



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

**PŘÍPRAVA SKAFOLDŮ NA BÁZI KALCIUM
FOSFÁTŮ A OXIDU KŘEMIČITÉHO PRO
BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE**

MANUFACTURING OF CALCIUM PHOSPHATES AND SILICA BASED SCAFFOLDS FOR
BIOAPPLICATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eliška Virágová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Klára Částková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav materiálových věd a inženýrství
Studentka:	Bc. Eliška Virágová
Studijní program:	Materiálové inženýrství
Studijní obor:	bez specializace
Vedoucí práce:	doc. Ing. Klára Částková, Ph.D.
Akademický rok:	2021/22

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Příprava skafoldů na bázi kalcium fosfátů a oxidu křemičitého pro biomedicínské aplikace

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Práce bude zaměřena na přípravu skafoldů na bázi kalcium fosfátů a oxidu křemičitého polymerační technikou. Bude optimalizován proces přípravy porézního skafoldu s definovaným fázovým složením a mikrostrukturou vhodnou pro kolonizaci specifických buněk s potenciálním využitím materiálu pro meziobratlovou páteřní fúzi.

Cíle diplomové práce:

Cílem práce je příprava porézních skafoldů na bázi kalcium fosfátů a charakterizace jejich chemických a fyzikálních vlastností.

Seznam doporučené literatury:

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, Mar 2010, 31(7), 1465-1485.

KHAN, A. S. and A. A. CHAUDHRY. Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites. Edition ed. San Diego, UNITED KINGDOM: Elsevier Science & Technology, 2019. ISBN 9780081028353.

NOVOTNA, L., L. KUCERA, A. HAMPL, D. DRDLIK, et al. Biphasic calcium phosphate scaffolds with controlled pore size distribution prepared by in-situ foaming. *Materials Science and Engineering: C*, 2019/02/01/ 2019, 95, 363-370.

OHJI, T. and M. FUKUSHIMA. Macro-porous ceramics: processing and properties. *International Materials Reviews*, 2012/03/01 2012, 57(2), 115-131.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2021/22

V Brně, dne

L. S.

prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Cílem této diplomové práce byla příprava porézních biokeramických skafoldů na bázi kalcium fosfátů a kalcium fosfátů dopovaných oxidem křemičitým, které budou vhodné pro aplikace v kostním tkáňovém inženýrství. K přípravě keramických pěn byly využity dvě technologie přípravy porézních struktur, a to templátová metoda a metoda přímého pění. První část diplomové práce je zaměřena na obecný popis kosterní soustavy, biomateriálů a metod přípravy vysoce porézních skafoldů s přehledem aktuálních publikovaných výsledků výzkumu porézních kalcium fosfátových keramik. Druhá část pak obsahuje popis a výsledky experimentální přípravy skafoldů uvedenými metodami. Postup přípravy metodou přímého pění byl optimalizován pro získání definované struktury. Skafoldy na bázi kalcium fosfátů s 0–20 hm.% SiO₂ byly následně slinuty a studovány z hlediska materiálových charakteristik (fázové složení, velikost pórů a porozita, studium mikrostruktury pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM)), bioaktivního chování (testy interakce s SBF a testy simulované degradace) a mechanických vlastností s cílem zhodnotit vliv dopování oxidem křemičitým a metody přípravy na stanovené charakteristiky připravených skafoldů. Oběma metodami byly připraveny skafoldy složené ze směsi hydroxyapatitu a/nebo trikalcium fosfátu a cristobalitu/wollastonitu se srovnatelnými porozitami v rozmezí 80–88 %. Velikost pórů u skafoldů připravených metodou přímého pění dosahovala intervalu 5–250 μm, u metody templátové dosahovala velikost pórů až 430 μm. Testy interakce s SBF a testy simulované degradace potvrdily bioaktivní chování připravených skafoldů a jejich schopnost degradovat v simulovaných podmínkách. Skafoldy připravené metodou přímého pění vykazovaly lepší mechanické vlastnosti (pevnosti v tlaku až 1,8 MPa) než skafoldy připravené templátovou metodou. Stanovené charakteristiky ukázaly, že připravené skafoldy jsou vhodné a perspektivní pro potenciální aplikace v kostním tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova

porézní keramika, kalcium fosfáty, oxid křemičitý, metoda přímého pění, mechanické vlastnosti

Abstract

The aim of this diploma thesis was to prepare porous bioceramic scaffolds based on calcium phosphates and calcium phosphates doped with silica. Scaffolds are intended to be used in bone tissue engineering. Two main preparation methods were used for the creation of scaffolds – replica method and direct foaming method. Theoretical part of the diploma thesis is focused on a general description of the skeletal system, biomaterials and methods of preparation of highly porous calcium phosphate ceramics. Experimental part contains a description and the results of prepared scaffolds by above mentioned methods. The preparation process by the direct foaming method was optimized to obtain a defined structure. Calcium phosphate scaffolds containing 0–20 wt.% SiO₂ were sintered and studied in terms of material characteristics (phase composition, pore size and porosity, microstructural study by scanning electron microscopy (SEM)), bioactive properties (simulated body fluid (SBF) interaction tests and tests of simulated degradation) and mechanical properties in order to evaluate the effect of

silica doping. Scaffolds prepared by both methods were composed of a mixture of hydroxyapatite and/or tricalcium phosphate and cristobalite and wollastonite with comparable porosity in the range of 80–88 %. The pore size of the scaffolds prepared by the direct foaming method reached the interval of 5–250 μm opposite to template method reached the pore size up to 430 μm . The SBF interaction tests and tests of the simulated degradation confirmed the bioactive behavior of the prepared scaffolds and their ability to degrade under the simulated conditions. The scaffolds prepared by the direct foaming method showed better mechanical properties (compressive strength up to 1,8 MPa) than the scaffolds prepared by the template method. The results showed that the prepared scaffolds are suitable and promising for potential applications in bone tissue engineering.

Keywords

porous ceramic, calcium phosphates, silica, direct foaming method, mechanical properties

VIRÁGOVÁ, E. *Příprava skafoldů na bázi kalcium fosfátů a oxidu křemičitého pro biomedicínské aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2022. 71 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Klára Částková PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Příprava skafoldů na bázi kalcium fosfátů a oxidu křemičitého pro biomedicínské aplikace* vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, které jsou součástí této práce.

V Brně dne:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí doc. Ing Kláře Částkové PhD. za cenné rady, vedení a trpělivost při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala dalším pracovníkům OKaP ÚMVI FSI v Brně za jejich rady a podněty a svým rodičům za podporu během studia.

Obsah

Abstrakt	1
1 Úvod	1
2 Cíle práce.....	2
3 Teoretická část.....	3
3.1 Kosterní soustava.....	3
3.1.1 Chemické složení kostní tkáně	3
3.1.2 Stavba kostní tkáně.....	4
3.1.3 Osifikace a remodelace kostní tkáně	6
3.1.4 Mechanické vlastnosti kostí	8
3.2 Biomateriály	10
3.2.1 Kovové biomateriály	12
3.2.2 Polymerní biomateriály	12
3.2.3 Keramické biomateriály	12
3.2.4 Kompozitní biomateriály.....	20
3.2.5 Vlastnosti skafoldů vhodných pro použití ve tkáňovém inženýrství	21
3.3 Metody přípravy porézních materiálů	22
3.3.1 Metoda částečného slinování (partial sintering).....	23
3.3.2 Templátová metoda (replikační, replica method)	24
3.3.3 Technika obětní šablony (sacrificial template method)	26
3.3.4 Metoda přímého pění.....	27
3.3.5 Aditivní technologie (rapid prototyping, solid free-form fabrication – SFF)	29
3.4 Současný stav studované problematiky	29
4 Experimentální část	32
4.1 Použité materiály	32
4.1.1 Materiály pro metodu přímého pění	32
4.1.2 Materiály pro templátovou metodu	32
4.2 Metodika.....	32
4.2.1 Metoda přímého pění.....	32
4.2.2 Templátová metoda	34
4.3 Charakterizace skafoldů a použité analytické metody	35
4.3.1 Analýza fázového složení.....	35
4.3.2 Analýza mikrostruktury.....	35

4.3.3	Světelná mikroskopie	36
4.3.4	Skenovací elektronová mikroskopie	36
4.3.5	Příprava výbrusů a obrazová analýza morfologie pórů.....	36
4.3.6	Testy bioaktivity v simulované tělní tekutině	37
4.3.7	Testy simulované biodegradace	38
4.3.8	Mechanické vlastnosti	38
5	Výsledky a diskuse.....	39
5.1	Metoda přímého pění	39
5.1.1	Optimalizace přípravy kompozitních směsí	39
5.1.2	Materiálové charakteristiky	42
5.1.3	Bioaktivní chování	45
5.1.4	Mechanické vlastnosti	48
5.2	Skafoldy připravené templátovou metodou.....	50
5.2.1	Materiálové charakteristiky	50
5.2.2	Bioaktivní chování	52
5.2.3	Mechanické vlastnosti	54
5.3	Porovnání vlastností skafoldů připravených templátovou metodou a metodou přímého pění	56
6	Závěr.....	58
7	Literatura	59
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	65
9	Seznam obrázků	69
10	Seznam tabulek a grafů	71

1 Úvod

Keramické materiály jsou řazeny mezi anorganické, polykrystalické materiály, na které se upíná pozornost díky jejich specifickým vlastnostem, jako je zejména žáruvzdornost, chemická stabilita v agresivních prostředí a vysoká biokompatibilita. Keramické materiály jsou díky těmto výjimečným vlastnostem používány v mnoha aplikacích, např. v automobilovém průmyslu, elektronice, energetice nebo v medicíně. Ty, které jsou používány ve zdravotnictví, jsou označovány pojmem ‚biokeramika‘ [1]. Mezi používané materiály patří polykrystalické keramiky, skla, sklokeramika a bioaktivní kompozity plněné keramickými materiály. Všechny uvedené materiály mohou být připraveny v porézní nebo hutné formě.

Keramické materiály a skla jsou využívány ve zdravotnictví již delší dobu na výrobu různých typů diagnostických nástrojů, teploměrů, kultivačních nádobek, dioptrických brýlí a optických vláken, jež jsou součástí endoskopů [1]. V posledních desetiletích došlo k významnému pokroku ve vývoji biomedicínských materiálů, včetně keramických materiálů využívaných k rekonstrukci pohybového aparátu. Pro materiály, které mají být používány v biomedicínských aplikacích pro kostní náhrady (výplně kostních defektů, nenosné implantáty nebo fixátory), je nezbytné, aby implantovaný materiál měl vlastnosti velmi blízké vlastnostem kostní tkáně. Zejména by měl materiál odolávat působení biomechanických sil. Kromě mechanických vlastností je neméně důležitá vhodná porozita a biokompatibilita, ke které se váže i vyšší odolnost vůči korozi a opotřebení. Dále jsou biokeramiky široce využívány ve stomatologii (dentální implantáty, augmentace dásní), otolaryngologii, kardiologii (umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory) [2]. Jejich použití je však omezeno pouze na nenosné aplikace, a to z důvodu vysoké křehkosti keramických materiálů, a tím pádem i jejich nízké pevnosti. Biokompatibilní keramické materiály jsou také často aplikovány ve formě povlaků nosných kovových implantátů, případně nosičů léků [2].

Velmi významnou skupinou keramik jsou kalcium fosfáty, které jsou díky své chemické podobnosti s anorganickou složkou kostních tkání podrobně zkoumány. Do této skupiny je řazen i všeobecně známý zástupce hydroxyapatit, který má vynikající biologické vlastnosti (osteokonduktivita, biokompatibilita), avšak nízkou lomovou houževnatost, a tedy vysokou křehkost. Hydroxyapatit je využíván buď čistý (povlaky, výplně defektů), nebo v kombinaci s jiným materiálem, který pomůže zlepšit jeho mechanické vlastnosti [1].

Tato diplomová práce, zaměřená na přípravu porézních biokeramik na bázi kalcium fosfátů pro náhradu pevných tkání, je rozdělena do tří stěžejních částí. Teoretická část je věnována popisu kostní tkáně, od chemického složení, po stavbu kostní tkáně, a z toho vyplývajících mechanických vlastností. Na tuto kapitolu navazuje teoretický rozbor všech skupin biomateriálů a nadále i nejvíce používané metody přípravy porézních materiálů. V experimentální části této diplomové práce jsou shrnuty postupy přípravy porézních materiálů pomocí templátové metody a metody přímého pění. V kapitole Výsledky a diskuse jsou uceleně shrnuty všechny získané výsledky z experimentů s cílem posoudit vliv obsahu oxidu křemičitého v hydroxyapatitu na mechanické a biologické vlastnosti připravených skafoldů.

2 Cíle práce

Cílem práce je příprava porézních skafoldů na bázi kalcium fosfátů a charakterizace jejich chemických a fyzikálních vlastností. Dílčími cíli práce jsou:

- Literární přehled na téma kalcium fosfátové materiály, jejich vlastnosti a příprava porézních struktur.
- Příprava skafoldů na bázi kalcium fosfátů dopovaných křemíkem metodou přímého pění a jejich materiálová charakterizace.
- Příprava skafoldů na bázi kalcium fosfátů dopovaných křemíkem templátovou metodou a jejich materiálová charakterizace.
- Stanovení bioaktivních vlastností připravených skafoldů.
- Stanovení mechanických vlastností připravených skafoldů.
- Srovnání vlivu metody přípravy na stanovené charakteristiky skafoldů.

3 Teoretická část

3.1 Kosterní soustava

Jelikož se tato diplomová práce zabývá přípravou materiálů vhodných pro náhradu pevných tkání, je důležité objasnit základní složení, strukturu a vlastnosti kostí. Kostní tkáň je pojivo, které obsahuje mezibuněčnou hmotu a kostitvorné buňky (osteocyty). Mezibuněčná hmota je složena z organické a anorganické složky, jež budou popsány níže [3]. Soubor kostí v lidském těle se nazývá kosterní soustava, která společně s vazivovými spoji tvoří pasivní pohybový aparát. Kosterní soustava má mnoho funkcí v organismu:

- funkci ochrannou a nosnou – ochrana orgánů a měkkých tkání před mechanickým poškozením, opora těla, udržení orgánů na určitém místě,
- funkci syntetickou (krvetvornou) – v kostní dřeni dochází ke tvorbě krevních buněk – červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček,
- funkci metabolickou – ukládání minerálů (zejména vápníku a fosforu) a tuků [4].

3.1.1 Chemické složení kostní tkáně

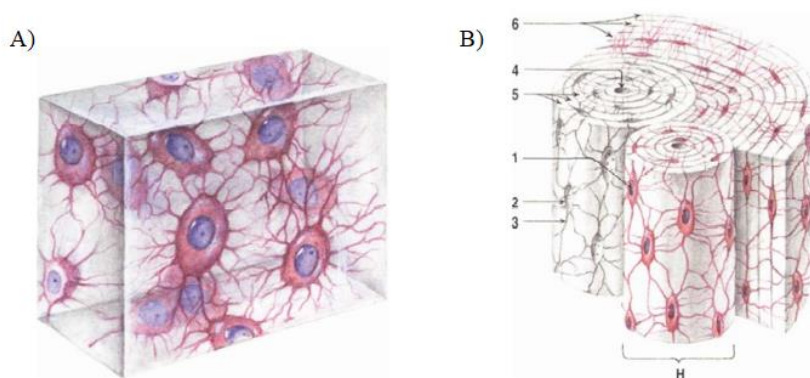
Jak již bylo zmíněno, kostní tkáň je složena z mezibuněčné hmoty a osteocytů. Neústrojná (neboli anorganická, minerální) část kostní tkáně tvoří dvě třetiny stavby kosti. Soli jsou v anorganické složce zastoupeny v poměru: 85 % kalcium fosfátů (CaP) – z něhož převážnou většinu činí hydroxyapatit (HAp), 10 % uhličitany vápenatého (CaCO_3) a zbytek ostatních solí, např. fosforečnan hořečnatý ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$), fluorid vápenatý (CaF_2), chlorid vápenatý (CaCl_2) a stopy solí s obsahem sodíku a draslíku [3]. Soli nejsou v kosti přímo vázány, mají schopnost mobilizace a je možné je doplnit [3]. Anorganické složky tvoří kost pevnou, tvrdou, ale křehkou [4]. Křehkost minerální složky kosti potlačuje složka ústrojná (organická, také nazývána ossein). Ta je tvořena kolagenními vlákny uspořádanými do svazků, které jsou stmeleny amorfni hmotou. Do osseinu se postupně ukládá minerální složka ve formě krystalů solí, nejprve na jejich povrchu, později i uvnitř vláken [3]. Díky vysokému obsahu kolagenních vláken (přibližně 90 %) je kost do jisté míry pružná a houževnatá. Organickou složku mimo kolagenní vlákna činí také nekolagenní molekuly, např. osteokalcin, osteopontin a další [4]. Složení kostní tkáně je rozdílné v závislosti na typu kostní tkáně, na místě odběru kostní tkáně, pohlaví a věku jedince [4]. Během života se poměr mezi organickou a anorganickou složkou mění, minerálních solí postupně přibývá, a z tohoto důvodu jsou kosti ve stáří křehčí [3].

Aby mohla vzniknout kostní tkáň, je nutná přítomnost kostitvorných buněk (osteocytů) v mezibuněčné hmotě. Kost vzniká činností buněk, které se nazývají osteoblasty, ty vznikají diferenciací kmenových buněk v kostní dřeni (osteoprogenitorů). Osteoblasty produkují organické prekurzory pro syntézu kostní matrix tím, že do svého okolí vylučují kolagen typu I. a další látky na bázi glykoproteinů [5]. Po plném obklopení vyloučenými látkami se mění osteoblast na osteocyt. Ty se aktivně podílejí na metabolismu uvolňování minerálů z kostí, čímž významně ovlivňují regulaci vápníku v těle. Osteocyty jsou oploštěné, podlouhlé buňky, které se v případě potřeby mohou aktivovat zpět na osteoblasty nebo transformovat na retikulární buňky [3]. Posledním typem kostních buněk jsou osteoklasty. Ty jsou na rozdíl od ostatních buněk volně pohyblivé s četnými výběžky na povrchu a nachází se na povrchu kostní tkáně. Mají opačnou funkci než osteoblasty, kostní tkáň odbourávají. Osteoklasty obsahují acidofilní plazmu a do okolí vylučují kyselé proteolytické enzymy (fosfatáza, kolagenáza aj.), které

působí na kostní matrix a uvolňují zmineralizovanou základní tkáň [5]. Osteoklasty se také podílejí na odstraňování produktů vzniklých při resorpci kosti [5].

3.1.2 Stavba kostní tkáně

Kostní tkáň se v lidském těle vyskytuje ve dvou variantách, v primární (nezralé, či vláknité) a sekundární (zralé, či lamelózní). Varianta primární se vyskytuje především během embryonálního vývoje a později při reparačních procesech. Je od sekundárního typu odlišná nahodilým uspořádáním kolagenních vláken a nižším obsahem minerálů. U dospělých jedinců je pak primární varianta z velké části nahrazena tou sekundární [3, 5]. Po ontogenezi je vláknitá kostní tkáň přítomna u švů lebečních kostí a v místech úponů svalů a vazů [3]. Schématické modely obou variant kostní tkáně je vyobrazeno na Obr. 1 [3].



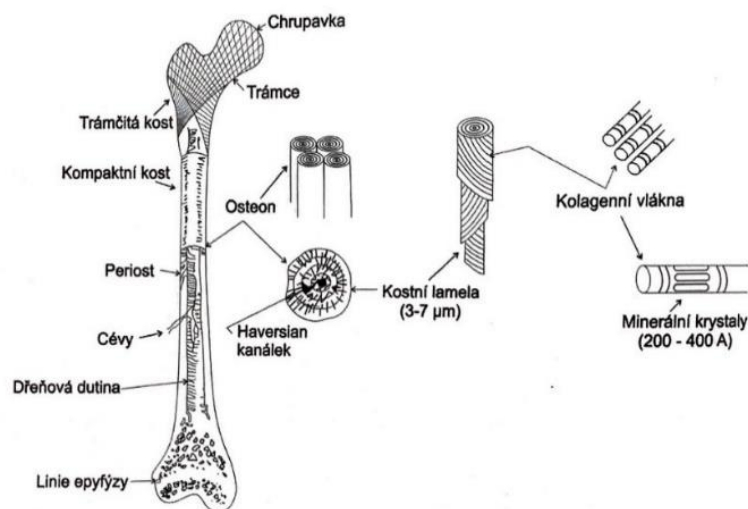
Obr. 1 Schématické modely A) vláknité a B) lamelózní kostní tkáně. U obou typů kostní tkáně jsou přítomné osteocyty (1). V lamelózní tkáni jsou dále přítomny lakuny – štěrbin, ve kterých jsou umístěny osteocyty (2), canaliculi ossium – kanálky, do nichž vstupují výběžky osteocytů (3), Haversův kanálek osteonu (4), koncentrické lamely osteonu (5) a povrchové (neboli plášťové) lamely kosti (6), (H) Haversův systém lamel (neboli osteon) [3].

Mikrostruktura kosti je velmi komplikovaná, a z tohoto důvodu je dělena na několik úrovní dle velikosti popisovaného celku. Nejmenší jednotkou, tzv. molekulární, o velikosti 60 nm, kostní tkáň jsou apatitové krystaly a tropokolagenové molekuly [4]. Nad molekulární úroveň je úroveň ultrastrukturální, v níž dochází k spojení apatitových krystalů s kolagenními vlákny do mikrofibril, které se dále uspořádávají do lamel, jež mají tloušťku přibližně 3–7 μm [4, 5]. Lamely se dále organizují. Pokud náhodně, vzniká fibrilární kostní tkáň, která se vyskytuje, jak již bylo zmíněno výše, např. při hojení kosti u zlomenin. Pokud se však lamely organizují a uspořádávají do soustředných skupin, tvoří osteony, v jejichž středu se nachází Haversův kanálek, jenž obsahuje nervová vlákna, cévy a řídké vazivo. Tato úroveň je mikroskopická a typická velikost osteonů pro tuto úroveň je v průměru 200 μm . Haversovy kanálky jsou obklopené depozity amorfního materiálu, který je tvořen mineralizovanou matrix s menším počtem kolagenních vláken – cementová substance [5]. Přítomnost osteonů v kostní tkáni je nezbytná, přivádí totiž do kortikální kosti živiny. Živiny jsou pak mezi povrchem kosti (periost) a jejím středem (dřeňová dutina) rozvedeny prostřednictvím Volkmannových kanálků. Na Obr. 2 je zachycen osteon včetně minerální složky části lamelózní kostní tkáně [2].



Obr. 2 Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu, na kterém je zachycen osten včetně minerální složky části lamelózní kostní tkáně [2].

Mimo organizace lamel je důležité rozlišovat také strukturu kostí – zda je kost spongiózní (trámčitá), nebo kortikální (kompaktní). Kortikální kostní tkáň je vysoce organizovaný systém orientovaných osteonů, z toho důvodu je kortikální tkáň velmi hutná, kompaktní, vyskytuje se tedy převážně ve středních částech dlouhých kostí, které mají nosnou funkci. Oproti tomu je spongiózní kostní tkáň významně poréznější, méně organizovaná a nachází se obvykle na koncích dlouhých kostí [4]. Makrostrukturální úroveň se už rozumí kost, která je tvořena všemi výše uvedenými úrovněmi. Jednotlivé úrovně popisu hierarchie uspořádání kostní tkáně shrnuje Obr. 3 [4].



Obr. 3 Hierarchické uspořádání vnitřních struktur lidské stehenní kosti [4].

Z hlediska tvarových typů je nutné rozeznávat kosti dlouhé, krátké a ploché, které se kromě tvaru od sebe liší i průběhem tvorby a růstem. Pro dlouhé kosti je typické, že mají dlouhé válcovité tělo (diafýza) s charakteristicky odlišnými rozšířenými kloubními konci na obou stranách (epifýzy). Jsou tvořeny hutným pláštěm kompaktní kosti a uvnitř jsou duté. Duté části dlouhých kostí, včetně dutin spongiózní tkáně vyplňuje kostní dřeň dvojího typu (červená, která se podílí na tvorbě krvinek a žlutá, která obsahuje především tukové buňky) [3, 5]. Kloubní

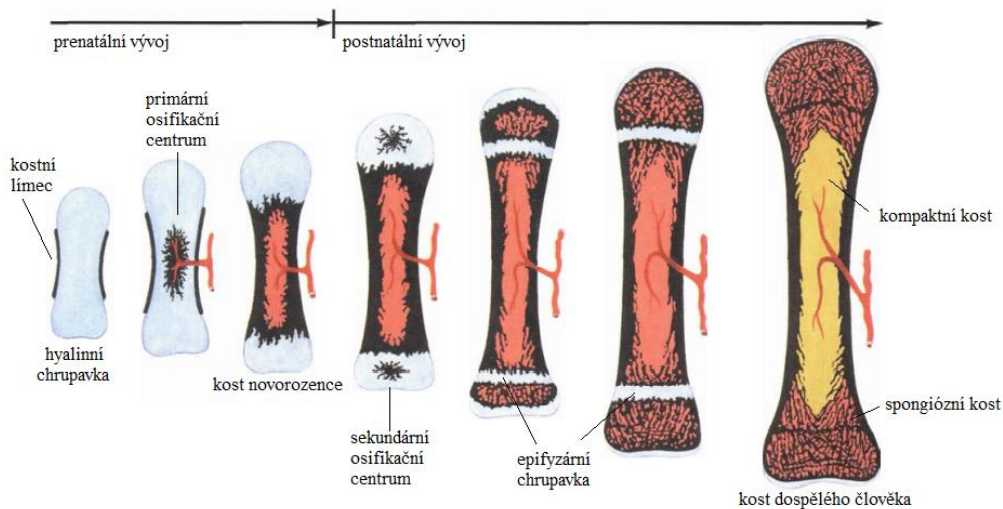
konce dlouhých kostí jsou tvořeny spongiózní kostí, která je charakteristicky funkčně uspořádaná. Na povrchu kloubních konců se nachází tenká vrstva kompaktní kosti [3]. Vrstva tenké kompaktní kosti je přítomná i u krátkých kostí. Na rozdíl od dlouhých kostí je pod povrchem krátkých kostí spongiózní kost hustší. Ploché kosti jsou tvořeny vrstvou spongiózní kostní tkáně, která je obklopena dvěma lamelami kompakty [3, 5].

3.1.3 Osifikace a remodelace kostní tkáně

Během prenatalního vývoje lidského těla je zásadním procesem tvorba kostí (osifikace). Osifikace začíná během prenatalního vývoje a pokračuje během dětství a dospívání. Kost má schopnost se i remodelovat, což je klíčové při hojení zlomenin. Remodelace kostí je neustále probíhající proces, který se skládá z odbourávání staré kosti (resorpce) a tvorby nové kosti (osifikace) [6].

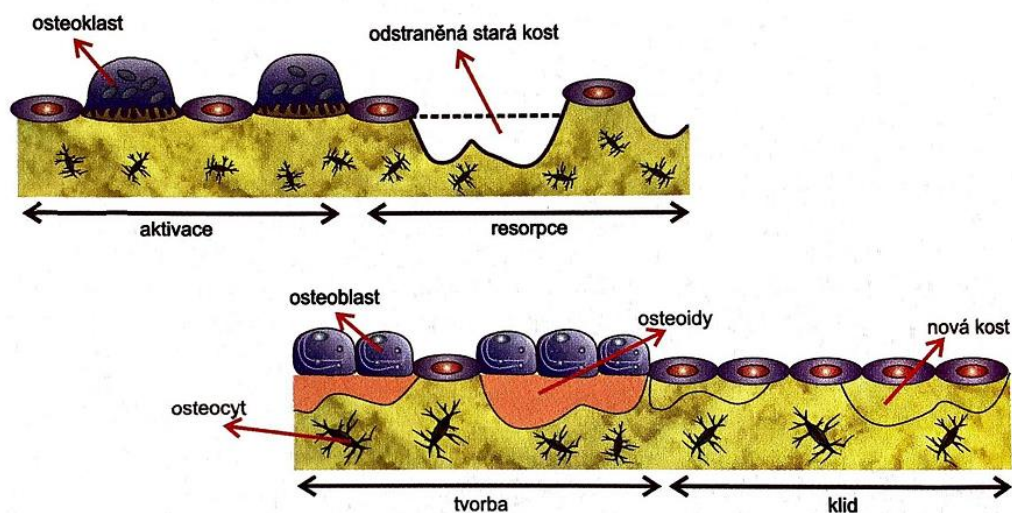
Osifikace kostní tkáně může probíhat dvěma mechanismy, buďto endochondrálně nebo intramembranózně. Intramembranózní osifikace je přítomná při tvorbě plochých kostí v lebce (kosti čelní, temenní, týlní a spánkové). Počáteční bod osifikace je nazýván jako primární osifikační centrum. Proces intramembranózní osifikace začíná diferenciací kmenových buněk v osteoblasty. Poté vzniká osteoid, což je nezmineralizovaná kostní matrix, která následně mineralizuje, a výsledkem je opouzdření části osteoblastů, jež se následně mění na osteocyty. Opouzdřené osteoblasty tvoří ostrůvky kostní tkáně (spikula). Spikuly se tvoří v primárním osifikačním centru a jejich splynutím vzniká kost, která má houbovitou strukturu. Zbývajícím vazivem, které se nachází uvnitř houbovité kosti, prorůstá krevní zásobením a nachází se v něm i nediferencované buňky, jež jsou zdrojem buněk kostní dřevě [5]. Po povrchích plochých kostí pak převládá tvorba nové kosti nad jejím odbouráváním. Díky tomuto procesu na vnějším i vnitřním povrchu vzniká lamelární kompakta [5].

Endochondrální proces osifikace se uplatňuje při tvorbě dlouhých a krátkých kostí. Samotná osifikace má dvě fáze a probíhá uvnitř hyalinních chrupavek, které slouží jako miniaturní předloha budoucí kosti. V počáteční fázi dochází ke zbytnění a následnému zániku buněk vyskytujících se v chrupavce (chondrocyty). Zaniklé chondrocyty po sobě nechávají rozšířené lakuny, které jsou od sebe odděleny zmineralizovanou chrupavkovou matrix, která je označována jako počáteční místo osifikace [5]. Primární osifikační místo se nachází uprostřed budoucí kosti. V následující fázi do prostor, které opustily chondrocyty, pronikají osteoprogenitorové buňky a krevní kapiláry, které prorůstají do dutin matrice [5]. Osteoprogenitorové buňky se diferencují na osteoblasty a na pozůstatcích zmineralizované chrupavky, která slouží jako podpůrná struktura, tvoří kostní matrix s trámčitou strukturou. V průběhu těchto dějů osteoklasty rozkládají houbovitou kost, jež se nachází uprostřed, a vytváří tak dřevnou dutinu, která obsahuje kostní dřev. Zpočátku je mineralizovaná matrice kolagenových vláken ukládána v náhodných směrech, vzniká tzv. primární kost. Ta se v průběhu času uspořádává a mění na uspořádanou lamelární kost, která je mnohem pevnější než kost primární. V místech, kde je potřeba, aby struktura kosti měla vyšší hustotu, dochází k dalšímu ukládání osteoidu. Při postnatalním vývoji kostí se v epifýzách objevují sekundární osifikační centra. Mezi primárním centrem a sekundárními centry se nachází chrupavčitá epifyzální ploténka, která dále stimuluje růst nové kosti. Chrupavčitá růstová ploténka zaniká po plném nahrazení kostí a kost dále neroste [5, 6]. Schématický postup osifikace dlouhé kosti je vyobrazen na Obr. 4 [3].



Obr. 4 Schématický postup osifikace dlouhé kosti [3].

Osifikační procesy jsou kromě vývoje kosti nezbytné i při její přestavbě. Kost je neustále adaptující se tkáň lidského těla, která je schopna přizpůsobit se změnám působení vnějšího zatížení, ale také je schopna opravovat mikrodefekty vzniklé každodenním zatěžováním. Kostní metabolismus je neustále probíhající proces, který udržuje rovnováhu mezi procesem tvorby nové kostní tkáně a resorpcí staré kostní tkáně [4]. Samotná remodelace kostní tkáně má několik fází: klidová, aktivace osteoklastů, resorpční, aktivace osteoblastů, tvorba kostní matrix a zahájení mineralizace, dokončení mineralizace a remodelace [4]. Jednotlivé fáze remodelace znázorňuje schéma na Obr. 5 [4].



