraví i nemoci



Strategie AV21



AHOJ, JÁ JSEM VERČA.
Veronika Hefka Blahnová

AHOJ, JÁ JSEM TONDA.
Antonín Brož

AHOJ, JÁ JSEM HONZA.
Jan Vodička

AHOJ, JÁ JSEM ONDRA.
Ondřej Šamaj

AHOJ, JÁ JSEM JITKA.
Jitka Řihová

AHOJ, JÁ JSEM PETR.
Petr Polách

AHOJ, JÁ JSEM JANA.
Jana Musilová

AHOJ, JÁ JSEM KATKA.
Katarína Mendová

AHOJ, JÁ JSEM TERKA.
Tereza Bělinová

AHOJ, JÁ JSEM RASTY.
Rastislav Ballay

AHOJ, JÁ JSEM JANA.
Jana Brtníková

AHOJ, JÁ JSEM KAREL.
Karel Tesář

AHOJ, JÁ JSEM VĚRKA.
Věra Jenčová

AHOJ, JÁ JSEM DAVID.
David Chvátíl

AHOJ, JÁ JSEM VENDULA.
Vendula Karbášová

AHOJ, JÁ JSEM DAVID.
David Lukáš

AHOJ, JÁ JSEM PETR.
Petr Písařík

AHOJ, JÁ JSEM HONZA.
Jan Krčil

AHOJ, JÁ JSEM JANO.
Ján Kužma

AHOJ, JÁ JSEM PAVLA.
Pavla Gadušová

AHOJ, JÁ JSEM VĚRA.
Věra Lukášová

AHOJ, JÁ JSEM LENKA.
Lenka Michlovská

AHOJ, JÁ JSEM DÁŠA.
Dagmar Poláková

AHOJ, JÁ JSEM ŠÁRKA.
Šárka Beranová

AHOJ, JÁ JSEM DENISA.
Denisa Svobodová

AHOJ, JÁ JSEM TÝNA.
Kristýna Kubašová

AHOJ, JÁ JSEM IVAN.
Ivan Jirka

AHOJ, JÁ JSEM MARTIN.
Martin Bartoš

AHOJ, JÁ JSEM ŠTĚPÁN.
Štěpán Podzimek

AHOJ, JÁ JSEM OLDA.
Oldřich Pospíchal

AHOJ, JÁ JSEM JITŘENKA.
Jitřenka Jirů

AHOJ, JÁ JSEM KAREL.
Karel Balík

AHOJ, JÁ JSEM EDGAR.
Edgar B. Montufar

AHOJ, JÁ JSEM VLASTA.
Vlasta Voříšková

AHOJ, JÁ JSEM ELENA.
Elena Filová

AHOJ, JÁ JSEM KRISTINA.
Kristina Eleršić Filipić

AHOJ, JÁ JSEM ADELIA.
Adelia Kashimbetová

AHOJ, JÁ JSEM ALEŠ.
Aleš Jira

AHOJ, JÁ JSEM FRANTA.
František Deník ml.

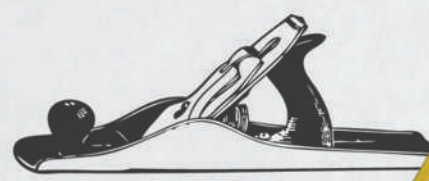
AHOJ, JÁ JSEM VÍTA.
Vítězslav Březina

AHOJ, JÁ JSEM PAVEL.
Pavel Klein

AHOJ, JÁ JSEM KRISTÝNA.
Kristýna Havlíčková

AHOJ, JÁ JSEM LUCKA.
Lucie Zavadáková

AHOJ, JÁ JSEM VLÁDA.
Vladimír Havránek



Herbertov
BIO SINCE 2008

