



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

**STUDIUM INTERAKCE KOMPOZITŮ NA BÁZI
HA/BIOSKLO V SIMULOVANÉ TĚLESNÉ TEKUTINĚ**

STUDY OF INTERACTION OF HA / BIOSKLO BASED COMPOSITES IN SIMULATED BODY FLUID

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Juraj Riša

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1350/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie materiálů
Student: **Bc. Juraj Riša**
Studijní program: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Studijní obor: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Vedoucí práce: **Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium interakce kompozitů na bázi HA/biosklo v simulované tělesné tekutině

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je studium schopnosti remineralizace kompozitního materiálu na bázi 45S5 bioskla a hydroxyapatitu s různě porézní strukturou v interakci se simulovanou tělní tekutinou.

Termín odevzdání diplomové práce: 17.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Juraj Riša
student(ka)

Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.
vedoucí práce

doc. Ing. František Šoukal, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá biokeramickými materiálmi na bázi hydroxyapatitu, bioskla a ich vzájomných kompozitov. Tieto materiály sa bežne používajú na medicínske účely, najmä ako náhrady tvrdého tkaniva. Obidve tieto látky patria medzi bioresorbovateľné materiály. Na prípravu sa používa veľké množstvo rôznych syntéz, z ktorých boli na túto prácu vybrané tie najčastejšie – syntéza hydroxyapatitu precipitáciou a syntéza bioskla sol-gel metódou. Na charakterizáciu pripravených keramických práškov boli použité termické analýzy a röntgenová difrakcia. Táto práca študuje najmä ich vlastnosti v rámci kompozitných materiálov, ktoré sa kvôli zlepšeniu bio vlastností pripravili vo forme napenených štruktúr. Prvým štúdiom možných bioaktívnych vlastností materiálov je ich interagovanie v rámci simulovanej telesnej tekutiny, ktorá svojim iónovým zložením pripomína krvnú plazmu. Experimentálna časť pokrýva syntézu keramických práškov, ich charakterizáciu, prípravu zmesí a napenených nosičov pomocou in situ penenia, ich výpal pri vhodných teplotách, meranie porozity a zmeny vo fázovom zložení, ku ktorým došlo pri výpale. Základné testy boli prevedené inkubovaním pripravených poréznych nosičov v simulovanej telesnej tekutine po dobu 3, 7, 14 a 21 dní a ich následné podrobenie skenovacej elektrónovej mikroskopii. Počas tohto obdobia boli sledované zmeny koncentrácií iónov Ca^{2+} a PO_4^{3-} ako aj hmotnosti vzoriek podľa času inkubovaného v simulovanej telesnej tekutine.

ABSTRACT

This work deals with bioceramic materials based of hydroxyapatite, bioglass and their composites. These materials are commonly used in medicine, especially as hard tissue substituents. They can be prepared by different types of syntheses, from which the most common were picked for this work – precipitation of hydroxyapatite and sol-gel method for bioglass. Thermal analysis and X-ray diffraction were used for characterization of prepared powders. This thesis studies mostly their features within the composite materials, which were foamed for better bone stimulation. Properties and possibility in bio application of materials is firstly studied through their interaction in simulated body fluids, which mimics ionic concentration of human plasma. Experimental part covers synthesis of ceramic powders, their characterization, preparation of mixtures and scaffolds foamed through in situ foaming, their sintering at ideal temperatures, characterization of porosity and phase changes due to sintering. Basic tests of apatite formation ability were provided by incubation of prepared scaffolds in simulated body fluid for 3, 7, 14 and 21 days and their assay in scanning electron microscopy. Changes in concentration of Ca^{2+} a PO_4^{3-} ions as well as in weight of the specimen were tracked within the incubation period.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Biomateriály, hydroxyapatit, kompozit, simulovaná telesná tekutina, keramická pena, SEM

KEYWORDS

Biomaterials, hydroxyapatite, composite, simulated body fluid, ceramic foam, SEM

RIŠA, J. *Studium interakce kompozitů na bázi HA/biosklo v simulované tělesné tekutině*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 63s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasuje, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Juraj Riša

POĎAKOVANIE

Chcel by som poďakovať za odborné vedenie, cenné rady, pevné nervy a čas, ktorý mi bol venovaný predovšetkým vedúcej Ing. Eve Bartoníčkovej, Ph.D. a Ing. Janovi Vojtíškovovi. Poďakovanie patrí samozrejme aj ostatným pracovníkom Fakulty chemickej za ich pomoc a ochotu pri tejto práci.

OBSAH

1 Úvod	8
2 Teoretická časť	9
2.1 Biomateriály.....	9
2.1.1 Biokompatibilita	10
2.1.2 Bioinertné materiály	10
2.1.3 Bioaktívne materiály	10
2.1.4 Bioresorbovateľné materiály	11
2.1.5 Nové trendy vo výrobe biomateriálov	11
2.2 Bioaktívne sklo (Biosklo)	12
2.2.1 Vlastnosti	12
2.2.2 Biosklo	12
2.2.2.1 Bioaktivita skla	12
2.2.3 45S5	12
2.2.4 Sol-gel proces	13
2.2.5 Rozkladné reakcie.....	14
2.2.6 Ďalšie použitie	14
2.2.7 Rozkladné mechanizmy	14
2.3 Hydroxyapatit	16
2.3.1 Vlastnosti	16
2.3.1.1 Mechanické vlastnosti.....	17
2.3.1.2 Chemické vlastnosti	17
2.3.2 Syntéza.....	17
2.3.2.1 Príprava suchou cestou	17
2.3.2.2 Príprava mokrou cestou	17
2.3.3 Použitie	18
2.4 Peny	18
2.4.1 Príprava poréznych štruktúr.....	18
2.4.1.1 Replikačná metóda.....	19
2.4.1.2 Priame penenie.....	19
2.4.1.3 Solid freeform fabrication (SFF)	20
2.5 Kompozitné materiály.....	20
2.5.1 Štruktúra kompozitných materiálov.....	20

2.5.2	Aplikácie kompozitných materiálov	20
2.5.2.1	Kostné náhrady	20
2.6	Spôsoby testovania biomateriálov	21
2.6.1	In vitro testy	21
2.6.1.1	„Apatite ability“ test.....	21
2.6.1.2	Testy cytotoxicity.....	22
2.6.2	In vivo testy	22
3	Experimentálna časť	24
3.1	Príprava keramických práškov.....	24
3.1.1	Syntéza hydroxyapatitu.....	24
3.1.2	Syntéza bioskla 45S5	24
3.1.3	Príprava zmesí na tvorbu kompozitov	25
3.2	Výroba napenených vzoriek	26
3.3	Charakterizácia pripravených materiálov	26
3.3.1.1	Röntgenová difrakčná analýza	26
3.3.1.2	Stanovenie merného povrchu (BET)	27
3.3.1.3	Meranie veľkosti častíc	28
3.3.1.4	Žiarová mikroskopia	29
3.3.1	Termická analýza.....	29
3.3.2	Testovanie porozity napenených vzoriek	30
3.4	Štúdium interakcie pripravených vzoriek v SBF.....	30
3.4.1	Príprava SBF.....	30
3.4.2	Inkubácia v SBF.....	31
3.4.3	Spektrofotometrické stanovenie prvkov v SBF	32
3.4.3.1	Stanovenie Ca^{2+}	32
3.4.3.2	Stanovenie PO_4^{3-}	33
3.5	Rastrovacia elektrónová mikroskopia.....	33
3.5.1	Príprava vodivého povrchu vzoriek	34
4	Výsledky a diskusia.....	35
4.1	Syntéza keramických práškov	35
4.1.1	Hydroxyapatit	35
4.1.2	Biosklo	35
4.1.3	Charakterizácia pripravených práškov pre ďalšie použitie.....	36

4.2	Príprava a charakterizácia napenených vzoriek	37
4.2.1	Príprava kompozitných vzoriek	37
4.2.1.1	Stanovenie spekacích teplôt	37
4.2.2	Stanovenie porozity	43
4.2.3	Pozorovanie fázových zmien v dôsledku spekania vzoriek.....	43
4.3	„ <i>Apatite ability</i> “ test.....	45
4.3.1.1	Kontrola hmotnosti vzoriek	45
4.3.2	Zmena koncentrácie iónov v SBF.....	46
4.3.3	SEM.....	48
5	Záver.....	54
6	Literatúra	56
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov	63
8	Prílohy	64

1 ÚVOD

V posledných desaťročiach sa využitie biomateriálov v medicíne výrazne rozšírilo. Jedným z najdôležitejších rozšírením skúmania biomateriálov má na starosti práve tkanivové inžinierstvo, ktorého úlohou je obnovenie funkčnosti poškodeného tkaniva. Prvým typom na opravu bolo práve kostné tkanivo, na ktorého náhradu sa používali najskôr inertné materiály, najmä zliatiny, ktoré svojou neinterakciou s okolitým tkanivom obzvlášť neublížujú, avšak nejedná sa o plnohodnotnú, celoživotnú náhradu. Toto je jedným z hlavných dôvodov, ktorý nabáda vedcom, aby sa pokúsili vytvoriť materiály, ktoré budú resorbovateľné či degradabilné, vďaka čomu dôjde ku postupnému vzniku vlastného, unikátneho tkaniva, na ktoré si organizmus danú náhradu upraví.

Jedným z prvých používaných materiálov v tejto kategórii bolo biosklo Bioglass® vyrobené prof. Larry Henchom v šesťdesiatych rokoch minulého storočia. Postupným výskumom sa zistilo, že sa jedná o prvý syntetický materiál, ktorý je schopný úplného naviazania na kostné tkanivo. Dnes sa používajú biosklá na náhradu rôznych typov tkanív. Pri degradabilných materiálov musíme avšak rátať s tým, že vložená náhrada musí mať dostatočnú pevnosť a primeranú rozpustnosť, aby malo telo dostatok času na vytvorenie vlastného tkaniva. Kvôli tomu sa pôvodné biosklo upravovalo rôznymi oxidmi či kovmi, vďaka čomu vznikli materiály s rôznou dobou rozkladu či dostatočnou mechanickou pevnosťou na náhradu kostného tkaniva.

Ďalším materiálom vhodným pre tkanivové inžinierstvo je hydroxyapatit, z ktorého sa vďaka jeho prirodzenému výskytu v kostiach stáva potencionálny kandidát na použitie v tkanivovom inžinierstve. Rovnako ako pri bioskle existuje veľa možností syntetizovania hydroxyapatitu. Kvôli jeho slabej mechanickej odolnosti sa však pri náhrade veľkých, zaťažovaných častí používa iba na povlakovanie bioinertných náhrad a pomáha ich rýchlejšiemu a lepšiemu spojeniu s okolitým tkanivom. Jednou z možností je príprava kompozitných materiálov, ktorých synergické vlastnosti majú za úlohu predísť zmieneným problémom.

Aby sme mohli vôbec uvažovať nad použitím nových materiálov v danom odvetví je potrebné jeho testovanie. Na získanie základných charakteristík správania implantátov v ľudskom tele pred ich vložením do organizmu je kvôli obrovského množstvu možných komplikácií potrebné podrobiť testované materiály jednoduchším in vitro a následne zložitejším in vivo testy. In vitro laboratórne testovanie nám ponúkne najzákladnejšie informácie o jeho správaní v simulovaných podmienkach vďaka testom v simulovanej telesnej tekutine, mitochondriálnom či bunkovom prostredí. Tieto testy nám avšak nedokážu ponúknuť výsledky vzhľadom na komplexnosť živých organizmov, na čo sa využívajú testy in vivo, ako forma preklinických testov, ktoré končia testovaním na živých organizmoch a po následnom splnení predchádzajú klinickým testom materiálu v ľudskom tele.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Biomateriály

Kvôli rastúcej potrebe špeciálnej starostlivosti je v dnešnej dobe najrýchlejšie rozvíjajúcim sa odvetvím medicíny tkanivové inžinierstvo a regeneračná medicína. Prehľbuje sa nedostatok náhradných orgánov, tkanív či buniek. Riešením tohto problému sa zaoberá práve tkanivové inžinierstvo. Na prípravu produktov sa používajú matrice z biomateriálov. Materiály, ktoré sa zaraďujú do tejto kategórie sú všetky neživé materiály, používané v zdravotníctve, pri ktorých dochádza ku určitému štýlu interakcie medzi biologickým systémom a daným materiálom[1].

I keď sa tento názov začal používať približne 60 rokov dozadu, boli biomateriály používané už pred našim letopočtom. Použité materiály sa líšili kvôli rôznej dostupnosti a možnému použitiu. Dôkazom sú pozostatky nájdené u Májov približne 600 rokov pred n.l. Rovnako sa našli železné zubné implantáty v Európe 200 rokov pred n.l. pričom tieto implantáty boli popísané ako riadne integrované[2].

Na začiatku 20. storočia boli prírodné materiály nahradené syntetizovanými polymérmi, keramikou či zliatinami kovov. Umožnilo to zlepšenie výkonu, funkcionality a reprodukovateľnosti náhrad, narozdiel od prírodných materiálov. Toto umožnilo rozvoj biomateriálov, ktoré mali za úlohu plniť mechanické funkcie, zabrániť biologickému odmientnutiu implantátu. Preferovali sa inertné biomateriály, ktoré s organizmom človeka neinteragovali.

Rozvoj molekulárnej biológie v sedemdesiatych rokoch 20. storočia spolu s rastúcimi znalosťami proteomiky a genomiky na konci 20. storočia zmenili spôsob návrhu a použitia biomateriálov. Príkladom je objavenie cytokínov ako kosť tvoriace proteíny v rámci osteogenézy a ich následné implantovanie do biomateriálov ako bioaktívna zložka. Toto viedlo ku vzniku implantátov, ktoré dokážu vyvolať v tele požadovanú funkciu pre lepšiu a rýchlejšiu pomoc pacientovi.