Obr. 5 Schématické zobrazení jednotlivých fází kostní remodelace [4].

V klidové fázi se na povrchu kosti nachází neaktivní osteoblasty. Pokud nastane remodelace, dojde během aktivační fáze ke shromažďování osteoklastů na povrchu kosti. Osteoklasty se shromažďují v malých prohloubeninách, které vznikají jejich působením, tzv. Howshipovy lakuny. Při resorpční fázi osteoklasty odstraňují starou kostní tkáň, jejich působením dochází k rozrušení minerální matrixe a rozkladu kolagenních vláken. Až proces

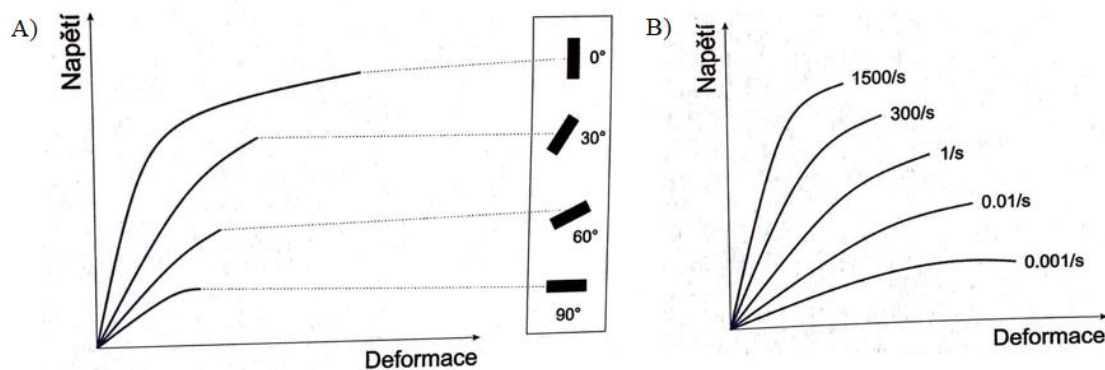
resorpce staré kosti skončí, osteoklasty jsou nahrazeny osteoblasty (aktivační fáze osteoblastů). Osteoblasty nejprve vytváří kolagenovou matici, kterou později mineralizují, a tvoří tím novou kost. Nově vytvořená kost se vrátí do svého klidového stavu [6]. Na cyklus remodelace má významný vliv mechanické namáhání kostní tkáně, především doba a míra zatížení. Pokud velikost zatížení odpovídá úrovni fyziologického zatížení, pak jsou procesy resorpce a novotvorby kostní tkáně v rovnováze. Pokud však dojde ke snížení mechanického zatížení, kostní tkáň na to reaguje resorpcí a dochází k útlumu tvorby nové kostní tkáně. Je-li však kostní tkáň trvale přetěžována, reaguje na tento nově vzniklý stav svým zbytněním, převažuje proces novotvorby kostní tkáně. V extrémních případech dochází k trvalému poškození tvrdých tkání [4]. Popsaný mechanismus remodelace tkáně je zásadní pro adaptaci kostní tkáně na mechanické zatížení [4].

3.1.4 Mechanické vlastnosti kostí

Z materiálového hlediska je kost dokonalým příkladem kompozitního materiálu. Kostní tkáň je složena z anorganické složky, která činí kost tuhou, tvrdou, a z toho důvodu křehkou, ale také je zároveň tvořena i složkou organickou, která přispívá k její pružnosti, a tím pádem i k její houževnatosti [4]. Z funkčního hlediska je nejdůležitější mechanická vlastnost, a to pevnost kostní tkáně. I přestože je kost pevnou tkání v lidském těle, je oproti ostatním technickým materiálům poddajná. Je potřebné brát na vědomí i možnost uspořádání kostní tkáně, tj. její strukturu. Oba typy uspořádání (spongiózní a lamelózní) mají různé materiálové vlastnosti, z tohoto důvodu byl zaveden pojem zdánlivé hustoty ρ_a [4]. Zdánlivá hustota vyjadřuje zastoupení kostní tkáně v měřeném objemu kosti [4]. Je obecně platné, že kortikální kost dokáže vydržet větší napětí než kost spongiózní, kdežto spongiózní kost vydrží mnohem vyšší deformace (až 75 %), jelikož má mnohem větší kapacitu pro uchování energie [4].

Kost je ze své podstaty materiál nehomogenní a anizotropní (má vlastnosti silně závislé na směru zatížení). Jelikož je kost v lidském těle namáhána komplexně, především dynamicky, je třeba kost považovat i za viskoelastický materiál. Pokud dojde k rychlé změně zátěžných sil, změní se i odezva viskoelastického materiálu. V případě kosti jde o zvýšení tuhosti, zvýšení meze kluzu a Youngova modulu vzhledem ke zvýšení rychlosti zatížení [2]. Výsledné mechanické vlastnosti jsou pozorovány při zatížení celku, ovlivněné jsou jak vlastnostmi kostní tkáně (uspořádaností, orientací kostní tkáně, hustotou tkáně a zdánlivou hustotou), tak i parametry a způsobem zatížení (směr a rozsah zatížení, rychlost a frekvence) [4]. Na kost mohou působit síly a dvojice sil (momenty) v různých směrech, a tím vyvíjet zatížení: tahem, tlakem, krutem, smykem, ohybem nebo jejich kombinací [4].

Nejjednodušším způsobem namáhání je tah (tlak) a ten nastává tehdy, pokud v ose součásti působí dvě síly o stejné velikosti. Při tahovém zatížení dochází k prodlužování tělesa a zužování jeho průřezu. Naopak při tlakovém zatížení dochází ke zkracování tělesa a k rozšiřování průřezu v ose zatížení [4]. Kostí mají schopnost adaptovat se na externí zatížení, při tahovém zatížení se kost osifikuje ve směru působení sil, kdežto při tlakovém působení se kost resorbuje [5]. Obecně platí, že kostní tkáň lépe snáší tlakové zatížení (to kompenzuje stav klidové napjatosti, která je způsobena kontrakcí svalů) [4]. Klinickými důsledky tohoto typu zatížení jsou kompresní zlomeniny obratlů nebo utržení úponů svalů od kosti [4]. Shrnutí rozdílných mechanických vlastností kortikální kosti shrnují grafy na Obr. 6 [4].



Obr. 6 A) Příklad rozdílných mechanických vlastností kortikální kosti při tahovém zatížení v závislosti na její orientaci vůči zatížení. B) Změna mechanických vlastností kostní tkáně v důsledku změn rychlosti zatěžování [4].

Nejvíce nebezpečné pro kostní tkáň je smykové zatížení. To vzniká v důsledku působení dvou paralelních sil, které působí proti sobě v blízkých rovinách. Hodnota mezního napětí ve smyku pro kortikální kost je přibližně 70 MPa. Pro toto zatížení je typické sřížné poranění obratlů, např. při autonehodách [4]. Pokud na kost působí kroutící moment, který indukují vznik smykového napětí, dochází k torznímu namáhání (namáhání krutem). Jelikož kost není schopná přenášet takový způsob zatížení, jsou typickými následky po přetížení torzním namáháním složité tříštivé zlomeniny [4]. Ve většině případů jsou však kosti lidského těla vystaveny kombinovanému namáhání, tj. kombinaci více druhů zatížení. Jednotlivé hodnoty mechanických vlastností kostí jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Srovnání jednotlivých mechanických vlastností kostí [2, 6].

	Směr zatížení	Youngův modul pružnosti [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Pevnost v tlaku [MPa]
Kortikální kost	podélný	11,00–21,00	60,00–70,00	70,00–280,00
	příčný	5,00–13,00	~ 50,00	~ 50,00
Kost stehenní (Femur)	podélný	17,20	121,00	167,00
Kost holenní (Tibia)	podélný	18,10	140,00	159,00
Kost lýtková (Fibula)	podélný	18,60	146,00	123,00
Krční obratel	podélný	0,23	3,10	10,00
Bederní obratel	podélný	0,16	3,70	5,00
Spongiózní kostní tkáň v obratlích	podélný	0,09	1,20	1,90

Kromě výše zmíněných pevnostních charakteristik je důležité při volbě materiálu vhodného k implantování do lidského těla zhodnotit i Youngův modul pružnosti. Kost lze považovat díky obsahu anorganické matrice a kolagenních vláken za vláknový kompozitní materiál. Youngův modul lze vypočítat dle směšovací rovnice (1, 2) platné pro vláknové kompozity [6]:

- rovnice pro výpočet Youngova modulu pro rovnoběžný směr zatížení kolagenních vláken:

$$E_{ax} = fE_f + (1 - f)E_m \quad (1)$$

kde E_{ax} je Youngův modul kompozitního materiálu zatíženého v podélném směru, E_m je Youngův modul matrice, E_f je Youngův modul vláken a f je objemový podíl vláken v matrici.

- rovnice pro výpočet Youngova modulu pro kolmý směr zatížení kolagenních vláken:

$$E_{trans} = \left[\frac{f}{E_f} + \frac{(1 - f)}{E_m} \right]^{-1} \quad (2)$$

kde E_{trans} je Youngův modul kompozitního materiálu zatíženého v příčném směru.

Z odvozených vzorců pak vyplývá, že kompozitní materiál, tedy kost, bude tužší v podélném (axiálním) směru než ve směru příčném. Kortikální kost tedy bude mít vyšší hodnoty pevnosti ve směru rovnoběžném s osteony. Ve skutečnosti je však patrný rozdíl při srovnání vypočítaných a experimentálních hodnot. Rozdíl hodnot je způsoben velmi zjednodušenou aproximací, ve skutečnosti nejsou kolagenní vlákna uspořádána s osteony a anorganická matrice není spojitá [6].

Na rozdíl od zjištěných hodnot pevnosti v tahu, tlaku a modulu pružnosti jsou hodnoty lomové houževnatosti obecně vyšší v příčném směru. Tato anomálie je zapříčiněna přítomností cementových čar v mikrostruktuře kostní tkáně. Cementové čáry jsou úzké oblasti, které oddělují koncentrické lamely osteonu, a jsou považovány za nejslabší složku v kosti. Právě cementovými čarami se může trhлина šířit snadněji v paralelním směru s osteony, což výrazně snižuje lomovou houževnatost kortikální kosti v podélném směru. Pokud se však trhлина šíří kolmo vůči osteonům, po dosažení cementační čáry dojde ke změně směru šíření trhliny a otupení jejího čela [6]. Ačkoliv je kost klasifikovaná jako křehký materiál, její houževnatost je díky přítomnosti kolagenních vláken vynikající. Tento fakt dokazuje i hodnota lomové energie (G_c) kosti, která dosahuje 1,5 kJ/m² a je obdobná hodnotám naměřeným u ocelí [6].

3.2 Biomateriály

Biomateriály jsou v současné době hojně využívány ve tkáňovém inženýrství při transplantacích. Druhou, ve světě nejčastěji transplantovanou tkání je kost s více než čtyřmi miliony operací ročně [7]. Biomateriály mají za úkol při transplantaci nahradit poškozenou nebo zcela chybějící tkáň vhodným implantátem. Obvykle jsou používány syntetické implantáty, které snižují přenos patogenů a riziko infekce, předchází imunologickému odmítnutí a rozdílné kvalitě kosti od dárce [7]. Jako biomateriály lze označit všechny materiály, které při náhradě spolehlivě plní funkci chybějící tkáně a při styku s tkáněmi lidského těla poté nevyvolávají alergickou reakci, neprodukují pro tělo toxické látky – kovové, polymerní, keramické a kompozitní materiály [2].

Před samotným rozdělením materiálů je nutné definovat pojmy, které jsou úzce spjaty s biomateriály:

Biokompatibilita (biologická snášenlivost) – je definována jako schopnost přijmout umělý implantát okolními tkáněmi bez toho, aniž by došlo k vyloučení implantátu. Před implantací nesmí být biomateriál degradován a kontaminován produkty vylučovanými organismem. Následně nesmí přítomnost syntetického materiálu v těle poškozovat hostitelské

tkáně, orgány. Pokud je materiál z degradabilního materiálu, pak i produkty degradace nesmí poškozovat orgány a tkáně [2].

Dále je možné biomateriály rozdělovat dle úrovně interakce s tkáněmi na materiály *bioinertní* a *bioaktivní*. Bioaktivní materiály se dále dělí do dvou skupin na materiály *resorbovatelné* a *neresorbovatelné* [8].

Bioinertní materiály vyvolávají minimální odezvu hostitelské tkáně, do níž je implantát vpraven [8, 9]. Po určité době dochází k vytvoření tenké vazivové vláknité vrstvy, která přilne k povrchu implantátu, bez ohledu na to, zda je implantát začleněn mezi měkkou, či tvrdou tkáň [8].

U *bioaktivních materiálů* dochází, na rozdíl od výše zmíněné skupiny bioinertních materiálů, k vyvolání specifické odezvy organismu. Na rozhraní mezi hostitelskou tkání a implantátem dochází k vytvoření přímé adhezní vazby a nedochází ke vzniku fibrózního vaziva okolo implantátu [8, 9]. Některé bioaktivní materiály disponují schopností rozpouštět se v organismu, jedná se o *resorbovatelné materiály*. Užívají se obvykle ve formě výplní kostních defektů nebo jako opora při osifikačních procesech. Jelikož se tyto materiály postupně po začlenění v organismu vstřebávají, dochází k uvolňování iontů materiálu do okolí, což je proces podporující regeneraci pevných tkání.

Kromě výše uvedené biokompatibility je nutné, aby implantáty vykazovaly další specifické vlastnosti, které jsou pro ně nezbytné. Jedná se zejména o chemickou stabilitu, do níž je zahrnuta nejen biokompatibilita, ale také farmakologická akceptovatelnost (což znamená, že materiál v těle nevyvolává toxicitu, alergickou reakci, není karcinogenní a nevyvolává imunogenní procesy – tělo nevytváří protilátky a nevyvolává se odpověď imunitního systému). Krom biologických vlastností je nutné přihlížet i k mechanickým vlastnostem daných biomateriálů. Materiálové charakteristiky musí být adekvátní a přiměřené tkáním, do kterých bude implantát vložen. Dle účelu aplikace je nutné zvolit odpovídající hustotu materiálu (zda bude výrobek porézní nebo hutný), s čímž úzce souvisí i hmotnost implantátu [2]. V Tabulce 2 jsou shrnuty výhody a nevýhody hlavních skupin materiálů používaných ve tkáňovém inženýrství.

Tabulka 2 Přehled materiálových skupin používaných ve tkáňovém inženýrství [2, 10].

Materiály	Výhody	Nevýhody	Příklady použití
Kovové materiály (titanové a kobaltové slitiny, stříbro, zlato, nerezavějící ocel)	houževnatost, tažnost, pevnost	mohou korodovat, mají vysokou hustotu, těžko připravitelné	kloubní implantáty, dentální implantáty (nahrazující kořen zubu), kostní desky a šrouby, šicí dráty
Polymerní materiály (chitosan, polyetylen, polykaprolakton, polypropylen, kolagen aj.)	pružnost, snadná výroba	nízká pevnost, schopnost deformace, degradace	stehy, náhrady cév, nosní a ušní implantáty aj.
Keramické materiály (oxid hlinitý, zirkoničitý, kalcium fosfáty, včetně hydroxyapatitu)	kompatibilní, osteokonduktivní, osteoinduktivní, resorbovatelné	špatné mechanické vlastnosti, křehkolomové chování	dentální a ortopedické implantáty, skafoldy, výplně kostních defektů, povlaky inertních materiálů
Kompozity	pevné, řízená výroba dle aplikace	obtížně připravitelné	plomby, kostní cementy, stenty, skafoldy

3.2.1 Kovové biomateriály

Čisté kovy a jejich slitiny jsou nejrozšířenějšími a nejdéle používanými biomateriály se širokým spektrem aplikací, jako jsou např. chirurgické nástroje, nosné náhrady – částečné nebo totální náhrady kloubů, fixace zlomenin atd. [2, 11]. Mezi nejpoužívanější kovové biomateriály lze zařadit korozivzdorné oceli, titanové slitiny (Ti6Al4V), chrom-kobaltové slitiny, čisté zlato a jeho slitiny nebo také slitiny na bázi hořčíku [11]. Dle interakce s hostitelskou tkání tyto materiály řadíme do skupiny bioinertních materiálů. V hostitelské tkáni mají kovové materiály sklon ke korozi. Nadměrné uvolňování kovových iontů z implantátu do těla je toxické, což obvykle vede k následným reoperacím implantátu. Koroze je i pro samotný implantát nežádoucí, jelikož během tohoto procesu ztrácí požadované vlastnosti. Hořčíkové slitiny (systémy s obsahem vápníku, zinku) představují zajímavou skupinu, neboť vykazují nejlepší biokompatibilitu z tradičních kovových materiálů a mají základní materiálové vlastnosti podobné kostem (hustotu, pevnost v tahu a Youngův modul pružnosti). Ve fyziologickém prostředí vykazují biodegradabilní chování – mají schopnost rozpouštět se beze zbytku v organismu. Nevýhodou těchto slitin je, že v agresivním prostředí lidského těla podléhají korozi, z těchto důvodů jsou tyto slitiny často používány jako jednorázové nebo dočasné implantáty – šrouby, dráty, stenty aj. [12, 13].

3.2.2 Polymerní biomateriály

V medicínských aplikacích je využíváno široké spektrum polymerních biomateriálů. Polymery jsou děleny do dvou skupin – syntetické a přírodní polymery. Mezi hlavní zástupce syntetických polymerů patří: polykaprolakton (PCL), kyselina polymléčná (PLA), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a polyetheretherketon (PEEK), polypropylen (PP), polyethylen (PE) a další. Do skupiny přírodních polymerů se řadí polymery, které se vyskytují v živých organismech: proteiny (kolagen, želatina), polysacharidy (celulóza, amyulóza, kyselina hyaluronová a chitosan) nebo polynukleotidy (DNA a RNA) [7]. Výhodou těchto materiálů jsou dobré mechanické a fyzikální vlastnosti (vysoká elasticita a nízká specifická hmotnost), snadná opracovatelnost a finanční dostupnost. Ve fyziologickém prostředí mají některé druhy polymerů schopnost degradovat. Přírodní polymery na bázi nukleotidů vykazují vyšší osteoinduktivitu než syntetické polymery z důvodu podobnosti s extracelulární matrix [7]. Nevýhodou je nízká mechanická pevnost, proto jsou jejich aplikace omezené na nenosné implantáty (po vyztužení keramickými nebo kovovými vlákny lze polymerní materiály použít i na náhrady kloubů a kostí). Používají se jako materiály vhodné pro transplantaci měkkých tkání: náhrady cév, srdečních chlopní, částí orgánů nebo jako kultivační nosič kožního krytu. V medicínských aplikacích také nachází uplatnění ve formě katetrů, šicích materiálů, injekčních stříkaček nebo také kultivačních nádob. Biodegradabilní polymery lze také využít jako prostředky pro transport léčiv (cytostatika, antibiotika, hormony) v organismu k cílenému místu působení [10].

3.2.3 Keramické biomateriály

Keramické materiály představují významnou skupinu materiálů, které se ve tkáňovém inženýrství využívají od konce 60. let minulého století. Nejprve byly biokeramické materiály využívány jako alternativa ke kovovým materiálům, a to za účelem zvýšení biokompatibility. V současné době je biokeramika samostatnou a perspektivní skupinou materiálů pro

biomedicínské aplikace. Dle interakce ve fyziologickém prostředí se biokeramika dělí na tři základní skupiny: bioinertní, bioaktivní (povrchově aktivní keramiku) a bioresorbovatelnou keramiku [14].

Bioinertní keramika

Bioinertní keramika ve fyziologickém prostředí je chemicky stabilní, při implantaci do lidského těla si zachovává své mechanické a fyzikální vlastnosti. Typickými zástupci bioinertních oxidových keramik jsou oxid hlinitý a oxid zirkoničitý (částečně stabilizovaný), z neoxidových keramik to jsou pak uhlíkové či nitridové keramiky [14, 15].

- Oxid hlinitý (Al_2O_3)

Oxid hlinitý byl zkoumán jako alternativa ke kovovým slitinám, které byly používány k výrobě nosných ortopedických implantátů (kyčelních protéz) nebo k výrobě zubních implantátů. Předností oxidu hlinitého oproti kovovým slitinám je lepší biokompatibilita s okolními tkáněmi a odolnost vůči korozi ve fyziologickém prostředí. Obecně je využíván v biomedicínských aplikacích vysoce čistý Al_2O_3 (>99,5 %). Výsledné materiálové charakteristiky oxidu hlinitého jsou závislé na čistotě prekurzorů a na technologii zpracování. Obecně je oxid hlinitý tvrdý materiál, odolný vůči působení silných anorganických kyselin (kyselina fluorovodíková, kyselina orthofosforečná). Mechanické vlastnosti souvisí s velikostí zrna a mírou pórovitosti materiálu. Obvykle je do oxidu hlinitého přidáváno malé množství oxidu hořečnatého nebo vápenatého tak, aby mohl být oxid hlinitý slinován při teplotách nižších než 1600 °C, a bylo tak zabráněno nechtěnému růstu zrna [14, 15]. Základní mechanické vlastnosti oxidu hlinitého jsou srovnány s ostatními bioinertními keramickými materiály v Tabulce 3.

Poprvé byl použit Al_2O_3 v oboru ortopedie jako materiál pro výrobu totální náhrady kyčelního kloubu v roce 1971 [14]. Obvykle je tedy používán ve formě náhrady hlavičky stehenní kosti v kombinaci s nízkotlakým vysokomolekulárním polyethylenem (UHMWPE), který se používá ve formě artikulační vložky – náhrada jamky kyčelního kloubu. Ve stomatologii je Al_2O_3 používán především na zubní implantáty, šrouby. Často je Al_2O_3 používán k výrobě nanokompozitů v kombinaci s titanem nebo hydroxyapatitem. Vytvořené nanokompozity jsou po vytvoření zkoumány z hlediska cytocompatibilního a biomechanického chování [14, 15].

Tabulka 3 Srovnání mechanických a fyzikálních vlastností základních zástupců bioinertních keramik [14, 15].

	Modul pružnosti [GPa]	Pevnost v tlaku [MPa]	Mez pevnosti v tahu [MPa]	Lomová houževnatost [$\text{MPa}/\text{m}^{1/2}$]	Tvrdość [HV]	Hustota [g/cm^3]	Velikost zrna [μm]
Al_2O_3	300	4500	380	5–6	2300	3,93–3,94	3,00–6,00
TZP	150	2000	500	7–8	1200	6,05–6,09	0,20–0,40
Mg-PSZ	208	1850	-	~8	1120	5,72	0,42

- Oxid zirkoničitý (ZrO_2)

Oxid zirkoničitý je vhodnou alternativou k oxidu hlinitému. Hlavní výhodou oxidu zirkoničitého, oproti oxidu hlinitému, je jeho vyšší lomová houževnatost. Oxid zirkoničitý je alotropní oxid, což znamená, že v závislosti na teplotě krystalizuje ve třech krystalografických modifikacích, a to: v monoklinické, tetragonální a kubické. Při atmosférickém tlaku a současně do teploty 1170 °C je struktura monoklinická. Mezi teplotami 1170 °C až 2370 °C se nachází oxid zirkoničitý v tetragonální symetrii. Při teplotě nad 2370 °C dochází k fázové přeměně na strukturu kubickou [15]. Transformace tetragonální fáze na fázi monoklinickou je doprovázena zvětšením objemu materiálu (o přibližně 4,5 %), což může způsobit jeho popraskání. Přidáním oxidů vápníku, hořčíku, cesia a yttria dochází ke stabilizaci (plné, nebo částečné) tetragonální fáze při pokojové teplotě. Tím je možné kontrolovat fázovou transformaci způsobenou vnějším napětím. Prostřednictvím této transformace dochází k efektivnímu zastavení šíření trhlin, a tím pádem ke zvýšení lomové houževnatosti [14, 15]. Ve fyziologickém prostředí však není tak inertní jako oxid hlinitý, s postupem času degraduje, což je způsobeno fázovou přeměnou [15]. Mechanické vlastnosti závisí na tepelném zpracování, kde je důležité nalézt kompromis mezi velikostí zrna a hodnotou hustoty tělesa.

Kromě aplikací v ortopedii nachází oxid zirkoničitý uplatnění ve stomatologii (korunky, můstky, fazety a ortodontické zámky), ať už pro své mechanické vlastnosti nebo také pro své estetické vlastnosti. Jeho barva totiž odpovídá odstínu přirozených zubů. Oxid zirkoničitý se tedy používá stabilizovaný, částečně stabilizovaný nebo společně s jiným materiálem ve formě kompozitního materiálu, obvykle v kombinaci s oxidem hlinitým nebo oxidem titaničitým. Kombinace poslední zmíněné dvojice materiálů vede ke zlepšení biologické odpovědi organismu a zvýšení adheze implantátu ke kostní tkáni [15].

Bioaktivní a resorbovatelná keramika

Bioaktivní chování keramických materiálů bylo objeveno na konci 60. let minulého století profesorem Henchem a spol. Materiály této skupiny po implantaci do lidského těla neindukují tvorbu vazivové blány, nýbrž se s okolní kostní tkání vážou extrémně pevnou chemickou vazbou – *osteokonduktivní chování*. Tyto materiály byly vyvinuty za účelem eliminace pohybu na rozhraní implantát/kost, ke kterému dochází po implantaci bioinertních materiálů. Nejběžněji používané materiály této skupinou jsou: biosklo, bioaktivní sklokeramika a keramika na bázi kalcium fosfátů [14, 15].

- Bioaktivní skla

Během 60. let minulého století Larry Hench představil bioaktivní skla. Jedná se o druh bioaktivních keramik s amorfni strukturou [7, 8]. Jsou označována jako biokompatibilní a cytocompatibilní materiály. Složení bioskla komerčně označovaného jako Bioglass® je následující (hm. %): 45 % SiO_2 , 24,5 % CaO , 24,5 % Na_2O a 6 % P_2O_5 . Strukturu a vlastnosti bioaktivních skel je poměrně jednoduché ovlivnit změnou poměrů mezi oxidy nebo přidávkem sklotvorných oxidů, což má vliv na chemické, fyzikální a biologické vlastnosti. Amorfni struktura skla, která je založena na sklotvorném oxidu křemičitém, je úzce spjata s bioaktivním chováním a schopností interagovat s okolními tkáněmi za vzniku vrstvy karbonátovaného hydroxyapatitu (HCA). Kromě osteokonduktivních vlastností vykazují bioskla také osteoinduktivní chování, spočívající v uvolňování iontů z bioaktivních skel podporujících růst

nových kostních buněk. Bioskla však díky svým nevhodným mechanickým vlastnostem, především díky své křehkosti a nízké lomové houževnatosti, nemohou být použita na výrobu ortopedických nosných implantátů. Bioskla jsou tedy používána především v tkáňovém inženýrství, stomatologii a ortopedii jako výplně kostních defektů a ve formě povlakování inertních implantátů atd. [7, 8].

- Bioaktivní sklo-keramika

Bioaktivní sklo-keramika vzniká vhodným tepelným zpracováním, a to řízenou krystalizací skel při vhodné teplotě. Většina bioaktivní sklo-keramiky je založena na obdobném chemickém složení jako bioskla, liší se však přítomností krystalické fáze. Biosklo-keramika vykazuje lepší mechanické vlastnosti (vyšší hodnota pevnosti v ohybu, než má kortikální kost), avšak horší bioaktivní chování než biosklo [8]. Komerčně dostupná sklo-keramika Cerabone® na bázi apatitu (38 hm.%) a wollastonitu (křemičitan vápenatý, CaSiO_3 , 34 hm.%) se zbytkem skelné fáze (28 hm.%) je používána na výrobu umělých obratlů, na výplně kostních defektů nebo jako povlak pro inertní titanové slitiny. Wollastonit přítomný ve struktuře zlepšuje mechanické a biologické vlastnosti, má však schopnost rychle se rozpouštět ve fyziologickém prostředí. Vhodná kombinace přítomných fází ve struktuře tedy umožňuje splnit široké spektrum požadovaných vlastností pro aplikaci bioaktivních sklo-keramik ve tkáňovém inženýrství [2, 8].

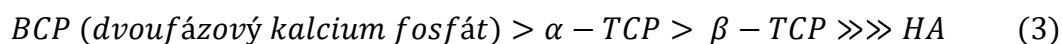
- Kalcium fosfátové keramiky

Skupina kalcium fosfátových keramik je jedna z nejvíce zkoumaných a používaných biokeramik ve tkáňovém inženýrství [7]. Širokému spektru použití kalcium fosfátových keramik přispívá jejich chemická podobnost s minerální složkou tvrdých tkání lidského těla. V těle tudíž nejsou toxické, do živých tkání se začleňují stejnými procesy jako při remodelaci kostní tkáně, což vede k pevné fyzikálně chemické vazbě mezi implantátem a kostí (osteointegrace) [9]. Přehled hlavních zástupců kalcium fosfátových keramik je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4 Přehled hlavních zástupců kalcium fosfátových keramik [9, 15, 16].

Sloučenina	Vzorec	Zkratka	Ca/P poměr [-]	Hustota [g/cm^3] [15]
Dihydrogenfosforečnan vápenatý monohydrát	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MCPM	0,50	2,33
Hydrogenfosforečnan vápenatý	CaHPO_4	DCPA	1,00	–
Hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD	1,00	2,32
α -fosforečnan trivápenatý	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -TCP	1,50	2,86
β -fosforečnan trivápenatý	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -TCP	1,50	3,08
Amorfni fosforečnan vápenatý	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4,5$; 15-20% H_2O	ACP	1,20–2,20	–
Hydroxyapatit s deficitem vápníku	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	CDHA	1,50–1,67	–
Hydroxyapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA (HAp)	1,67	3,16
Fluorapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	FA (FAp)	1,67	3,20
Bisfosforečnan-oxid tetravápenatý	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2,00	3,05

Dle aplikace a funkce implantátu používaného ve tkáňovém inženýrství je důležité, při výběru vhodného materiálu, sledovat jeho rychlost degradace. Biodegradace (neboli rozpustnost) je odhadována pomocí testů rozpustnosti, kdy je testovaný materiál ponechán v kyselém pufru (pH=5) a je sledováno uvolňování Ca^{2+} iontů v čase. Samotná degradace jednotlivých zástupců kalcium fosfátových keramik závisí na jejich chemickém složení, porositě, velikosti částic, krystalinitě (odráží velikost krystalů) a podmínkách přípravy [9]. Dle experimentálních výsledků publikovaných ve studiích [9, 14, 17] jsou seřazeni zástupci CaP keramik v sestupném pořadí dle následující posloupnosti (3):

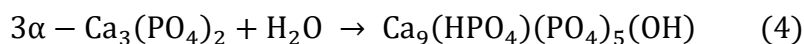


Jak již bylo výše zmíněno, rozdílná krystalografická soustava každé modifikace má vliv na jejich rozdílné chemické a biologické vlastnosti, především na biodegradabilitu a rozpustnost. V citovaném článku [18] byla porovnávána rozpustnost jednotlivých zástupců kalcium fosfátových keramik při teplotách 25 °C a 37 °C ve fyziologickém prostředí při hodnotách pH = 7,2–7,4. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5 Srovnání rozpustnosti jednotlivých zástupců kalcium fosfátových keramik [18].

	Ca/P poměr	-log K_{ps}		Rozpustnost [mg/l]	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	6,59	6,73	87,00	74
CaHPO_4	1,00	6,90	7,04	48,00	41
$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	25,50	28,50	0,97	0,24
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	28,90	29,60	0,20	0,15
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	116,80	117,20	0,0001	0,000096
$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00	38,00–44,00	37,00–42,00	0,28–0,038	0,39–0,075

Hodnoty v Tabulce 5 dokládají míru stability popsanou posloupností (3). Při daných podmínkách je nejvíce stabilní HA, a zároveň v těchto podmínkách při rozpouštěcích procesech může precipitovat z HA α -TCP. Tato predikce je termodynamickým základem kalcium fosfátových kostních cementů odvozených od α -TCP dle následující rovnice (4) [16].