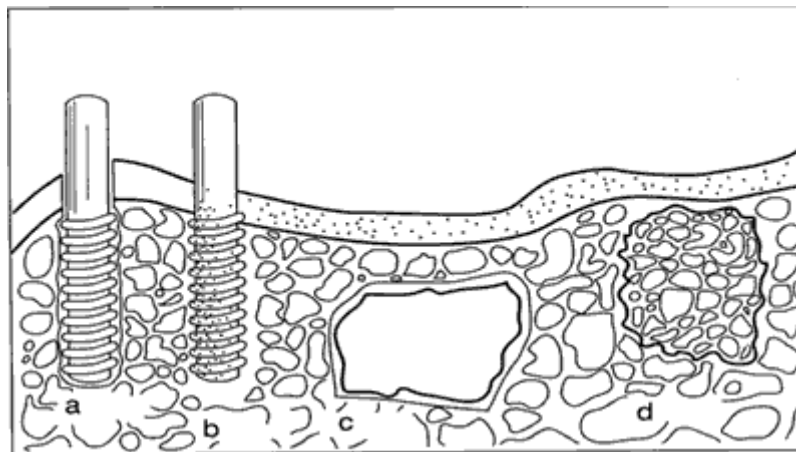


Obr. 1: The Infuse® Bone Graft/LT-Cage® používaná na liečbu degeneratívnych platničiek[3]

Príkladom je implantát od firmy Medtronic® používaný na liečbu degeneratívnej poruchy platničiek, ktorý sa spája syntetické komponenty s kosťotvornými proteínmi. Toto zariadenie má za úlohu opotrebovanú platničku obnoviť na jej pôvodnú veľkosť. Úlohou proteínu je v tomto prípade stimulovať tvorbu kosti.

Schopnosť biologickej aktivity v rámci syntetického materiálu mnohonásobne zvýšilo možnosti použitia biomateriálov a zároveň vylepšilo ich schopnosti v tradičných aplikáciách. Na rozdiel od väčšiny umelých materiálov sú materiály používané v živých organizmoch viacfunkčné, dynamické a vyrábané metódami, umožňujúcimi výrobu štýlom „bottom-up“, pri ktorom sa na rozdiel od klasickej prípravy materiálov štýlom „top-down“ postupne veľkosť zvyšuje, napríklad oproti mletiu väčších štruktúr na vznik nano/mikroštruktúr. Rozvoj rôznych inžinierskych odvetví umožňuje sofistikovanejší prístup k dizajnovaniu a výrobe materiálov s komplexnými funkciami. Často napodobňujú správanie či fyzikálno-chemické vlastnosti prírodných materiálov[4].

Základnou vlastnosťou biomateriálov je biokompatibilita, pričom tieto materiály delíme na niekoľko skupín podľa ich správania po vložení do organizmu.



Obr. 2: porovnanie správania bioinertného (a), bioaktívneho (b), povrchovo aktívneho (c) a resorbateľného materiálu (d)[5]

2.1.1 Biokompatibilita

Vzhľadom na prirodzenú reakciu imunitného systému sa telo snaží vylúčiť zo seba všetky cudzorodé látky. Pojem biokompatibilita vyjadruje schopnosť pozitívnej interakcie materiálu s ľudským telom bez nepriaznivých účinkov. Vlastnosťami charakterizujúcimi biokompatibilitu sú napríklad cytotoxicita, bio-degradabilita, vplyv na infekčné procesy, atď.

2.1.2 Bioinertné materiály

Termín bioinertné sa uplatňuje pre materiály, ktoré po vložení do ľudského tela majú minimálne interakcie s obklopujúcim tkanivom. Príkladmi sú titán, hliník, nehrdzavejúca oceľ, čiastočne stabilizované zirkónium či polyetylén s ultravysokou molekulárnou hmotnosťou (UHMWPE).

2.1.3 Bioaktívne materiály

Bioaktívny materiál je schopný vytvárať priame a pevné väzby so živým tkanivom. Je vhodným podkladom pre kolonizáciu a usadzovanie buniek. V súčasnosti je rozšírená výroba 3D

polymérnych nosičov, ktoré sú in vitro kolonizované bunkami a následne implantované do tela pacienta za účelom nahradenia poškodeného tkaniva kostí, ciev, chrupaviek alebo aj celého orgánu (pečene, obličky, čreva alebo srdca). Novým trendom v oblasti tkanivového inžinierstva je tzv. bioprinting. Je to jedna z najnovších metód výroby náhrad a pozostáva z vytvorenia trojrozsomernej náhrady z čisto biologického materiálu. Vhodnými bioaktívnymi materiálmi sú niektoré kovy, hydroxyapatitová, tri- a tetrakalciová keramika, bioaktívna sklokeramika, uhlíkové kompozity a polyméry (polystyrén, polypropylén, polyuretán a iné)[6].

2.1.4 Bioresorbovateľné materiály

Po vložení do ľudského tela sa bioresorbovateľný materiál začne rozkladať a postupne prerastať vlastným tkanivom. Typickým príkladom bioresorbovateľných materiálov je trikalcium fosfát $[Ca_3(PO_4)_2]$ či kopolymér polyaktát-polyglykolová kyselina.

Tab. 2.1 klasifikácia biomateriálov, príklady, ich výhody, nevýhody, použitie - prevzaté z[7]

Typ	Výhody	Nevýhody	Použitie
Kovy a zliatiny kovov	Modul pružnosti	Korozívne	Ort. implantáty
Napr. zlato, platina, titán, oceľ	Výroba, sterilita	Elastický modul Aseptickosť	Šrouby Platničky
Keramické a uhlíkaté zlúčeniny	Výborná pevnosť	Zlé tvarovanie	Zubné imp.
Napr. sklá, CaP soli, oxidy hliníku	Biokompatibilita Nekorozívnosť	Elastický modul	Bio. ort. imp. Načúvadlá Ort. implantáty
Polyméry	Biodegradabilita	Ťažká sterilizácia	Zubné implantáty
	Biokompatibilita		Tkanivové nosiče
	Tvarovateľnosť		Protézy
Napr. PMMA, PCL, PLA, PC, PU	Dobrá pevnosť	Rozpustnosť	Riadený targeting liekov

2.1.5 Nové trendy vo výrobe biomateriálov

Jedným z najnovších trendov je 3D tlač, ktorá sa v rámci automobilové a leteckého priemyslu používa vyše 30 rokov, no v medicíne bola používaná iba na prípravu anatomických modelov v rámci výučby. Vďaka pokroku pri výrobe nových biodegradabilných materiálov je možnosť využiť túto techniku do hĺbky. Vďaka širokým možnostiam 3D tlače je možné naskenovať a následne vytlačiť modely, ktoré budú rozmermi a tvarom vytvorené priamo pre individuálne využitie pacienta. Rovnako je možnosť tlačiť živé tkanivá či nosiče pre regeneračnú medicínu. Používané sú napríklad algináty, chitosan, kolagén či fibrín[7].

2.2 Bioaktívne sklo (Biosklo)

Väčšina materiálov založených na skle a keramike má za úlohu zlepšiť kvalitu života vďaka obnoveniu funkcie tkaniva či orgánu v tele. Cieľ výskumu poréznych nosičov sa ubera nielen cestou náhrady kostí, ale aj aplikácií na náhradu mäkkého tkaniva. Dôkladné pochopenie správania a vlastností bioskla napomáha ku využitiu jeho potenciálu pre biomedicínske aplikácie.

2.2.1 Vlastnosti

Vďaka amorfnej štruktúre má sklo niekoľko vlastností, ktoré z neho robia optimálny materiál pre rôzne aplikácie. Konvenčné sklá, zložené z oxidov kremíku, hliníku, bóru, alkalických kovov či alkalických zemín sa používajú najmä vďaka priehľadnosti spojenej s inými vlastnosťami (dobrá mechanická pevnosť, chemická odolnosť..). Tieto komerčné sklá sa vyrábajú pomerne lacným spôsobom tavenia. Na druhej strane, špeciálne sklá, ktoré majú špecifickú funkciu sú pre dnešnú dobu nevyhnutnosťou najmä kvôli svojim optickým vlastnostiam[8].

2.2.2 Biosklo

Biosklo, používané na priamy kontakt s ľudským telom patrí medzi špeciálne sklá. V tomto prípade však nehrá rolu transparentnosť materiálu. Bioaktivita skla je založená na zmene zloženia a morfológie skla po vložení do ľudského tela. Rovnako sa mení aj koncentrácia anorganických iónov v okolnej telesnej tekutine. Či už je to priehľadnosť alebo bioaktivita, obe tieto vlastnosti sú založené na amorfnosti skla. Toto zloženie skla dovoľuje meniť fyzikálne či chemické vlastnosti do určitého štádia vďaka rôznym sklotvorným oxidom či ich pomerom. Tento fakt dovoľuje vytvorenie skla potrebného pre špecifické využite v rámci tkanivového inžinierstva[9].

2.2.2.1 Bioaktivita skla

Bioaktívne sklá sú tvorené rovnakými oxidmi ako komerčné sklá, avšak vďaka rôznym pomerom týchto oxidov sa dostávajú k úplne rozdielnym vlastnostiam. Jednou z týchto vlastností je napríklad rozpustnosť skla, ktorá pri bioskle musí dosahovať výrazne vyšších hodnôt vo vodnom prostredí, než komerčné sklá. Táto vlastnosť je daná potrebou rozpustnosti bioskla na podporu tkanivového rastu, narozdiel od inertnosti skla pri komerčnom použití. Biosklá vďaka tomuto dočasne podporujú liečbu a regeneráciu tkaniva.

Prvým skúmaným biosklom na protetické využitie bol systém $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. Nápad profesora Hencha, vynálezcu bioskla na vývoj materiálu, ktorý by bol zložený z rovnakých prvkov, ako sa vyskytujú v ľudskom tele bol založený na rýchlom začiatku rozpúšťania alkálií z povrchu vo vodnom roztoku a následným zrážaním vonkajšej vrstvy bohatej na fosfór a vápnik s vnútornou kremíkovou vrstvou. Práve druhú podmienku nespĺňajú sklá. Myšlienkou bolo navrhnuť vrchnú vápenato-fosfátovú vrstvu tak, aby pripomínala hydratovanú vápenato-fosfátovú zložku kostného tkaniva a sklo nebolo telom vylúčené[10].

2.2.3 45S5

Práve práca profesora Hencha sa zaslúžila o vznik prvého keramického bioskla. Jeho názov 45S5 pochádza zo zloženia skla zobrazeného v tab, komerčne vyrábaného pod názvom Bioglass®. Mimo schopnosti vytvorenia väzby s tvrdým tkanivom boli dokázané aj väzby

s mäkkým tkanivom, schopnosť diferencovania kmeňových buniek na osteoblasty či vytvorenie ciev vďaka neovaskularizácii podporenej 45S5[11].

Tabulka 2.1 Prvkové zloženie bioskla 45S5

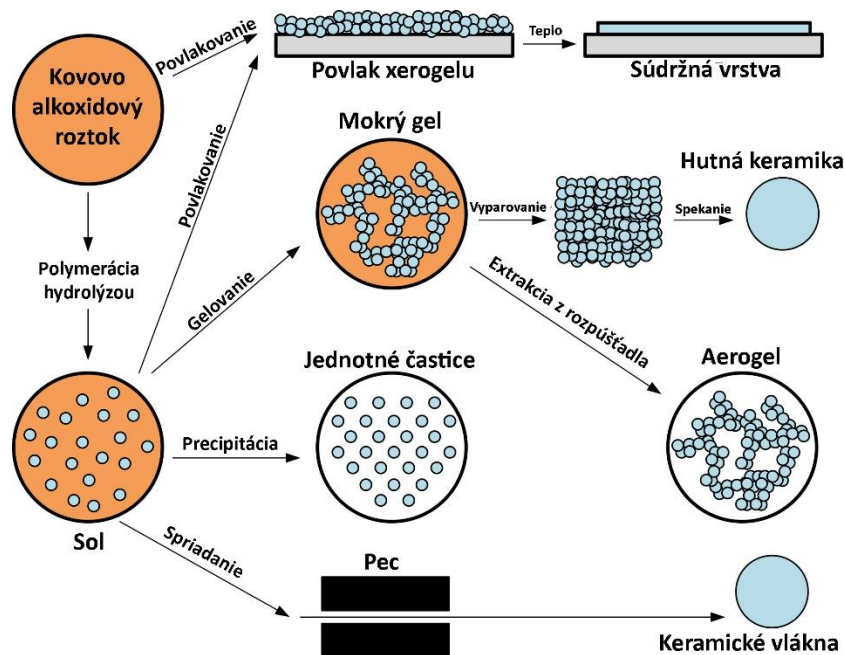
Oxid	Hm. %
SiO ₂	45
Na ₂ O	24,5
CaO	24,5
P ₂ O ₅	6

Biosklá sú konvenčne pripravované pomocou tavenia z oxidov a uhličitanov. Vďaka možnosti riadenia zloženia a mikroštruktúry sa však pokladá výroba cez sol-gel za prijateľnú alternatívu ku tradičnému postupu výroby bioskiel. Tá môže prebiehať pri zníženej teplote a tým sa vyhnúť nepríjemnostiam, spojenými s taviacou metódou. Na druhú stranu na použitie sol-gel metódy sú potrebné drahé materiály, dlhé procesné časy a zmršťovanie spojené so sušením a spekaním. Ďalšou nevýhodou pre niektoré použitia môže byť pomerne rýchly rozklad bioskiel pripravených touto metódou[12].

2.2.4 Sol-gel proces

Môžeme ho charakterizovať ako koaguláciu s následnou sedimentáciou či polykondenzáciu disperznej fáze ultramikroheterogénnych sústav – solov. Tento proces je vďaka termodynamike koloidných roztokov spontánny, môže sa však ovplyvňovať či urýchľovať na dosiahnutie požadovanej štruktúry produktu. Následne vznikne viazaný disperzný systém – gel, za ktorým dochádza ku sušeniu produktu kvôli odstráneniu disperzného prostredia, pričom vzniká xerogel. Práve sušenie má najväčší vplyv na vlastnosti produktu, ako sú pórovitosť či mechanické vlastnosti. Táto metóda je vhodná na prípravu veľmi čistých práškov, pričom nám umožňuje ovplyvniť veľkosť vzniknutých častíc a tým aj vlastnosti pripraveného materiálu[13].

Výhodami tejto metódy je vznik homogénneho, čistého produktu, pričom nepotrebujeme používať vysoké teploty. Vzniká nám produkt s pomerne nízkou hustotou, ktorého vlastnosti môžeme do istej miery upraviť počas výroby. Medzi nevýhody patrí vysoká cena východných látok a ich častá toxicita. Úprava podmienok pre vytvorenie požadovaného produktu je síce pozitívna, avšak táto metóda sa vyznačuje značnou citlivosťou na podmienky prípravy[14].