Rychlost rozpouštění α -TCP ve formě prášku lze ovlivnit modifikací povrchu (aktivací nebo pasivací), použitím inhibitorů rozpouštění nebo popřípadě změnou rozpouštění v roztoku (změna kontaktní plochy mezi práškem a roztokem, změna nasycení atd.) [18].

V případě dvoufázových kalcium fosfátových keramik (BCP) závisí rychlost degradace (kinetika) na poměru mezi HA/TCP. Čím je poměr mezi hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem vyšší, tím nižší je rychlost degradace [9]. Rozpustnost lze ovlivnit také začleněním různých iontů do struktury, např. ionty CO_3^{2-} , Mg^{2+} a Sr^{2+} podpoří rychlost degradace HA, naopak F^- u HA nebo Mg^{2+} u TCP tento proces zpomalují [9, 14]. Obecně je uvedeno, že kinetika degradace biodegradovatelného materiálu musí odpovídat kinetice růstu nové tkáně. Níže budou popsány nejpoužívanější a nejstudovanější materiály kalcium fosfátových biokeramik, a to: hydroxyapatit, α -TCP a β -TCP.

○ Hydroxyapatit

Hydroxyapatit je nejvíce používaným materiálem ve tkáňovém inženýrství, z důvodu jeho chemické podobnosti s apatitem vyskytujícím se v minerální složce kostí. Jedná se o nejstabilnějšího zástupce kalcium fosfátových keramik při pokojové teplotě a pH = 4,2. HA se svým stechiometrickým vzorcem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (krystalografická jednotka HA obsahuje dvě molekuly) a Ca/P poměrem 1,67 obvykle krystalizuje v hexagonální soustavě, méně často pak v monoklinické soustavě, a to dle orientace hydroxylových skupin [16, 19]. Rozdílné krystalografické struktury umožňují HA dopovat jinými ionty, a tím pádem ovlivnit jeho chemickou kompozici a dále pak ovlivnit jeho fyzikální, mechanické a biologické vlastnosti. Dopování Zn^{2+} a (SiO_4^{4-}) ionty zlepšuje biokompatibilitu, přítomnost Ag^+ iontů poskytuje antibakteriální vlastnosti HA. Obecně dopování Mg^{2+} , Sr^{2+} a Mn^{2+} významně přispívá k podobnosti lidské kosti z hlediska biochemie a struktury a rovněž i k angiogenezi [16, 20].

HA lze syntetizovat mnoha technikami, které lze rozdělit do šesti skupin. Tyto skupiny jsou blíže specifikovány v následující Tabulce 6. Všechny zmíněné metody syntéz HA mají různé procesní podmínky a charakteristiky, které ovlivňují morfologii syntetizovaných částic. Získaná morfologie (mikroskopický tvar, velikost a distribuce částic) totiž následně ovlivňuje technologické procesy, biologické vlastnosti (biokompatibilita a bioaktivita) a mechanické vlastnosti. Z těchto důvodů je tedy nutné morfologii při syntéze řídit a kontrolovat [16].

Tabulka 6 Metody využívané k syntéze HA [14, 16].

Metoda	Typ syntézy	Teplota [°C]	Morfologie částic	Čistota	Ca/P poměr	Velikost částic
Suché	Reakce v tuhé fázi	~ 1000	smíšená	nízká	variabilní	μm
	Mechanochemické	~ 1000	smíšená	nízká	nestechiometrický	nm
Mokrě	Chemická precipitace	100–1300	smíšená	variabilní	nestechiometrický	převážně nm
	Hydrolyza	~ 900	smíšená	vysoká	stechiometrický	variabilní
	Sol-gel	500–1300	smíšená, vlákna	variabilní	stechiometrický	nm
Hydrotermální	Hydrotermální	~ 120	sférická, jehlicovitá	vysoká	stechiometrický	nm nebo μm
	Emulzní	~ 25	sférická, jehlicovitá	variabilní	nestechiometrický	nm
	Sonochemická	600–1000	smíšená	vysoká	variabilní	nm
Vysokoteploní	Pyrolýza	~ 600	smíšená	variabilní	stechiometrický	nm nebo μm
	Biogenní zdroje	-	smíšená	vysoká	variabilní	variabilní
	Kombinace metod	-	smíšená	variabilní	stechiometrický	převážně nm

HA je pro lidské tělo netoxický materiál (pokud není dopován ionty, které mohou vyvolat alergickou reakci, např. Er^{3+} , Cd^{2+} a Pd^{4+}), jelikož obsahuje hydroxylové, fosforečnanové aniony a vápenaté kationy, které se přirozeně vyskytují v lidském těle. HA je značně zkoumaným materiálem pro tkáňové inženýrství (ať už jako náhrada kostních štěpů nebo jako substituční materiál) z hlediska jeho biologických vlastností: je biokompatibilní, bioaktivní, osteokonduktivní a při určitých podmínkách také osteoinduktivní [19, 20]. Po implantování HA do fyziologického prostředí lidského těla dochází na rozhraní povrchu implantátu/kosti k tvorbě uhlíkem nasycené apatitové vrstvy s deficitem vápníku (CDHA), na

kteřou se váže nově formovaná kost. Tvorba apatitové vrstvy aktivuje proces uchycení kosti přímo na povrch implantátu. Při testech *in vitro* dochází ke tvorbě amorfního nebo hydroxylovými skupinami nasyceného kalcium fosfátu v apatitové vrstvě. Apatitová vrstva vzniká částečným rozpouštěním HA a výměnou iontů mezi SBF a povrchem implantátu z HA a zahrnuje dílčí procesy, a to: nukleaci, růst a krystalizaci [9, 13, 16, 17]. Dílčí procesy tvorby apatitové vrstvy závisí na koncentraci Ca^{2+} a (PO_4^{3-}) iontů, pH prostředí, teplotě a vlastnostech povrchu implantátu. Prokázání přítomnosti apatitové vrstvy na povrchu implantátů se tedy stalo hlavním kritériem při hodnocení bioaktivity, přestože z definice bioaktivity vyplývá jiný závěr, a to ten, že bioaktivní materiály po implantaci do lidského těla vyvolají specifickou odezvu organismu na nový materiál tím, že se na rozhraní mezi implantátem a okolní tkání vytvoří adhezní pevná vazba [8, 9, 17].

Obecně vykazují biokeramické materiály nevhodné mechanické vlastnosti, které neumožňují je používat v ortopedii na nosné implantáty [9]. Lomová houževnatost HA nepřesahuje $1 \text{ MPa/m}^{1/2}$, kdežto u kosti dosahuje lomová houževnatost hodnot od 2 do $12 \text{ MPa/m}^{1/2}$ (díky obsahu kolagenových vláken) [9]. Hodnotu lomové houževnatosti lze pozitivně ovlivnit zmenšením velikosti zrna. Naopak, čím více bude materiál porézni, tím bude klesat hodnota lomové houževnatosti s téměř lineární závislostí [9]. Weibullův modul je nízký, vypovídá tedy o křehkolomovém chování keramik, z čehož vyplývá i nízká spolehlivost implantátů.

Tabulka 7 Srovnání mechanických vlastností HA v hutné a porézni formě [9].

Materiál	Modul pružnosti [GPa]	Tvrdość dle Vickerse [GPa]	Pevność v tahu [MPa]	Pevność v tlaku [MPa]	Pevność v ohybu [MPa]	Lomová houževnatost [$\text{MPa/m}^{1/2}$]	Weibullův modul [-]
hutný HA	35–120	3–7	38–300	120–900	38–250	0,6–1	5–12
	40–120 [16]	–	~3	300–600 [16]	60–115 [16]	–	–
porézni HA	3,1	–	~3	2–100	2–11	–	–

Velké rozpětí hodnot uvedených v Tabulce 7 u porézni formy HA je způsobeno statistickým charakterem rozložení pevnosti – vliv na rozptyl hodnot má především porozita, ale také i velikost zrna, nečistoty nebo přítomná (v některých případech i zbytková) mikroporozita materiálu [9]. Hodnota pevnosti závisí i na míře porozity materiálu, pevnost klesá téměř exponenciálně s rostoucí pórovitostí. Nezanedbatelný vliv má i Ca/P poměr, do hodnoty 1,67 (poměr stechiometrického HA) pevnost roste, nad 1,67 pak náhle klesá. Porézni HA má také mnohem nižší odolność vůči únavě než hutný HA [9].

Vzhledem k vysoké křehkości HA, která je spojena s nízkou odolnoostí vůči šíření trhlin, je aplikace HA omezena na výrobu nenosných implantátů (oblast chirurgie středního ucha, čelistní a ortopedická chirurgie a výplně kostních defektů) [9]. HA může být také využíván ve formě povlaků implantátů, kostních štěpů a skafoldů (podpůrné trojrozměrné porézni systémy) v tkáňovém inženýrství [16]. Nejčastěji jsou povlakovány bioinerní materiály, především titanové slitiny, které nevykazují příliš dobré biokompatibilní a osteointegrační vlastnosti. Povlak HA musí mít adekvátní tloušťku, tenčí povlaky vykazují lepší mechanické vlastnosti, avšak v prvních měsících po implantaci často dochází k jejich částečnému rozpouštění.

Povlaky, jejichž tloušťka se pohybuje v rozmezí od 100 do 150 μm , jsou náchylné na únavové poškození při tahovém zatížení [16]. Ve tkáňovém inženýrství je HA používán jako výplň kostních defektů (v porézní formě), které jsou způsobeny závažnými úrazy, záněty nebo onkologickými onemocněními. Použití biokompatibilních skafoldů je alternativou při léčbě kostních defektů, kdy slouží jako podpora pro adhezi buněk, podporují jejich životaschopnost a diferenciaci tak, aby byla podpořena tvorba nové kosti. Makroporézní skafoldy umožňují tvorbu a mineralizaci nové kosti, podporují migraci osteoblastů a osteoprogenitorových buněk, zatímco mikropóry přítomné ve struktuře podporují vaskularizaci a difúzi živin během regeneračního procesu [16]. Navíc se HA používá jako tzv. nosič léčiv s kontrolovaným uvolňováním jejich různých typů (antibiotika pro kostní tkáň, léky používané k terapii onkologických onemocnění, protizánětlivé medikamenty, léky proti osteoporóze nebo vitamíny, růstové hormony atd.) nebo proteinů.

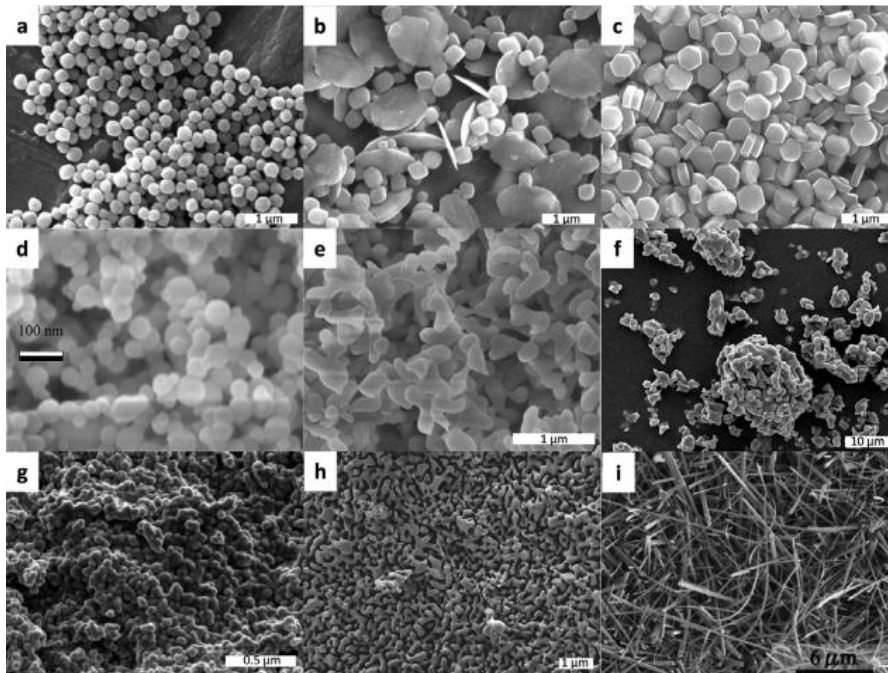
- Trikalciium fosfáty (TCP)

Trikalciium fosfát je polymorfní materiál ze skupiny kalcium fosfátových keramik vyskytující se ve třech modifikacích: nízkoteplotní β -TCP a vysokoteplotní formy α -TCP a α' -TCP, jenž existuje pouze při teplotách vyšších než $\sim 1430\text{ }^\circ\text{C}$ a při ochlazení pod transformační teplotu se ihned vrací na vysokoteplotní modifikaci α -TCP. Modifikace β -TCP je při pokojové teplotě stabilní a postupně se transformuje při $\sim 1125\text{ }^\circ\text{C}$ na α -TCP [18]. Výše transformačních teplot je ve struktuře TCP určena přítomností nečistot, které mají původ v syntézách.

Všechny tři modifikace mají stejné stechiometrické chemické složení se vzorcem $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$, přičemž krystalizují v odlišných krystalografických strukturách: β -TCP (rhomboedrická) \rightarrow α -TCP (monoklinická) \rightarrow α' -TCP (hexagonální). Z toho plynou odlišné fyzikální, chemické vlastnosti a následně aplikace. β -TCP je používán především pro přípravu biodegradabilních hutných nebo makroporézních bloků a granulí, kdežto více reaktivní a rozpustnější α -TCP je využíván ve formě jemného prášku při přípravě kostních cementů na bázi kalcium fosfátů. Obě modifikace TCP jsou používány při klinických aplikacích u léčby kostních defektů nebo při remodelaci kostní tkáně, jelikož vykazují osteoinduktivní a osteokonduktivní vlastnosti [18].

α -TCP je syntetizován méně častěji než HA, v laboratořích je pracováno obvykle s komerčně dostupným práškem. Syntéza α -TCP probíhá pomocí tepelné transformace prekurzorů s molárním poměrem $\text{Ca/P} = 1,5$, což odpovídá následujícím prekurzorům: HA s deficitem vápníku, amorfnímu fosforečnanu vápenatému nebo β -trikalciium fosfátu. Další možný způsob syntézy α -TCP je tuhofázová reakce prekurzorů za vyšších teplot [18].

β -TCP může být syntetizován obdobně jako α -TCP tuhofázovou reakcí vhodných prekurzorů bohatých na vápník (uhličitan vápenatý, hydroxid vápenatý), včetně HA a prekurzorů bohatých na fosfor (hydrogenfosforečnan vápenatý nebo jeho dihydrát aj.) při vyšších teplotách. Stejně jako při syntéze α -TCP je důležité, aby prekurzory měly molární Ca/P poměr = 1,5. Tuhofázová reakce obvykle vede k syntéze vysoce aglomerovaných částic β -TCP. Další, poměrně běžná metoda přípravy β -TCP, je teplotní transformace amorfního kalcium fosfátu nebo hydroxyapatitu s deficitem vápníku při teplotách nad $650\text{--}750\text{ }^\circ\text{C}$ [21]. Přehled rozdílných morfologií částic β -TCP je na Obr. 7.



Obr. 7 Přehled rozdílných morfologií částic β -TCP: (a, b, c) Morfologie β -TCP částic precipitovaných z ethylenglykolu, (d) Amorfni kalcium fosfát (ACP) v práškové formě získaný pomocí sprejové pyrolýzy, (e) ACP prášek po transformaci na β -TCP při 800 °C, (f) Morfologie komerčně dostupného β -TCP prášku (Aldrich, Art No 20218), (g) Hydroxyapatit s deficitem vápníku (CDHA) – prášek, (h) β -TCP získaný kalcinováním CDHA prášku, (h) při 850 °C, (i) β -TCP vlákna [21].

Dle publikované literatury jsou aplikace α -TCP omezeny na jeho použití při výrobě kostních cementů. Cementy na bázi α -TCP jsou používány v zubním lékařství, při kraniofaciálních a maxillofaciálních operacích a dále v ortopedii při rekonstrukčních operacích, týkajících se páteřních obratlů [18]. β -TCP je často aplikován v regenerativní medicíně společně s HA, společně tvoří dvoufázový kalcium fosfát (BCP). BCP keramika je rovněž využívána k transportu léčiv nebo také jako výplň komplexních a rozsáhlých kostních defektů [15].

3.2.4 Kompozitní biomateriály

Kompozitní materiály jsou složeny ze dvou, či více základních materiálů, které mají rozdílné fyzikální, chemické nebo mechanické vlastnosti. Charakteristické vlastnosti kompozitů závisí na vlastnostech jednotlivých složek a jejich objemovém podílu, tvaru, ale také i pevnosti na rozhraní mezi disperzní fází (výztuží) a spojitou fází (matricí). Disperzní fáze může mít tvar částice, vlákna nebo destičky a má obvykle za úkol zlepšit mechanické nebo biologické vlastnosti. Z koncepčního hlediska lze kompozity rozlišit dle tvaru výztuže na částicové, vláknové nebo vrstevnaté (lamináty) [2, 22].

Použití kompozitních biomateriálů ve zdravotnictví je rozsáhlé. Jsou používány při diagnostice a léčbě zranění nebo mohou být použity jako přímé náhrady poškozených tkání. V kardiokirurgii jsou kompozitní biomateriály užívány při chirurgickém zákroku známém jako angioplastika. Při angioplastice se do kardiovaskulárního systému zavádí stent. Ten

udržuje průchodnost zúžených, nebo dokonce uzavřených cév. Běžně používanými materiály na výrobu stentů jsou titanové slitiny, slitiny hořčíku, slitiny kobaltu a železa. Vhodnou alternativou jsou kompozitní materiály na bázi kombinace kovových materiálů a polymerní matrice. Tato kombinace je cenově výhodná a vhodná díky biologické rozložitelnosti a vyrobiteľnosti. Ve stomatologii jsou naopak užívány materiály, které mají obdobné složení jako sklovina a dentin (fosforečnan vápenatý v kombinaci s kolagenem). Používají se kompozitní materiály s polymerní matricí, které slouží k výplni defektů tkání, k opravě zlomených zubů nebo přímo k výrobě dentálních implantátů. Tyto materiály jsou mnohem více biokompatibilní než konvenčně používané kovové biomateriály. Stříbrno-rtuťové amalgámové výplně jsou toxické a akrylové pryskyřice mají nízkou mechanickou pevnost. Některé zubní náhrady se vyrábí z vysoce korozivzdorného polykarbonátu vyztuženého sklem. Nedávné studie uvedly, že methakrylátová matrice vyztužená vlákny a anorganickými částicemi má lepší mechanické a estetické vlastnosti než konvenční kompozity s polymerní matricí. Kompozitní biomateriály nachází uplatnění také v ortopedii. Kombinací polyhydroxyethylmetakrylátu (PHEMA) a syntetických vláken polyethyltereftalátu (PET) vzniká biomateriál, který je používán při náhradě chrupavky. Další alternativou k tomuto kompozitu je hydroxyapatit, který je povlakován ultravysokomolekulárním polyethylenem. Tento kompozit se používá při náhradě kloubních chrupavek, intervertebrálních vazivových chrupavek nebo menisků. Kompozitní biomateriály se aplikují i při léčbě zlomenin kostí. Kombinace vhodných materiálů na bázi kalcium fosfátů a polymerů přispívá k vysoké biokompatibilitě, osteokonduktivě a mohou poskytnout oporu pro hojení kostní tkáně. Pokud je kostní tkáň narušena a obsahuje defekty, jako výplň těchto defektů se používají kostní cementy nebo porézní skafoldy. Kombinací polyuretanové matrice s polyesterovými nebo sklolaminátovými vlákny je vytvořen kompozit, který je pevnější než konvenční materiály [22].

3.2.5 Vlastnosti skafoldů vhodných pro použití ve tkáňovém inženýrství

Skafoldy jsou používány ve tkáňovém inženýrství při náhradách a výplních kostních defektů, které vznikají v důsledku úrazů, onkologických nebo degenerativních onemocnění. Ideální skafold je vyroben z biokompatibilního, biologicky odbouratelného materiálu, který je svými mechanickými vlastnostmi podobný vlastnostem tkáně, do které bude implantován [23]. Tyto podpůrné systémy nejsou určeny jako trvalé implantáty, postupem času by měly být nahrazeny tkání, do které byl systém implantován. Materiály, z nichž se skafoldy vyrábí, musí být biokompatibilní a částečně nebo zcela degradabilní. Chemické složení produktů rozkladu původního materiálu nesmí vykazovat cytotoxické chování a nesmí být biologicky závadné. Rychlost degradace skafoldu musí odpovídat rychlosti tvorby nové tkáně. Pokud degradace podpůrného systému probíhá rychleji než novotvorba tkáně, může nastat mechanické selhání skafoldu [23].

Povrch podpůrných systémů je uzpůsoben tak, aby se hostitelské buňky na povrch snadno uchytily a mohly se dále dělit a diferencovat. Kromě povrchu má na úspěšnou proliferaci vliv i velikost pórů materiálu. Vzájemné propojení pórů podporuje také prorůstání tkání a vaskularizaci podpůrného systému. Podílí se rovněž na difuzi kyslíku a živin dovnitř skafoldu a odvodu odpadních produktů pryč. Pórovitost také podporuje migraci buněk do skafoldu a zvyšuje specifický povrch pro vazbu mezi buňkami a skeletem a jejich interakci s okolními tkáněmi. Důležitým faktorem posuzování vhodnosti podpůrného systému je také

velikost pórů. Je obecně platné, že velikost pórů významně ovlivňuje úchyt buněk a jejich růst. Pokud jsou póry příliš malé, buňky mohou mít problém s migrací skrz skafold.

Podpůrné systémy proto musí být navrženy přesně na parametry tkání a buněk, do kterých budou implantovány. Ukázalo se, že skafoldy s průměrnou velikostí pórů blízkou 300 μm , které jsou implantovány *in vivo*, podporují osteogenezi díky vyšší permeabilitě a potenciálu pro vaskularizaci [23]. Kdežto skafoldy, jejichž velikost pórů se blíží velikosti 100 μm , jsou příznivější pro procesy chondrogenese (vývoj chrupavky). Podpůrné systémy pro tkáňové inženýrství proto musí obsahovat makropóry, které umožňují prorůstání buněk a osteonů *in vivo*, a také musí obsahovat mikropóry, které podporují interakci mezi buňkami a skafoldem [23].

Aby byla zaručena určitá míra pórovitosti, je důležité brát v úvahu i pokles mechanických charakteristik, zejména pevnosti v tlaku. Další důležitou materiálovou charakteristikou je tuhost. Volený materiál by měl mít hodnotu tuhosti obdobnou jako kost. Docílí se tím lepšího přenosu fyziologického zatížení skafoldu. Dalšími zvažovanými vlastnostmi při volbě materiálu vhodného pro podpůrné systémy jsou Youngův modul pružnosti, pevnost v tlaku a únavová pevnost. Ideální skafold by měl mít mechanické a fyzikální vlastnosti shrnuté v Tabulce 8 [23]. V současné době je však stále obtížné najít vhodný materiál nebo kombinaci materiálů tak, aby byla nalezena rovnováha mezi požadovanými vlastnostmi, kladenými na vhodné skafoldy [23].

Tabulka 8 Shrnutí ideálních fyzikálních a mechanických vlastností skafoldu, implantovaného do tvrdých tkání [23].

	Pevnost v tlaku (podélný směr) [MPa]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Pórovitost [%]	Průměrná velikost pórů [μm]
Ideální skafold	100–230	7–30	50–151	60–90	>100

3.3 Metody přípravy porézních materiálů

Vysoce porézní (makroporézní) materiály nachází uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích při technologických procesech. Tyto materiály vykazují speciální vlastnosti, např. nízkou hustotu, vysokou porozitu, velký měrný povrch a dobrou odolnost vůči opotřebení [24, 25, 26], které závisí na řízené porozitě výrobku, a proto není možné těchto vlastností dosáhnout pomocí konvenčních metod [25]. Často jsou tyto materiály využívány v extrémních podmínkách: ve vysokých teplotách, korozním prostředí nebo v prostředí náročném na opotřebení (např. filtrace tavenin, částic z plynů, biomedicínské aplikace, bioreaktory aj.) [25, 27]. Významný vliv na vlastnosti materiálu má velikost pórů, jejich distribuce, morfologie a typ, zda jde o otevřenou, či uzavřenou pórovitost. Všechny tyto mikrostrukturní vlastnosti jsou úzce spojeny se zvoleným technologickým postupem (viz. Tabulka 9), který je vhodný pro danou aplikaci [25].

Tabulka 9 Srovnání mikrostrukturních vlastností dle zvolené metody přípravy [25, 27].

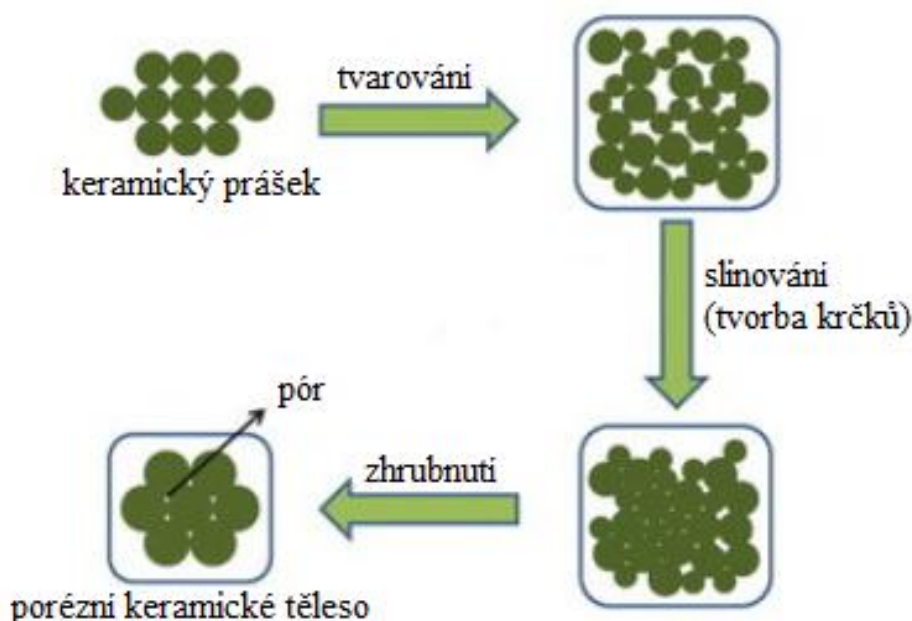
Metoda	Průměr pórů [μm]	Porozita [%]	Výhody metody	Nevýhody metody
Částečné slinování	2–5krát menší než velikost prekursoru	≤ 50	jednoduchost, úzká distribuce pórů	velikost pórů je limitována slinovatelností prekursorů, porozita dosahuje max. 50 %
Metoda obětní šablony	1–700	20–90	definovaný tvar a velikost pórů	nízká propojenost pórů
Replikační metoda	200–3000	40–95	vysoce porézní struktura s otevřenými, propojenými póry	limitované mechanické vlastnosti, velký rozměr pórů
Metoda přímého pění	10–300	45–90	vysoce porézní struktura s uzavřenými nebo propojenými póry	heterogenita pórů

Jelikož je tato diplomová práce orientovaná na přípravu makroporézních materiálů vhodných pro aplikace ve tkáňovém inženýrství, je důležité definovat vhodnou velikost pórů. Ideální průměr pórů makroporézních struktur by měl být větší než 100 μm , optimální je však interval od 300 do 500 μm , jenž je vhodný pro vrůst tkáně do implantátu, včetně cévního zásobení a výživy nové tkáně. Důležité jsou také mikropóry ve struktuře, které zvětšují měrný povrch implantátu, což umožňuje absorpci proteinů, a také možné uchycení a následnou proliferaci buněk [28]. Pórovitost musí být propojená z důvodu průchodnosti cév na zabezpečení výživy tkání a odvodu odpadních látek [29].

3.3.1 Metoda částečného slinování (partial sintering)

Technologicky nejjednodušší metodou přípravy porézní keramiky je metoda částečného slinování. Princip metody je založen na slinování zhutněných keramických prášků nebo jejich směsí, avšak cyklus tepelného zpracování je ukončen před plným zhutněním materiálu. Mezi jednotlivými částicemi dojde k vytvoření vazby, tzv. krčku, mechanismem povrchové difuze nebo pomocí procesu vypařování/kondenzace souvisejícího se zahříváním materiálu [30]. Výslednou strukturu tělesa (porozitu a velikost pórů) lze řídit velikostí částic keramického prášku, která by měla být 2 až 5krát vyšší, než je požadovaná velikost pórů, nebo také podmínkami tepelného zpracování (výše slinovací teploty, tlak a atmosféra) [26, 30]. Touto metodou lze vytvořit poměrně hutné materiály s porozitou nižší než 60 % [25], homogenní strukturou a nahodile, přičemž rovnoměrně, rozmístěnými póry. Mechanické vlastnosti jsou ovlivněny mírou vytvoření krčku mezi částicemi, což přímo souvisí i s výslednou porozitou materiálu. Nevýhodou této metody při použití v tkáňovém inženýrství je uzavřená nepropojená porozita. Schéma technologie metody částečného slinování je vyobrazeno na Obr. 8 [31].

Částečné slinování

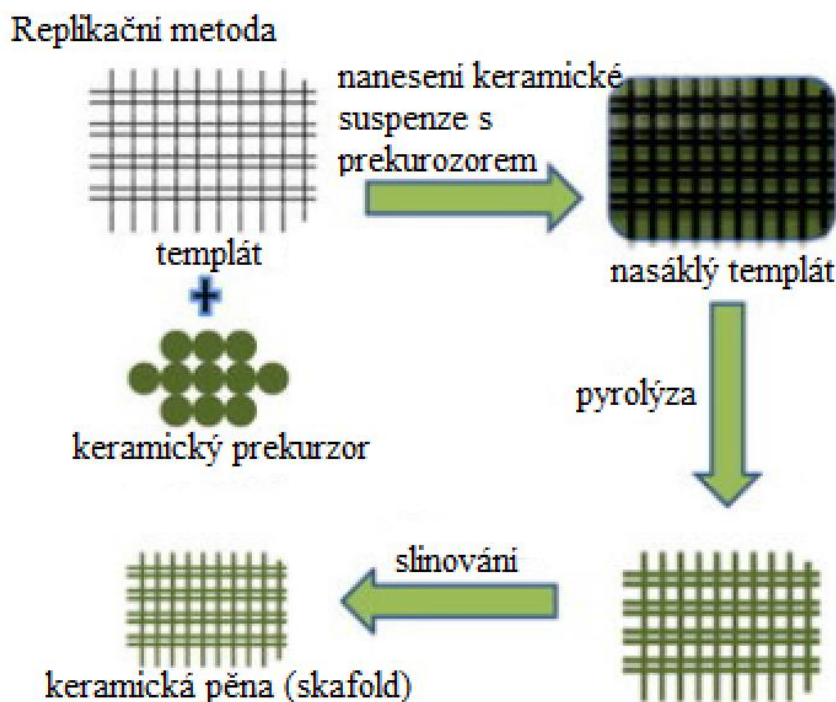


Obr. 8 Technologické schéma metody částečného slinování [31].

3.3.2 Templátová metoda (replikační, replica method)

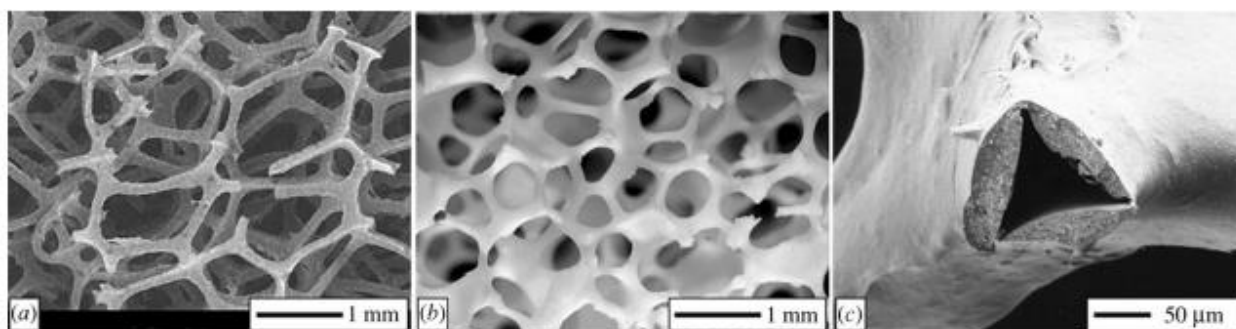
Pomocí replikační metody lze dosáhnout pravidelné, velmi porézní síťové struktury s propojenými otevřenými póry a definovanou velikostí od 200 μm do 3 mm [25]. Keramická suspenze je nanášena na templát (šablonu) s předem definovanou geometrií (s porézní strukturou), výsledná struktura skafoldu přímo odpovídá replice šablony (pozitivní replika). Technologicky je metoda jednoduše proveditelná, variabilní a díky možnosti replikace definované struktury také vhodná pro aplikaci ve tkáňovém inženýrství.

Principem replikační metody je ponoření templátu do keramické suspenze, ve které je templát ponechán do plného nasáknutí (do doby plného zaplnění vnitřních pórů suspenzí) dle schématu na Obr. 9. Nasáknutý templát je po vyjmutí ze suspenze stlačen válci natolik, aby došlo k odstranění přebytečného materiálu z pórů templátu a vytvořil se okolo trámečků tenký keramický film. Keramický povlak je po odstranění přebytku suspenze sušen a před finálním tepelným zpracováním pyrolyzován. Pyrolýza se zařazuje před slinování, jelikož by mohlo při slinování dojít k popraskání a dekompozici struktury při vypalování šablony. To je hlavní nevýhoda této metody, jelikož velmi negativně ovlivňuje mechanické vlastnosti finálního výrobku (z hlediska výskytu dutých vzpěr po úplném odstranění šablony, které působí jako koncentrátoři napětí viz. Obr. 10 [25, 26]). Pyrolýza je tedy pozvolná, vzorek je ohříván maximální rychlostí 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu v intervalu od 300–800 $^{\circ}\text{C}$ dle materiálu šablony. Po pyrolýze je výrobek finálně slinován na teploty od 1100 $^{\circ}\text{C}$ do teploty tavení dle druhu keramického materiálu [25].



Obr. 9 Schéma templátové metody [31].

Keramické suspenze, využívané při templátové metodě, musí splňovat mnoho parametrů. Suspenze musí být dostatečně řídká, aby došlo k dokonalé impregnaci templátu. Také musí být dostatečně viskózní, aby při odstranění přebytku suspenze zůstal na stěnách pěny keramický film. Je zřejmé, že parametry popisující viskózní chování jsou jiné pro různé velikosti pórů [25]. Do suspenzí jsou také přidávána aditiva, která podpoří výše zmíněné parametry – zahušťovadla nebo látky podporující tixotropní chování, jako jsou např.: jíly, koloidní oxid křemičitý, karboxymethylcelulóza nebo polyethylen glykol v kombinaci s konvenčními disertanty [25]. Dále jsou kromě výše zmíněných aditiv do suspenzí přidávána pojiva – koloidní oxid křemičitý, křemičitan sodný, hydrogenfosforečnan draselný aj., aby tak do jisté míry zabránila strukturním defektům [25, 32].



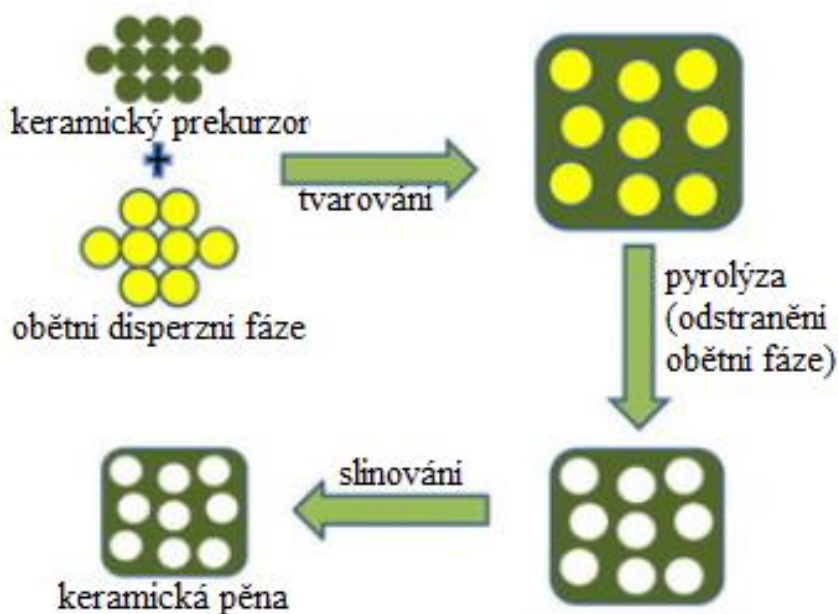
Obr. 10 a) Snímek ze SEM polyuretanového pěnového templátu. b) Struktura po nanesení keramické suspenze s obsahem Al_2O_3 . c) Snímek ze SEM duté vzpěry po vypálení templátu [32].

Dle původu materiálu lze templáty rozdělit na syntetické a přírodní. Průmyslově jsou používány především syntetické templáty, obvykle polymerní pěny (polyuretanové, polyvinylchloridové a polystyrenové) [32]. Při používání přírodních templátů je nutné vybrat takový materiál, který bude mít během zpracování schopnost vrátit se do původního stavu po stlačení, bude mít rozměrovou a strukturní stálost. Dále je nutné, aby přírodní templát během pyrolýzy vyhořel beze zbytku z materiálu. Přední výhodou přírodních templátů je složitost mikrostruktury a morfologie pórů, nejčastěji využívanými přírodními templáty jsou celulóza, latex, korál nebo dřevo [25, 32].

3.3.3 Technika obětní šablony (sacrificial template method)

Technika zahrnuje tvorbu dvoufázového kompozitního materiálu složeného z keramického prekursoru nebo keramické suspenze (kontinuální matrice) a tzv. obětního pórotvorného materiálu, který je dispergován v matrici. Obětní materiál je tepelným zpracováním (pyrolýzou) dle typu materiálu odstraněn, a vznikne negativní replika struktury [25], která je následně slinována dle schématu na Obr. 11. Mezi přednosti této techniky lze zařadit řízenou distribuci a velikost pórů, tím pádem také morfologii pórů [4, 25]. Velikost pórů se liší dle použití obětní fáze, póry mohou dosahovat velikosti v rozmezí 1–700 μm [25].

Technika obětní šablony



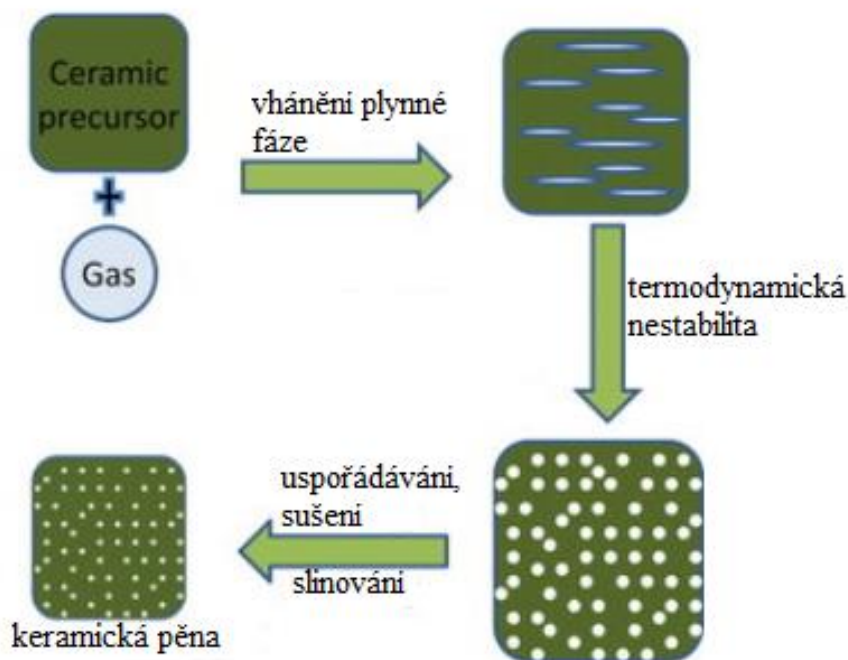
Obr. 11 Schéma techniky obětní šablony [31].

Podobně jako u templátové metody může být dispergovaná fáze syntetická (syntetické organické látky – polystyrenové, polyvinylchloridové kuličky, polymerní gely, nylon nebo také olejové emulze, nikl, částice a vlákna oxidu křemičitého aj.) nebo přírodní (želatina, vosk, škrob) [25, 26]. Nevýhodou této metody je však delší tepelné zpracování (pyrolýza) při teplotách v rozmezí 200–600 $^{\circ}\text{C}$. Při použití organických materiálů při pyrolýze vznikají vyhoříváním vedlejší plynné produkty. Doba trvání pyrolýzy závisí na způsobu začlenění pórotvorného materiálu, po pyrolýze následuje slinování finální podoby výrobku.

3.3.4 Metoda přímého pění

Při použití metody přímého pění není potřeba, na rozdíl od ostatních výše zmíněných metod, používat templát. Porézní struktura vzniká vháněním plynné fáze do keramické suspenze nebo přímou chemickou reakcí jednotlivých komponent tak, aby byla vytvořena porézní struktura. Ustálená porézní struktura je následně vysokoteplotně zpracována (slinována), přičemž je dosaženo vysoce porézní a vysoce pevné struktury. Schéma metody přímého pění s jednotlivými stádii je vyobrazeno na Obr. 12 [31].

Metoda přímého pění



Obr. 12 Schéma metody přímého pění [31].

Výsledná porozita pěny je přímo úměrná množství plynné fáze, které je vháněno do kapalné fáze (obvykle keramické suspenze), vzniklá struktura pěny je homogenní. Pěny, které nejsou vysušené, se nazývají ‚mokrý‘ pěny, ty nejsou termodynamicky stabilní a podléhají destabilizačním procesům, které snižují celkovou energii systému – tj. koalescenci a Ostwaldovo hrubnutí. Termodynamická nestabilita mokrých pěn je nežádoucí jev, který následně negativně ovlivňuje strukturu výsledného materiálu, zejména pak zvětšuje velikost pórů. Tyto mokré pěny je nutné stabilizovat pomocí povrchově aktivních látek nebo pomocí částic [25].

Stabilizace pěn pomocí povrchově aktivních látek (surfaktantů)

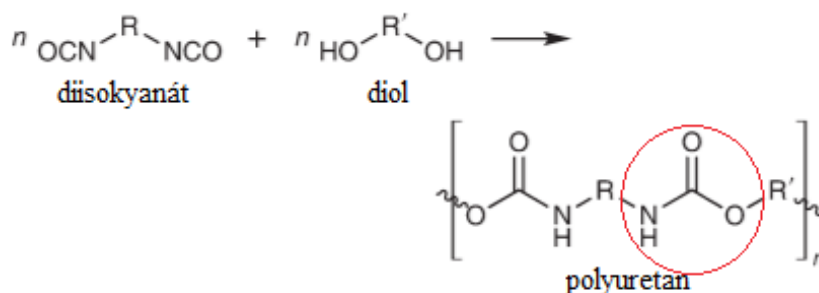
Amfoterní molekuly nebo biomolekuly (lipidy a proteiny) jsou pomocí svých dlouhých řetězců adsorbovány na povrch plynné fáze a redukuje povrchovou energii na rozhraní dvou fází (mezifázovou energii). Povrchově aktivní molekuly po adsorpci na povrchu zabraňují destabilizačním procesům, nicméně účinek tohoto typu stabilizace není dlouhodobý, jelikož adsorpční energie povrchově aktivních látek je nízká. Destabilizace po ukončení pění nastává během několika minut, pokud je systém stabilizován proteiny, destabilizace nastává později, zpravidla během několika hodin [25].

Stabilizace částicemi

Jelikož mezifázové rozhraní plynná fáze – kapalná fáze je velmi energeticky náročné, jsou tyto vlhké pěny (systémy) stabilizovány pomocí lyofobních koloidních částic, které jsou adsorbovány na rozhraní plynná fáze – kapalná fáze, a vytvoří tím energeticky výhodnější rozhraní pevná fáze – kapalná fáze (nebo plynná fáze). Pěny stabilizované koloidními částicemi jsou mnohem déle stabilní, tj. v řádech dní, než pěny stabilizované pomocí povrchově aktivních látek. Velikost pórů u pěn stabilizovaných částicemi je čtyřikrát až pětikrát nižší než u pěn stabilizovaných pomocí surfaktantů, póry mají velikost v rozmezí od 10–300 μm a celková porozita se pohybuje od 40 do 93 % [25].

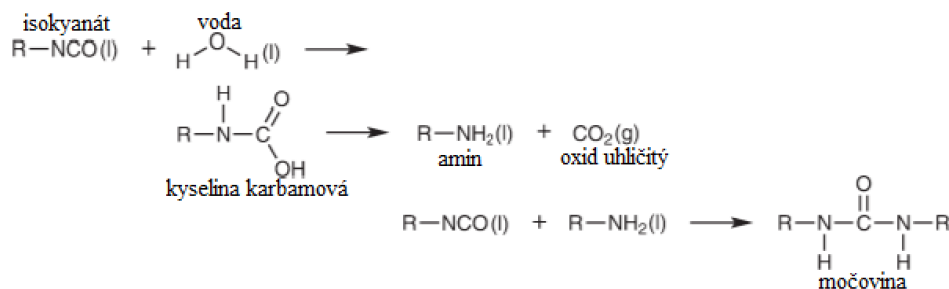
Polyuretanové pěny – metoda přímého pění

Polymerní materiály ze skupiny polyuretanů jsou hojně využívanými materiály, ať už ve formě vláken, pěn nebo povlaků, a uplatnění nachází v mnoha odvětvích, ve stavebnictví, automobilovém průmyslu, textilním průmyslu aj. [33]. Polyuretanové pěny vznikají polyadiční reakcí polyolů (polyalkoholů) s izokyanáty (látek s izokyanátovou funkční skupinou) za vzniku charakteristické uretanové vazby (označeno červeným kruhem na Obr. 13.).



Obr. 13 Reakční schéma vzniku polyuretanu [33].

Při výrobě polyuretanových pěn je přidávána do reakce mezi diisokyanátem a diolem také voda. Ta reaguje s diisokyanátovými skupinami za vzniku oxidu uhličitého dle reakce zobrazené na Obr. 14.

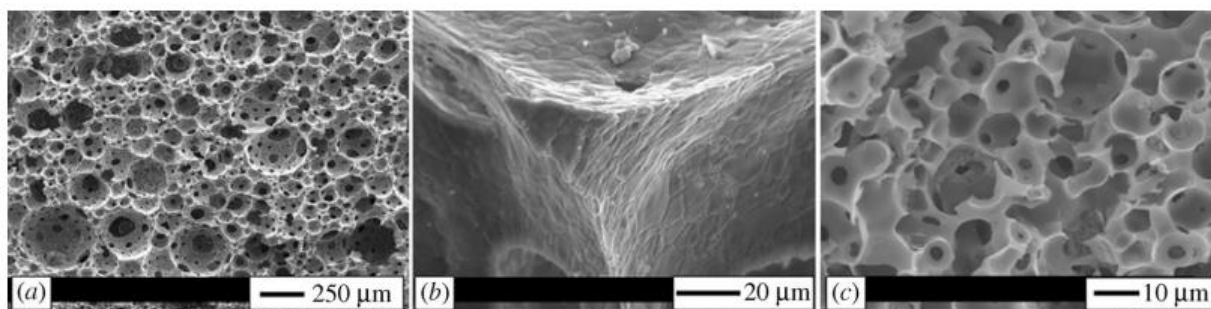


Obr. 14 Reakční schéma isokyanátu s vodou [33].

Oxid uhličitý, který vznikl jako vedlejší produkt reakce mezi izokyanátem a vodou, působí v systému jako nadouvadlo, jež iniciuje vznik a následný růst pórů. To vytvoří porézní strukturu (pěnu). Při in situ reakci jsou keramické částice začleněny přímo do systému, ze kterého reakcemi vzniká polyuretanová pěna. Aby polymerace monomerů (polyolů

a polyisokyanátů) proběhla úplně, musí být množství funkčních skupin (NCO a OH) stejné. V praxi, při uvažování přítomnosti vody v polyolech, se používá malý přebytek NCO skupin, aby kompenzovaly přebytek OH skupin v polyolech. Takzvaný NCO index (I_{NCO}) je mírou poměru mezi množstvím NCO skupin ku množství OH skupin. Například $I_{NCO} = 1,05$ znamená, že při navážce bylo počítáno s 5 % molárním přebytkem NCO skupin, než je potřeba k úplné reakci s OH skupinami [33]. Obecně platí, že vyšší NCO index způsobí silné zesílení struktury, vzniklá polyuretanová pěna bude mít vyšší pevnost v tahu a lepší chemickou odolnost. Pro zvýšení pevnosti alifatických izokyanátů je možné je kombinovat s cyklickými izokyanuráty, které podporují síťování a pevnost polymerní struktury [34, 35].

U metod přímého pění tedy nedochází k vytvoření dutých vzpěr při vypálení polymerní pěny tak, jako je obvyklé u templátové metody, viz Obr. 15 [25].



Obr. 15 Snímky ze SEM a) HA pěna připravena metodou gel-casting. b) Hutná vzpěra skafoldu po pyrolýze. c) Mikrostruktura SiC pěny připravené metodou obětní šablony [32].

3.3.5 Aditivní technologie (rapid prototyping, solid free-form fabrication – SFF)

Třídímní struktury lze vyrábět řízeně ‚vrstvu po vrstvě‘, pomocí metod rapid prototyping, kde jednotlivé 2D vrstvy jsou nanášeny postupně, dokud není vytvořen finální výrobek. Strukturu a tvar polotovaru je možné navrhout pomocí počítačového programu CAD, není tedy potřeba používat formu nebo šablonu. Výhodou těchto metod je získání tvarově složitých struktur s přesně definovanou složitou geometrií a rozměrovou přesností, které by bylo obtížné dosáhnout pomocí konvenčních výše zmíněných metod. Nevýhodou je časová náročnost a vysoké finanční náklady na pořízení výrobního zařízení, materiálů použitelných pro jednotlivé technologie. Jelikož je celý proces designu součásti automatizován a probíhá v programu CAD, je možné při návrhu implantátu využít i data z počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance. Do skupiny technologií rapid prototyping se řadí stereolitografie (SL), robocasting, 3D tisk a selektivní laserové tání (SLM) nebo spékání (SLS) [36].

3.4 Současný stav studované problematiky

Téma přípravy vysoce porézních biokeramických materiálů je rozsáhle studováno již více než deset let. Vliv teploty kalcinace HA nanoprášku na morfologii částic, a následně i na mechanické vlastnosti vysoce porézních skafoldů zkoumal Scalera et. al. [37]. Byl zkoumán vliv čtyř kalcinačních teplot (600, 700, 800 a 900 °C) na charakteristiku prášku a následný vliv na vlastnosti připraveného skafoldu. Porovnávané skafoldy byly připraveny pomocí replikační metody, byly impregnovány syntetické polymerní pěny s velikostí pórů 25 ppi. Výsledkem tohoto experimentu je, že kalcinace HA nanoprášku neindukovala žádnou fázovou transformaci, došlo také ke zvýšení průměrné velikosti částic (z 52 nm při 600 °C na 220 nm

při 900 °C) a zmenšení specifického měrného povrchu. XRD analýza prokázala, že kalcinované prášky jsou stabilní do slinovací teploty 1300 °C, není přítomná žádná sekundární fáze a krystalinita dosáhla hodnoty 94 %. Všechny slinované skafoldy měly vysoce porézní strukturu, póry byly propojené a jejich průměrná velikost dosahovala 400–500 µm. V závěru této studie byl posouzen vliv kalcinační teploty na mechanické vlastnosti, zejména na pevnost v tlaku. Pevnost v tlaku byla nejnižší u skafoldu, který byl připraven z hydroxyapatitového prášku kalcinovaného na 600 °C, a to $0,18 \pm 0,10$ MPa při porozitě 79 ± 1 %. Nejvyšší hodnoty pevnosti v tlaku byly naměřeny u skafoldu připraveného z HA prášku při 900 °C, a to $0,48 \pm 0,08$ MPa při porozitě 89 ± 2 %.

Vhodnou alternativní metodou přípravy vysoce porézních skafoldů k replikační metodě je metoda přímého pění. Novotná et. al. se ve své práci věnovala přípravě dvoufázových kalcium fosfátových skafoldů s kontrolovanou distribucí a velikostí pórů metodou přímého pění [29]. K přípravě skafoldů byla použita přímo pění polyuretanová pěna, která vznikla reakcemi mezi izokyanátovými skupinami se skupinami polyolu a vodou. Do polyuretanové pěny byl před pěním zapracován HA prášek. Vznikem oxidu uhličitého (vznikl jako vedlejší produkt reakcí) došlo k napěnění struktury, tj. ke vzniku porézní struktury s víceúrovňovou velikostí pórů, které jsou mezi sebou propojeny. Přítomnost vody ve směsi ovlivnila velikost pórů, která dosahovala rozmezí 150–1000 µm. Celková porozita skafoldů byla řízena hmotnostním poměrem HA/PU a bylo dosaženo porozit v rozmezí 76–95 %. Bylo také zjištěno, že optimální poměr mezi HA/PU je roven 1 s optimální porozitou okolo 85 % s dostatečným propojením pórů a dostatečnou pevností. Při testech bioaktivity v simulované tělní tekutině se formovala apatitová vrstva pouze u vzorků obsahujících α -TCP. Připravené dvoufázové skafoldy podporovaly adhezi a životaschopnost kmenových buněk.

Kunjalukkal a spol. ve své práci připravoval kompozitní biokeramické skafoldy na bázi kalcium fosfátů a kalcium silikátů. Kompozitní skafoldy byly poté porovnávány z hlediska mechanických, bioaktivních a biodegradabilních vlastností [38]. K přípravě biokeramických pěn byla využita replikační metoda, jako templát sloužila měkká polyuretanová pěna. Kompozity byly připraveny o následovných složeních: 0, 25, 50, 75 a 100 hm.% wollastonitu (dále WS) v poměru ku HA. Všechny slinuté skafoldy vykazovaly porozitu vyšší než 90 % s velikostí pórů >500 µm. Při obsahu 25 a 50 hm.% WS bylo dosaženo maximálních hodnot pevnosti v tlaku z $0,51 \pm 0,14$ MPa u čistého HA na $0,62 \pm 0,11$, eventuálně na $1,02 \pm 0,16$ MPa, kde při vyšším obsahu WS došlo k poklesu pevnosti v tlaku. Kompozitní skafoldy při testech bioaktivity vykazovaly vlastnosti silně závislé na obsahu WS. Je tedy patrné, že přítomnost WS ve struktuře HA silně ovlivňuje bioaktivní chování a zlepšuje mechanické vlastnosti.

HA skafoldy s porozitou vyšší než 90 % jsou extrémně křehké [38]. Použití čistého a vysoce porézního HA bez aditiv je pro nosné implantáty pro regeneraci kostí téměř nemožné z důvodu nízké pevnosti. Mechanické vlastnosti mohou být zlepšeny přidáním nebo kombinací HA s pevnější a tvrdší fází s cílem vytvořit kompozitní materiál. Ze studie [39] vyplývá, že přítomnost WS fáze podporuje především bioaktivní vlastnosti. Tento fakt má na svědomí přítomnost křemíku ve struktuře. Křemík hraje nezanedbatelnou roli při metabolických procesech, které indukují tvorbu nové kosti, podílí se na síťování ECM a podporují precipitaci HA a mineralizaci kostí. Přítomnost křemíku při vysokoteplotním zpracování TCP podporuje tvorbu α -TCP před tvorbou β -TCP. Z článků [38, 39] také vyplývá, že do určitého obsahu křemičité fáze po vysokoteplotním zpracování dochází ke zlepšení mechanických vlastností.

Přítomnost křemíku lze tedy optimálně zajistit přidáním koloidního SiO_2 do připravovaných suspenzí, které se používají při replikační metodě, kam je mimo jiné přidáván i jako aditivum. Obdobný princip platí i při stabilizaci přímo pěněných polyuretanových pěn.

Výše uvedené informace shromažďují základní teoretické poznatky, ale také nejnovější trendy v oblasti metodiky přípravy, charakterizace a aplikace kalcium fosfátových keramik a poukazují na potenciál těchto materiálů pro použití v biomedicínských aplikacích ve formě skafoldů. Jak bylo zmíněno, fyzikálně-chemická optimalizace kalcium fosfátů přidávkem oxidu křemičitého je perspektivní cesta, a tato práce je proto věnována studiu vlivu oxidu křemičitého na strukturu a mechanické vlastnosti kalcium fosfátových porézních skafoldů připravených rozdílnými technikami.

4 Experimentální část

V experimentální části jsou popsány metody, které byly použity pro přípravu a hodnocení keramických pěn na bázi kalcium fosfátů a oxidu křemičitého. Porézní struktury byly vytvořeny pomocí dvou metod, a to pomocí templátové metody a pomocí metody přímého pění. Struktury připravené výše zmíněnými metodami budou porovnávány z pohledu fázového složení, mikrostruktury, bioaktivního chování, a také mechanických vlastností.

4.1 Použité materiály

4.1.1 Materiály pro metodu přímého pění

- Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, HA, Nanografi, Turecko, >99,5 %), laboratorně kalcinovaný při 1000 °C/3 h
- Polyol (STEPHANOL PS-2412, Chemin Jongkind, Francie)
- Difenylnmethan-4,4'-diisokyanát, izomer (MDI, Lupranat[®] M 70 R, BASF Polyurethanes GmbH, Německo), tato izokyanátová složka pro přímé pění již byla z výroby (Kingspan Hradec Králové a.s.) namíchána včetně polyizokyanurátové složky (bez zveřejněné specifikace a množství) pro zvýšení pevnosti PU pěny a s doporučeným reakčním indexem $\text{INCO} = 3,5$.
- Oxid křemičitý připravený vysušením 50 hm.% koloidního roztoku (Ludox TM50, Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda (laboratorní)

4.1.2 Materiály pro templátovou metodu

- Šablona – polymerní pěna na bázi polyuretanu s otevřenou porézní strukturou (Bulpren S 31062, Eurofoam, Česká republika), průměrná velikost buněk 520–720 μm, 75 ppi.
- Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, HA, Nanografi, Turecko, >99,5 %), laboratorně kalcinovaný při 1000 °C/3 h
- Polyvinylalkohol (PVA, Mw 89000–98000, stupeň hydrolyzy 99 mol%, Sigma-Aldrich, Německo)
- 50 hm.% koloidní roztok oxidu křemičitého (Ludox TM50, Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-oktanol ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$, Fluka, Německo)
- Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, Merck, Německo)
- Deionizovaná voda (laboratorní)

4.2 Metodika

4.2.1 Metoda přímého pění

Příprava kompozitních směsí

Při přípravě kompozitních směsí na bázi polyuretanu (dále PU) a HA (popřípadě i na bázi SiO_2) byla nejprve věnována pozornost optimalizaci procesu přípravy. Byl studován vliv reakčních parametrů na výslednou mikrostrukturu připraveného skafoldu:

- přítomnost vody v hm.% ku polyolu (0, 2, 4 a 6 hm.%),
- INCO poměr (0,95; 1,05; 2; 3,5),
- poměr plnění v hm.% mezi PU pěnou a HA (45, 50, 55 hm.% HA ku PU),

- reakční čas.

Výsledná struktura ve stavu green body byla pozorována pomocí stereolupy a porozita byla stanovena pomocí geometrické metody. Na základě těchto experimentů, jejichž výsledky shrnují Tabulky 13 a 14 v části Výsledků a diskuse, byly vybrány reakční parametry pro přípravu skafoldů s optimální velikostí pórů a porozitou. Optimalizované navážky shrnuje Tabulka 10 a příprava skafoldů s 0–20 hm.% SiO₂ je detailně popsána v následujícím postupu.

Tabulka 10 Složení kompozitních směsí pro přípravu skafoldů metodou přímého pění.

Vzorek	Polyol [g]	Deioniz. voda [g]	MDI [g]	HA [g]	SiO ₂ [g]	Sum PU [g]	HA/PU [hm.%]	SiO ₂ [hm.%]	H ₂ O [hm.%]	I _{NCO} [-]
HA0SiO ₂	2,59	0,0518	2,36	5,00	0,00	5,0018	50,00	0,00	2,00	1,05
HA5SiO ₂	2,59	0,0518	2,36	4,75	0,25	5,0018	50,00	5,00	2,00	1,05
HA10SiO ₂	2,59	0,0518	2,36	4,50	0,50	5,0018	50,00	10,00	2,00	1,05
HA20SiO ₂	2,59	0,0518	2,36	4,00	1,00	5,0018	50,00	20,00	2,00	1,05

Pro přípravu reakčních směsí byly nejdříve směsi prášků (HA a SiO₂) důkladně homogenizovány promícháváním pomocí mlecích kuliček z oxidu zirkoničitého v třídimenziálním míšiči (Willy A. Bachofen AG, Švýcarsko) po dobu 1 hodiny rychlostí 30 ot/min. Dále bylo předepsané množství polyolu, prášku (HA, HA + SiO₂) a deionizované vody smícháno ve třecí misce po dobu 2 minut do úplné homogenizace prekurzorů. Poté bylo přidáno požadované množství izokyanátu. Vytvořená směs byla ve třecí misce homogenizována další dvě minuty. Po homogenizaci byla kompozitní směs plněna do forem válcového tvaru ($\varnothing = 12,5$ mm a h = 60 mm), kde byla ponechána minimálně 24 hodin, přičemž docházelo k pění a vytvrzování kompozitní směsi. Během 24 hodin ve formě probíhaly reakce dle reakčních schémat na Obr. 13 a 14 mezi izokyanátovými a hydroxylovými skupinami a jako vedlejší produkt reakcí se uvolňoval oxid uhličitý, který vytvořil porézní strukturu. Po vytvrzení byly kompozitní polyuretanové pěny vyjmuty z formy a nařezány na požadované rozměry ($\varnothing = 12,5$ mm a h = 20 mm).

Tepelné zpracování

Vytvrzené vzorky byly následně vyžihány v muflové peci za účelem odstranění polymerních prekurzorů a organických látek z připraveného vzorku [40]. Vyžihané vzorky byly finálně slinovány ve vysokoteplotní peci při teplotě 1250 °C zvolené dle předchozích publikovaných experimentů [41]. Podrobný popis tepelného zpracování je popsán v Tabulce 11.

Tabulka 11 Režim tepelného zpracování vysušených skafoldů.