Obr. 3: Schématické zobrazenie rôznych možností technologických postupov solgel prípravy, upravené z[15]

2.2.5 Rozkladné reakcie

Bioaktívne sklá sú navrhnuté na rozklad a reagovanie v ľudskom organizme. Sú považované za povrchovo aktívne materiály, ktoré sú schopné vytvoriť mechanicky silnú chemickú väzbu so živým tkanivom, prevažne kosťou. Toto je založené na rozpustnosti skla a na následných zrážacích reakciách skla s okolnou tekutinou. Zmena koncentrácie iónov v okolitej tekutine má za následok vytvorenia uhličitanovo-hydroxyapatitovej (HCA) medzivrstvy. Tá je podobná anorganickému apatitu v kosti, čím vzniká chemická väzba implantátu s okolím na rozdiel od mechanických väzieb, akými sa prichytávajú nedegradabilné implantáty. Táto medzivrstva má podobné zloženie ako apatit v kostiach, rovnako ako aj veľkosť kryštálov. Zároveň spôsobuje osteokonduktivitu bioskla, čo vďaka jeho postupnej rozpustnosti robí z bioskla resorbovateľný materiál. Ióny vylúčené z bioskla následne aktivujú niekoľko rôznych génov, napríklad tie, zodpovedné za osteogénu a rast, nasledujúcu adsorpciou proteínov a uchytením buniek na povrchu reagujúceho skla[16].

2.2.6 Ďalšie použitie

Vplyv bioskla na regeneráciu kostného tkaniva bol dokázaný, avšak tieto materiály majú potenciál na uplatnenie sa pri regenerácii srdečného, pľúcneho či nervového tkaniva. Vrstva hydroxyapatitu, ktorá sa vytvára na povrchu bioskla je totiž schopná viazať sa aj na mäkké tkanivo, avšak mechanizmus pre interakcie bioskla a buniek, ktoré tvoria iné mäkké tkanivo nie je zatiaľ dostatočne pochopený[17].

2.2.7 Rozkladné mechanizmy

Sklo sa môže rozkladať kongurentne, t.j. pomer prvkov v roztoku je rovnaký ako pomer prvkov v rozkladajúcom sa skle, alebo nekongurentne, kedy dochádza ku preferovanému, či selektívnemu rozkladu niektorých prvkov. V princípe sa všetky kremičité sklá rozkladajú vo vodnom roztoku, avšak rozsah rozkladných reakcií závisí na zložení skla a roztoku. V rámci širšieho záberu môžeme rozdeliť tieto základné rozkladné mechanizmy na primárne reakcie,

ktoré formujú vnútornú vrstvu, bohatú na kremík a sekundárne zrážacie reakcie, ktoré formujú povrchovú vrstvu. Tieto reakčné mechanizmy vysvetľujú vytvorenie typickej dvojvrstvy u bioskiel.

Reakcie zodpovedné za vznik väzby s kosťou sú zvyčajne popísané ako jedenásť nadväzujúcich reakcií na povrchu bioskla. Prvých päť reakcií sa odohráva v rámci 24h na miestach s najväčšou bioaktivitou. Tieto reakcie vysvetľujú vznik dvojvrstvy hydratovanej siliky a polykryštalického HCA na povrchu skla. Nasleduje väzba s kosťou vďaka sérii biologických reakcií a počas šiestich až dvanástich dní je vytvorený konečný produkt – kolagén-HCA matrica, obsahujúca osteocyty[18].

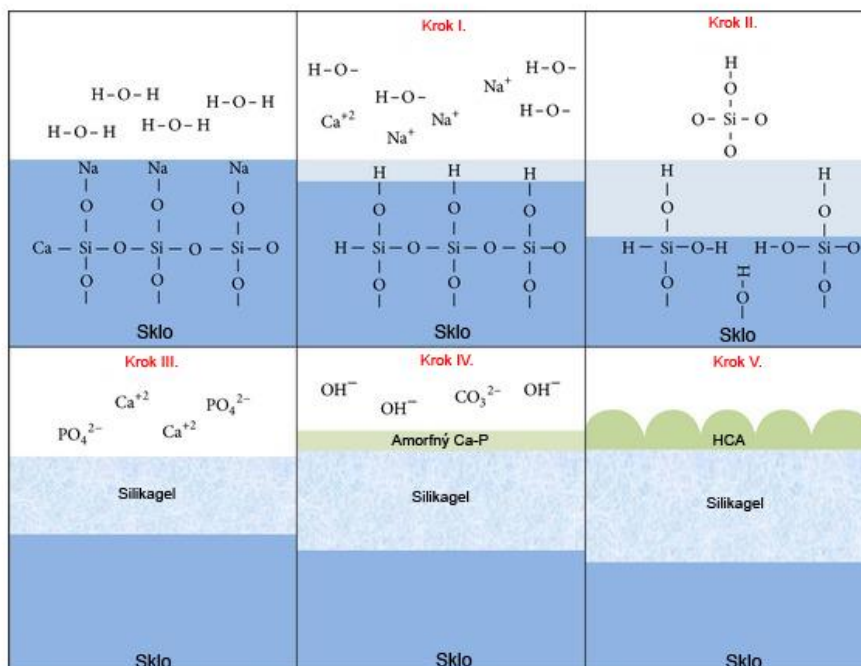
Pri $\text{pH} < 9$ dominuje selektívna výmena iónov alkálií s protónmi z okolitého roztoku. Rovnako môže reagovať aj kremičitá štruktúra s vodou. Tieto výmeny iónov a hydratácia spôsobujú vznik mierne poréznej, hydratovanej kremičitej vrstvy a zvýšenie pH okolitého roztoku.

Hydroxylové ióny pôsobia ako katalyzátor na rozklad siete a pri $\text{pH} > 9$ dochádza ku hydrolyze a depolymerizácii sklenenej štruktúry. Postupne môže dôjsť ku rozkladu silanolových skupín a uvoľneniu kremíku do roztoku. Rovnako môžu kondenzovať a vytvoriť na povrchu bioskla gél bohatý na kremík.

Vnútorná štruktúra, ktorá sa vytvorí spomínanými reakciami je často opisovaná ako vrstva bohatá na kremík, ktorá môže byť pórovitá a obsahuje vodu a silanolové skupiny. Sekundárne reakcie (zrážanie) začína v momente, keď sa dosiahne nasýtenie roztoku rozpustenými iónmi.

Gél bohatý na kremík na povrchu slúži ako základ pre migráciu iónov Ca^{2+} a PO_4^{3-} zo skla či zrážanie z okolitého roztoku za vzniku amorfnej vápenato-fosfátovej vrstvy, ktoré kryštalizujú za vzniku HCA. Táto vrstva môže slúžiť ako difúzna bariéra, ktorá môže spomaľovať ďalšie rozpúšťanie. Tento fakt vysvetľuje, prečo sa v niektorých prípadoch našli sklenené jadrá aj po rokoch od implantovania[19].

Celý postup je vykreslený na *Obr. 4*.



Obr. 4: ilustrácia mechanizmu vzniku HCA na povrchu bioskla po kontakte s telesnými tekutinami-
prevzaté z[20]

2.3 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HA) patrí spoločne s keramickými biosklami medzi vápenato-fosfátovú (Ca-P) keramiku, ktorá sa v rámci posledných desaťročí používa ako materiál na náhradu kostí. Z celej skupiny Ca-P keramiky má najmenšiu mieru degradácie. Kostí sú zložené z HA a kolagénových vlákien v pomere 70 % HA, 20 % kolagénu a 10 % okolitej vody. U cicavcov je hlavnou minerálnou zložkou apatit bez hydroxyly s pomerom $\text{Ca/P} < 1,67$ [21].

HA sa využíva najmä kvôli svojmu minerálnemu zloženiu podobnému štruktúre kostí a zubov. V prípade kostí má tento materiál za hlavnú úlohu vydržať zaťaženie. Vďaka jednoduchej príprave v podobe pevných nosičov s rôznou pórovitosťou sa používa na dosiahnutie čo najlepšej migrácie buniek a tvorbe kostí[22]. Rovnako sa môže podriť na nanoprášok a použiť v kombinácii s iným biomateriálom na lepšiu mineralizáciu kostí či integráciu implantátov[23].

2.3.1 Vlastnosti

Mechanické aj chemické vlastnosti ako aj molekulárne zloženie syntetického HA sú podobné tým, ktorými sa vyznačujú kosti a zuby. Kvôli tomu je už niekoľko rokov používaný ako biomateriál na ortopedické a zubné aplikácie na opravu či náhradu tvrdých tkanív. Syntetické biomateriály s HA sú skúmané na tvorbu umelých kostí zložených čisto zo syntetického HA alebo v rámci povlakovania materiálov HA. Popri biokompatibilite a bioaktivite sa rovnaký význam pokladá mechanickej pevnosti či poréznej štruktúre po vložení do organizmu[24].

Na výrobu kompozitov sa používajú prírodné a syntetické polyméry. Prírodné sa vyznačujú dobrou bunkovou afinitou, syntetické zase vylepšujú mechanickú pevnosť a disponujú upravovateľnou dobou degradácie[25].

2.3.1.1 Mechanické vlastnosti

Obsah HA zvyšuje pevnosť v tlaku ako aj elastický modul kompozitných nosičov. Žiaduca tvrdosť biomateriálov je pri použití na kostné implantáty rovná tvrdosti kosti. Pokiaľ je ich tvrdosť väčšia, prenikajú biomateriály do kosti. Kvôli veľkosti častíc sa na testovanie mechanických vlastností používajú skúšky tvrdosti v mikro- a nanoškále – Vickersonov intendačný či Knoopov pevnostný test[26].

2.3.1.2 Chemické vlastnosti

HA je rozpustný v kyslom a nerozpustný v zásaditom prostredí, pričom vo vode je čiastočne rozpustný, so stúpajúcim charakterom s pridaním elektrolytov do roztoku destilovanej vody. Rozpustnosť závisí na tvare, pórovitosti, kryštalinite, veľkosti kryštálov, atď. Pri spekanom HA je jeho rozpustnosť veľmi malá. HA reaguje aktívne s proteínmi, tukmi a ďalšími anorganickými či organickými zlúčeninami. Najzaujímavejšia vlastnosť HA je avšak jeho biokompatibilita – jeho schopnosť priamej chemickej väzby s pevným tkanivom[23].

2.3.2 Syntéza

Syntetický HA sa pripravuje pomocou prekursorov vápenatých a fosfátových solí, napríklad oxid vápenatý a kyselina fosforečná. Na syntézu môže byť použitých viacero techník prípravy ako napr. precipitácia, hydrolyza, hydrotermálna syntéza či extrakcia z prírodných zdrojov – rybacích a byvolích kostí, vaječných škrupín či ulít z morských živočíchov. Vďaka existencii viacerých spôsobov, ktorými je možné HA pripraviť je možnosť zvoliť metódu na základe ktorej dostaneme požadované vlastnosti výsledných častíc. Ďalším pozitívom je možnosť vybrať si cenovo najpriateľnejšiu cestu prípravy[27].

2.3.2.1 Príprava suchou cestou

Táto metóda dostala svoj názov, pretože nedochádza ku použitiu rozpúšťadla. Častice vyrobené touto metódou nemajú veľkú závislosť na reakčných podmienkach, čo z nej robí vhodného kandidáta na masovú produkciu HA prášku[28]. Medzi tento typ prípravy patrí napríklad mechanicko-chemický proces či vysokoteplotná syntéza v pevnom stave.

2.3.2.2 Príprava mokrou cestou

Na rozdiel od prípravy HA suchou cestou sa pri použití mokrých metód dosahuje oveľa pravidelnejších tvarov pripravených molekúl. Výsledná morfológia častíc má oveľa bližšiu závislosť na použitých reakčných podmienkach. Na prípravu sa však používajú nižšie teploty, čo môže mať za následok vznik iných CaP fáz ako HA[29].

Spomedzi rôznych spôsobov prípravy patriacich pod mokrú cestu sa najčastejšie používa konvenčný spôsob precipitácie v roztoku. Zakladá sa na fakte, že HA je pri laboratórnej teplote a pH 4,2 najstabilnejšou a najmenej rozpustnou fázou CaP vo vodnom roztoku[30].

Pri použití precipitácie je však potrebné dodržiavať rovnaké podmienky (teplotu, rýchlosť pridávania reagujúcich zložiek, otáčky miešania, atď.) kvôli reprodukovateľnosti veľkosti a tvaru pripravených častíc[31].

2.3.3 Použitie

Využitie HA v rámci tkanivového inžinierstva siaha až ku aplikáciám trikalciumpfosfátových (TCP) práškov na urýchlenie liečby kostí v roku 1920[32]. Povlakovanie HA práškami bolo prvýkrát použité na hliníkovú keramiku v rámci dentálnych implantátov a kovových náhrad pri prasklinách kostí.

Pri použití na náhradu kostí je potrebné vytvorenie poréznych nosičov, ktoré pomáhajú riadiť smer rastu kostného tkaniva[33]. Kvôli mimoriadne podobnému anorganickému zloženiu ku kostnému zubnému tkanivu je HA považovaný za ideálny materiál používaný vyše než 40 rokov v zubárstve a ortopédii[34]. Nanokryštály HA boli použité na zlepšenie regenerácie kostných chrupaviek. Oproti použitiu samotnej poly(lakto-ko-glykolidovej) kyseliny s pridaním HA dochádza ku stimulovaniu adhézie a lepšiemu prechodu chondrocytov a to i bez použitia pridaných rastových faktorov[35]. Kompozity s nanočasticovým HA sú taktiež skúmané ako nový spôsob liečby a prevencie nervových poranení[36].

Ďalším skúmaným odvetvým za posledné roky je použitie HA ako média v rámci *targetingu*, kdeže rozpustnosť HA silne závisí na pH prostredia, v ktorom sa nachádza. Tento fakt by mohol byť využitý pri liečbe nádorových ochorení, kde okolo týchto buniek máva pH ~ 5 oproti zvyčajnému pH buniek ~ 7 [37].