	Ohřev	Prodleva	Chladnutí
Žihání	20–600 °C; 1 °C/min 600–1050 °C; 5 °C/min	1050 °C/2 h	1050–500 °C; 10 °C/min
Slinování	20–1250 °C; 10 °C/min	1250 °C/2 h	1250–500 °C; 10 °C/min

4.2.2 Templátová metoda

Příprava suspenzí pro skafoldy na bázi kalcium fosfátů

Polymerní pojivo (PVA) 0,25 g bylo rozpouštěno v 7 g deionizované vody při teplotě 75 °C na elektromagnetické míchače s rychlostí otáček 450 ot/min po dobu 2 hodin. Do vzniklého roztoku byly přidány organické látky – 0,01 g oktanolu a 0,02 g glycerolu. Po smísení roztoku byl HA postupně přidáván do dosažení optimální hustoty tak, aby mohla být suspenze efektivně nanášena na polyuretanový templát. Navážené množství HA sloužící k efektivnímu nanášení suspenze odpovídalo 5,5 g. Výsledná suspenze byla finálně homogenizována ultrazvukovou sondou (Bandelin Sonopuls HD 2070, Německo) po dobu 1 minuty. Polyuretanové templáty o rozměrech $\varnothing=7$ mm, $h=10$ mm, popř. $\varnothing=15$ mm, $h=10$ mm byly ponořeny do homogenní suspenze do plného nasáknutí. Přebytečná suspenze byla z templátů odstraněna stlačením vzorku mezi další PU pěny a dále pak i stlačeným vzduchem. *Označení suspenze vychází z následujícího uspořádání: T (templátová metoda) _HA (použitý keramický prášek), tedy T_HA.*

Příprava suspenzí pro skafoldy na bázi kalcium fosfátů dopovaných oxidem křemičitým

Pro suspenze na bázi kalcium fosfátů dopovaných oxidem křemičitým (dále SiO_2) byl připraven roztok, který obsahoval 4 g deionizované vody a 1,09 g koloidního roztoku oxidu křemičitého. Vzniklý roztok byl homogenizován pomocí elektromagnetické míchačky po dobu 5 minut rychlostí 200 ot/min. Množství přidávaného HA prášku v poměru ku SiO_2 bylo řízeno poměrem 90 hm.% ku 10 hm.%. HA prášek (5 g) byl přidáván postupně, při přidání poloviční hmotnosti navážky keramického prášku byla suspenze homogenizována pomocí ultrazvukové sondy po dobu 30 sekund. Po homogenizaci byla postupně přidána druhá polovina hmotnosti navážky keramického prášku a cyklus homogenizace pomocí ultrazvukové sondy se opakoval. Nanášení homogenní suspenze na templát bylo obdobné, jako u skafoldů na bázi kalcium fosfátů. *Označení suspenze vychází z následovného uspořádání T (templátová metoda) _HA (použitý keramický prášek) 10SiO₂ (10 hm.% SiO₂), tedy T_HA10SiO₂.*

Sušení a tepelné zpracování skafoldů

Po nanesení suspenze na polymerní pěny byly vzorky umístěny do klimatizační komory (Weiss, WK3-180/40, Německo), kde probíhalo řízené sušení. Teplota v klimatizační komoře byla nastavena na 20 °C po celý cyklus. Řízena byla relativní vlhkost, v počáteční fázi byla nastavena relativní vlhkost na 98 %, a to po dobu 24 hodin. V druhé fázi cyklu byla relativní vlhkost snížena na 90 %, kde při této vlhkosti vzorky vysychaly 48 hodin. Ve finálním kroku byly ponechány vzorky při relativní vlhkosti 80 % posledních 24 hodin v klimatizační komoře. Po ukončení cyklu byly vloženy do exikátoru, kde vzorky dosychaly v podmínkách laboratoře (teplota a vlhkost).

Vysušené vzorky byly následně žihány a slinovány v identických cyklech jako skafoldy připravené metodou přímého pění. Podrobný popis tepelných cyklů je uveden v Tabulce 11, kapitola 4.2.1.

4.3 Charakterizace skafoldů a použité analytické metody

4.3.1 Analýza fázového složení

Fázové složení slinutých skafoldů bylo analyzováno pomocí RTG difrakční analýzy (SmartLab 3 kW, Rigaku, Japonsko). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí Rietveldovy analýzy.

4.3.2 Analýza mikrostruktury

Stanovení porozity pomocí geometrické metody

Jelikož vybranými metodami byla připravena tělesa s definovanými rozměry, byla porozita keramické pěny stanovena z geometrického objemu vzorku, hmotnosti a teoretické hustoty dle následující rovnice [42]:

$$P = \frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} * 100 [\%] \quad (5)$$

kde ρ_t [g/cm³] je teoretická hustota zkoumaného materiálu, ρ_b [g/cm³] je geometrická objemová hustota, vypočtena dle následující rovnice:

$$\rho_b = \frac{m_b}{V_b} \left[\frac{g}{cm^3} \right] \quad (6)$$

kde m_b [g] je hmotnost suchého (slinutého) vzorku a V_b [cm³] je geometricky stanovený objem tělesa (vypočteno ze získaných rozměrů tělesa válcovitého tvaru), který je sumou objemu pevného materiálu a objemů otevřených/uzavřených pórů.

Teoretická hustota jednotlivých skafoldů byla vypočítána na základě fázového složení z jednotlivých teoretických hustot, ty byly zvoleny následující: $\rho_{rel}=3,16$ g/cm³ pro HA [15], $\rho_{rel}=3,08$ g/cm³ pro Si- β -TCP [15], $\rho_{rel}=2,82$ g/cm³ pro wollastonit [43] a $\rho_{rel}=2,17$ g/cm³ pro cristobalit [44].

Stanovení porozity pomocí metody nasákavosti dle Archimeda (ČSN EN 623-2)

K ověření hodnot porozit získaných pomocí geometrické metody, je metoda stanovení nasákavosti dle Archimeda vhodnou alternativou. Zpočátku je zvážen suchý vzorek (vzorek vysušený v sušárně na 120 °C/ 2 h), ten je poté ponechán nasáknout smáčecí kapalinou (deionizovaná voda s přísadkou smáčedla) ve vakuu. Zvážením nasáknutého vzorku, který je ponořen do stejné smáčecí kapaliny, je stanovena jeho zdánlivá hmotnost. Následně je nasáknutý vzorek, zbavený přebytečné kapaliny, zvážen na vzduchu. Z těchto tří hmotností byla určena relativní hustota ρ_{rel} dle následující rovnice [45]:

$$\rho_{rel} = \frac{\rho_{H_2O}}{\rho_{teor}} = \frac{m_1}{m_3 - m_2} * 100 [\%] \quad (7)$$

kde ρ_{H_2O} [g/cm³] je hustota vody při aktuální teplotě měření, ρ_{teor} [g/cm³] je teoretická hustota materiálu, m_1 [g] je hmotnost suchého vzorku, m_2 [g] je zdánlivá hmotnost a m_3 je hmotnost vzorku nasyceného kapalinou. Výpočet porozity lze pak odvodit dle rovnice 7:

$$P_{rel} = 1 - \rho_{rel} [\%] \quad (8)$$

kde P_{rel} [%] je relativní porozita měřeného tělesa. Všechna měření probíhala v souladu s normou ČSN EN 623-2.

4.3.3 Světelná mikroskopie

Morfologie skafoldů byla pozorována pomocí digitální kamery DinoLite AM4115ZTL (DinoLite, Holandsko), s menším než stonásobným zvětšením.

4.3.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Distribuce a velikost pórů, ale také mikrostruktura před a po testech bioaktivity byly pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Verios 5XHR SEM (ThermoFischer Scientific, Česká republika).

4.3.5 Příprava výbrusů a obrazová analýza morfologie pórů

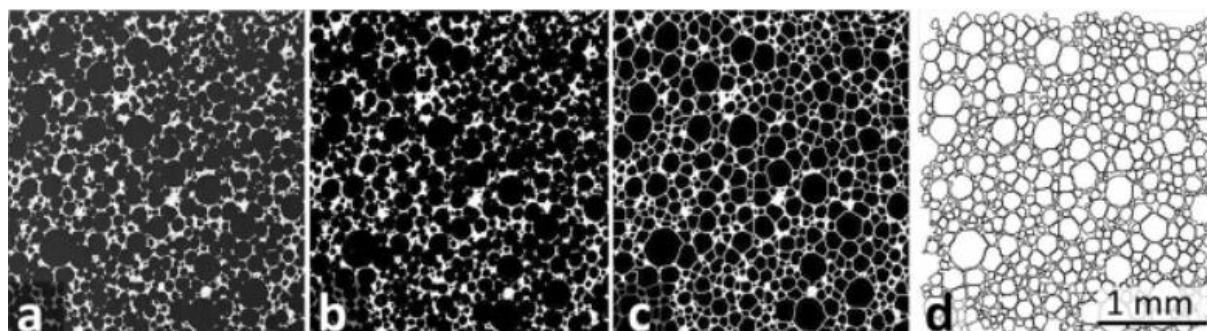
Aby mohla být morfologie skafoldů hodnocena pomocí SEM, a poté také i hodnocena pomocí obrazové analýzy, bylo nutné připravit keramografické výbrusy. Skafoldy byly zalité do dvoufázové epoxidové pryskyřice (SpeciFix 20, Struers, Dánsko) při sníženém tlaku. Zalité skafoldy byly nejprve broušeny na nejhrubším kotouči 80 MD piano (Struers, Dánsko) s přitlačnou silou 30 N a rychlostí otáček 300 ot/min, dokud nebyla odstraněna zalévací pryskyřice natolik, že bylo možné na výbrusu pozorovat vlastní vzorek. Tyto cykly byly opakovány i s jemnějšími kotouči – 120, 220 MD piano (Struers, Dánsko), při stejných podmínkách. Na finální leštění vzorků byly použity kotouče MD largo/MD dac (Struers, Dánsko) společně s diamantovou pastou o příslušné velikosti částic 9, 3 a 1 μm k danému kotouči (DiaPro, Struers, Dánsko). Jelikož při broušení a leštění výbrusů keramických pěn dochází k častému uvolňování částic, které znehodnotí povrch výbrusu, byla použita nižší přitlačná síla – 15 N, přičemž rychlost otáček byla snížena na 150 ot/min. Délka cyklů byla konstantní, trvala vždy 5 min.

Obrazová analýza byla použita pro stanovení velikostí pórů u skafoldů připravených metodou přímého pění. Velikost pórů byla stanovena na základě minimálně dvou snímků keramografických výbrusů daných vzorků získaných pomocí SEM. Analýza obrazu byla provedena softwarem ImageJ (Národní institut zdraví, Spojené státy americké). Aby mohl být obraz analyzován, bylo nutné jej prahováním převést na binární (přehled procesu obrazové analýzy je uveden na Obr.16). Celková porozita byla určena počtem pixelů, které reprezentovaly póry (tj. černé pixely). Tvar pórů definoval použitý algoritmus ‚watershed‘, který slouží k segmentaci obrazu. Plochy pórů získaných pomocí algoritmu byly změřeny a k nim následně dopočítány patřičné průměry (včetně zahrnutí tvarového korekčního faktoru (0,785) do výpočtu průměru dle rovnice (9) [46]).

$$d_{koule} = \frac{d_{kružnice}}{0,785} = 1,27 * d_{kružnice} \quad (9)$$

kde d_{koule} stanovuje skutečný průměr pórů ve 3D, $d_{kružnice}$ představuje průměrnou hodnotu průměru póru sférického tvaru.

Hodnoceny byly všechny póry s průměrem vyšším než 5 μm z důvodu eliminace artefaktů, nepropojených pórů nebo nedostatečné segmentace obrazu v průběhu obrazové analýzy. Pro přehlednost byly určeny intervaly velikostních tříd průměrů pórů v rozmezí 25 μm a byla stanovena celková plocha, kterou daná velikostní třída zaujímá. Tato závislost byla vynesena do histogramu.



Obr. 16 Přehled procesu obrazové analýzy, a) SEM snímek keramografického výbrusu, b) napražený (binární) obraz, c) segmentace obrazu algoritmem ‚watershed‘, d) identifikované póry [29].

4.3.6 Testy bioaktivity v simulované tělní tekutině

Simulovaná tělní tekutina (SBF) byla připravena dle postupu uvedeného v publikovaném článku Kokuba [47]. Do deionizované vody, ohřáté na $36,5 \pm 1,5$ °C, byly postupně přidávány reaktanty dle pořadí uvedeného v publikaci. Při přidávání posledních dvou reaktantů – Tris ($C_4H_{11}NO_3$, 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3diol, pufr, Lach-Ner, Česká republika) a 1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl, Penta, Česká republika) bylo průběžně měřeno pH připravované simulované tělní tekutiny. Hodnota pH při přidávání Tris pufru nesměla ležet mimo interval hodnot 7,4-7,45. Pokud se pH této hodnotě blížilo, bylo do roztoku přidáno malé množství 1 M HCl. Tento postup se opakoval do vyčerpání reaktantů. Srovnání koncentrací jednotlivých iontů, které se nachází v simulované tělní tekutině a v krevní plazmě, je uvedeno v Tabulce 12.

Tabulka 12 Srovnání koncentrací jednotlivých iontů, které jsou obsaženy v SBF a krevní plazmě [47].

Iont		Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	pH
Iontová	SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4
konzentrace [mM]	Krevní plazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,2–7,4

Jednotlivé vzorky byly před testováním vysušeny v sušárně (120 °C/1 h) a zváženy. Každý skafold byl umístěn samostatně do uzavíratelné plastové lékovky a byl zalit simulovanou tělní tekutinou v poměru 1:50 (hmotnost vzorku: hmotnosti SBF). Kultivace vzorků probíhala v inkubátoru při konstantní teplotě 36,5 °C. Při vyjmutí z SBF byly vzorky promyty deionizovanou vodou a řádně vysušeny v sušárně (120 °C/1 h). Vysušené skafoldy byly zváženy po sedmi, čtrnácti a dvaceti osmi dnech. V průběhu testů byla SBF měněna každé dva

dny. Sledovaným parametrem byl přírůstek hmotnosti vzorků po kultivaci a tvorba nové krystalické apatitové vrstvy na vzorku.

4.3.7 Testy simulované biodegradace

Schopnost biodegradace skafoldů byla testována v mírně kyselém roztoku, tzv. McIlvainově pufru. Pufr byl připraven dle publikovaného článku [48] smícháním 0,1 M roztoku monohydrátu kyseliny citronové ($\text{H}_2\text{O}\cdot\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, p.a., Lach-Ner, Česká republika) a 0,2 M roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4 , Lachema, Česká republika) tak, aby výsledný pufr měl hodnotu $\text{pH}=5,5$. Jednotlivé skafoldy byly před stanovením počáteční hmotnosti vysušeny (v sušárně na $120\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ h}$) a zváženy. Každý vzorek byl umístěn zvlášť do uzavíratelné plastové lékovky a byl zalit McIlvainovým pufrům v poměru 50 gramů pufru na 1 gram vzorku. Takto připravené vzorky byly umístěny do inkubátoru, který udržoval konstantní teplotu $36,5\text{ }^\circ\text{C}$. Degradace skafoldů byla sledována po dvou dnech, a dále po sedmi a čtrnácti dnech. Po vyjmutí z pufru byly vzorky jemně omyty deionizovanou vodou a byly vloženy do sušárny, kde byly sušeny při stejných podmínkách, jako na začátku testů. V průběhu testů byl každé dva dny měněn pufr a byla sledována jeho hodnota pH . Sledovaným parametrem byl úbytek hmotnosti keramických pěn a zároveň změna hodnoty pH pufru. Úbytek hmotnosti keramických pěn byl stanoven dle následující rovnice (10) [49]:

$$W_l = \frac{W_p - W_k}{W_p} * 100 [\%] \quad (10)$$

kde W_l [%] představuje hmotnostní změnu po degradaci, W_p [g] je počáteční hmotnost testovaného skafoldu, W_k [g] je konečná hmotnost po degradaci skafoldu.

4.3.8 Mechanické vlastnosti

Z mechanických vlastností byla určována pevnost porézních struktur v tlaku. Válcová tělesa byla testována pomocí zkušebního stroje Instron 8862 (Instron, USA). K měření síly byl použit siloměr HBM U9C o kapacitě 100 N. Vzorky byly vloženy mezi přitlačné desky. Mezi přitlačnou deskou a vzorek byl vložen plátek silikonového materiálu o tloušťce 1 mm tak, aby byl zajištěn přenos aplikovaného zatížení na vzorek. Ve všech testech byla použita rychlost zatěžování (rychlost pohybu příčnicku) $0,5\text{ mm}/\text{min}$. Během testů byla zaznamenávána závislost mezi aplikovanou tlakovou silou a posuvem příčnicku. Záznamy síly a posuvu příčnicku byly přepočítány na napětí a deformaci. Získané hodnoty byly vyneseny do grafů závislosti napětí na deformaci vzorku. Z těchto grafů byly následně určeny hodnoty napětí odpovídající prvnímu významnému poškození struktury pěny (jako kritérium byl stanoven pokles napětí o 10 %). Na základě výsledků z těchto testů byly porovnány mechanické vlastnosti pěn připravovaných pomocí metody templátové a metody přímého pění. Dalším sledovaným parametrem byla změna pevnosti v tlaku po přidání oxidu křemičitého do struktury hydroxyapatitu.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Metoda přímého pění

5.1.1 Optimalizace přípravy kompozitních směsí

Při optimalizaci postupu přípravy kompozitních směsí byl sledován vliv reakčních parametrů (I_{NCO} poměr, přítomnost vody v hm.% ku polyolu, poměr plnění mezi PU/HA v hm.% a technologie času nanášení) na výslednou strukturu, porozitu a manipulační pevnost skafoldů.

V první části optimalizace postupu přípravy byl studován vliv poměru izokyanátových a hydroxylových skupin na přípravu skafoldů s žádanou porozitou v rozmezí 80–85 %, velikostí pórů $>100 \mu\text{m}$ a dostatečnou manipulační pevností. Byly zkoumány čtyři typy I_{NCO} poměrů: 0,95; 1,05; 2,0 a 3,5 v kombinaci s přísadkou nebo bez přísadky deionizované vody. Přehled provedených experimentů a výsledné porozity skafoldů shrnuje Tabulka 13.

Tabulka 13 Vzorky připravené v rámci optimalizace I_{NCO} poměru a jejich výsledné porozity.

Vzorek	Polyol [g]	Deioniz. voda [mg]	MDI [g]	HA [g]	Sum PU [g]	HA [%]	H ₂ O/polyol [hm.%]	I_{NCO} [-]	Porozita [%]
EV1	3,24	0,00	1,76	5,00	5,00	50,00	0,00	0,95	83
EV2	3,13	0,00	1,87	5,00	5,00	50,00	0,00	1,05	86
EV3	2,34	0,00	2,66	5,00	5,00	50,00	0,00	2,00	84
EV4	1,67	0,00	3,33	5,00	5,00	50,00	0,00	3,00	85
EV5	2,71	54,20	2,23	5,00	4,99	50,00	2,00	0,95	90
EV6	2,59	51,80	2,36	5,00	5,00	50,00	2,00	1,05	86
EV7	1,82	36,30	3,15	5,00	5,01	50,00	2,00	2,00	88
EV8	1,23	24,70	3,74	5,00	4,99	50,00	2,00	3,50	85

Na základě vizuálního hodnocení struktury a vypočítané porozity připravených vzorků byl jako optimální vyhodnocen poměr 1,05. V systému se nachází přebytek 5 % –NCO skupin, aby došlo k úplnému zreagování se všemi hydroxylovými skupinami prekurzorů. Při tomto poměru je teoreticky dosaženo rovnováhy při zesítujících reakcích [50] a lze očekávat ideální porézní strukturu s úplnými póry. Předpoklad se potvrdil a po slinutí vznikla pevná, dobře dělitelná pěna s relativně pravidelnými kulovými póry a pórovitostí kolem 86 %. Při izokyanátovém indexu 0,95 nedošlo k plnému zreagování –OH skupin a přebytek polyolu v systému způsobil, že neplně zesítovaná pěna šla snadno nařezat na požadované rozměry. Póry však nebyly dokonale vyvinuty a byla okem patrná nehomogenita výsledné slinuté struktury (porozita 83–90 %). Naopak přebytek –NCO skupin při vyšších I_{NCO} indexech (2; 3,5) způsobil vyšší stupeň zesílení polymerních řetězců. Po vytvrzení tyto plněné polyuretanové pěny byly pevné a velmi křehké, což komplikovalo pěnu nařezat na požadované rozměry. Rozhodujícím parametrem při volbě vhodného izokyanátového indexu byla také manipulační pevnost po slinování. Při zvýšení NCO indexu nad 1,05 došlo po slinutí k významnému snížení mechanické pevnosti vzorků v důsledku nerovnováhy mezi tzv. tvrdými (segmenty vzniklé reakcí izokyanátů s extendery – prodlužovači řetězců) a měkkými segmenty (vytvořenými reakcí mezi izokyanáty a makroglykoly) vzniklé polyuretanové pěny [51, 52].

V druhém kroku optimalizace byl hledán optimální hmotnostní poměr mezi polyuretanovou pěnou a plnivem. Množství plniva v polyuretanovém systému ovlivňuje schopnost kompozitní směsi dosáhnout specifického objemu a napětí struktury. Při experimentech byly porovnávány tři poměry mezi HA/PU: 45/55, 50/50 a 55/45 (EV9 – EV11) v hm.% (což odpovídalo 4,1 – 6,1 g HA). Poměr mezi polymerními prekurzory a plnivem měl významný vliv na viskozitu připravované kompozitní směsi. Čím vyšší byl poměr mezi plnivem a polymerními látkami, tím více byla kompozitní směs viskóznější a plnivo se hůře zapracovávalo do směsi a bylo náročnější připravit homogenní směs. Vysoké plnění také způsobilo nízkou porozitu (78 %). Po vizuálním vyhodnocení připravených struktur a vyhodnocení porozity po slinutí bylo konstatováno, že optimální poměr mezi polymerními látkami a plnivem je HA/PU 50:50. Takto připravený skafold měl porozitu okolo 86 %. Tato porozita odpovídá porozitě trabekulární kostní tkáně [53].

Ve třetím kroku optimalizace byl zkoumán vliv množství přidané deionizované vody do směsi. Byly hodnoceny čtyři sady vzorků se zvyšujícím se množstvím přidávané vody v poměry vůči polyolu: 0, 2, 4 a 6 hm.%. Při volbě vhodného poměru vody ku polyolu byl kladen důraz na výslednou porozitu slinutého skafoldu a velikost pórů. Tabulka 14 shrnuje navážky všech experimentů provedených ve třetí části optimalizace.

Tabulka 14 Vzorky připravené v rámci optimalizace přídavku vody a jejich porozita

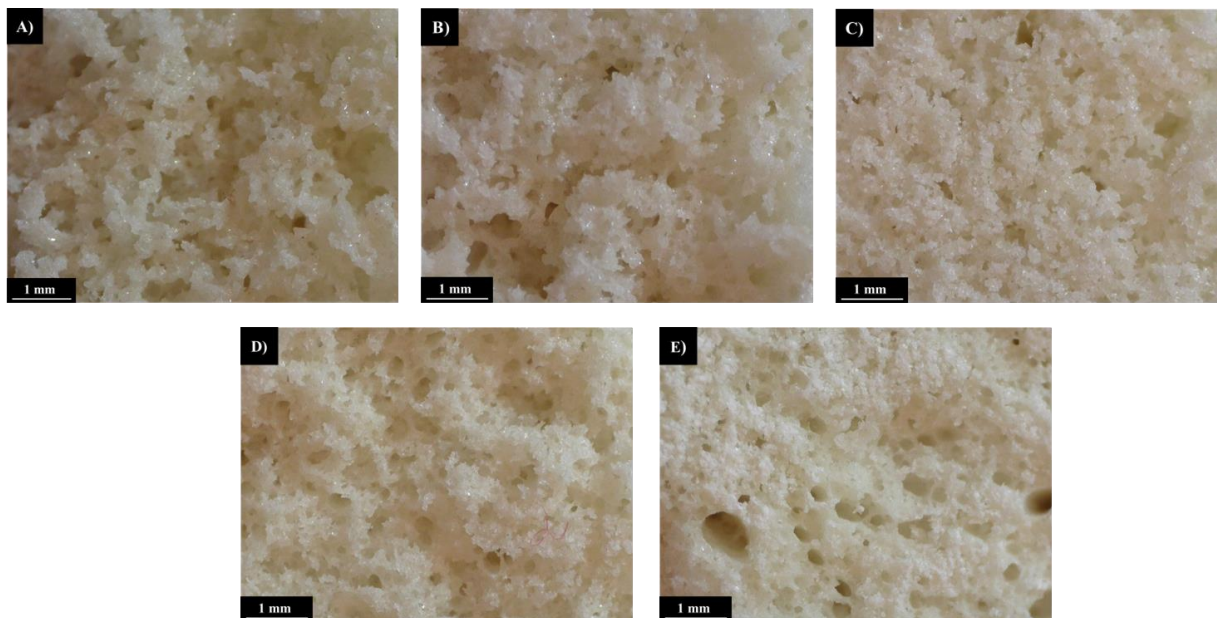
Název	Polyol [g]	Deioniz. voda [mg]	MD I [g]	HA [g]	Sum PU [g]	HA [%]	H ₂ O/polyol [hm.%]	I _{NCO} [-]	Porozita [%]
EV12	3,13	0,00	1,87	5,00	5,0000	50,00	0,00	1,05	86
EV13*	2,59	51,80	2,36	5,00	5,0018	50,00	2,00	1,05	86
EV14	2,21	88,50	2,70	5,00	4,9100	50,00	4,00	1,05	84
EV15	1,93	115,70	2,96	5,00	5,0057	50,00	6,00	1,05	88

* vzorek shodný s EV 6 (viz. Tabulka 13)

Přidání vody do systému polyuretanových prekurzorů během zpracování významně ovlivňuje velikost pórů a míru pórovitosti výsledné pěny. Voda se účastní reakcí a reaguje s funkčními skupinami izokyanátu za vzniku nestabilní kyseliny karbamové, která se okamžitě rozkládá na amin a oxid uhličitý, který napěňuje daný systém (viz Obr. 14). Z Tabulky 14 je však patrné, že rozdíl v přídavku vody v systému neměl významný vliv celkovou porozitu slinutých skafoldů tak, jak se předpokládalo. Hodnota výsledné porozity je ovlivňována více parametry, které jsou na sobě závislé. Při vizuálním hodnocení jednotlivých vzorků byla tedy zohledněna zejména morfologie struktury a velikost pórů. Vzorky, které obsahovaly vyšší přídavky vody (4 a 6 hm.%) vykazovaly po slinutí nedostatečnou manipulační pevnost a skafoldy se drolily, tudíž byly vyloučeny z hodnocení. Při porovnání mikrostruktur vzorků bez vody a s 2 hm.% vody byl patrný rozdíl v morfologii. Mikrostruktura kompozitní směsi, která obsahovala 2 hm.%, byla mnohem homogennější, póry byly pravidelné, sférického tvaru. Z tohoto důvodu byl následně vybrán pro další experimenty poměr přídavku vody vůči polyolu 2 hm.%.

V posledním kroku optimalizačního procesu byl proveden časový experiment, který měl zhodnotit vliv času homogenizace kompozitní směsi a následné nanášení směsi do formy. Po homogenizaci, která byla stanovena na 2 minuty (optimální čas na plné promísení

kompozitní směsi) byla vytvořená homogenní směs ponechána v misce a po 30 sekundách bylo stejné množství směsi nanášeno do forem. Přehled struktur vytvrzených pěn je na Obr. 17. Pro přehlednost budou popsány struktury časovým údajem ($t=2+x'$), kde 2 značí čas homogenizace (tzn. dvě minuty), $x = 30, 60, 90, 120$ čas plnění do forem v sekundách od uplynutí homogenizace.



Obr. 17 Struktury vytvrzených pěn ve stavu ‚green body‘. A) $t=2+0'$, B) $t=2+60'$, C) $t=2+120'$, D) $t=2+180'$, E) $t=2+240'$.

Při vyhodnocení porozity a struktury bylo zjištěno, že vzorky, které byly plněny nejdříve (v čase $t = 2+0'$), měly homogenní strukturu, póry nebyly sférického tvaru a měly vyšší porozitu ve stavu green body $\sim 90\%$. Vzorky, které byly plněny později (v čase $t = 2+240'$), měly strukturu také homogenní, póry měly sférický tvar a porozita mírně klesala na $\sim 83\%$. Optimální čas vhodný k plnění materiálu do formy po plné homogenizaci byl zvolen 120 sekund.

Na základě uvedených optimalizačních postupů byla získána finální kompozice prekurzorů pro přípravu skafoldů na bázi kalcium fosfátů. Jelikož cílem této práce je posoudit vliv oxidu křemičitého na materiálové charakteristiky, biologické a mechanické vlastnosti, bylo dále stanoveno množství náhrady hydroxyapatitu oxidem křemičitým v hm.% jako plniva v systému. Byly připraveny čtyři sady kompozitních skafoldů s 0, 5, 10 a 20 hm.% SiO_2 , podrobné složení skafoldů a navážky jsou uvedeny v Tabulce 10 v kapitole 4.2.1.

5.1.2 Materiálové charakteristiky

Analýza fázového složení

Skafoldy připravené na základě optimalizovaného postupu a označené HAXSiO_2 ($x=0, 5, 10, 20$) byly po slinování studovány z hlediska fázového složení pomocí rentgenové difrakční analýzy. Fázové složení hydroxyapatitového prekurzoru a skafoldů připravených metodou přímého pění z HA, popřípadě z HA/SiO₂ prekurzoru je uvedeno v Tabulce 15. Kvantitativní vyhodnocení bylo vzhledem ke složitosti spekter stanoveno s přesností $\pm 5 \%$. Hlavními sledovanými fázemi byl hydroxyapatit a křemíkem substituovaný β -trikalcium fosfát (dále psán Si- β -TCP). Ostatní menšinové fáze SiO₂ (cristobalit) a CaSiO₃ (wollastonit) byly pro kvantitativní stanovení zahrnuty vzhledem k přesnosti měření do jedné skupiny.

Tabulka 15 Analýza fázového složení skafoldů připravených metodou přímého pění.

Vzorek	HA [%]	Si- β -TCP [%]	SiO ₂ + CaSiO ₃ [%]	ρ_{rel} [g/cm ³]
Hydroxyapatit (kalcinovaný)	100	-	-	3,16
HA0SiO ₂	100	-	-	3,16
HA5SiO ₂	35	65	-	3,10
HA10SiO ₂	5	85	10	3,00
HA20SiO ₂	-	80	20	2,93

Z výsledků shrnutých v Tabulce 15 je patrné, že čistý hydroxyapatit byl stabilní až do teploty 1250 °C. Nedošlo tedy v průběhu tepelného zpracování k fázové transformaci, tak jak by mohlo být dle dostupných zdrojů [9] očekáváno. Tento fakt lze vysvětlit vysokou čistotou kalcinovaného hydroxyapatitového prášku (>99,5 %), použitého jako prekurzor. Je obecně známo, že chemická čistota prekurzoru a přítomnost nečistot ovlivňuje průběh slinování a snižuje transformační teploty [1, 40, 54, 55]. Skafoldy bez obsahu oxidu křemičitého byly tedy čistě hydroxyapatitové. V přítomnosti SiO₂ došlo při teplotě do 1250 °C v apatitové struktuře k substituci křemíkem a následně k rozkladu apatitu na Si- β -TCP tak, jak popisuje literatura [56, 57]. Dále byly v materiálech, které obsahovaly více než 10 hm.% SiO₂, identifikovány tyto fáze: SiO₂ a CaSiO₃ ve formě cristobalitu a wollastonitu. Jejich vzrůstající množství odpovídalo zvětšujícímu se přídavku SiO₂ do keramického prášku a také ve zvyšující se míře degradace hydroxyapatitu a uvolnění vápenatých iontů. U HA5SiO₂ byl zjištěn stopový obsah fází na bázi křemíku a z důvodu přesnosti měření $\pm 5 \%$ byl považován za zanedbatelný. V Tabulce 15 je uveden jako nulový.

Porozita a velikost pórů

Parametry ovlivňující míru pórovitosti připravovaných skafoldů byly optimalizovány tak, aby porozita slinutých skafoldů odpovídala rozmezí 80–85 %. Tabulka 16 shrnuje experimentálně zjištěné porozity připravených skafoldů. K ověření stanovených hodnot porozit pomocí geometrické metody byla použita metoda dle Archimeda, porovnáváné hodnoty jsou

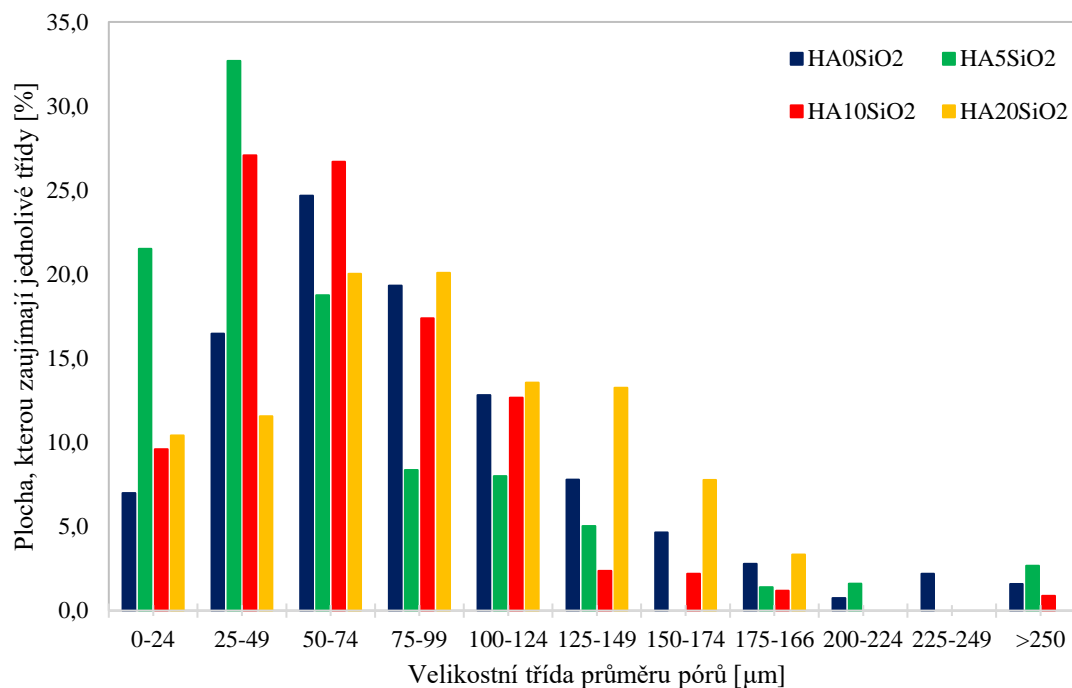
srovnatelné. Z naměřených hodnot porozit lze vidět, že byly připraveny skafoldy s porozitou v rozmezí ~ 80–88 %, což odpovídá původnímu záměru.

Tabulka 16 Specifikace porozity skafoldů připravených metodou přímého pění.

Vzorek	Porozita	
	Geometrická metoda [%]	Metoda dle Archimeda [%]
HA0SiO ₂	86±1	85±2
HA5SiO ₂	83±1	83±3
HA10SiO ₂	84±3	80±1
HA20SiO ₂	88±1	87±1

Distribuce velikosti pórů, míra porozity, tvar a spojitost pórů byla ovlivněna procesními parametry včetně objemového smrštění při tepelném zpracování. Při slinování došlo u všech sad vzorků k přibližně srovnatelnému smrštění jak ve směru osy x (průměr), tak ve směru osy z (výška), a to průměrně o 20 %. Změny objemu, které jsou spojovány se změnou fázového složení, nebyly díky minimálním rozdílům v hustotách jednotlivých fází (viz. Tabulka 15) zaznamenány. Smrštění tak lze považovat za izometrické a srovnatelné pro všechny studované materiály.

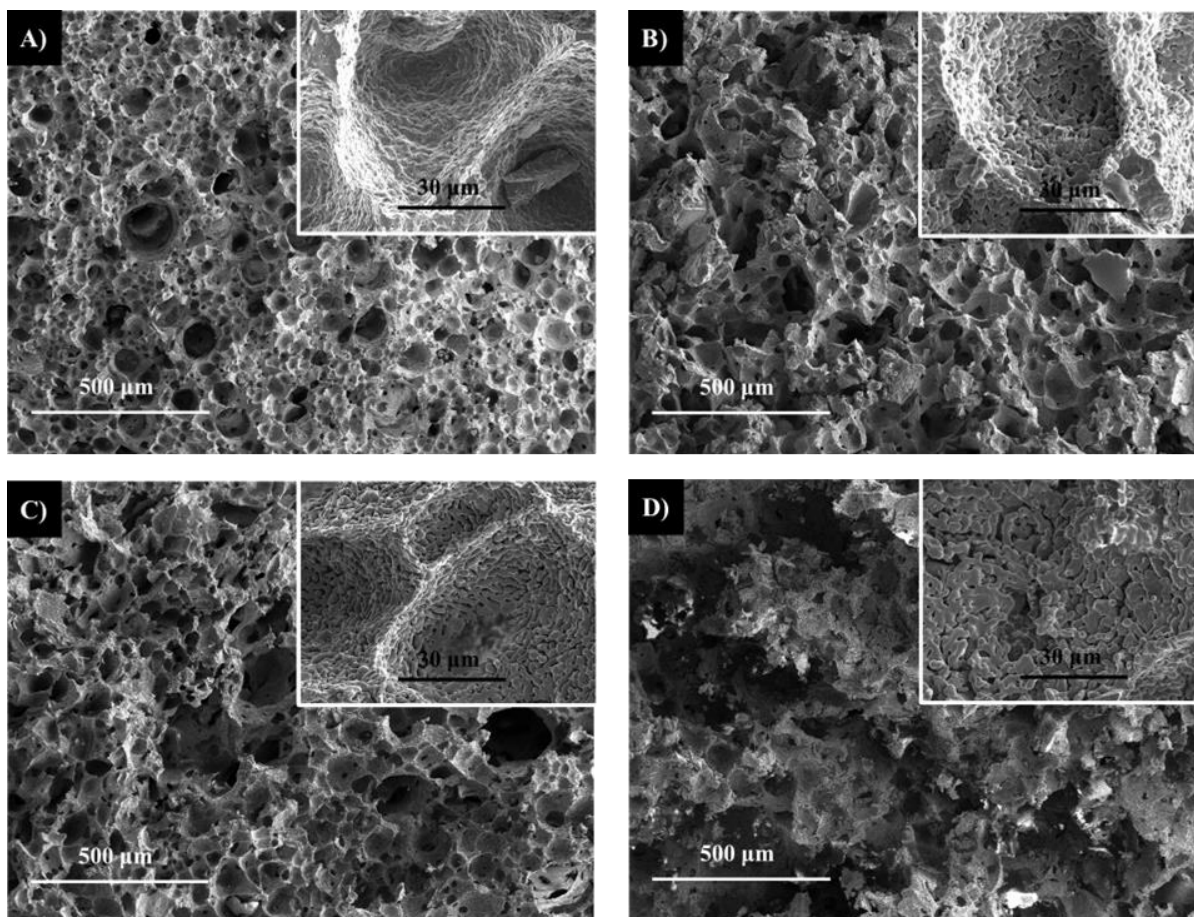
Na základě uvedeného popisu v experimentální části byly stanoveny průměry pórů v závislosti na procentu plochy, kterou zaujímají. Pro větší přehlednost jednotlivých velikostí pórů byly naměřené průměry shrnuty do jednotlivých intervalů hodnot o velikosti 25 μm (velikostní třída). Závislost těchto parametrů je vynesena do histogramu vyobrazeného na Obr. 18.



Obr. 18 Histogram popisující distribuci velikosti pórů skafoldů připravených metodou přímého pění.

Jak je možné z histogramu (Obr. 18) pozorovat, distribuce velikostí pórů vzorků ležely od 5 μm do 250 μm . Nejvíce pórů bylo zjištěno v rozmezí průměrů 25 μm – 100 μm . HA skafoldy měly ve struktuře nejvíce pórů v rozmezí 50 μm – 75 μm . U skafoldů dopovaných oxidem křemičitým se zvětšovala průměrná velikost pórů se zvyšujícím se obsahem SiO_2 . Největší póry dosahovaly velikosti mezi 75 μm a 100 μm , a to u $\text{HA}_{20}\text{SiO}_2$. Ze snímků mikrostruktury je patrné, že póry mají ve všech případech srovnatelný charakter, jsou sférické a propojené (viz Obr. 19).

Kromě pórů vzniklých uvolňováním oxidu uhličitého při reakci patří v naší struktuře do kategorie nejmenších pórů (do 25 μm) také póry vzniklé mezi zrny kalcium fosfátů při slinování tak, jak ukazují detaily mikrostruktur na Obr. 19. Tato „mikroporozita“ je pro bioaktivní chování materiálu přínosná. Zvětšuje specifický povrch skafoldu, a hraje tak velmi důležitou roli při kostní indukci, adsorpci proteinů, ale také při výměně iontů (při níž dochází k tvorbě kostního apatitu rozpouštěním materiálu a následným srážením) [42]. Navíc se podílí na zvýšení drsnosti povrchu implantátu, tudíž zlepšuje přilnavost buněk, které jsou následně stimulovány k proliferaci a diferenciaci [42, 49].



Obr. 19 SEM snímky mikrostruktury skafoldů připravených metodou přímého pění. A) $\text{HA}_{0}\text{SiO}_2$, B) $\text{HA}_{5}\text{SiO}_2$, C) $\text{HA}_{10}\text{SiO}_2$ a D) $\text{HA}_{20}\text{SiO}_2$.

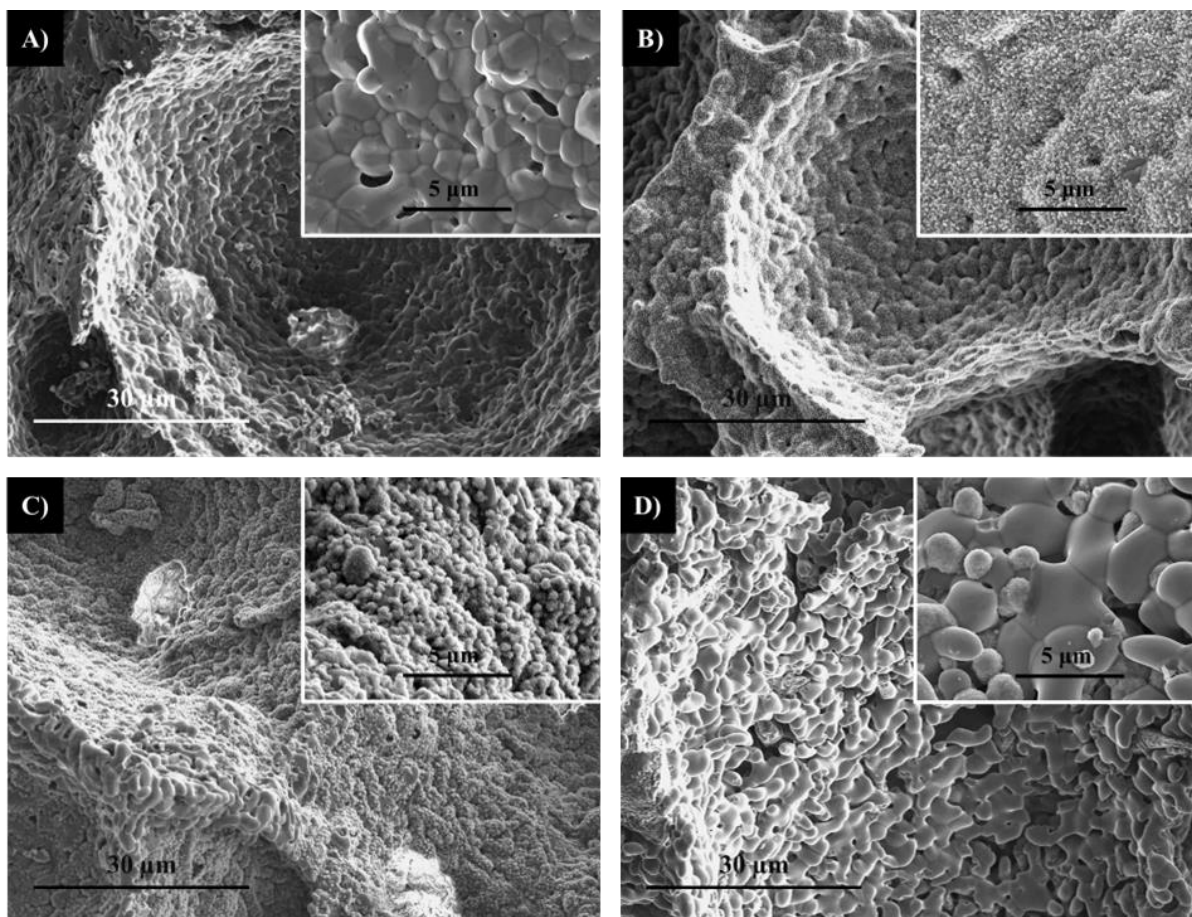
Pro migraci buněk při novotvorbě cévní a kostní tkáně jsou však póry s velikostí >50 μm nejdůležitější [58]. Z výsledků je vidět, že metodou přímého pění byly připraveny skafoldy s největším množstvím pórů v rozmezí 25 μm – 100 μm , což naplňuje základní požadavky pro

biologickou interakcí s živým organismem. Pro zlepšení kontaktu povrchu s tělními tekutinami vedoucí k urychlení angiogeneze a osteogeneze je optimální větší rozmezí velikostí pórů až do 500 μm [59]. Další studium přípravy skafoldů metodou přímého pění bude proto zaměřeno na zvětšení pórů modifikacemi reakčních parametrů (např. zvýšení reakční teploty, snížení tlaku nebo použití pentanu jako nadouvadla místo deionizované vody).

5.1.3 Bioaktivní chování

Testy interakce s SBF

Bioaktivní chování připravených sad vzorků bylo testováno v prostředí simulované tělní tekutiny, kde byly připravené sady skafoldů ponechány po dobu sedmi, čtrnácti a dvaceti osmi dnů. V průběhu testů bioaktivního chování byly pozorovány povrchy připravených skafoldů, zda dojde v průběhu testů k formování nové apatitové vrstvy [47]. Tato vrstva vykrystalizovaná v podmínkách *in vivo* předurčuje bioaktivní vlastnosti připravených materiálů, tzn. schopnost tvořit pevnou vazbu mezi kostí a materiálem. Na Obr. 20 se nachází snímky povrchů skafoldů po testech bioaktivního chování.



Obr. 20 SEM snímky mikrostruktury skafoldů po 28 dnech kultivace v SBF. A) HA0SiO_2 , B) HA5SiO_2 , C) HA10SiO_2 a D) HA20SiO_2 .

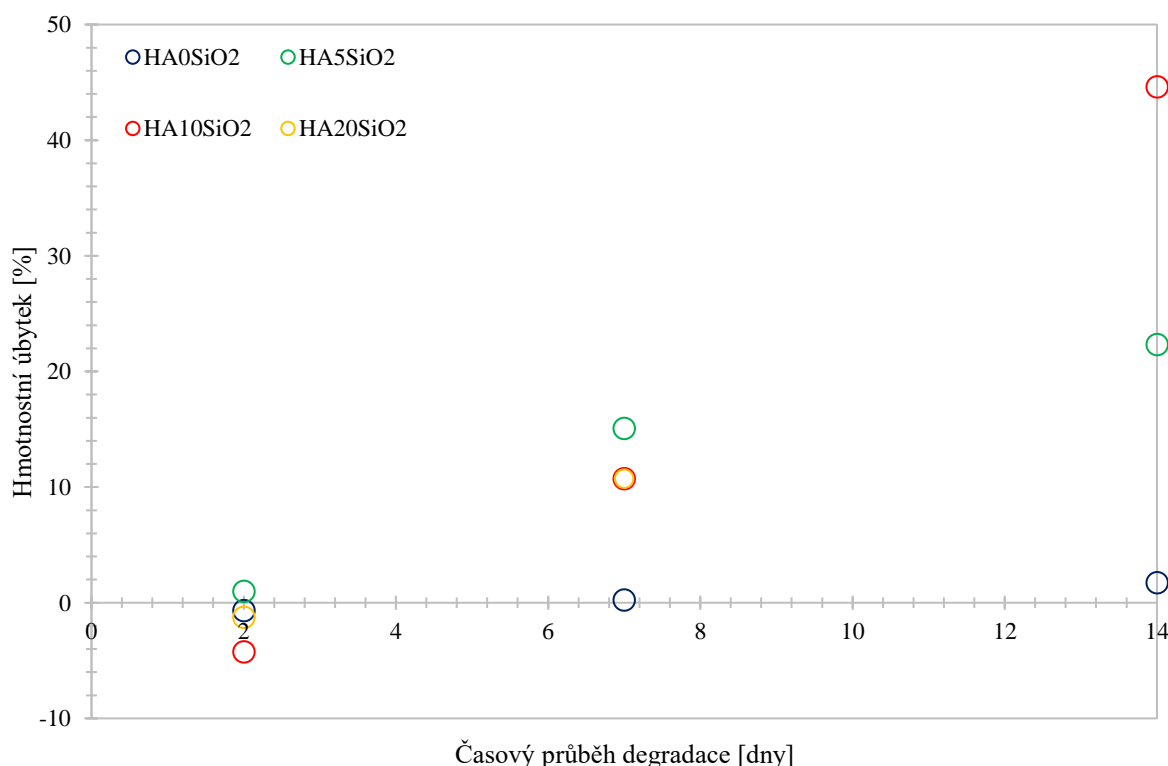
U skafoldů dopovaných křemíkem (5 a 10 hm.%) byla po sedmi dnech testování patrná nová krystalická struktura, která po porovnání s literaturou [40] odpovídala vzniku nové apatitové vrstvy. U HA20SiO_2 nedošlo ani po čtyřech týdnech k vytvoření celistvé vrstvy, nové

krystalické útvary se vytvářely pouze lokálně. Důvodem mohlo být vyšší množství CaSiO_3 (okolo 10 hm.%), který je nerozpustný a snižoval celkovou rozpustnost materiálu a nasycenost kapalného média, což vedlo ke zpomalení rekrystalizace.

Krystalizace apatitové vrstvy na povrchu implantátu obecně potvrzuje bioaktivní chování připravených skafoldů [47]. Přestože je čistý hydroxyapatit považován za bioaktivní materiál, po čtvrtém týdnu testování v SBF nebyla přítomná nová apatitová vrstva na povrchu hydroxyapatitových skafoldů, a ke vzniku nových krystalických útvarů docházelo pouze lokálně. Provedené testy tedy potvrdily, že kalcium fosfátové skafoldy dopované oxidem křemičitým jsou více bioaktivní než skafoldy čistě hydroxyapatitové. To je dáno zejména přítomností ve vodném prostředí rozpustnějších fází, než je HA.

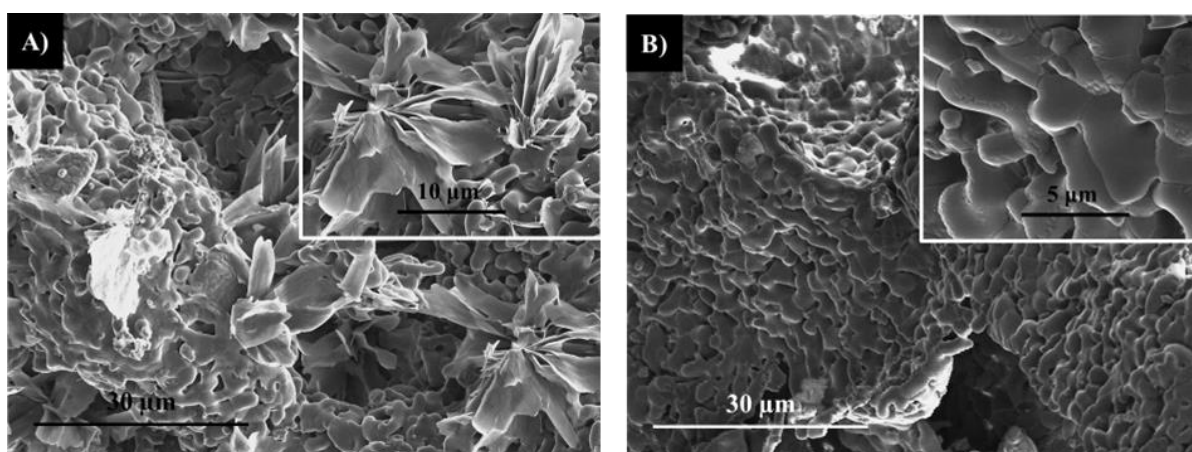
Testy simulované degradace

Cílem testů simulované degradace bylo zjistit, zda jsou vytvořené skafoldy rozpustné v mírně kyselém prostředí McIlvanova pufru s počátečním $\text{pH}=5,5$. Ten má simulovat podmínky při resorpci kostní tkáně osteoklasty v prostředí lidského těla. Pozorovanými parametry, jež popisují fyzikálně chemické změny během degradace materiálu, byly změna hmotnosti skafoldů doprovázená změnou pH testovaného prostředí nebo ztráta mechanické pevnosti [49]. Testovány byly všechny připravené sady skafoldů po dobu čtrnácti dní. Z grafu na Obr. 21 je patrná závislost hmotnostních změn testovaných sad na čase.



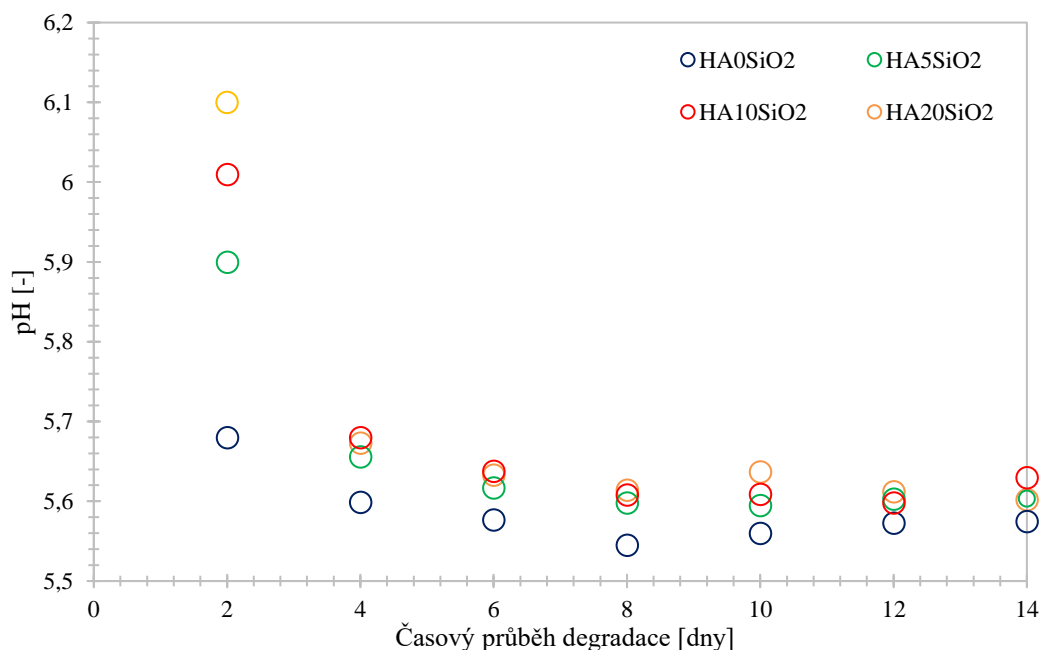
Obr. 21 Závislost hmotnostní změny na časovém průběhu degradace skafoldů připravených metodou přímého pění (hodnoty naměřené po sedmi dnech u sad HA10SiO_2 a HA20SiO_2 se překrývají).

Provedené testy simulované degradace potvrdily zvýšenou rozpustnost skafoldů dopovaných oxidem křemičitým. Jak je možné vidět na grafu závislosti hmotnostní změny na čase, degradace u HA0SiO₂ téměř neprobíhala. Po dvou týdnech kultivace došlo u této sady skafoldů pouze k 1,7 % úbytku hmotnosti. Naměřený úbytek hmotnosti u HA0SiO₂ odpovídá již publikovaným výsledkům Gua et. al, kde hmotnostní úbytek hydroxyapatitového skafoldu ponechaného v Tris-HCl pufru byl roven 10 % po 12 týdnech testování [49]. Hydroxyapatitové skafoldy si i po testech degradace zachovaly mechanickou pevnost, jelikož mají omezenou rozpustnost v imerzních médiích [49]. U sad, které byly dopovány SiO₂, byly hmotnostní úbytky lineárně závislé na přidaném množství SiO₂. V případě sady HA10SiO₂ byl zaznamenán hmotnostní úbytek vyšší než 44 % po ukončení testování. U sady HA20SiO₂ není definován hmotnostní úbytek po 14 dnech, jelikož skafold degradoval natolik, že jej nebylo možné zvážit. Zvýšená rozpustnost sad dopovaných SiO₂ souvisí s fázovým složením. Sada HA0SiO₂ je po tepelném zpracování jednofázová, obsahuje pouze HA. Sady dopované SiO₂ obsahují více rozpustnou fázi Si-β-TCP. Záporné hodnoty úbytků hmotnosti byly po dvou dnech testování u HA10SiO₂ a HA20SiO₂ pravděpodobně spojeny se vznikem nové krystalické vrstvy, která se vytvořila v rámci přesycení díky uvolňujícím se iontům z nejvíce rozpustných fází. Díky opakované výměně testovacího pufru došlo ke snížení koncentrace rozpouštěných iontů a docházelo pak postupně ke zpětnému rozpouštění rekrystalizované vrstvy (viz. Obr. 22).



Obr. 22 SEM snímky krystalické vrstvy vzniklé díky přesycení uvolňujících se iontů u HA20SiO₂. A) HA20SiO₂ po prvním týdnu testování, B) HA20SiO₂ po dvou týdnech testování.

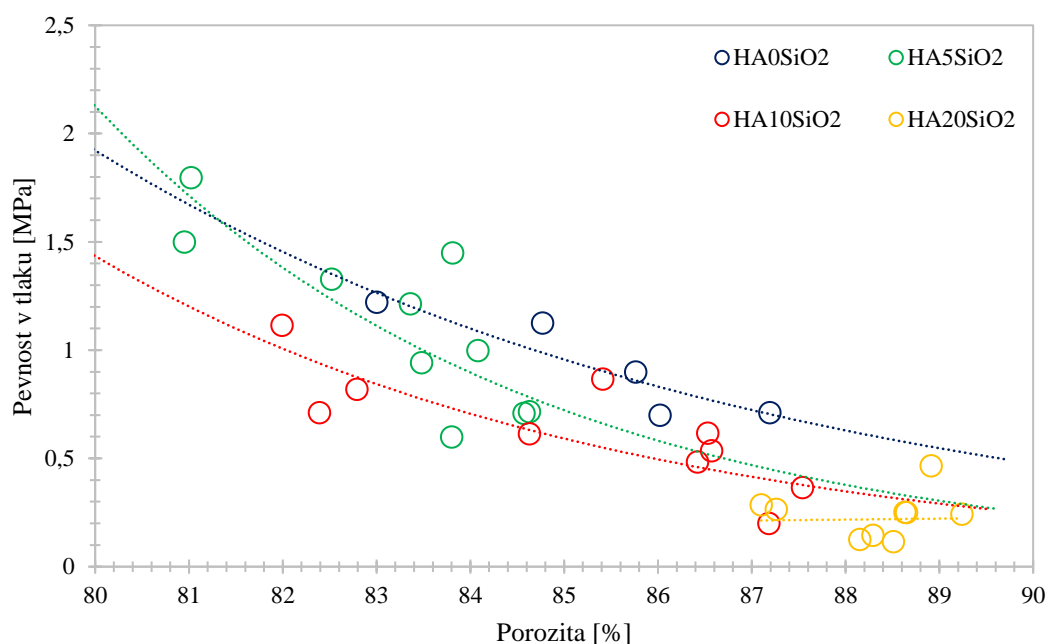
S trendem rozpouštění koreluje i závislost hodnoty pH měřeného v průběhu kultivace skafoldů (viz. Obr. 23). U čistě hydroxyapatitových skafoldů došlo po prvních dvou dnech k nepatrnému zvýšení z pH=5,5 na pH=5,7; to se pak v průběhu kultivace ustálilo na hodnotě pH ~ 5,57. U sad dopovaných SiO₂ však došlo už po prvních dvou dnech testování k výraznému zvýšení pH. Rychlé rozpouštění skafoldů vedlo ke zvýšenému uvolňování vápenatých, křemičitých a fosforečnanových iontů, což vedlo k lokálnímu zvýšení pH testovacího roztoku. Prostředí bohaté na tyto ionty vytváří vhodné podmínky pro stimulaci buněčné proliferace a diferenciaci [49]. U sady HA20SiO₂, kde byly zaznamenány nejvyšší úbytky hmotnosti, byla naměřena nejvyšší hodnota pH=6,1. U sad HA5SiO₂ a HA10SiO₂ byla hodnota pH nepatrně nižší (pH=5,9; resp. pH=6,01). U všech skafoldů dopovaných SiO₂ však došlo k postupnému snižování pH až k úplnému ustálení hodnoty na ~ 5,6; a to z důvodu pravidelné výměny testovacího pufru.



Obr. 23 Závislost pH na časovém průběhu degradace.

5.1.4 Mechanické vlastnosti

Při stanovování pevnosti v tlaku byl posuzován vliv přítomnosti krystalických fází na bázi křemíku (tj. cristobalitu a wollastonitu) na mechanické vlastnosti. Pro zkoušky mechanických vlastností byly připraveny skafoldy o porozitách, které odpovídaly rozmezí ~ 80–90 %. Výsledky měření jsou shrnuty v Obr. 24 a 25, kde je uvedena závislost pevnosti v tlaku čistých hydroxyapatitových skafoldů (HA0SiO₂) a skafoldů dopovaných SiO₂ (HA5SiO₂, HA10SiO₂ a HA20SiO₂) na jejich porozitě.



Obr. 24 Závislost pevnosti v tlaku na porozitě skafoldů připravených metodou přímého pění.

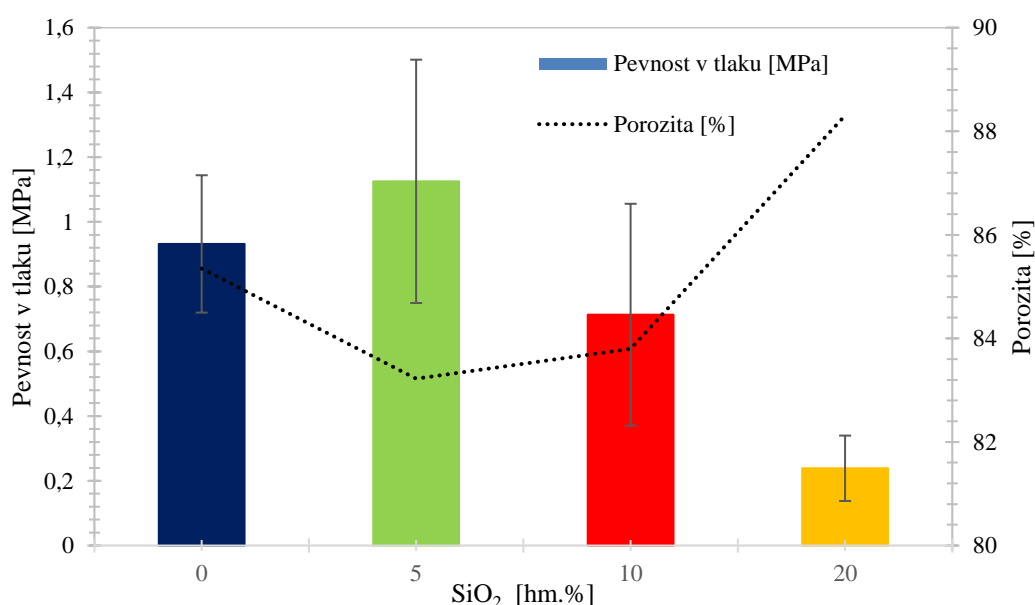
Vzhledem ke skutečnosti, že pevnost v tlaku u porézních struktur je závislá na porozitě, byla naměřená data proložena křivkou tak, aby bylo možné porovnat hodnoty pevnosti v tlaku jednotlivých sad vzorků s rozdílnou porozitou. Jednou z nejjednodušších metod, jak popsat tuto závislost je publikovaný přístup [60] popisující aproximaci exponenciální funkcí (rovnice 11):

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-bp), \quad (11)$$

kde σ_0 je hodnota pevnosti v tlaku při nulové porozitě, σ odpovídá hodnotě pevnosti v tlaku při porozitě p a veličina b přímo odpovídá charakteristice pórů [60].