Hlavným problémom pri aplikácii HA sú jeho relatívne slabé mechanické vlastnosti, kvôli ktorým je nutné použiť ho v rámci povlakovania implantátov. Najčastejším spôsobom povlakovania je plazmové sprejovanie. Najdôležitejšou vlastnosťou povlakov je dobrá adhézia na substrát. Miera kryštalinity HA po naprášení určuje rozpustnosť vyrobenej vrstvy – čím väčšia kryštalinita, tým pomalšie sa bude HA rozpúšťať. Problémom použitia metódy plazmového sprejovania je použitie vyšších teplôt, ktoré môžu mať za následok zvýšenie amorfnej zložky nanoseného materiálu[38].

2.4 Peny

Jednou z hlavných úloh moderného tkanivového inžinierstva je vyrobiť nosiče, ktoré sa budú podobať architektonicky a mechanicky prírodným materiálom pri čom si uchovajú schopnosť stimulovať vlastné hojenie tkaniva.

2.4.1 Príprava poréznych štruktúr

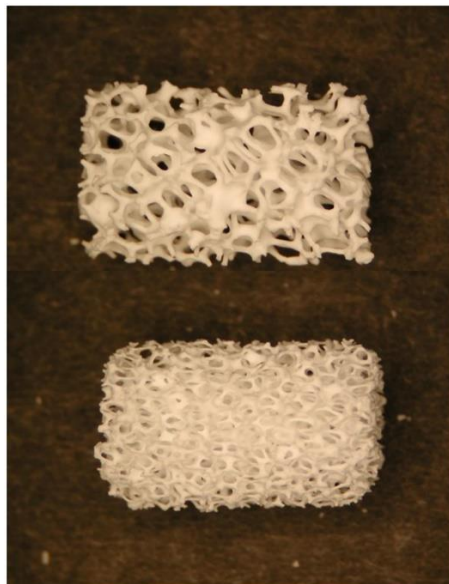
Všeobecne platí, že sa na prípravu pien môžu použiť dva základné spôsoby (1) vmiešanie externého plynu mechanicky, nástrek prúdu plynu či použitie hnacieho plynu alebo (2) vývoj plynu *in situ*. Dôležitým faktorom je stabilizácia peny pred následným spekaním. Kvôli vysokým teplotám potrebným na vytvrdnutie pien sa používajú povrchovo aktívne látky, ktoré znižujú napätie na rozhraní fázy pena-kvapalina. Toto spôsobí zastabilizovanie systému a pomáha proti rozpadnutiu požadovanej štruktúry počas odparovania kvapaliny. Podľa

rôzneho spôsobu prípravy spomínaného v texte vyššie delíme prípravu pien na niekoľko typov[39].

2.4.1.1 Replikačná metóda

Špongiová replikačná metóda je od svojho patentovania v roku 1963 najpopulárnejšou a najefektívnejšou metódou na prípravu nosičov na tkanivové inžinierstvo. Úspech prislúcha najmä jednoduchosti a možnosti použiť ju na ľubovoľný druh keramiky rozpustnej do formy suspenzie. Sieťovanie, ktorého možno dosiahnuť touto metódou je považované za najlepšie pre použitie v rámci náhrady kostí, pretože jeho štruktúra pripomína špongiovitú formu kosti. Ďalšou výhodou je možnosť zrezania špongie (ako nosiča pre túto techniku) na požadovanú veľkosť a tým sa priblížiť potrebám pacienta. Zároveň je možné presne ovládať veľkosť pórov a ich objem vo vzorku výberom šablóny[40].

Tento proces pozostáva z impregnácie pripravenej suspenzie z keramického prášku a spojiva (napr. polyvinyl alkohol na matricu – polymérnu špongiu. Prebytočná suspenzia sa odstráni z formy, ktorá je pyrolyzovaná a pri zvýšenej teplote dochádza k vypáleniu čistého keramického vzorku[41].



Obr. 5: fotografia dvoch komerčných hydroxyapatitových nosičov pripravených replikačnou metódou s rôznou porozitou. Prevzaté z[42]

Hlavným problémom tejto metódy je príprava homogénnej suspenzie s dobrými reologickými vlastnosťami, ktorej adhézia bude dostatočná na udržanie sa na forme. Suspenzia musí byť dostatočne tekutá, aby prenikla do pórov polymérnej špongie pri jej stláčaní a expanzii, zároveň však natoľko viskózna, aby na špongii ostal požadovaný povlak. Pokiaľ nedôjde ku odstráneniu všetkej prebytočnej suspenzie, objavia sa na výslednom produkte uzavreté póry.

2.4.1.2 Priame penenie

Proces priameho penenia patrí k najjednoduchším prípravám poréznych štruktúr. Jedná sa o vmiešanie plynu či kvapaliny do keramickej suspenzie, ktorá sa vďaka mechanickému vmiešaniu do suspenzie napení. Celková porozita pripraveného vzorku závisí na objeme

použitá daného penidla, pričom veľkosť pórov závisí na intenzite miešania počas penenia. Tento spôsob sa vďaka schopnosti pripraviť vysokoporézne vzorky s kontrolovanou veľkosťou pórov používa na mnoho aplikácií, ako sú napr. membrány či filtre[43].

Na udržanie napenenej formy pred následným sušením a vypálením je potrebné použiť povrchovo aktívne látky, ktoré vďaka svojmu amfifilnému charakteru molekúl dokážu znížiť napätie na fázovom rozhraní medzi suspenziou a bublinami, ktoré budú po vysušení tvoriť póry vzorku. Toto funguje avšak iba na krátky čas, preto majú takto pripravené peny nízku životnosť a musia sa čo najskôr podrobiť sušeniu a následnému výpalu[44].

2.4.1.3 Solid freeform fabrication (SFF)

Metóda SFF („*Solid freeform fabrication*“) tiež nazývaná ako rýchle prototypovanie je počítačom ovládaný spôsob prípravy nosičov v tkanivovom inžinierstve. Na vytvorenie modelu sa používa počítačom podporovaný dizajn (CAD), ktorý je vykreslený ako súbor na sebe uložených vrstiev. Používa sa napríklad na počítačové namodelovanie 3-D kostného defektu, ktorý sa následne prevedie na súbor vrstiev (slice) a následný 3-D model je vyrobený za použitia napr. stereolitografie či 3-D tlače[45].

Hlavnou výhodou tejto techniky je možnosť vytvorenia nosiča o tvare a rozmeroch, ktoré presne zapasujú potrebám pacienta. Zároveň je možné ovládať pórozitu, prepojenie pórov či poskytovanie biomimetickej štruktúry, ktorá sa líši v dizajne a použitých materiáloch. Hlavnou nevýhodou sú typy polymérnych materiálov, ktoré sa na túto techniku využívajú[46].

2.5 Kompozitné materiály

Kompozitné materiály sa skladajú z dvoch alebo viacerých rôznych materiálov alebo fáz jedného materiálu pričom výsledný výrobok má vlastnosti, aké nemá žiadna zo samotných zložiek. Prírodné biologické materiály ako sú kosti, drevo, dentín, či koža sú pokladané za kompozity[47].

2.5.1 Štruktúra kompozitných materiálov

Vďaka rôznej štruktúre východných materiálov dokážeme dostať rôzne vlastnosti. V tomto prípade môžeme hovoriť o rôznych vlastnostiach kompozitov vďaka – tvaru pôvodných surovín, objemového zloženia či ich medzifázového spojenia.

Základnými typmi kompozitov podľa výplne matrice sú časticové, vláknité a laminárne kompozity. Výplň sa môže líšiť veľkosťou či tvarom materiálu. Ďalším delenie kompozitov je určené usporiadaním výplne na orientované a náhodné kompozity[48].

2.5.2 Aplikácie kompozitných materiálov

Jedným z najdôležitejších pravidiel biokompozitných materiálov je, aby každá zložka kompozitu bola biokompatibilná a aby medzifáza medzi zložkami v ľudskom tele nedegradovala. Keramické aj polymérne kompozity sú považované za vhodné náhrady kostí[49].

2.5.2.1 Kostné náhrady

Môžeme ich rozdeliť podľa času degradácie na bioabsorbateľné, semiabsorbateľné či nedegradabilné. Rýchlosť absorpcie závisí na mnohých faktoroch, medzi ktoré patria napríklad:

veľkosť, distribúcia častíc, povrch materiálu či pórovitosť. Aj nesorbiteľné materiály dokážu byť absorbované makrofágmi, pokiaľ je veľkosť častíc dostatočne malá. Väčšina biokompatibilnej keramiky je osteokonduktívna, čo znamená, že kosť dokáže rásť na povrchu materiálu. Niektoré absorbovateľné keramiky sú osteoinduktívne a dochádza ku prerastaniu materiálu kostným tkanivom[50].

2.6 Spôsob testovania biomateriálov

Pred vypustením určitého biomateriálu na trh je nutné overiť jeho teoretické vlastnosti (biokompatibilitu, bioaktivitu, degradabilitu, atď.) sériou testov. Prvou vlnou testovania sú testy *in vitro*, ktoré sa uskutočňujú pomocou umelo udržiavaných buniek či tkanív. Po uspokojujúcich výsledkoch sa prechádza ku testovaniu *in vivo* na zvieracích modeloch (preklinické skúšky) a následne klinické skúšky *in vivo* na ľuďoch[51].

2.6.1 *In vitro* testy

In vitro je testovanie, pri ktorom je skúmaný komponent organizmu izolovaný z jeho zvyčajného biologického prostredia na preskúmanie jeho určitých interakcií. Patrí pod tzv. skúmvkové pokusy, pretože sa zvyčajne uskutočňujú v testovacích skúmvkách, bankách, Petriho miskách či mikrotitračných pipetách. Často sa používa ako prvá vlna testovania subjektov kvôli ich použitiu v rámci biomateriálov.

Kvôli komplexnosti živých organizmov, nespočetného množstva génov, proteínov, organických zlúčenín či systému orgánov v rámci mnohobunkových organizmov, ich vzájomnej bunkovej interakcii a rozdielnemu správaniu, ktoré závisí na podnetoch ako sú svetlo, teplo, dotyk a iné je ťažké pozorovať interakciu dvoch samostatných komponentov a skúmať ich biologické funkcie. Vďaka *in vitro* testovaniu sa môžeme sústrediť na deje, ktoré nás zaujímajú a izolujeme deje, ktoré našej štúdiu nie sú potrebné či výhodné.

2.6.1.1 „*Apatite ability*“ test

Simulované telesné tekutiny (simulated body fluid – SBF) sú roztoky o koncentrácii iónov podobných hodnôt ako v ľudskej krvnej plazme, ktoré sa používajú na . Udržiava sa v podobnom rozmedzí pH a teploty.

Prvou osobou, ktorá poukázala na možnosti použitia SBF na povrchové zmeny bioaktívnej keramiky bol Kokubo. Dnes sa SBF používa pri biomateriáloch v rámci počiatočných *in-vitro* testovania. Upravená SBF (corrected, c-SBF) avšak nemá presné zloženie iónov o koncentrácii krvnej plazmy, preto boli v rámci viacerých štúdií pokusy o vytvorenie SBF s presnejšou koncentraciou. (r-revised, i-ionized, m-modified, n-improved). U r-SBF je celková koncentrácia iónov rovnaká u krvnej plazmy, u i-SBF zase koncentrácia disociovaných iónov. M-SBF bola navrhnutá, aby mala koncentráciu všetkých iónov rovnakú, ako u krvnej plazmy, až na koncentráciu HCO^- , ktorá bola nastavená na nasýtenú hodnotu tekutiny. Po uzavretí r-SBF a i-SBF v nádobách bolo preukázané, že pri teplote $36,5^\circ\text{C}$ nedochádza ku zmene koncentrácii iónov a pH v priebehu dvoch týždňov. Po uplynutí tohto času dochádza ku zníženiu koncentrácie HCO^- a zvýšeniu pH. Pri použití rovnakých podmienok u c-SBF a m-SBF došlo ku týmto zmenám až po uplynutí ôsmich týždňov, z čoho vyplýva, že v závislosti

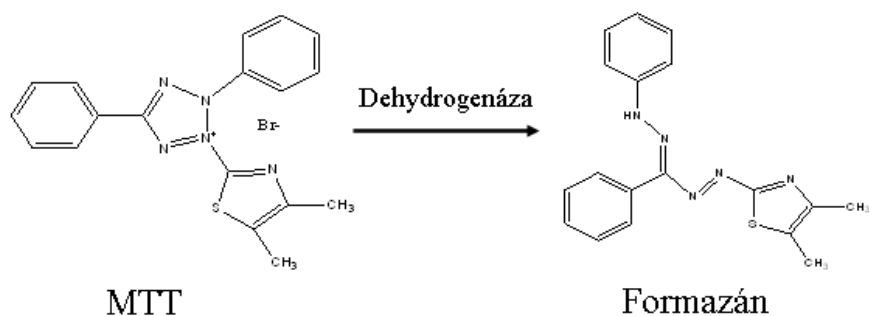
na zmene koncentrácie iónov sú tieto dve simulované telesné tekutiny stabilnejšie. Porovnanie chemického zloženia krvnej plazmy a SBF je zobrazené v *Tab. 2.2* [52].

Tab. 2.2 chemické zloženie rôznych typov SBF

Tekutina	Na⁺	K⁺	Mg²⁺	Ca²⁺	Cl⁻	HCO⁻	HPO²⁻	SO²⁻	Tlmič
Krvná plazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	-
Originálna SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0	TRIS
Upravená (c-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	TRIS
Tas-SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	125,0	27,0	1,0	0,5	TRIS
Bigi-SBF	141,5	5,0	1,5	2,5	124,5	27,0	1,0	0,5	HEPES
Revidovaná (r-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	HEPES
Modifikovaná (m-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	10,0	1,0	0,5	HEPES
Ionizovaná (i-SBF)	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5	HEPES
Vylepšená (n-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5	TRIS

2.6.1.2 Testy cytotoxicity

Na základné testovanie cytotoxicity biomaterálov sa používa metóda „*MTT assay*“ ktorá patrí medzi kolorimetrické testovacie metódy pre živé bunky. Je založená na tetrazolovej soli MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid), ktorá je pridaná ku testovanej vzorke, kde vďaka inkubácii v prítomnosti živých buniek dochádza ku redukcii žltu sfarbeného MTT na tmavomodrý formazán, ktorého pevná forma sa rozpustí v izopropanole kvôli homogenizácii pre meranie optickej hustoty vzorky pri vlnovej dĺžke 570 nm. Vďaka schopnosti MTT reagovať iba s metabolicky aktívnymi bunkami je množstvo vzniknutého formazánu priamoúmerné počtu živých buniek v testovanej vzorke. Hlavnou výhodou tejto metódy je jej rýchlosť a presnosť, pričom nie je potrebné použitie rádioizotopov[53].



Obr. 6: redukcia MTT na Formazán v prítomnosti živých buniek, upravené z[54]

2.6.2 In vivo testy

Termín *in vivo* odkazuje na procedúry či experimenty, ktoré sú skúmané na živom organizme, napr. laboratórnom zvierati či človeku. Na rozdiel od *in vitro* testovanie je táto časť potrebná k určeniu reakcie celého tela. Vzhľadom na množstvo reakcií, ktoré v organizmoch prebiehajú

simultánne môžeme dostať z týchto testov kompletne rozdielne výsledky než pri *in vitro* testovaní[55].

Preukázanie biokompatibility v rámci *in vitro* testovania teda neznamená, že môžeme považovať výsledok za konečný. V rámci kompletného výsledku musíme podrobiť skúšanú látku ďalším preklinickým testom.

Vo svojej práci sa budem venovať bližšie *in vitro* testovaniu keramických kompozitov v rámci interakcie s SBF.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Príprava keramických práškov

3.1.1 Syntéza hydroxyapatitu

Na prípravu hydroxyapatitu (HA) bola vybraná precipitačná metóda vo vodnom prostredí podľa rovnice:



Ktojej príprava bola vybraná ako najvhodnejšia podľa predošlých experimentov[56]. Do reakčnej nádoby (*Obr. 7*) opatrenej elektronickým miešadlom bolo na prípravu 20 g HA naliatych 75 ml HN_3 s 300 ml vody. Po dobu 30 minút sa do reaktoru prikvapkávali vodné roztoky H_3PO_4 a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Miešanie bolo nastavené na 400 ot./min, ktoré prebiehalo ešte nasledujúce 2 hodiny po pridaní všetkých reagentov. Po starnutí roztoku prišla na rad viacnásobná dekantácia a odstredovanie až po dosiahnutie neutrálneho pH zvyšného roztoku.

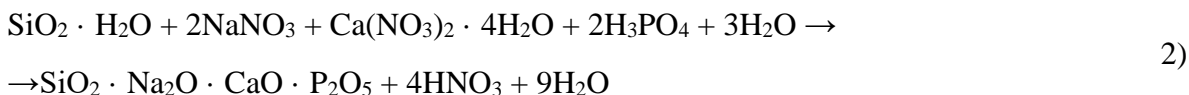


Obr. 7: fotografia aparatury na prípravu HA

Ďalším krokom v úprave HA bolo vysušenie produktu v sušiarňi pri teplote 105 °C. Týmto štýlom bolo pripravených niekoľko sérií HA, každá z nich charakterizovaná na zistenie čistoty a následné zmiešanie do jednej sady.

3.1.2 Syntéza bioskla 45S5

Na syntézu bioskla bola použitá metóda sol-gel podľa rovnice:



Na prípravu 45S5 sa väčšinou používa ako zdroj SiO₂ tetraetyl ortosilikát (TEOS), ktorý sme sa kvôli jeho cene pokúsili nahradiť lacnejším Levasilom s obsahom SiO₂ 40%. Hodnota SiO₂ bola stanovená metódou straty žíhaním.

Ako prvý sa do kadičky pridala navážka Levasilu, ktorá bola okyslená šiestimi kvapkami HNO₃, aby sa upravilo pH (10→1) kvôli kyslej katalýze, ktorá predpokladá vznik nanočastíc[57]. Za stáleho miešania na magnetickej miešačke bol pridaný zdroj P₂O₅ v podobe H₃PO₄, následne NaNO₃ ako zdroj Na₂O a ako posledné Ca(NO₃)₂ kvôli CaO· 4H₂O podľa navážok v *Tab. 3.1*.

Tab. 3.1 prehľad navážok na prípravu 5 g Bioskla 45S5

Látka	Množstvo
NaNO ₃	3,364 g
Ca(NO ₃) ₂	5,518 g
Levasil	5,572 g
H ₃ PO ₄	0,290 ml

Sol bol miešaný ďalších 30 minút, a nechal starnúť 48 hodín. Po zgelovaní prišlo na rad sušenie pri teplote 105 °C. Rovnako ako pri príprave HA bolo pripravených viacero sérií 45S5, ktoré boli po dôkladnom charakterizovaní zmiešané do jednej sady.

Pripravené látky HA a 45S5 boli na vibračnom mlyne pomleté a podrobené Röntgenovej difrakčnej analýze (XRD). Zmerané boli taktiež metódy na získanie špecifického merného povrchu - Brunauer–Emmett–Teller (BET) a veľkosti častíc.

3.1.3 Príprava zmesí na tvorbu kompozitov

Ďalej boli vytvorené zmesi 45S5 s HA v hmotnostných pomeroch podľa *Tab. 3.2*.

Tab. 3.2 hmotnostný pomer 45S5 a HA v pripravených zmesiach a ich označenie

Názov vzorky	Pomer 45S5:HA
HA	0:1
K 10/90	1:9
K 25/75	1:3
K 50/50	1:1
45S5	1:0

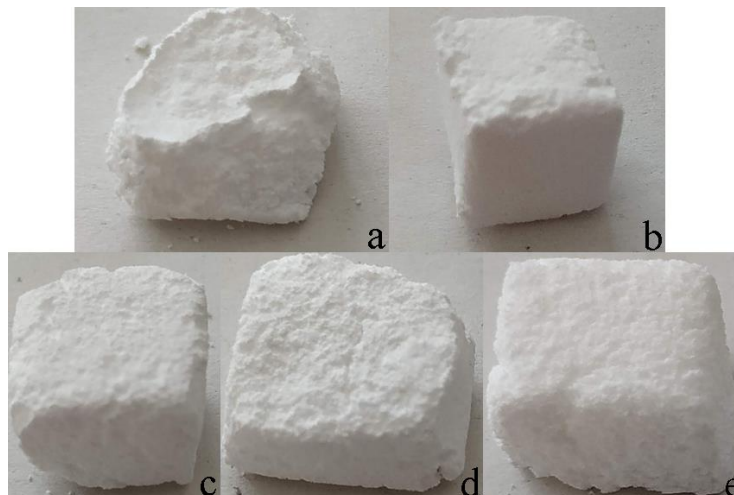
Zmesi boli následne premiešané na trepačke hlava-päta po dobu 3 hodín.

Pre prípravu penových vzoriek boli vzorky študované z hľadiska správania pri spekaní pomocou žiarovej mikroskopie (ŽM). Jednotlivé metodiky sú popísané v kapitole 3.3.

3.2 Výroba napenených vzoriek

Na prípravu poréznych kompozitov bola vybratá metóda tzv. priameho penenia vo vodnej suspenzii. Ako povrchovo aktívna látka bola použitá komerčná povrchovo aktívna látka Schäumungsmittel v koncentrácii 0,25 hm.% (na sušinu). Magnetickou miešačkou bol zhomogenizovaný prášok do vzniku suspenzie, do ktorej bol pridaný tenzid. Takto napenené vzorky boli odliate do predpripravených hliníkových foriem a pripravené na sušenie. Sušiaci program pozostával zo sušenia pri teplote 50 °C po dobu 4 hodiny, 80 °C na 12 hodín a následne bola sušiareň nastavená na teplotu 110 °C na 3 hodiny. Postupné zvyšovanie teploty bolo použité kvôli cielenému, postupnému odparovaniu vody zo vzorky, čím sa zabránilo rýchlemu prechodu bublín z vnútornej časti vzorku na povrch a porušeniu poréznej štruktúry vzorky.

Vysušené peny boli vypálené v kantalovej peci. Teploty spekania boli získané z analýzy ŽM.



Obr. 8: fotografia napenených nosičov priamym penením, po spekaní, a) 45S5, b) HA, c) K 10/90, d) K 25/75, e) K 50/50

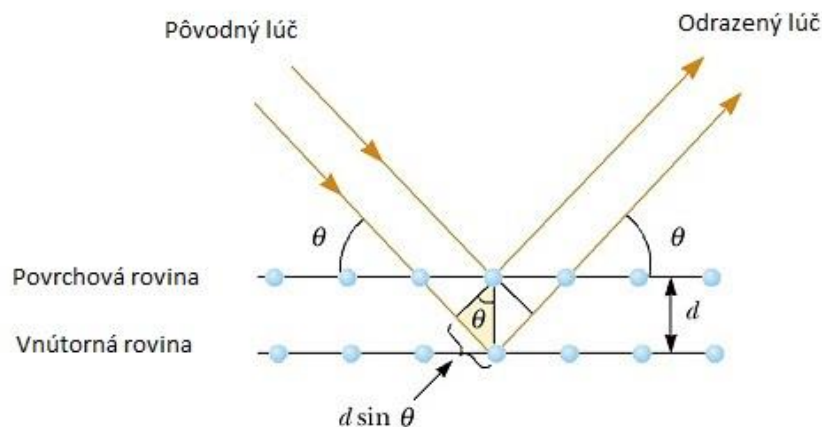
3.3 Charakterizácia pripravených materiálov

3.3.1.1 Röntgenová difrakčná analýza

Pre charakterizáciu štruktúrneho a fázového zloženia pripravených vzoriek sme vybrali analytickú metódu založenú na röntgenovej difrakcii. Postupným menením uhlov dopadu röntgenových lúčov dopadajúcich na materiál s kryštalickou mriežkou dochádza k rozptylu a interferencii odrazených zväzkov s určitým smerom pôsobenia. Žiarenie, ktoré splní Braggovu podmienku:

$$2d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda \quad 3)$$

a teda dopadajúce monochromatické žiarenie bude mať rovnakú dráhovú vzdialenosť ako žiarenie po odraze, dôjde ku pozitívnej interferencii. Týmto sa dosiahne difrakčného maxima, ktoré je špecifické polohou a tvarom pre daný typ atómu. Výstupom tejto analýzy je difraktogram[58].



Obr. 9: schéma princípu Braggovej podmienky; prevzaté z[59]

Na analýzu boli vzorky pomleté, zhomogenizované a merané na prístroji Empyrean od firmy Panalytical (viď Obr. 10). Použitá bola medená anóda, krok bol nastavený na 0,013, pričom na ose x bolo rozmedzie nastavené na 5-90° Théta. Výsledné spektrá boli spracované pomocou programu Highscore, kde porovnaním s databázami (ICOD, ICCD PDF4) boli zistené fázové zloženia produktov. Nájdené zhodné štruktúry v databázi neobsahovali dostatočné dáta pre určenie semikvantitatívneho či kvantitatívneho zloženia.



Obr. 10: difraktometer Empyrean od firmy Malvern Panalytical[60]

3.3.1.2 Stanovenie merného povrchu (BET)

Na určenie špecifického merného povrchu disperzných/poréznych materiálov bola použitá metóda BET, ktorej pravidlo o fyzisorpcii molekúl plynu na povrchu pevných látok je základom tejto analytickej metódy. Ide o rozšírenie Langmuirovej izotermy, kde molekuly

plynu fyzisorbujú na povrch pevnej látky vo vrstvách, ktoré spolu neinteragujú. Rovnica izotermy (4) bola navrhnutá Brunauerom, Emmettom a Tellerom, aby presnejšie vystihovala jej reálny tvar, kde:

$$n_a = n_m \frac{C \frac{P}{p_0}}{\left(1 - \frac{P}{p_0}\right) \left[1 + (C - 1) \frac{P}{p_0}\right]} \quad 4)$$

n_a = objem adsorbovaného plynu pri danej teplote a tlaku

p = rovnovážny tlak adsorbátu, p_0 = saturačný tlak adsorbátu

n_m = objem plynu v monovrstve

C = BET konštanta

Kde n_m závisí na hodnotách smernice a absolútneho člena preloženej priamky[61].



Obr. 11: NOVA 2200 od Quantachrome instruments na určenie špecifického merného povrchu látok[62]

Vzorky boli pre meranie navážené do meracej cely (s presnosťou 0,0001 g), cela so vzorkou bola vložená do odplyňovacej komory, kde bola vzorka za zvýšenej teploty a vákua pred upravená pre samotné meranie, odplynená vzorka bola vložená do meracej cely, kde prebiehalo samotné meranie v tekutom N_2 , ako adsorpčný plyn bol použitý N_2 (4N).

3.3.1.3 Meranie veľkosti častíc

Na zistenie distribúcie veľkosti častíc pripravených keramických práškov bolo použité meranie za použitia laserovej difrakcie. Funguje na princípe lasera odrazeného od meranej vzorky,

pričom zmena uhla rozptýleného laserového zväzku je nepriamo úmerná veľkosti častíc. Vzorky boli merané na Sympatec HELOS (H2568)& RODOS.



Obr. 12: laserový analyzátor veľkosti častíc HELOS (H2568)&RODOS

3.3.1.4 Žiarová mikroskopia

Patrí medzi termické analýzy, ktoré študujú zmeny vlastností skúmaného vzorku na základe prednastaveného teplotného programu. Výhodou tejto analýzy je optické sledovanie rozdielov vlastností materiálu pri jeho ohrievaní. Výstup je následne možné ako funkciu tvarovej teploty vzhľadom na modifikačné či tvarové premeny, štruktúrne zmeny či mechanické a teplotné závislosti.

V našom prípade boli podrobené ŽM všetky vzorky od prípravy práškov až po prípravy samotných zmesí. Hlavným cieľom bolo stanoviť teploty spekania, ktoré boli použité na vytvrdenie vyrobených napenených produktov a porovnanie teplôt na spekanie zmesí oproti samotným látkam.



Obr. 13: Žiarový mikroskop LEITZ 2A-P[63]

3.3.1 Termická analýza

Vstupné vzorky aj zmesi boli taktiež analyzované pomocou termickej analýzy na prístroji Q600 (TA Instruments). Navážka (cca 30 mg) bola zahrievaná krokom 10 °C/min na teplotu 1400

°C. Správanie vzoriek v teplotnom poli bolo pozorované z hľadiska hmotnostnej krivky (TG) a jej derivácia (DTG) a tepelne sfarbených reakcií pomocou krivky (DTA).