Z Obr. 24 je patrné, že v daném rozmezí porozit (80–90 %) mírně klesá pevnost v tlaku se zvyšujícím se obsahem SiO₂. Jak již bylo uvedeno v kapitole 5.1.2 v Tabulce 15, přítomnost SiO₂ ve struktuře má vliv na fázové složení slinutých skafoldů. Se zvyšujícím se obsahem SiO₂ dochází ke zvyšování podílu Si-β-TCP na úkor HA ve struktuře, od obsahu 10 hm.% SiO₂ se navíc ve struktuře objevují i křehčí fáze bohaté na křemík. Pokles pevnosti v tlaku u sad dopovaných SiO₂ byl tedy pravděpodobně způsoben přítomností méně pevných fází: β-TCP, SiO₂ a CaSiO₂. Vzhledem k tomu, že čistý β-TCP dosahuje výrazně nižších hodnot pevnosti v tlaku než HA [54, 61], lze konstatovat, že dopování oxidem křemičitým do jisté míry kompenzuje předpokládaný pokles pevnosti způsobený teplotním rozkladem čistého hydroxyapatitu.

Jelikož u připravených sad bylo obtížné porovnat pevnosti vzhledem k velkému rozptylu porozit, byly naměřené hodnoty shrnuty do průměrných hodnot, včetně směrodatných odchylek. (viz. Obr. 25). U sady HA0SiO₂ (modré body na Obr. 24), kde byl po tepelném zpracování přítomný pouze hydroxyapatit, byla naměřena průměrná pevnost v tlaku ~ 0,9 MPa při průměrné porozitě ~ 85 %. Tyto naměřené hodnoty jsou ve shodě s již publikovanými výsledky [7].



Obr. 25 Přehled průměrných hodnot pevnosti v tlaku a porozit v závislosti na přídatku oxidu křemičitého.

Nejvyšší průměrná hodnota pevnosti v tlaku byla dosažena u sady HA5SiO₂, a to ~ 1,1 MPa, zatímco nejnižší hodnota byla změřena u sady s obsahem 20 hm.% SiO₂ (~ 0,2 MPa). Z grafu na Obr. 25 je však evidentní, že nejvyšší/nejnižší hodnoty pevností byly stanoveny u sad, které vykazovaly nejnižší/nejvyšší hodnoty porozit. Velký rozptyl chybových úseček u pevnosti v tlaku je dán statistickou povahou křehkosti porézních keramických materiálů (Weibullovou teorií nejslabšího místa) [9]. Z hlediska tohoto ne příliš spolehlivého chování keramických skafoldů je při aplikaci nutné počítat s nejnižší naměřenou hodnotou pevnosti v tlaku u dané sady.

5.2 Skafoldy připravené templátovou metodou

Skafoldy připravené templátovou metodou byly vytvořeny ověřeným postupem [40] pro základní srovnání mikrostruktury, fázového složení, biologických a mechanických vlastností se skafoldy připravenými metodou přímého pění. Ta vytváří teoreticky pevnější porézní strukturu při srovnatelných parametrech porozity než struktury připravené templátovou metodou [25, 26].

5.2.1 Materiálové charakteristiky

Analýza fázového složení

Přehled fázového složení skafoldů připravených templátovou metodou z HA nebo HA+SiO₂ prekurzorů slinutých na 1250 °C je uvedeno v Tabulce 17. Kvalitativní vyhodnocení bylo vzhledem ke složitosti spekter stanoveno s přesností ±5 % stejně jako u skafoldů připravených metodou přímého pění.

Tabulka 17 Fázové složení skafoldů připravených templátovou metodou.

Vzorek	HA [%]	Si-β-TCP [%]	SiO ₂ + CaSiO ₃ [%]	ρ _{rel} [g/cm ³]
T_HA	100	-	-	3,16
T_HA10SiO ₂	-	90	10	3,00

Z výsledků shrnutých v Tabulce 17 je patrné, že HA zůstal při teplotě 1250 °C stabilní a skafold obsahoval pouze jedinou fázi – hydroxyapatit, stejně jako u skafoldů připravených metodou přímého pění. Srovnatelné složení bylo zjištěno také u skafoldů dopovaných 10 % SiO₂, kdy většinu tvořila nová fáze: křemíkem dopovaný β-TCP a fáze bohaté na křemík, tj. cristobalit a wollastonit (SiO₂ a CaSiO₃).

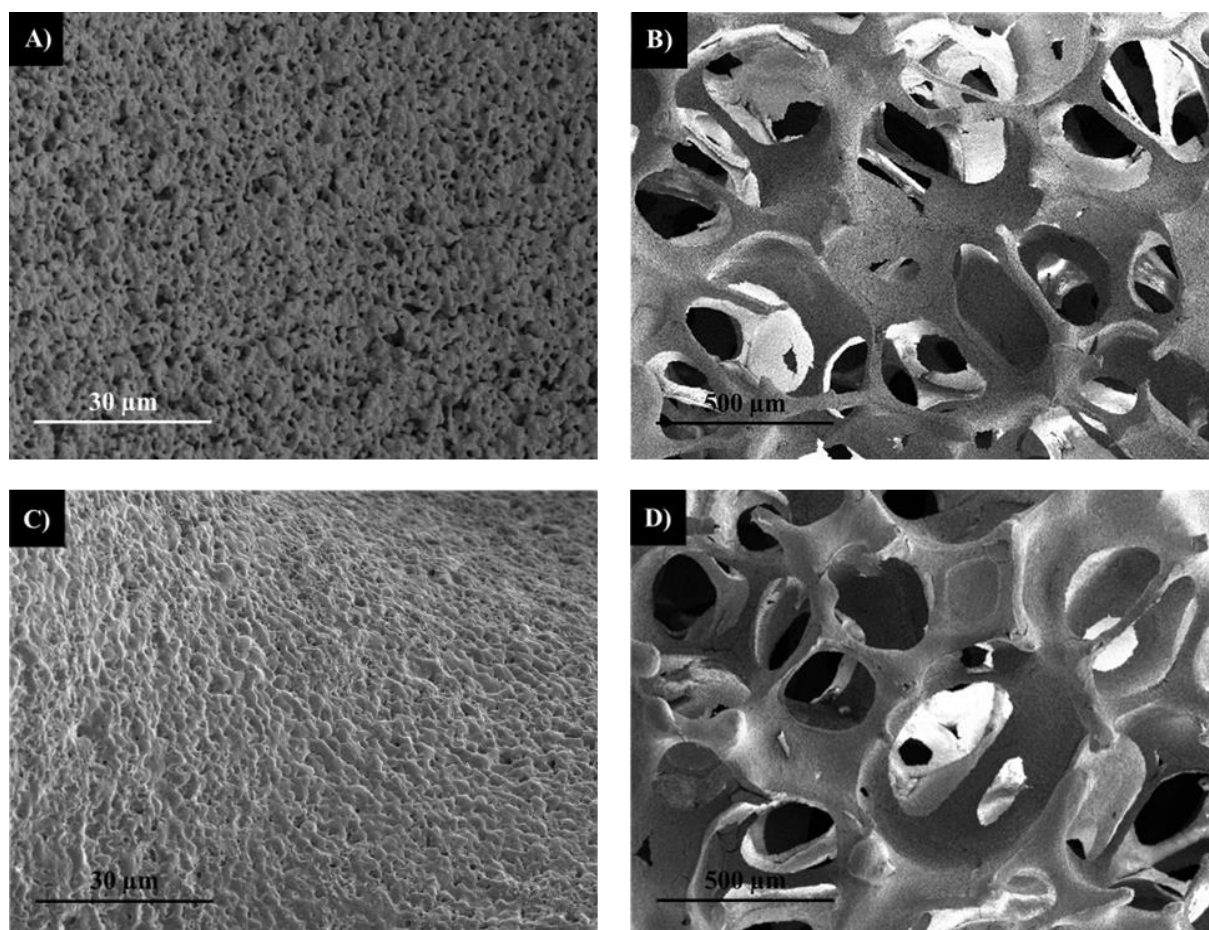
Mikrostruktura (velikost pórů a porozita)

Templátová metoda vedla k přípravě skafoldů s porozitou v rozmezí 80–85 %. Tabulka 18 shrnuje experimentálně zjištěné porozity připravených skafoldů. Z údajů je vidět, že byly připraveny skafoldy s porozitou v intervalu od 82 do 87 %, což odpovídalo původnímu záměru. Stejně jako u metody přímého pění byla použita k ověření hodnot porozit stanovených geometrickou metodou metoda založená na jiném fyzikálním principu (metoda dle Archimeda).

Tabulka 18 Parametry mikrostruktury a porozity skafoldů připravených templátovou metodou.

Vzorek	Mikrostruktura		Porozita	
	Průměr pórů [μm]	Velikost trámčů [μm]	Geometrická metoda [%]	Metoda dle Archimeda [%]
T_HA	440±97	34±8	85±3	85±4
T_HA10SiO ₂	428±71	40±17	81±7	82±2

Velikost pórů slinutých skafoldů se odvíjí od intervalu velikosti pórů použité polymerní pěny, velikosti trámčů a smrštění v průběhu slinování. Jak je z Tabulky 18 patrné, tak průměrná velikost pórů dosahovala asi 430 μm u obou sad připravených skafoldů. Tloušťka trámčů odpovídala intervalu od 30–40 μm. Makropóry přítomné ve struktuře měly sférický tvar a ze snímků vyobrazených na Obr. 26 je viditelné i jejich vzájemné propojení. Makrostruktury obou sad připravených skafoldů jsou, jak je patrné z Obr. 26 B) a D), srovnatelné. Velikost makropórů je vhodná k prorůstání kostní tkáně včetně prorůstání vaskulární sítě dovnitř skafoldu [42, 59].



Obr. 26 SEM snímky mikrostruktury A) detail T_HA, B) T_HA, C) detail T_HA10SiO₂, D) T_HA10SiO₂.

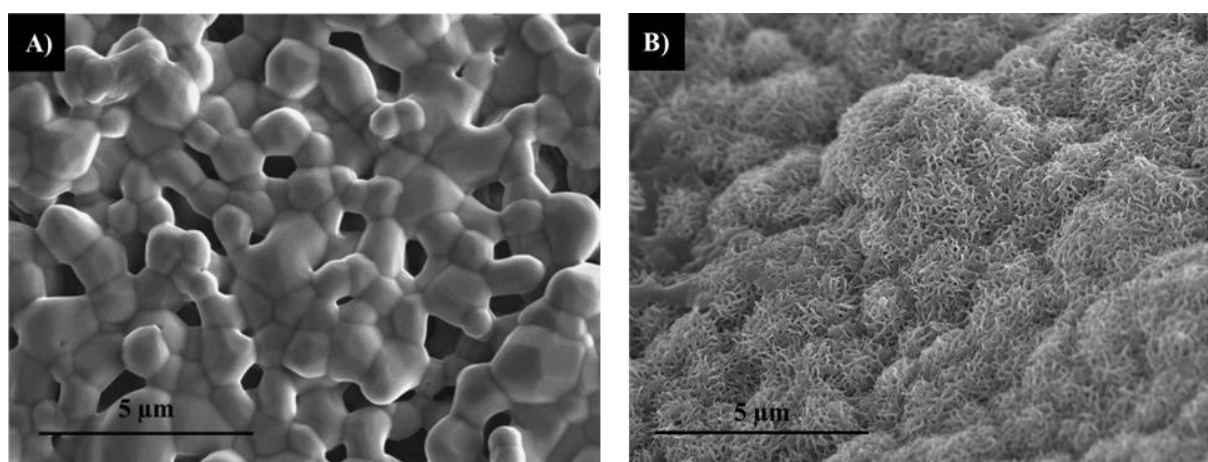
Detailní snímky (Obr. 26 A) a C)) však poukazují na rozdíl v charakteru mikrostruktur po tepelném zpracování. I přestože byly obě sady skafoldů slinovány při stejné teplotě, u T_HA

je patrná charakteristická více porézní struktura, než je u T_HA10SiO₂. Ta, jak již bylo zmíněno, je u skafoldů připravených metodou přímého pění žádoucí. Kromě zvětšení specifického povrchu skafoldu pozitivně ovlivňuje i jeho členitost. Menší porozita mikrostruktury viditelná na detailním snímku Obr. 26 C) je způsobena patrně přítomností křemíkových fází, které se v systému vytvořily v průběhu tepelného zpracování.

5.2.2 Bioaktivní chování

Testy interakce s SBF

Bioaktivní chování skafoldů připravených templátovou metodou bylo testováno ponecháním skafoldů v SBF po dobu až čtyř týdnů při stejných podmínkách jako skafoldy připravené metodou přímého pění. Na Obr. 27 se nachází detailní snímky mikrostruktur skafoldů po testech bioaktivního chování ze skenovacího elektronového mikroskopu.

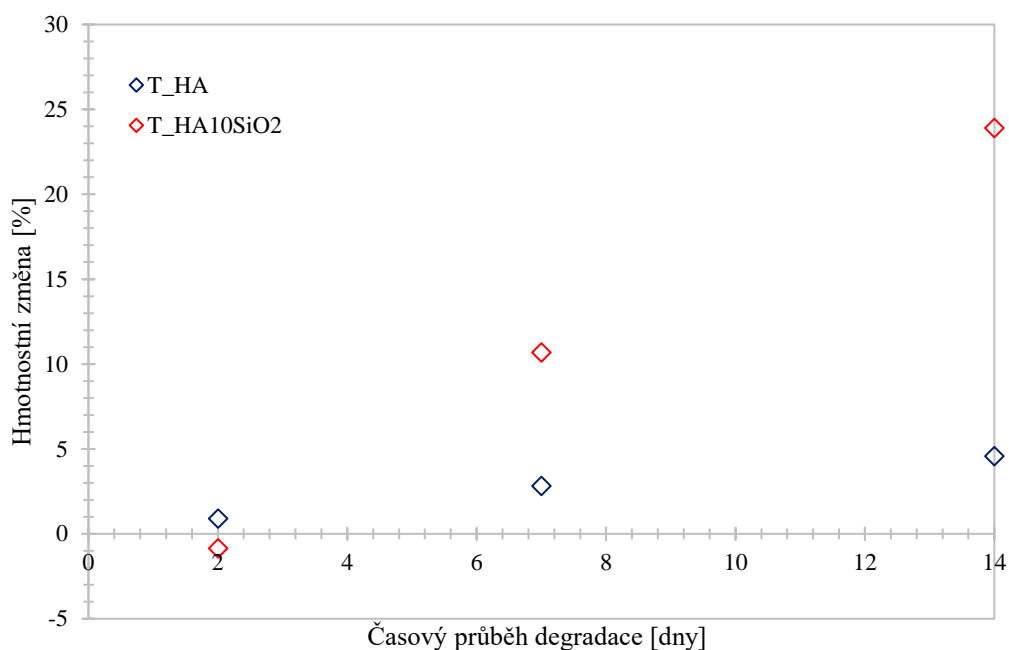


Obr. 27 SEM snímky detailu mikrostruktury skafoldů po 28 dnech kultivace v SBF, A) T_HA a B) T_HA10SiO₂

Už po sedmi dnech byly na povrchu skafoldů dopovaných křemíkem viditelné nové krystalické struktury, které stejně jako u skafoldů připravených přímým pěním potvrzují bioaktivní chování materiálu [40, 47]. Stejně jako v předchozím případě na povrchu čistě hydroxyapatitového skafoldu nová souvislá krystalická vrstva nevznikla. Z pohledu bioaktivního chování se skafoldy připravené rozdílnými technikami chovají srovnatelně, což je důsledkem srovnatelného fázového složení, a je možné konstatovat, že dopování křemíkem urychluje jejich bioaktivní odezvu v přítomnosti SBF.

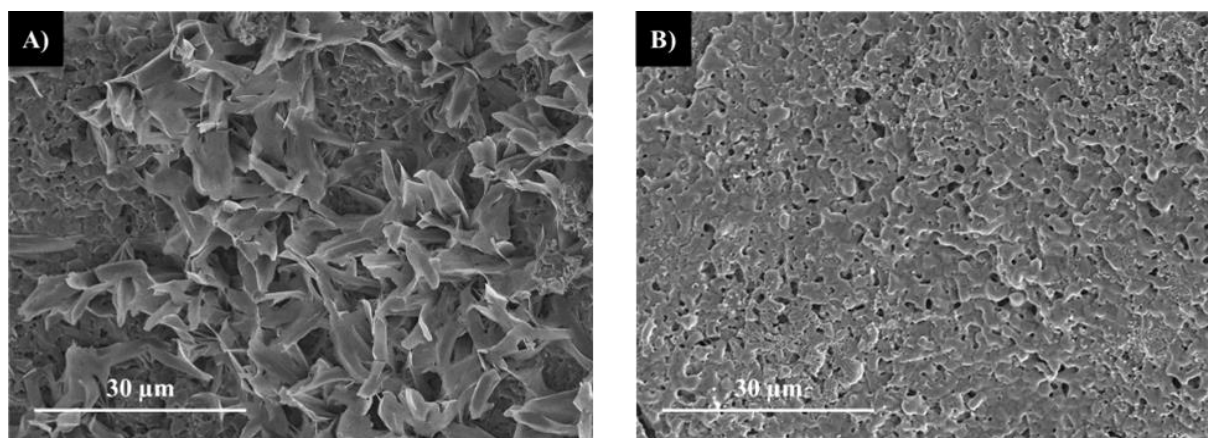
Testy simulované degradace

Testy rozpustnosti, probíhající při obdobných podmínkách jako u skafoldů připravených metodou přímého pění, připravených materiálů potvrdily zvýšenou rozpustnost skafoldů dopovaných SiO₂. Jak je vidět z grafu závislosti hmotnostních změn na čase (viz. Obr. 28), degradace u T_HA byla mírná a za čtrnáct dní byl zaznamenán úbytek pouze 4,5 hm.%. V případě T_HASiO₂ byl úbytek větší, a to 24 hm.%.



Obr. 28 Závislost hmotnostní změny na časovém průběhu degradace skafoldů připravených metodou přímého pění.

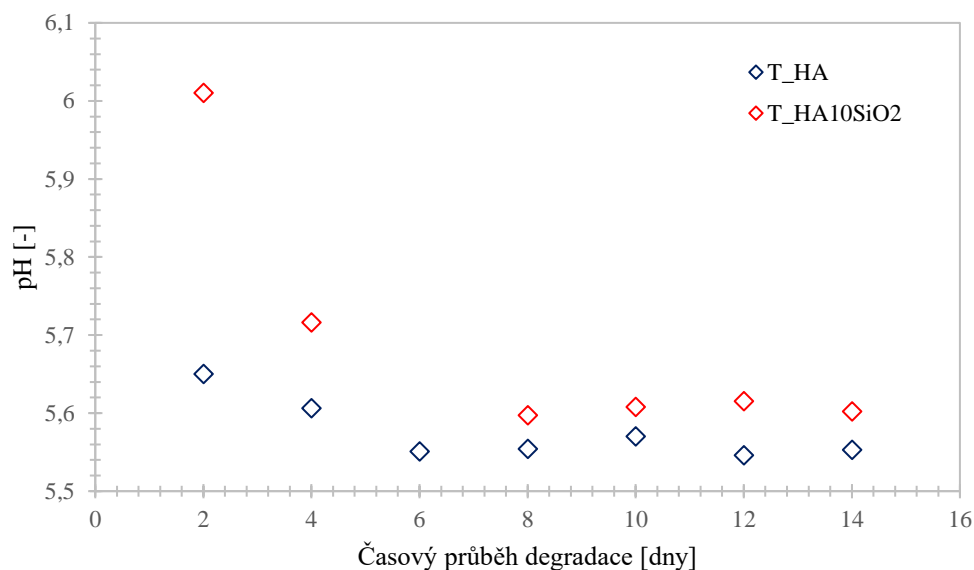
Zvýšená rozpustnost je opět dána přítomností rozpustnějších fází Si- β -TCP, než je samotný HA. Opačný trend zvyšování hmotnosti u skafoldů dopovaných Si v prvním stádiu rozpouštění má shodný původ jako u skafoldů připravených přímým pění. V prvních dnech totiž došlo k dočasnému přesycení ionty testovacího media a k následné rekrystalizaci nových složek na bázi kalcium fosfátů (Obr. 29).



Obr. 29 SEM snímky krystalické vrstvy vzniklé díky přesycení uvolňujících se iontů u T_HA_10SiO₂. A) T_HA10SiO₂ po 1. týdnu testování, B) T_HA10SiO₂ po dvou týdnech testování.

S trendem rozpouštění koreluje také závislost pH měřeného s časem (viz Obr. 30). V případě T_HA10SiO₂, kdy docházelo nejprve k intenzivnímu rozpouštění nejvíce rozpustných fází. Uvolněné vápenaté a fosforečnanové ionty zvýšily pH roztoku v prvních dvou dnech z pH=5,5 až na pH=6, dále pH mírně klesalo a po prvním týdnu se drželo na hodnotě

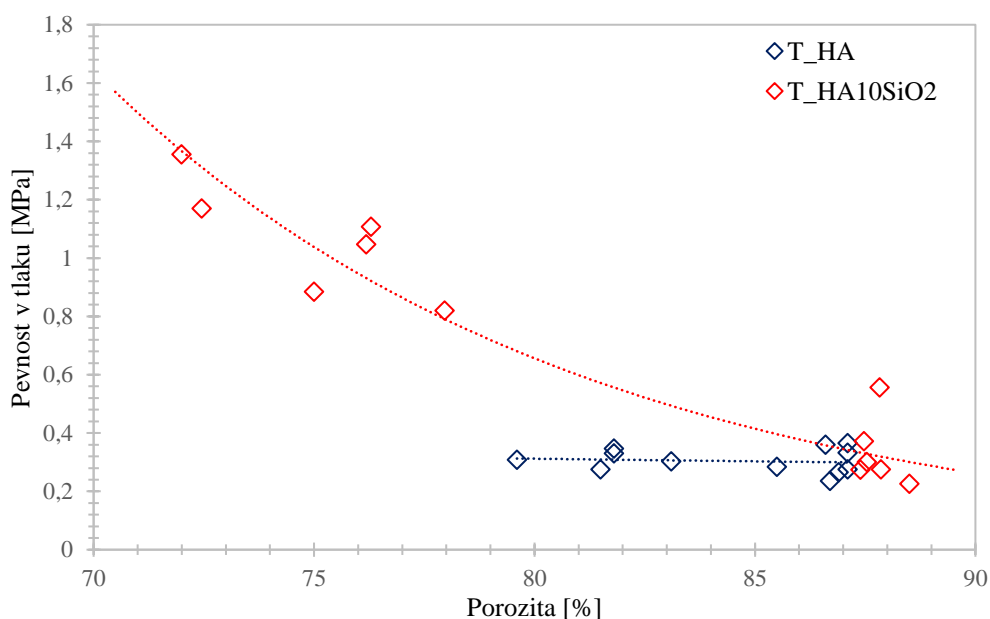
okolo 5,6. T_HA zvýšil pH po dvou dnech jen nepatrně na pH=5,55 a tato hodnota byla přibližně konstantní celou dobu testování.



Obr. 30 Závislost pH na časovém průběhu degradace.

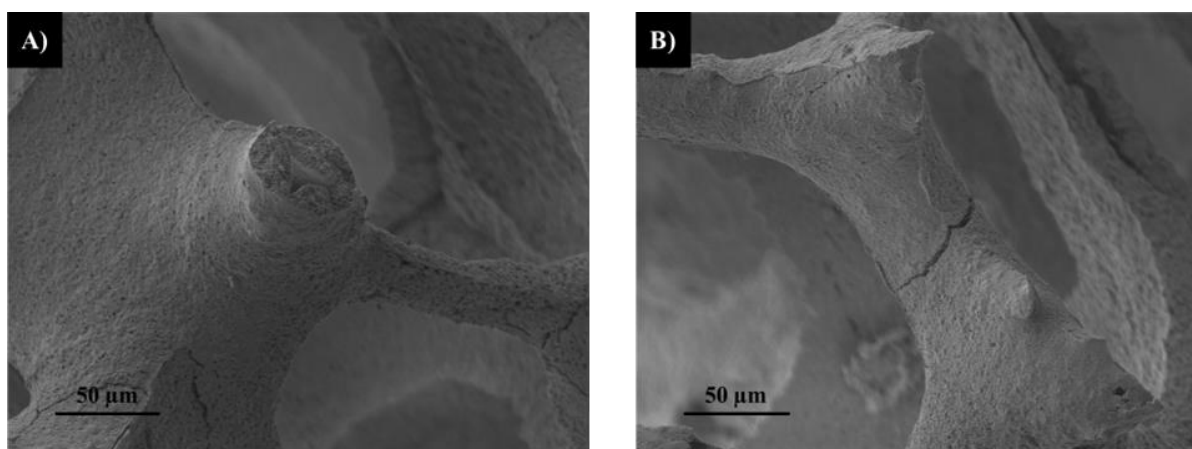
5.2.3 Mechanické vlastnosti

Při stanovování mechanických vlastností byl posuzován vliv metody přípravy vysoce porézních materiálů na výslednou pevnost v tlaku. Dále pak byl posuzován vliv přítomnosti křemičitých fází ve struktuře kalcium fosfátů na pevnost v tlaku (obdobně jako u metody přímého pění). Pro zkoušky mechanických vlastností byly připraveny skafoldy v rozmezí porozit ~ 70 – 90 %. Výsledky měření jsou shrnuty v Obr. 31, kde je uvedena závislost pevnosti v tlaku čistých hydroxyapatitových skafoldů (T_HA) a skafoldů dopovaných SiO_2 (T_HA10SiO₂) na jejich porozitě.



Obr. 31 Graf závislosti pevnosti v tlaku na porozitě.

Ze získaných výsledků na Obr. 31 je patrné, že u sady T_HA10SiO₂ existuje exponenciální závislost mezi rostoucí pevností v tlaku a klesající porozitou, kdežto u sady T_HA se tato závislost jeví být konstantní (na rozdíl od publikovaných výsledků [60]). Přestože porozita hydroxyapatitových skafoldů klesala, přítomnost pravděpodobných defektů ve struktuře vzniklých během přípravy vzorků ovlivnila pevnost v tlaku natolik, že nedošlo k jejímu nárůstu se snižující se porozitou (jak by se dalo předpokládat). Předpokládané defekty ve struktuře mohly být způsobeny nerovnoměrným nanášením HA suspenze (nerovnoměrná velikost trámců, příliš tenké trámce) nebo popraskáním trámců v důsledku sušení, tepelného zpracování viz. Obr. 32 B). Suspenze pro přípravu skafoldů na bázi HA navíc obsahovaly odlišný systém pojení (polymerní polyvinylalkohol) než suspenze připravené T_HA10SiO₂, kde jako pojivo byl použit koloidní oxid křemičitý.



Obr. 32 A) Detail duté vzpěry T_HA, B) Detail defektů v trámci T_HA.

Průměrná hodnota pevnosti v tlaku u skafoldů sady T_HA dosahovala ~ 0,3 MPa při průměrné porozitě 84±3 %. Naopak skafoldy dopované SiO₂ už potvrzují (červené body) exponenciální závislost. Stejných hodnot pevnosti v tlaku (~ 0,3 MPa) dosahovaly i skafoldy T_HA10SiO₂ při mírně vyšších hodnotách porozity (~ 88 %). S klesající porozitou pevnost vzrostla až k 1,36 MPa při porozitě 72 %. Výsledky tedy ukazují, že v případě templátové metody mají skafoldy obsahující SiO₂ vyšší pevnost oproti HA skafoldům.

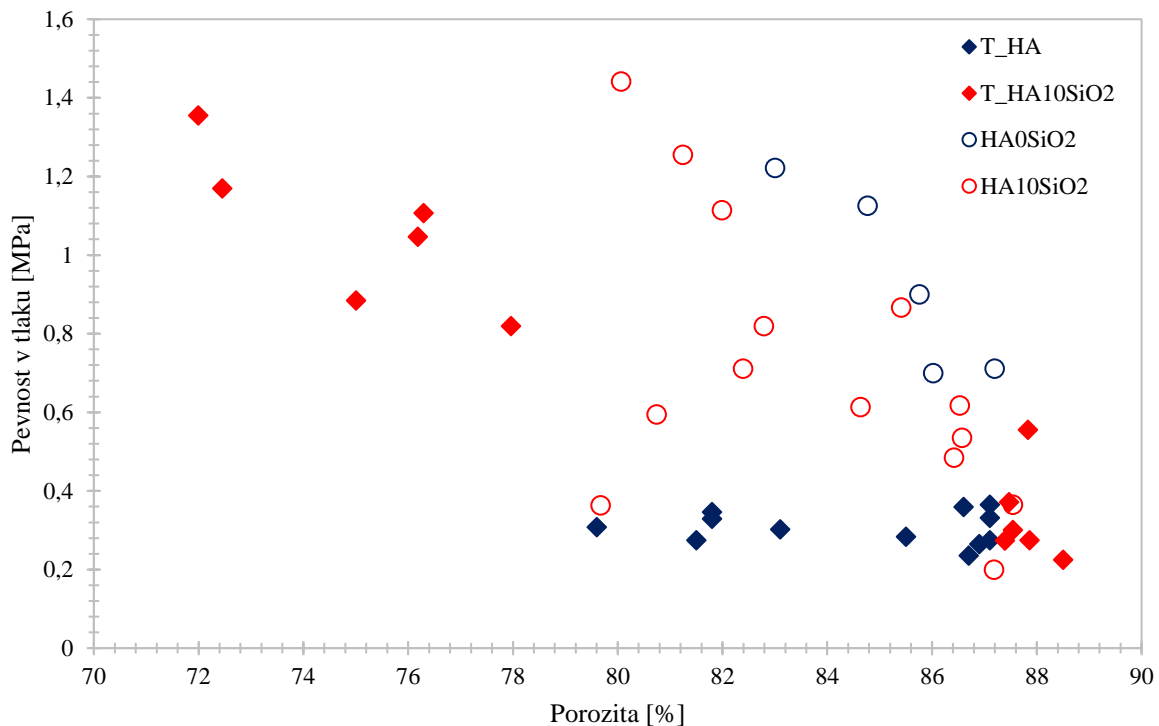
5.3 Porovnání vlastností skafoldů připravených templátovou metodou a metodou přímého pění

Templátovou metodou a metodou přímého pění byly připraveny skafoldy na bázi kalcium fosfátů dopovaných oxidem křemičitým. Metoda přímého pění umožnila připravit struktury s porozitou v rozsahu 80–88 % a distribucí velikostí pórů v rozmezí od 5 μm do 250 μm , sférického tvaru mezi sebou propojenými. Fázové složení připravených skafoldů se skládalo ze směsi HA, HA+TCP nebo TCP+křemičité sloučeniny podle množství přidaného oxidu křemičitého. Skafoldy s obsahem TCP a křemičitých sloučenin vykazovaly lepší interakci se simulovanou tělní tekutinou, kdy došlo po dvaceti osmi dnech testování k vytvoření krystalické vrstvy na povrchu. Skafoldy s obsahem SiO_2 jsou tedy více bioaktivní než skafoldy čistě hydroxyapatitové.

Skafoldy připravené templátovou metodou měly porozitu v rozmezí 82–87 % a velikost pórů odpovídala velikosti pórů použité polymerní pěny, tedy přibližně 430 μm . Póry sférického tvaru vykazovaly vzájemnou propojenost. Fázové složení bylo v rozmezí stejného množství přidaného SiO_2 srovnatelné se skafoldy připravenými přímým pěním. Jejich bioaktivní chování v SBF a trend rozpouštění lze také považovat za srovnatelné. Vyšší rozpustnost skafoldů připravených přímým pěním než u templátových skafoldů (44 hm.%, resp. 24 hm.%) je možné přisoudit většímu počtu menších pórů, a tím většímu povrchu přístupnému pro rozpouštění.

Aby mohl být posouzen vliv metody přípravy skafoldů na pevnost v tlaku, byly srovnány sady připravené pomocí templátové metody (T_HA a T_HA10SiO₂) se sadami připravenými pomocí metody přímého pění (HA0SiO₂ a HA10SiO₂). Na Obr. 33 jsou vyneseny získané hodnoty pevností skafoldů připravených oběma metodami.