3.3.2 Testovanie porozity napenených vzoriek

Na otestovanie porozity pripravených vzoriek bola použitá Archimedova metóda merania hustoty (ČSN 623-2), pri ktorom sa dopredu vysušené, zvažené (m_s) vzorky v sklenenej nádobe evakuovali rotačnou vývevou po dobu 1 h, následne bola pod vákuom pripustená kvapalina o známej hustote a celá sústava bola naďalej evakuovaná. Po uplynutí 1 h boli vzorky prenesené na analytické váhy opatrené špeciálnym nástavcom na meranie hustoty. Vzorky sa vybrali na závesné váhy a odvážili pod hladinou (m_a), následne sa mierne otreli od prevyšujúcej kvapaliny a odvážené v hornej časti vážiaceho nástavca (m_p). Pre výpočet porozity bola použitá teoretická hustota jednotlivých komponentov.

$$\rho_{rel} = \frac{m_s \cdot \rho_{H_2O}}{(m_p - m_a) \cdot \rho_{teor}} \cdot 100 \quad 5)$$



Obr. 14: fotografia aparatury pre meranie porozity keramických nosičov Archimedovou metódou

3.4 Štúdium interakcie pripravených vzoriek v simulovanej telesnej tekutine

3.4.1 Príprava SBF

Pre štúdium interakcie simulujúcej telesné procesy bol vybraný fyziologický roztok (c-SBF) podľa Kokuba[52]. Na jeho prípravu bolo do plastovej nádoby, zahrievanej na teplotu $36,5 \pm 1,5$ °C bolo za stáleho miešania magnetickou miešačkou naliatych 700 ml destilovanej vody. Celý proces bol kontrolovaný pomocou pH metru. Do roztoku boli postupne pridávané látky podľa poradia v *Tab. 3.3*. Nasledujúci reagent bol pridaný do roztoku až po úplnom rozpustení predošlého. Kvôli hygroskopii niektorých látok bolo potrebné navažovať ich čo najrýchlejšie. Keďže má CaCl_2 najväčší podiel na nežiadúcej precipitácii apatitu v našom roztoku je ho potreba pridávať pomaly.

Tab. 3.3 poradie a množstvo pridávaných zlúčenín na výrobu 1000 ml SBF

Poradie	Zlúčenina	Množstvo
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g
6	1.0M HCl	39 ml
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,576 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	Tris	6,118 g

Prvých osem látok bolo pridaných pri vyššie uvedenej teplote, bez ohľadu na pH roztoku. Po pridaní Na₂SO₄ bol celkový objem roztoku zvýšený na 900 ml pridaním destilovanej vody. Pridávanie Tris bolo pomalé pri teplote 36,5 ± 1,5 °C kvôli veľkému skoku pH a vyzrážaniu apatitov v roztoku. Teoretické množstvo Tris však nestačilo na konečnú úpravu pH o hodnote 7,40 a tak bolo do roztoku pridávané ďalšie množstvo Tris. Po dosiahnutí pH 7,30 ± 0,05 bola teplota udržiavaná na hodnote 36,5 ± 0,5 °C a následne bol opatrne pridávaný ďalší Tris až po dosiahnutí pH 7,40. Po ustálení pH bol roztok ochladený na laboratórnu teplotu, pridaná destilovaná voda na celkový objem roztoku 1000 ml a uschovaný v chlade[64].



Obr. 15: fotografia aparatury na prípravu SBF

3.4.2 Inkubácia v SBF

Na ďalšie testovanie pripravených poréznych vzoriek boli napenené nosiče vložené do plastových nádob s viečkom a následne bol pridaný roztok SBF. Objem bol spočítaný podľa povrchu a hmotnosti vzoriek podľa Kokuba[52].

Takto pripravené vzorky boli vložené do inkubátoru s temperovanou teplotou 36,5 °C po dobu 3, 7, 14 a 21 dní.



Obr. 16: fotografia inkubátoru na vzorky v SBF

3.4.3 Spektrofotometrické stanovenie prvkov v SBF

Vzhľadom na reakcie prebiehajúce na povrchu vzoriek a vzniku HCA vrstvy sa mení koncentrácia iónov v SBF. Medzi tieto ióny patria Ca^{2+} a PO_4^{3-} . Na ich analýzu sme použili spektrofotometrické metódy.



Obr. 17: fotografia použitého spektrometra Hach Lange DR2800

3.4.3.1 Stanovenie Ca^{2+}

Prvým zo stanovovaných koncentrácií iónov v SBF bol vápnik, na ktorý sa využilo činidlo Arzenázo III, čo je metalochrómne farbivo s citlivosťou na Ca^{2+} a využíva sa na stanovenie vápniku v neutrálnych roztokoch a roztokoch s použitím tlmivcov. Na toto stanovovanie sa použil roztok o koncentrácii 200 $\mu\text{l/l}$. Na toto stanovovanie bola použitá metóda kalibračnej krivky, kde sa pripravili roztoky o koncentrácii 0,5 až 5 mmol/l CaCl_2 . 10 μl analyzované vzorky bolo následne nabitých do kyvety spoločne s 1 ml farbiva Arzenázo III a stanovované

pri vlnovej dĺžke 650 nm. Pri normálnom stanovovaní sa použili rovnaké množstvá SBF a farbiva ako pri vytvorení kalibračnej krivky.

3.4.3.2 Stanovenie PO_4^{3-}

Princípom je reakcia fosforečnanov s molybdenanom amónnym na fosfomolybdenany, ktoré sú po redukcii roztokmi hydrochinónu a siričitanu sodného na molybdenovú modrú vhodné ku spektrofotometrickému stanoveniu. Táto metóda je vhodná pre všetky druhy biologických materiálov.

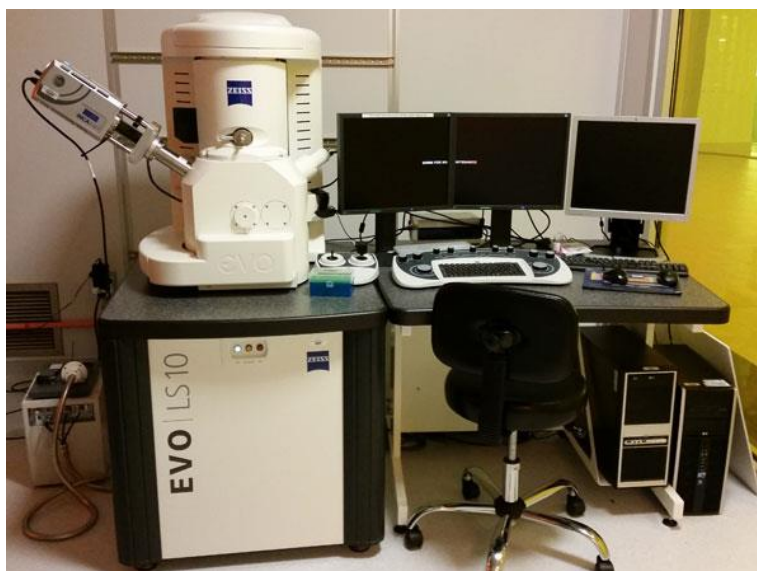
Na toto stanovenie boli pripravené roztoky: 1 l roztoku molybdenanu amónneho (Mo) (25 g molybdenanu amónneho, 500 ml H_2O , 300 ml konc. H_2SO_4), 1 l roztoku hydrochinónu (Hy) (300 ml H_2O , 0,5 g hydrochinónu, pár kvapiek H_2SO_4 proti oxidácii) a 100 ml roztoku siričitanu sodného (Na) (20 g siričitanu sodného). Všetky roztoky boli pripravené v odmerných bankách, doplnené po rysku destilovanou vodou.

Kalibračná krivka bola pripravená roztokom (A) dihydrogenfosforečnanu amónneho (0,3714 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v 1000 ml H_2O), ktorý bol štvornásobne zriedený a tým bol pripravený roztok (B), kde 1 ml roztoku obsahuje 25 μg fosforu. Do 10ml odmerných baniek bolo následne pridaných 0,0;0,1;0,2;0,3;0,4;0,5;0,6 a 0,7 ml zriedeného roztoku B, následne bol do každej banky pridaný 1 ml roztoku Mo, Hy, Na. Každá banka bola pretrepaná a po 30-tich minútach zmeraná pri vlnovej dĺžke 610 nm[65].

Pri stanovovaní koncentrácie fosforu v SBF bolo množstvo dávkovanej SBF 0,1 ml, zvyšné množstvá roztokov boli použité v rovnakom objeme ako to bolo pri príprave kalibračnej krivky.

3.5 Rastrovacia elektrónová mikroskopia

Na pozorovanie interakcie (rastu vrstvy HCA) na povrchu vyrobených vzoriek bola použitá rastrovacia elektrónová mikroskopia (SEM) EVO LS 10 od firmy ZEISS.



Obr. 18: skenovací elektrónový mikroskop EVO LS 10 od Firmy ZEISS, prevzaté z[66]

Na meranie vzoriek pomocou SEM je potrebné mať vodivý povrch sledovaného materiálu. V našom prípade bolo potrebné vytvoriť pred meraním na vzorkách vodivú vrstvu, vďaka ktorej

budú pri skenovaní povrchu vznikajú vyrazené (sekundárne) elektróny, ktorého miesto bolo následne zaplnené elektrónom z vyššej hladiny a došlo k vyžiareniu energie vo forme fotónov[67].

3.5.1 Príprava vodivého povrchu vzoriek

Kvôli nevodivým vlastnostiam pripravených vzoriek bolo potrebné upraviť ich povrch pred samotným meraním, čo v našom prípade znamenalo využitie vakuového naprašovania použitím vakuovej naprašovačky POLARON SC 7640.



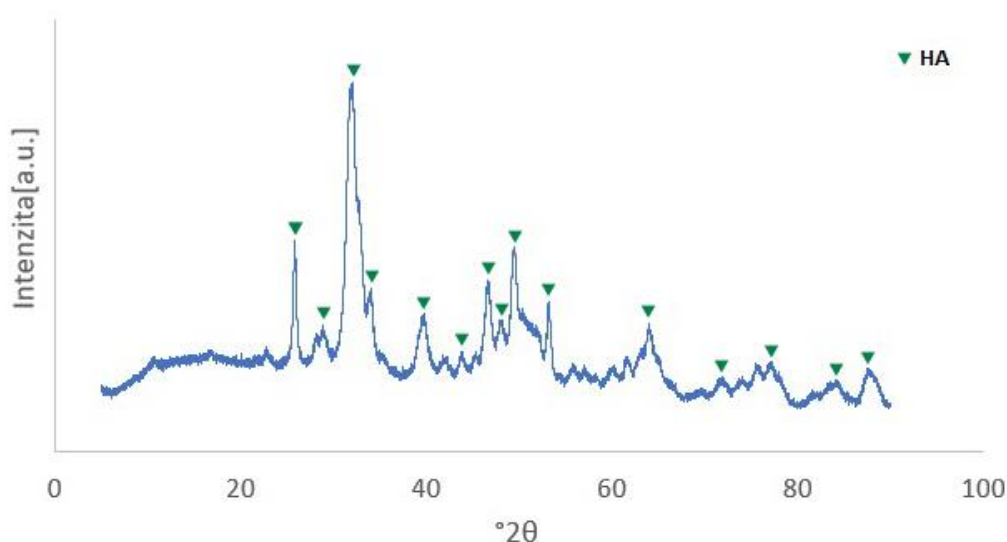
Obr. 19: vakuová naprašovačka POLARON SC 7640, prevzaté z[63]

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Syntéza keramických práškov

4.1.1 Hydroxyapatit

Kvôli zvýšenej výťažnosti a čistote pripraveného prášku bola využitá precipitačná metóda syntézy s nadbytkom hydroxidu amonného. Po podrobení pripraveného prášku röntgenovej difrakcii sa zistilo, že nadbytok hydroxidu (zvýšenie pH) vedie ku vzniku čistého HA. Na premývanie vzniknutého produktu bola použitá dekantácia striedaná s odstred'ovaním pridaním destilovanej vody až do zbavenia všetkých alkálií. Následne bol produkt podrobený XRD analýze (*Obr. 20*) na potvrdenie čistoty pripraveného prášku. Analýza potvrdila fázovo čistý produkt.



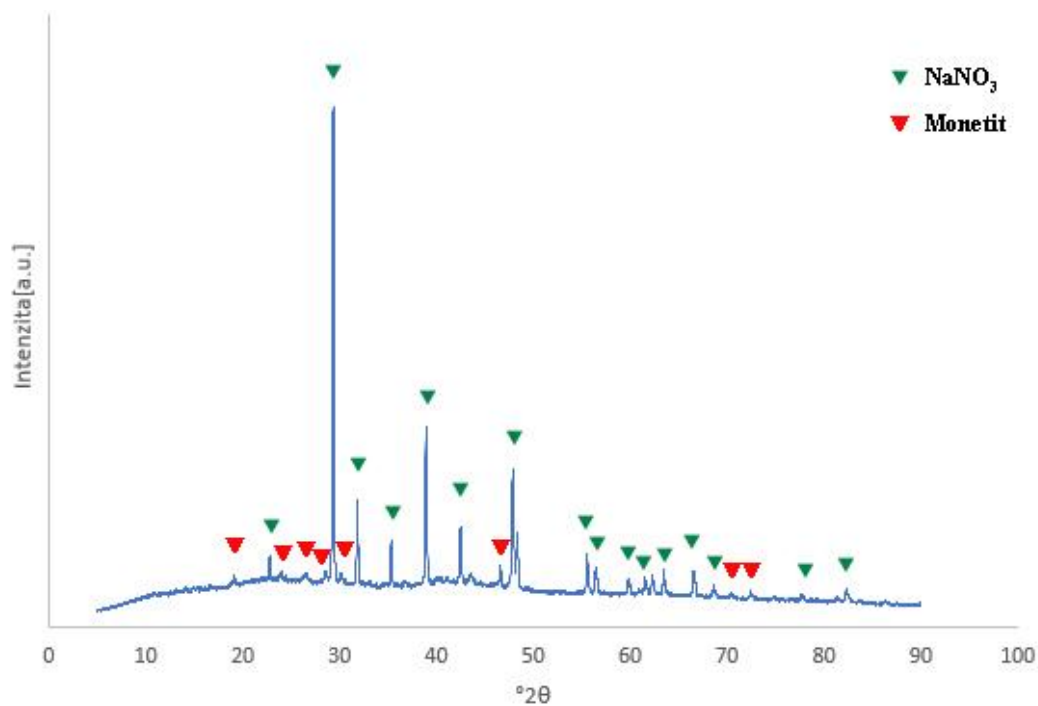
Obr. 20: röntgenový záznam pripraveného HA prášku

4.1.2 Biosklo

Biosklo (45S5) bolo vyrobené sol-gel metódou z dusičnanových a koloidných prekursorov gelovaním. Na prípravu boli otestované dva rôzne typy reagentov. V prvom prípade bolo zdrojom Na_2O a SiO_2 vodné sklo. Problém bol avšak s obsahom vody vo vodnom skle a pH, kvôli ktorému nedošlo ku cielenému zgelovaniu bioskla.

Druhým postupom bolo použitie Levasilu (40 hm.% komerčný roztok koloidnej siliky stabilizovaný amonnými iónmi) ako zdroja SiO_2 a dusičnanu sodného pre Na_2O , pri ktorom došlo ku zgelovaniu solu po 48 h. Po usušení a pomletí bola zistená čistota pripraveného 45S5 röntgenovou difrakciou rovnako ako v prípade HA.

Tu sa zistilo, že usušený gél nie je amorfný, ako sa predpokladalo. Bol zistený nezreagovaný NaNO_3 a vyzrážané fosforečnany. Štruktúra sa teda líšila od zloženia komerčného zloženia 45S5. Aj napriek tomu bola ďalej testovaná ako vhodný zdroj bioresorbovateľnej zložky kompozitu (vid' *Obr. 21*).

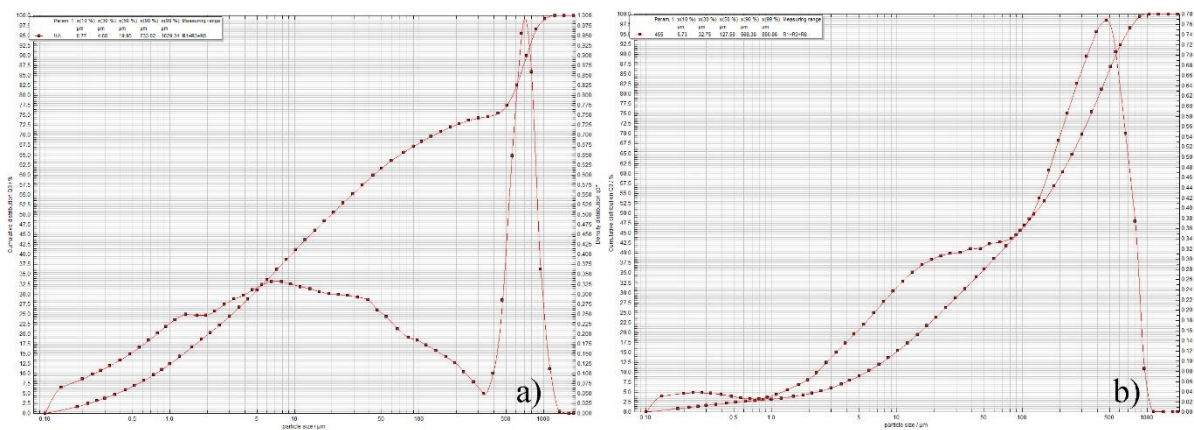


Obr. 21 röntgenový záznam pripraveného 45S5 prášku

4.1.3 Charakterizácia pripravených práškov pre ďalšie použitie

Oba nasyntetizované keramické prášky boli podrobené stanoveniu veľkosti častíc a merného povrchu.

Veľkosť častíc bola stanovená v rádoch μm .



Obr. 22: záznam merania veľkosti častíc pripravených keramických práškov

Výsledné hodnoty stredných veľkostí častíc sú zhrnuté v *Tab. 4.1*. Stredná veľkosť častíc 45S5 spadá do rozmedzia prvého komerčne predávaného produktu na bázi Bioglass® 45S5 – PerioGlas 90 – 710 μm [68]. Pri HA, sa podarilo pripraviť o jeden rád menšie častice, čo potvrdzujú aj výsledky merného povrchu, ktoré boli zmerané metódou BET. Hodnoty merných povrchov pripravených práškových materiálov sú zhrnuté v *Tab. 4.2*.

Tab. 4.1 stredná veľkosť častíc pripravených keramických práškov

Vzorka	D50 [μm]
HA	19,95
45S5	127,58

Tab. 4.2 namerané hodnoty merného povrchu pripravených práškov

Vzorka	Merný povrch [m^2/g]
HA	77,23
45S5	4,52

4.2 Príprava a charakterizácia napenených vzoriek

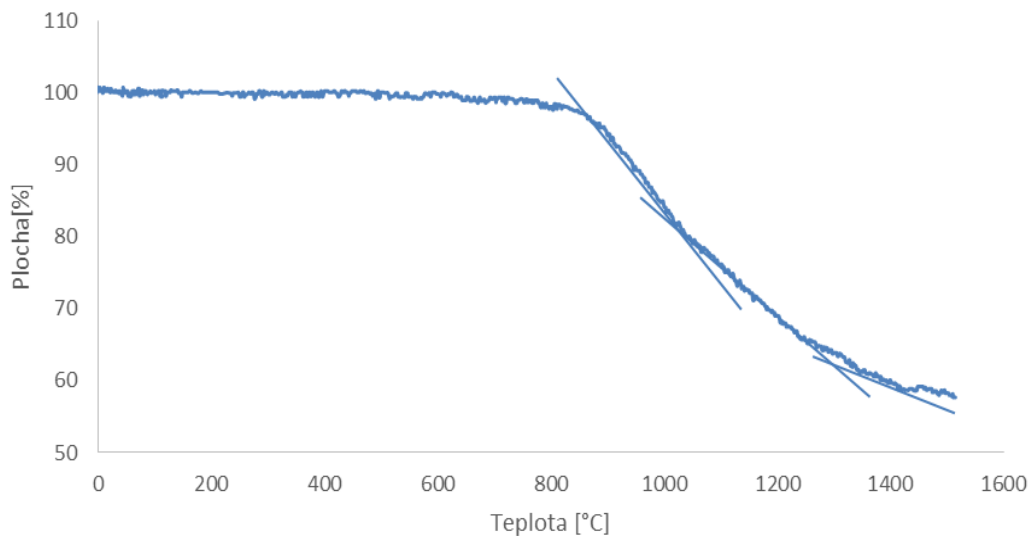
4.2.1 Príprava kompozitných vzoriek

Pripravili sme kompozitné zmesi zmiešaním nasyntetizovaných práškov v hm. pomere podľa tabuľky 3.1.3. Zmesi boli ďalej charakterizované z hľadiska určenia vhodnej teploty spekania.

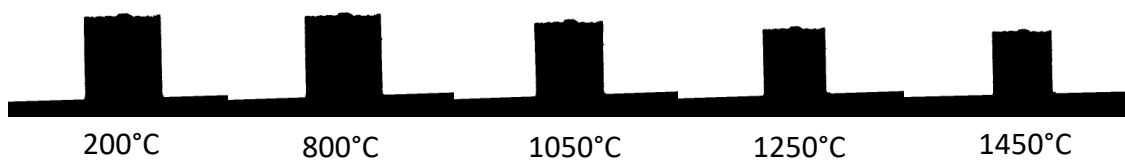
4.2.1.1 Stanovenie spekacích teplôt

Pripravené zmesi boli podrobené ŽM a TGA, aby sme dostali teploty spekania a charakterizáciu teplotne zafarbených prechodov.

V prípade ŽM u vzorky HA prvá oblasť na Obr. 23 v rozmedzí 800 - 1050 °C pravdepodobne pripadá dehydroxylácii hydroxyapatitu. Následne je zrejماً druhá oblasť od 1050 do 1250 °C a od 1250 do 1400 °C. Tieto oblasti pripadajú spekaniu a rozpadu hydroxyapatitu na trikalcium či dikalcium fosfát, z ktorej bola stanovená teplota spekania čistého HA prášku 1250 °C[69]. Pri spekaní došlo ku zmršteniu materiálu o približne 40 %.



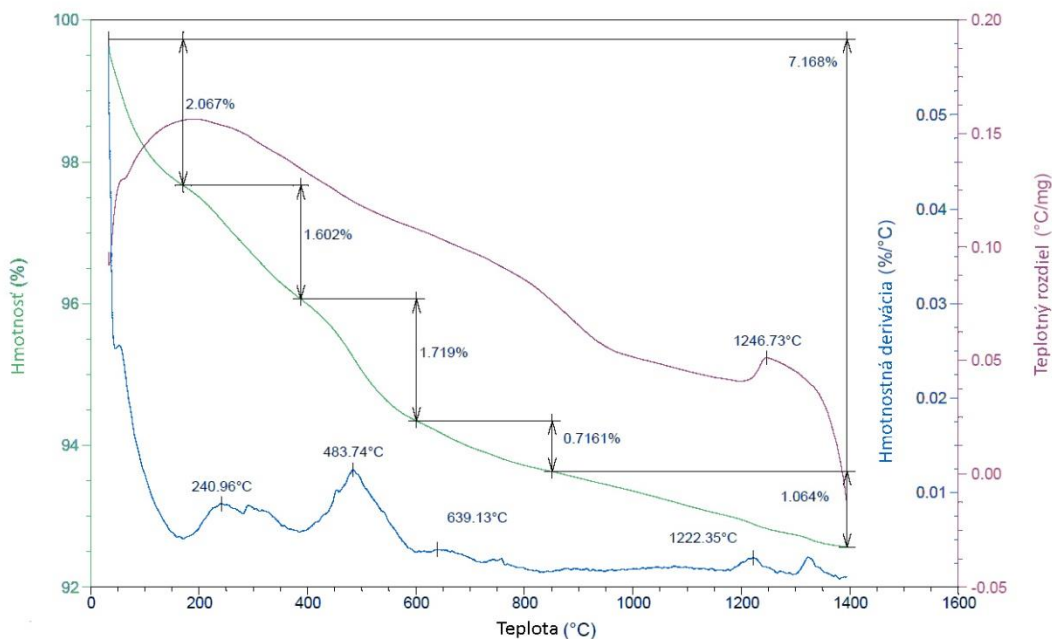
a)



b)

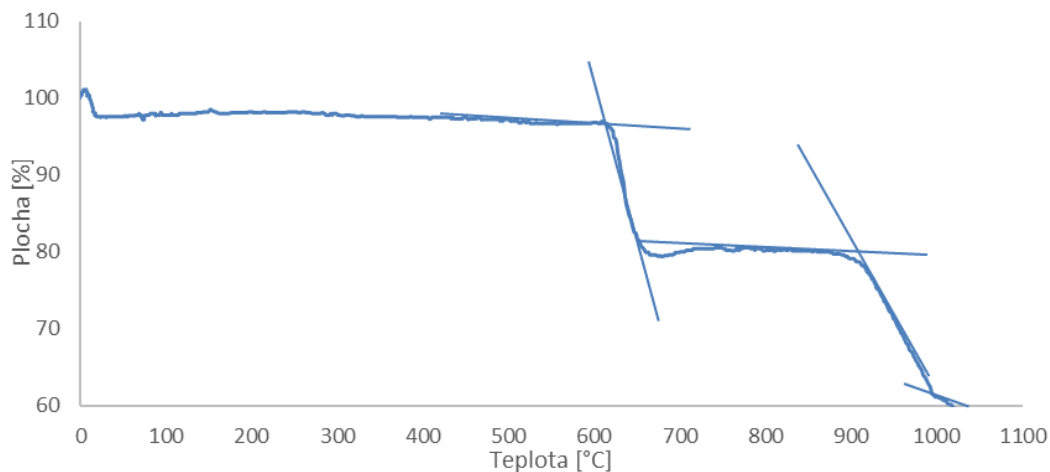
Obr. 23: závislosť plochy na teplote HA tablety pri meraní žiarovou mikroskopiou, a) grafické znázornenie, b) obrazové znázornenie

Pri TG-DTA analýze prášku HA môžeme pozorovať rovnaké správanie ako u ŽM. V rozmedzí od 200 do 970 °C analýzy môžeme pozorovať viacstupňovú dehydroxyláciu s približne 4% hmotnostnou stratou. V rozmedzí 1200 – 1400 °C s maximom pri teplote 1220 °C pozorujeme exotermickú reakciu, ktorá môže súvisieť so začiatkom spekania materiálu a s rozpadom pôvodnej štruktúry na TCP. Celková hmotnostná strata pri tejto analýze dosiahla 7,2 hm. %.

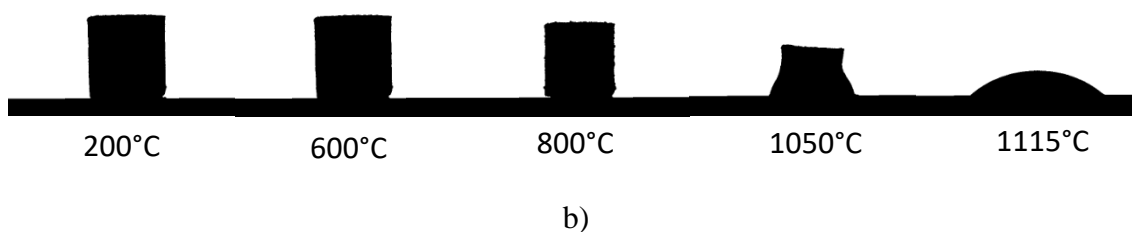


Obr. 24: grafické zobrazenie TG-DTA merania vzorky HA

Pri výsledkoch ŽM u 45S5 môžeme vidieť dve oblasti s veľkým plošným poklesom, z čoho prvá prvej pri teplotách 600–700 °C pravdepodobne reprezentuje dehydroxyláciu a kondenzáciu silanolových skupín. Druhá v teplotnom rozmedzí 880 – 1200 °C odpovedá spekaniu, z čoho sme vybrali dostatočnú teplotu spekania 45S5 900 °C. Teplota tvorby pologule pripadá na 1050 °C a k úplnému roztaveniu pri teplote 1115 °C. Pri tomto meraní bolo zmrštenie materiálu podobné ako pri HA, približne 40 %.