Z vynesných dat je patrné, že obě sady skafoldů připravených metodou přímého pění mají obecně vyšší hodnoty pevností v tlaku. Např. u sady HA0SiO₂ bylo při stejné porozitě (~ 87 %) dosaženo až dvakrát vyšší hodnoty pevnosti v tlaku (0,71 MPa oproti 0,36 MPa naměřených u T_HA). U skafoldů dopovaných SiO_2 není tento jev až tak patrný, avšak stejných hodnot pevnosti v tlaku (1,4 MPa) bylo dosaženo u sady HA10SiO₂ při výrazně vyšších porozitách (80 %) než u T_HA10SiO₂ (~ 72 %). Rozdíl ve výsledné pevnosti v tlaku je úměrný množství defektů přítomných ve struktuře. Templátová metoda se od ostatních metod přípravy liší charakterem trámčů (vzpěr). Po tepelném zpracování, kdy dochází k vypálení templátu, zůstanou trámce duté (viz Obr. 32 A)), zatímco u metody přímého pění jsou po odstranění trámce plné (viz. Obr. 10c) a 15c)). Duté trámce mají trojúhelníkový tvar dutiny, což působí, že v rozích trojúhelníků se vyskytují koncentrátoři napětí, které snižují celkovou pevnost trámčů [26]. Pokud jsou navíc trámce tenké, může dojít ke vzniku defektů při tepelném zpracování [32].



Obr.33 Hodnocení vlivu metody přípravy na mechanické vlastnosti.

Jedním z předních požadavků kladených na materiály používaných ve tkáňovém inženýrství je podobnost mechanických vlastností s okolními tkáněmi, do kterých bude materiál implantován. Jelikož byly skafoldy připravovány s cílem nahrazení kostních defektů v oblasti páteře, bylo důležité, aby jejich pevnost v tlaku byla podobná pevnosti trabekulární kostní tkáňě obratlů, tj. $\sim 1,9$ MPa (viz. Tabulka 1). Jako optimální kompromis mezi mírou porozity a dosaženou pevností v tlaku pro skafoldy používané ve tkáňovém inženýrství se proto jeví struktura skafoldu s přídavkem 5 hm.% SiO₂ připravená optimalizovaným postupem metody přímého pění.

6 Závěr

Pomocí metody přímého pění a metody templátové byly připraveny biokeramické porézní materiály na bázi kalcium fosfátů nebo kalcium fosfátů dopovaných oxidem křemičitým (s 5; 10 a 20 hm.% SiO₂ u metody přímého pění, a s 10 hm.% SiO₂ u templátové metody).

Postup přípravy porézních skafoldů metodou přímého pění byl optimalizovaný modifikací reakčních parametrů. Jako optimální byl zjištěn I_{NCO} poměr 1,05; přídavek vody 2 hm.% ku polyolu, plnění hydroxyapatitem 50:50, s optimálním časem plnění směsi do forem po uplynutí 2 minut po homogenizaci. Tyto parametry byly použity pro přípravu křemíkem dopovaných skafoldů. U metody templátové byl zvolen postup přípravy keramických skafoldů dle dříve ověřených experimentů.

Metodou přímého pění a slinutím byly připraveny kalcium fosfátové skafoldy složené ze směsi HA a/nebo TCP a SiO₂/CaSiO₃ s porozitou v rozmezí 80–88 % a velikostí pórů v intervalu od 5 do 250 μm. Skafoldy připravené templátovou metodou byly po stránce fázového složení, porozity, ale také bioaktivního chování srovnatelné, avšak s významným rozdílem ve velikosti pórů. Póry připravené templátovou metodou měly průměrnou velikost 430 μm. Zvětšení pórů struktur připravených přímým pěním, které by bylo přínosné pro proces osteogeneze nebo angiogeneze, bude předmětem dalšího studia. Skafoldy připravené metodou přímého pění vykazovaly vyšší pevnost v tlaku až 1,8 MPa. Lepší mechanické vlastnosti byly patrně ovlivněny pevnější a méně defektní strukturou v porovnání se strukturou připravenou templátovou metodou. Skafoldy jsou díky svým vlastnostem (bioaktivní chování, rozpustnost ve fyziologickém prostředí a pevnost v tlaku) perspektivní pro potenciální aplikace v kostním tkáňovém inženýrství.

7 Literatura

- [1] BEST, S.M.; PORTER, A.E.; THIAN, E.S.; HUANG, J. Bioceramics: Past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2008**, 28, 1319–1327
- [2] PARK, Joon. *Bioceramics: Properties, Charakterizations, and Applications*. Springer, 2008. ISBN 978-0-387-09544-8.
- [3] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2004. ISBN 80-716-9970-5.
- [4] ČAPEK, Lukáš, Petr HÁJEK a Petr HENYŠ. *Biomechanika člověka*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0367-6.
- [5] JUNQUEIRA, L. Carlos, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany: H & H, 1997. 502 s. a LANGE medical book; ISBN 80-85787-37-7.
- [6] CAMBRIDGE, U. O. TLP Library *Structure of bone and implant materials – Mechanical properties of bone* 2014 http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/bone_mechanical.php
- [7] JODATI, Hossein, Bengi YILMAZ a Zafer EVIS. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramics International* [online]. 2020, **46**(10), 15725-15739 [cit. 2021-10-18]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2020.03.192
- [8] BEST, S.M., A.E. PORTER, E.S. THIAN a J. HUANG. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2008, **28**(7), 1319-1327 [cit. 2021-10-27]. ISSN 09552219. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001
- [9] DOROZHKIN, Sergey V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(7), 1465-1485 [cit. 2021-10-26]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.050
- [10] KRATOCHVÍL, Bohumil, Václav ŠVORČÍK a Dalibor VOJTĚCH. *Úvod do studia materiálů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-588-4.
- [11] LOVE, Brian. Metallic Biomaterials. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 159-184 [cit. 2021-11-01]. ISBN 9780128094785. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809478-5.00007-9
- [12] SINGH RAMAN, R.K., Sajjad JAFARI a Shervin Eslami HARANDI. Corrosion fatigue fracture of magnesium alloys in bioimplant applications: A review. *Engineering Fracture Mechanics* [online]. 2015, **137**, 97-108 [cit. 2021-11-30]. ISSN 00137944. Dostupné z: doi: 10.1016/j.engfracmech.2014.08.009
- [13] VOJTĚCH, Dalibor, Vítězslav KNOTEK, Jaroslav ČAPEK a Jiří KUBÁSEK. Hořčík – Kov pro medicínu i pro skladování vodíku. *Chemické listy* [online]. 2011, 678-683 [cit. 2021-11-30].

- [14] DE AZA, P. N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. Crystalline bioceramic materials. *Bol. Soc. Esp. Ceram*, 2005, 44.3: 135-145.
- [15] PUNJ, Shivani, Jashandeep SINGH a K. SINGH. Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future perspectives. *Ceramics International* [online]. 2021, **47**(20), 28059-28074 [cit. 2021-12-19]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2021.06.238
- [16] GOMES, D. S., A. M. C. SANTOS, G. A. NEVES a R. R. MENEZES. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Cerâmica* [online]. 2019, **65**(374), 282-302 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1678-4553. Dostupné z: doi:10.1590/0366-69132019653742706
- [17] TANG, Zhurong, Xiangfeng LI, Yanfei TAN, Hongsong FAN a Xingdong ZHANG. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regenerative Biomaterials* [online]. 2018, **5**(1), 43-59 [cit. 2021-12-29]. ISSN 2056-3418. Dostupné z: doi:10.1093/rb/rbx024
- [18] CARRODEGUAS, R.G. a S. DE AZA. A-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, **7**(10), 3536-3546 [cit. 2021-12-31]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.019
- [19] ANITA LETT, J., Suresh SAGADEVAN, Is FATIMAH, et al. Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications. *European Polymer Journal* [online]. 2021, **148** [cit. 2021-12-29]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110360
- [20] PANDA, Sikta, Chandan Kumar BISWAS a Subhankar PAUL. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. *Ceramics International* [online]. 2021, **47**(20), 28122-28144 [cit. 2021-12-29]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2021.07.100
- [21] BOHNER, Marc, Bastien Le Gars SANTONI a Nicola DÖBELIN. B-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, **113**, 23-41 [cit. 2021-12-31]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.022
- [22] EGBO, Munonyedi Kelvin. A fundamental review on composite materials and some of their applications in biomedical engineering. *Journal of King Saud University – Engineering Sciences* [online]. 2021, **33**(8), 557-568 [cit. 2022-03-05]. ISSN 10183639. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jksues.2020.07.007
- [23] TURNBULL, Gareth, Jon CLARKE, Frédéric PICARD, Philip RICHES, Luanluan JIA, Fengxuan HAN, Bin LI a Wenmiao SHU. 3 D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* [online]. 2018, September 2018, **3**(3), 278-314 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001
- [24] HE, Xing, Bo SU, Zhihong TANG, et al. The comparison of macroporous ceramics fabricated through the protein direct foaming and sponge replica methods. *Journal of Porous Materials* [online]. 2012, **19**(5), 761-766 [cit. 2021-9-28]. ISSN 1380-2224. Dostupné z: doi:10.1007/s10934-011-9528-z

- [25] STUDART, Andre R., Urs T. GONZENBACH, Elena TERVOORT a Ludwig J. GAUCKLER. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society*. 2006, **89**(6), 1771-1789. ISSN 0002-7820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x
- [26] OHJI, T a M FUKUSHIMA. Macro-porous ceramics: processing and properties. *International Materials Reviews*. 2013, **57**(2), 115-131. ISSN 0950-6608. Dostupné z: doi:10.1179/1743280411Y.0000000006
- [27] JEAN, Guillaume, Valérie SCIAMANNA, Maryse DEMUYNCK, Francis CAMBIER a Maurice GONON. Macroporous ceramics: Novel route using partial sintering of alumina-powder agglomerates obtained by spray-drying. *Ceramics International* [online]. 2014, **40**(7), 10197-10203 [cit. 2021-9-28]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2014.02.089
- [28] TRUNEC, Martin a Zdenek CHLUP. Subtractive manufacturing of customized hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Ceramics International* [online]. 2017, **43**(14), 11265-11273 [cit. 2021-9-28]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2017.05.177
- [29] NOVOTNÁ, Lenka, Lukáš KUČERA, Aleš HAMPL, Daniel DRDLÍK, Jaroslav CIHLÁŘ a Jaroslav CIHLÁŘ JR. Biphasic calcium phosphate scaffolds with controlled pore size distribution prepared by in-situ foaming. *Material Science and Engineering* [online]. 1 February 2019, 363-370 [cit. 2021-9-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117302709>
- [30] LIN, K. a J. CHANG. Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*. Elsevier, 2015, 2015, s. 3-19. ISBN 9781782420330. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-033-0.00001-8
- [31] EOM, Jung-Hye, Young-Wook KIM a Santosh RAJU. Processing and properties of macroporous silicon carbide ceramics: A review. *Journal of Asian Ceramic Societies*. 2018, **1**(3), 220-242. ISSN 2187-0764. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jascers.2013.07.003
- [32] COLOMBO, Paolo. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2006, **364**(1838), 109-124. ISSN 1364-503X. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2005.1683
- [33] PINTO, Moisés L. Formulation, Preparation, and Characterization of Polyurethane Foams. *Journal of Chemical Education* [online]. 2010, **87**(2), 212-215 [cit. 2021-9-26]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed8000599
- [34] LENZI, Veniero, Anna CREMA, Sergey PYRLIN a Luís MARQUES. Current State and Perspectives of Simulation and Modeling of Aliphatic Isocyanates and Polyisocyanates. *Polymers* [online]. 2022, **14**(9), 2443-2449 [cit. 2022-05-08]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14091642

- [35] DRIEST, P. J., V. LENZI, L. S. A. MARQUES, M. M. D. RAMOS, D. J. DIJKSTRA, F. U. RICHTER, D. STAMATIALLIS a D. W. GRIJPM. Aliphatic isocyanurates and polyisocyanurate networks. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2017, **28**(10), 1299-1304 [cit. 2022-05-08]. ISSN 10427147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.3891
- [36] KUNDU, Joydip, Falguni PATI, Young HUN JEONG a Dong-Woo CHO. Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. *Biofabrication* [online]. Elsevier, 2013, 2013, , 23-46 [cit. 2021-9-27]. ISBN 9781455728527. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-2852-7.00002-0
- [37] SCALERA, F., F. GERVASO, K.P. SANOSH, A. SANNINO a LICCIULLI. Influence of the calcination temperature on morphological and mechanical properties of highly porous hydroxyapatite scaffolds. *Ceramics International* [online]. 2013, **39**(5), 4839-4846 [cit. 2022-03-20]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2012.11.076
- [38] KUNJALUKKAL PADMANABHAN, Sanosh, Francesca GERVASO, Marina CARROZZO, Francesca SCALERA, Alessandro SANNINO a. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. *Ceramics International* [online]. 2013, **39**(1) [cit. 2022-03-20]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2012.06.073
- [39] TAHA, Mohammed A., Rasha A. YOUNESS a Medhat IBRAHIM. Biocompatibility, physico-chemical and mechanical properties of hydroxyapatite-based silicon dioxide nanocomposites for biomedical applications. *Ceramics International* [online]. 2020, **46**(15), 23599-23610 [cit. 2022-03-20]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceramint.2020.06.132
- [40] NOVOTNA, Lenka, Zdenek CHLUP, Josef JAROS, et al. Macroporous bioceramic scaffolds based on tricalcium phosphates reinforced with silica: microstructural, mechanical, and biological evaluation. *Journal of Asian Ceramic Societies* [online]. 1-14 [cit. 2022-04-20]. ISSN 2187-0764. Dostupné z: doi:10.1080/21870764.2022.2053278
- [41] STASTNY, Premysl, Radek SEDLACEK, Tomas SUCHY, Vera LUKASOVA, Michala RAMPICHOVA a Martin TRUNEC. Structure degradation and strength changes of sintered calcium phosphate bone scaffolds with different phase structures during simulated biodegradation in vitro. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **100** [cit. 2022-04-30]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi: 10.1016/j.msec.2019.03.027
- [42] KARAGEORGIU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(27), 5474-5491 [cit. 2021-11-04]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
- [43] PERSSON, Kristin. *Materials Data on CaSiO₃ (SG:15) by Materials Project: Computed materials data using density functional theory calculations. These calculations determine the electronic structure of bulk materials by solving approximations to the Schrodinger equation.* [online]. 2014 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:10.17188/1192565
- [44] PERSSON, Kristin. *Materials Data on SiO₂ (SG:92) by Materials Project: Computed materials data using density functional theory calculations. These calculations determine the*

electronic structure of bulk materials by solving approximations to the Schrodinger equation. [online]. 2014 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:10.17188/1272702

[45] ČSN EN 623-2. *Speciální technická keramika, Monolitická keramika: Všeobecné a strukturální vlastnosti, část 2: Stanovení hustoty a pórovitosti.* 1995.

[46] LOCK, P. A., JING, X. D., ZIMMERMAN, R. W., SCHLUETER, E. M. Predicting the permeability of sandstone from image analysis of pore structure, *Journal of applied physics*, 2002, vol. 92, pp. 6311.

[47] KOKUBO, Tadashi a Hiroaki TAKADAMA. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(15), 2907-2915 [cit. 2021-11-04]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017

[48] MCILVAINE, T.C. *A buffer solution for colorimetric comparison.* Morgantown, 1921. West Virginia University

[49] O-M. Goudouri, P. Balasubramanian, A.R. Boccaccini,6 - Characterizing the degradation behavior of bioceramic scaffolds, Editor(s): Paul Tomlins, In Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Characterisation and Design of Tissue Scaffolds, Woodhead Publishing, 2016, Pages 127-147, ISBN 9781782420873, <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-087-3.00006-7>.

[50] Lee, Choy & Ooi, T.L. & Chuah, Cheng Hock & Ahmad, Shahzad. (2007). Effect of isocyanate index on physical properties of flexible polyurethane foams. *Malaysian Journal of Science.* 26. 91-98.

[51] GOGOI, Runumi, Utpal Kumar NIYOGI, M. Sarwar ALAM a Dayal Singh MEHRA. Study of Effect of NCO/OH Molar Ratio and Molecular Weight of Polyol on the Physico-Mechanical Properties of Polyurethane Plaster Cast. *World Applied Sciences Journal 21* [online]. 2013, 276-283 [cit. 2022-04-11]. ISSN 1818-4952. Dostupné z: doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.21.2.2549

[52] Mohammed, M. M., ALJarrah, M. M., & Abdul Lateef, A. A. (2008). Effect of NCO/OH on the Mechanical properties of Polyurethane Elastomers. *Al-Nahrain Journal for Engineering Sciences*, 11(3), 485–493. Retrieved from <https://nahje.com/index.php/main/article/view/548>

[53] OPPON, C., P.M. HACKNEY, I. SHYHA a M. BIRKETT. Effect of Varying Mixing Ratios and Pre-Heat Temperature on the Mechanical Properties of Polyurethane (PU) Foam. *Procedia Engineering* [online]. 2015, **132**, 701-708 [cit. 2022-04-11]. ISSN 18777058. Dostupné z: doi: 10.1016/j.proeng.2015.12.550

[54] KWON, Soon-Ho, Youn-Ki JUN, Seong-Hyeon HONG, In-Seop LEE, Hyoun-Ee KIM a Ye Yeon WON. Calcium Phosphate Bioceramics with Various Porosities and Dissolution Rates. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. 2002, **85**(12), 3129-3131 [cit. 2022-05-02]. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1151-2916.2002.tb00599.x

[55] CHAMPION, E., V. LENZI, L. S. A. MARQUES, M. M. D. RAMOS, D. J. DIJKSTRA, F. U. RICHTER, D. STAMATIALIS a D. W. GRIJPMMA. Sintering of calcium phosphate

bioceramics. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(10), 1299-1304 [cit. 2022-05-08]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.029

[56] REID, J.W., A. PIETAK, M. SAYER, D. DUNFIELD a T.J.N. SMITH. Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(16), 2887-2897 [cit. 2022-05-08]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.005

[57] PIETAK, A., M. SAYER a M. J. STOTT. Crystallization kinetics of Si-TCP bioceramic films. *Journal of Materials Science* [online]. 2004, **39**(7), 2443-2449 [cit. 2022-05-08]. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1023/B: JMSC.0000020008.76515.bd

[58] JEONG, Jiwoon, Jung Hun KIM, Jung Hee SHIM, Nathaniel S. HWANG a Chan Yeong HEO. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research* [online]. 2019, **23**(1) [cit. 2022-05-12]. ISSN 2055-7124. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-018-0149-3

[59] LI, Guoyuan, Lei WANG, Wei PAN, et al. In vitro and in vivo study of additive manufactured porous Ti6Al4V scaffolds for repairing bone defects. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2022-05-10]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep34072

[60] LIU, Dean-Mo. Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite ceramic. *Ceramics International* [online]. 1997, **23**(2), 135-139 [cit. 2022-04-28]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi:10.1016/S0272-8842(96)00009-0

[61] MIRANDA, Pedro, Antonia PAJARES, Eduardo SAIZ, Antoni P. TOMSIA a Fernando GUIBERTEAU. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, **85A** (1), 218-227 [cit. 2022-04-28]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31587

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

Zkratky

1M – jednomolární

2D – dvoudimenzionální

3D – třídimeznionální

α -Ca₃(PO₄)₂ (α -TCP) – α -fosforečnan trivápenatý

α' -Ca₃(PO₄)₂ (α' -TCP) – α' -fosforečnan trivápenatý

β -Ca₃(PO₄)₂ (β -TCP) – β -fosforečnan trivápenatý

μ m – mikrometr

ρ_a – zdánlivá hustota

Ag⁺ – stříbrný kation

aj. – a jiné

Al₂O₃ – oxid hlinitý

BCP – dvoufázový kalcium fosfát

Ca – vápník

Ca²⁺ – vápenatý kation

CaCO₃ – uhličitan vápenatý

CaCl₂ – chlorid vápenatý

CAD – počítačem podporované projektování

CaF₂ – fluorid vápenatý

CaHPO₄ (DCPA) – hydrogenfosforečnan vápenatý (monetit)

CaHPO₄•2H₂O (DCPD) – hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát (brushite)

Ca(H₂PO₄)₂•H₂O (MCPM) – dihydrogenfosforečnan vápenatý monohyrát

Ca_xH_y(PO₄)_z•nH₂O, n=3-4,5; 15-20% H₂O (ACP) – amorfni fosforečnan vápenatý

Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅(OH) – apatitová fáze

Ca₁₀(PO₄)₆F₂ (FA) – fluorapatit

Ca₄(PO₄)₂O (TTCP) – bisfosforečnan-oxid tetravápenatý

CaO – oxid vápenatý

CaP – kalcium fosfáty

CaSiO₃ – křemičitan sodný (wollastonit)

Cd²⁺ – kademnatý kation

Cl⁻ – chlorný anion

CO₃²⁻ – uhličitanový anion

CT – počítačová tomografie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECM – extracelulární matrix

Er³⁺ – kation erbidia (erbiditý kation)

F⁻ – fluoridový anion

g – gram

GPa – giga pascal

h – hodina

HA – Ca₅(OH)(PO₄)₃ – hydroxyapatit

HCA – uhlíkem nasycený (karbonátovaný) hydroxyapatit

HCO₃⁻ – hydrogenuhličitanový anion
hm.% – hmotnostní procento
H₂O – voda
HPO₄²⁻ – hydrogenfosforečnanový anion
K⁺ – draselný kation
Mg²⁺ – hořečnatý kation
min – minuta
Mn²⁺ – manganatý kation
mm – milimetr
MPa – mega pascal
Mg₃(PO₄)₂ – fosforečnan hořečnatý
Mg-PSZ – částečně stabilizovaný oxid zirkoničitý hořčíkem
Na⁺ – sodný kation
Na₂O – oxid sodný
nm – nanometr
OH – hydroxylová skupina
ot/min – otáček za minutu
P – fosfor
PCL – polykaprolakton
Pd⁴⁺ – palladičitý kation
PE – polyethylen
PEEK – polyetheretherketon
PET – polyethylentereftalát
PHEMA – polyhydroxyethylmetakrylát
PLA – kyselina polyléčná
PLGA – kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
P₂O₅ – oxid fosforečný
(PO₄³⁻) – fosforečnanový anion
PP – polypropylen
ppi – počet pórů na palec
PVA – polyvinylalkohol
PU – polyuretan
RNA – ribonukleová kyselina
SBF – simulovaná tělní tekutina
SEM – rastrovací elektronový mikroskop
Si-β-TCP – křemíkem dopovaný beta trikalciem fosfát
SiC – karbid křemíku
SiO₂ – oxid křemičitý (vysokoteplotní forma cristobalit)
(SiO₄⁴⁻) – křemičitanový anion
SL – stereolitografie
SLM – selektivní laserové tání
SLS – spékání
SO₄²⁻ – síranový anion
Sr²⁺ – strontnatý kation

TCP – trikalcium fosfát

Ti6Al4V – titanová slitina s 6 hm.% hliníku a se 4 hm.% vanadu

tj. – to jest

TZP – tetragonální polykrystalický oxid zirkoničitý

tzv. – tak zvaně

UHMWPE – polyetylen s ultra vysokou molekulární hmotností

WS – wollastonit

XRD – rentgenová analýza

Zn²⁺ – zinečnatý kation

ZrO₂ – oxid zirkoničitý

Symbols

~ – přibližně

\varnothing [mm] – průměr

ρ_{abs} [g/cm³] – absolutní hustota

ρ_{b} [g/cm³] – objemová geometrická hustota

ρ_{rel} [g/cm³] – relativní hustota

ρ_{t} (ρ_{teor}) [g/cm³] – teoretická hustota

σ [MPa] – hodnota pevnosti v tlaku při porozitě P

σ_0 [MPa] – hodnota pevnosti v tlaku při nulové porozitě

σ_{C} [MPa] – pevnost v tlaku

σ_{pt} [MPa] – mez pevnosti v tahu

b [-] – koeficient popisující charakteristiku pórů

Ca/P [-] – Ca/P poměr

d [μm] – velikost zrna

E [GPa] – Youngův modul pružnosti v tahu

E_{ax} [GPa] – Youngův modul pružnosti kompozitu zatíženého v podélném směru

E_{f} [GPa] – Youngův modul pružnosti vláken

E_{m} [GPa] – Youngův modul pružnosti matrice

E_{trans} [GPa] – Youngův modul pružnosti kompozitu zatíženého v příčném směru

f [-; %] – objemový podíl vláken obsažených v kompozitu

F [N] – přítláčná síla

G_{C} [kJ/m²] – lomová energie

h [mm] – výška

HV [Pa] – tvrdost podle Vickerse

I_{NCO} [-] – NCO index, poměr mezi NCO a OH skupinami

K_{C} [MPa/m^{1/2}] – lomová houževnatost

K_{ps} [mg/l] – rozpustnost

m_1 [g] – hmotnost suchého slinutého vzorku

m_2 [g] – zdánlivá hmotnost

m_3 [g] – hmotnost vzorku nasyceného kapalinou

m_{b} [g] – hmotnost suchého slinutého vzorku

M_{w} [-] – molární hmotnost

P [%] – porozita

V_{b} [cm³] – geometricky stanovený objem tělesa

W_{k} [g] – koncová hmotnost po degradaci

W_1 [%] – hmotnostní změna po degradaci

W_{p} [g] – počáteční hmotnost testovaného skafoldu

9 Seznam obrázků

Obr. 1 Schématické modely A) vláknité a B) lamelózní kostní tkáně. U obou typů kostní tkáně jsou přítomné osteocyty (1). V lamelózní tkáni jsou dále přítomny lakuny – štěrby, ve kterých jsou umístěny osteocyty (2), canaliculi ossium – kanálky, do nichž vstupují výběžky osteocytů (3), Haversův kanálek osteonu (4), koncentrické lamely osteonu (5) a povrchové (neboli plášťové) lamely kosti (6), (H) Haversův systém lamel (neboli osteon).

Obr. 2 Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu, na kterém je zachycen ostěn včetně minerální složky části lamelózní kostní tkáně.

Obr. 3 Hierarchické uspořádání vnitřních struktur lidské stehenní kosti.

Obr. 4 Schématický postup osifikace dlouhé kosti.

Obr. 5 Schématické zobrazení jednotlivých fází kostní remodelace.

Obr. 6 A) příklad rozdílných mechanických vlastností kortikální kosti při tahovém zatížení v závislosti na její orientaci vůči zatížení, B) změna mechanických vlastností kostní tkáně v důsledku změn rychlosti zatěžování.

Obr. 7 Přehled rozdílných morfologií částic β -TCP: (a, b, c) Morfologie β -TCP částic precipitovaných z ethylenglykolu, (d) Amorfni kalcium fosfát (ACP) v práškové formě získaného pomocí sprejové pyrolýzy, (e) ACP prášek po transformaci na β -TCP při 800 °C, (f) Morfologie komerčně dostupného β -TCP prášku (Aldrich, Art No 20218), (g) Hydroxyapatit s deficitem vápníku (CDHA) – prášek, (h) β -TCP získaný kalcinováním CDHA prášku, (h) při 850 °C, (i) β -TCP vlákna.

Obr. 8 Technologické schéma metody částečného slinování.

Obr. 9 Schéma templátové metody.

Obr. 10 a) snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu polyuretanového pěnového templátu, b) struktura po nanesení keramické suspenze s obsahem Al_2O_3 , c) snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu duté vzpěry po vypálení templátu.

Obr. 11 Schéma techniky obětní šablony.

Obr. 12 Schéma metody přímého pění.

Obr. 13 Reakční schéma vzniku polyuretanu.

Obr. 14 Reakční schéma izokyanátu s vodou.

Obr. 15 Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu a) hydroxyapatitová keramická pěna připravena metodou přímého pění (gel-casting), b) hutná vzpěra skafoldu po pyrolýze, c) mikrostruktu SiC pěny získané metodou obětní šablony.

Obr. 16 Přehled procesu obrazové analýzy, a) SEM snímek keramografického výbrusu, b) prahování snímku pomocí algoritmu ‚threshold‘, c) použití algoritmu ‚watershed‘, d) identifikované póry.

Obr. 17 Struktury vytvrzených pěn ve stavu ‚green body‘. A) $t=2+0'$, B) $t=2+60'$, C) $t=2+120'$, D) $t=2+180'$, E) $t=2+240'$.

Obr. 18 Histogram popisující distribuci velikosti pórů skafoldů připravených metodou přímého pění.

Obr. 19 SEM snímky mikrostruktury skafoldů připravených metodou přímého pění. A) HA0SiO_2 , B) HA5SiO_2 , C) HA10SiO_2 a D) HA20SiO_2 .

Obr. 20 SEM snímky mikrostruktury skafoldů po 28 dnech kultivace v SBF. A) HA0SiO_2 , B) HA5SiO_2 , C) HA10SiO_2 a D) HA20SiO_2 .

Obr. 21 Závislost hmotnostní změny na časovém průběhu degradace skafoldů připravených metodou přímého pění.

Obr. 22 SEM snímky krystalické vrstvy vzniklé díky přesycení uvolňujících se iontů u HA20SiO_2 . A) HA20SiO_2 po 1. týdnu testování, B) HA20SiO_2 po 2. týdnech testování.

Obr. 23 Závislost pH na časovém průběhu degradace.

Obr. 24 Závislost pevnosti v tlaku na porozitě skafoldů připravených metodou přímého pění.

Obr. 25 Přehled průměrných hodnot pevnosti v tlaku a porozit v závislosti na přídávku SiO_2 v hm.%.

Obr. 26 SEM snímky mikrostruktury A) detail T_HA, B) T_HA, C) detail T_HA10SiO₂, D) T_HA10SiO₂.

Obr. 27 SEM snímky detailu mikrostruktury skafoldů po 28 dnech kultivace v SBF, A) T_HA a B) T_HASiO₂.

Obr. 28 SEM snímky krystalické vrstvy vzniklé díky přesycení uvolňujících se iontů u T_HA10SiO₂. A) T_HA10SiO₂ po 1. týdnu testování, B) T_HA10SiO₂ po 2. týdnech testování.

Obr. 29 Závislost hmotnostní změny na časovém průběhu degradace skafoldů připravených metodou přímého pění.

Obr. 30 Závislost pH na časovém průběhu degradace.

Obr. 31 Graf závislosti pevnosti v tlaku na porozitě.

Obr. 32 A) Detail duté vzpěry T_HA, B) Detail defektů v trámci T_HA.

Obr. 33 Hodnocení vlivu metody přípravy na mechanické vlastnosti.

10 Seznam tabulek a grafů

Tabulka 1 Srovnání jednotlivých mechanických vlastností kostí.

Tabulka 2 Přehled materiálových skupin používaných ve tkáňovém inženýrství.

Tabulka 3 Srovnání mechanických a fyzikálních vlastností základních zástupců bioinertních keramik.

Tabulka 4 Přehled hlavních zástupců kalcium fosfátových keramik.

Tabulka 5 Srovnání rozpustnosti jednotlivých zástupců kalcium fosfátových keramik.

Tabulka 6 Metody využívané k syntéze HA.

Tabulka 7 Srovnání mechanických vlastností HA v hutné a porézní formě.

Tabulka 8 Shrnutí ideálních fyzikálních a mechanických vlastností skafoldu, implantovaného do tvrdých tkání.

Tabulka 9 Srovnání mikrostrukturních vlastností dle zvolené metody přípravy.

Tabulka 10 Složení kompozitních směsí pro přípravu skafoldů metodou přímého pění.

Tabulka 11 Režim tepelného zpracování vysušených skafoldů.

Tabulka 12 Srovnání koncentrací jednotlivých iontů, které jsou obsaženy v SBF a krevní plazmě.

Tabulka 13 Vzorky připravené v rámci optimalizace I_{NCO} poměru a jejich výsledné porozity.

Tabulka 14 Vzorky připravené v rámci optimalizace přídavku vody a jejich porozita.

Tabulka 15 Analýza fázového složení skafoldů připravených metodou přímého pění.

Tabulka 16 Specifikace Porozity skafoldů připravených metodou přímého pění.

Tabulka 17 Fázové složení skafoldů připravených templátovou metodou.

Tabulka 18 Parametry mikrostruktury a porozity skafoldů připravených templátovou metodou.