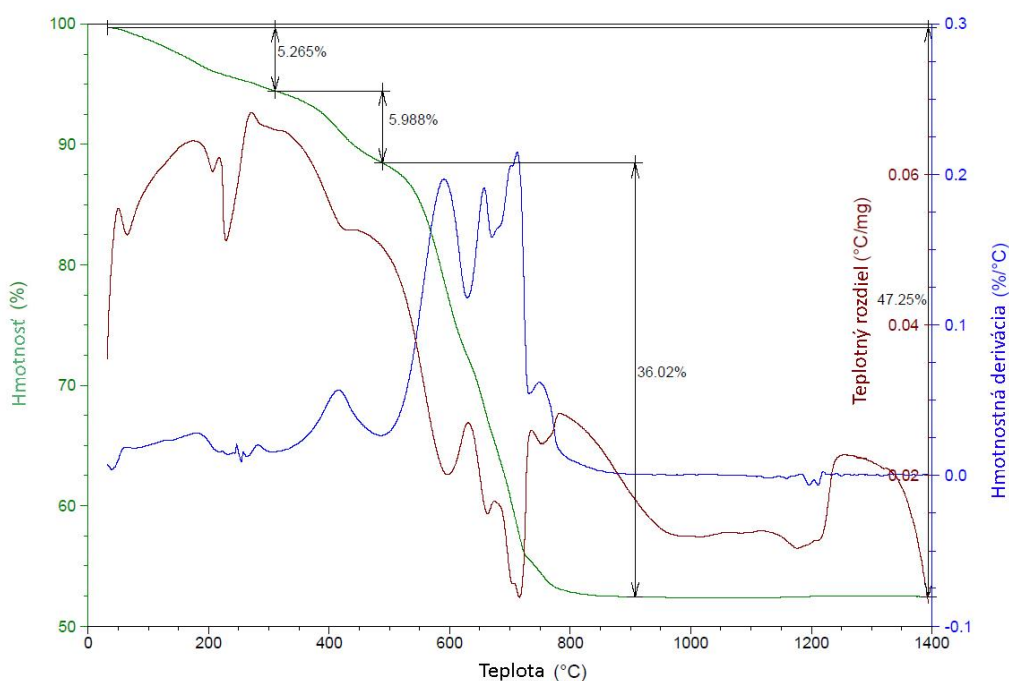


a)



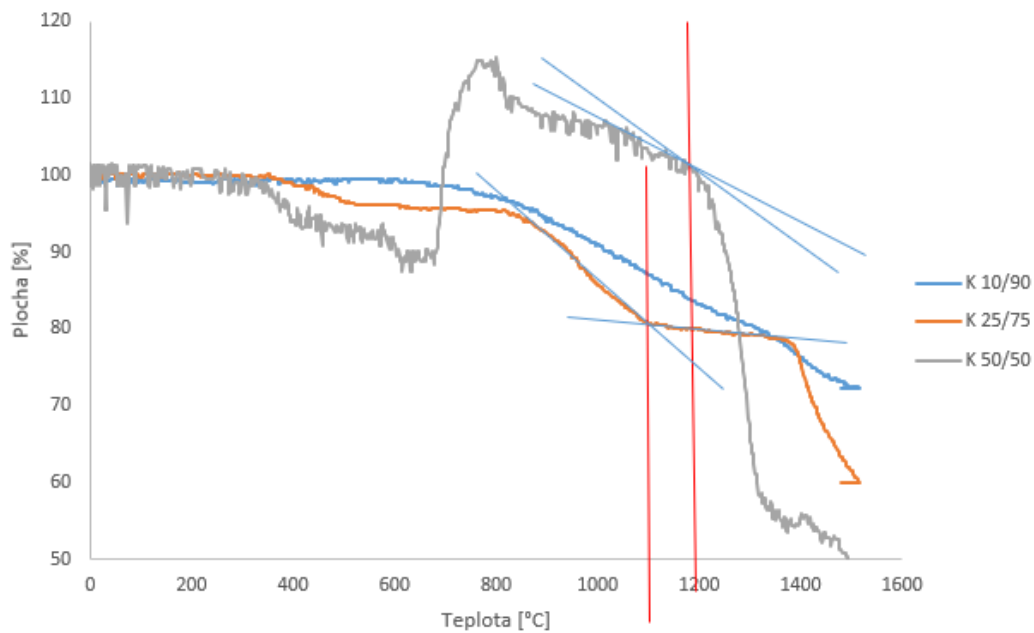
Obr. 25: závislosť plochy na teplote 45S5 tablety pri meraní žiarovou mikroskopiou, a) grafické znázornenie, b) obrazové znázornenie

U hodnôt z TGA môžeme pri 45S5 presnejšie pozorovať jednotlivé prechody, ktoré môžeme rozdeliť rovnako ako pri analýze ŽM na odstránenie adsorbovanej vody, v tomto prípade do 300 °C s hmotnostnou stratou 5 %. Ďalšiu hmotnostnú stratu reprezentuje kondenzácia silanolových skupín v teplotnom rozmedzí 300-500 °C. Od 500 °C pozorujeme najväčšiu hmotnostnú stratu až 36 %, ktorá vznikla z dôvodu rozkladu dusičnanov do teploty 700 °C. Pri teplote 750 °C môžeme pozorovať mierny exotermický pík, ktorý reprezentuje začiatok spekania materiálu, po ktorom končí hmotnostná strata pri teplote 900 °C spekaním materiálu. Posledný pík s maximom okolo 1300 °C reprezentuje úplné roztavenie materiálu. Hmotnostná strata počas celého merania predstavuje 47,3 hm. % testovaného materiálu.

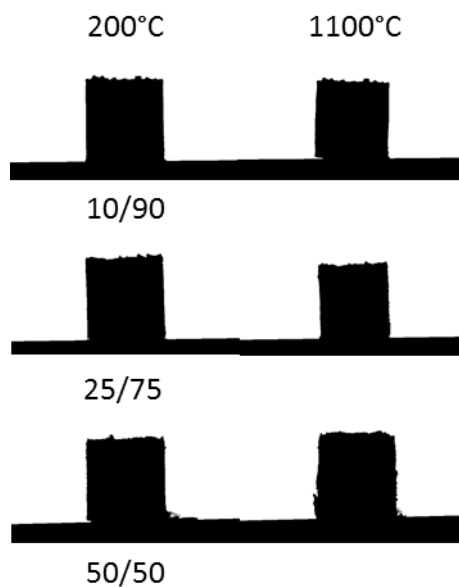


Obr. 26: grafické zobrazenie TG-DTA merania vzorky 45S5

Z nameraných hodnôt ŽM pri kompozitných zmesiach bolo zrejmé, že prídavkom 45S5 ku HA sa budú teploty na spekanie pohybovať v rozmedzí teplôt týchto dvoch čistých látok. Najmenšie zmrštenie bolo pozorované pri K 10/90 s hodnotou necelých 30 %, s pridaným množstvom 45S5 v zmesi stúpalo zmrštenie spekaných vzoriek až na 50 % pri K 50/50.



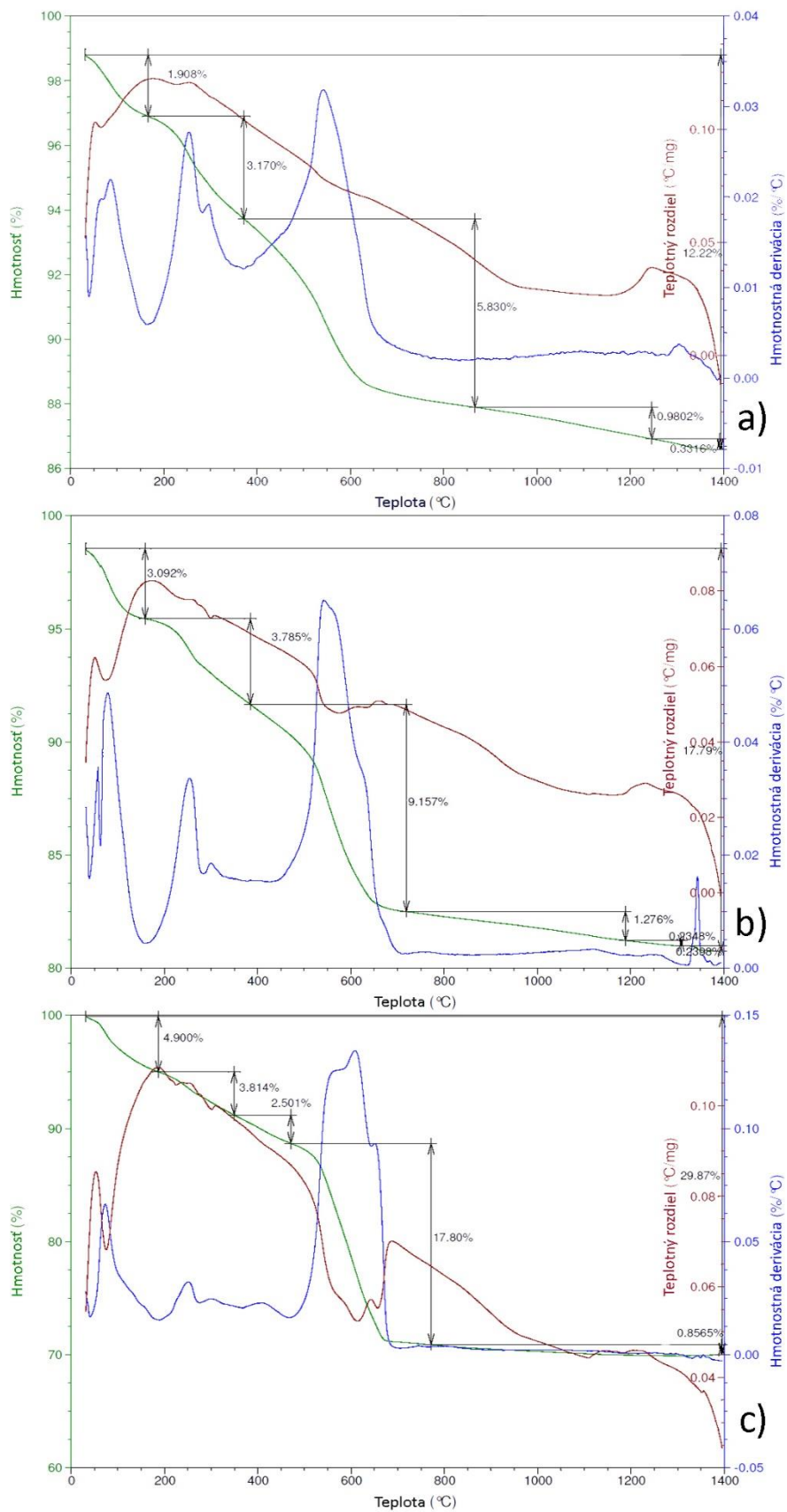
a)



b)

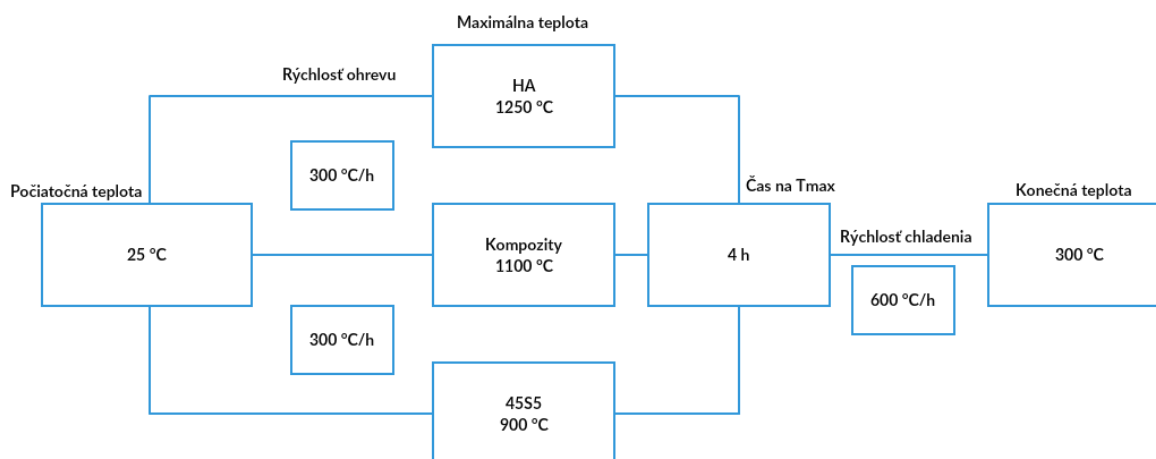
Obr. 27: závislosť plôch na teplote kompozitných zmesí K 10/90, K 25/75, K 50/50, a) grafické znázornenie, b) obrazové znázornenie

U TGA analýzy kompozitov môžeme lepšie pozorovať priamu úmeru straty hmotnosti so zvyšovaním hm. % 45S5 v zmesi. Z kriviek hmotnostných derivácií môžeme usúdiť, že sa všetky kompozity správajú rovnako, jediným rozdielom sú intenzity píkov pri hmotnostnej derivácii. U vzorky K 25/75 pozorujeme ako u jedinej exotermický dej pri teplote 1350 °C. Táto teplota koreluje s hodnotami teplôt fázových premen pri čistom HA. Po uvážení bola pre všetky tri vzorky vybraná teplota spekania 1100 °C.



Obr. 28: grafické zobrazenie TG-DTA meraní kompozitných materiálov, a) K 10/90, b) K 25/75, c) K 50/50

Pri porovnaní výsledkov z ŽM a TGA môžeme považovať za presnejšie výsledky TGA, ktoré rátajú s hmotnostným úbytkom vzorky a nie s jeho zmrštením. Po určení vypaľovacích teplôt boli pripravené porézne kompozity priamym penením (*in situ*) popísané v kapitole 3.2 a následne vypálené v kantalovej peci s nasledovným nastavením:



Obr. 29: schéma nastavenia kantalovej pece na jednotlivé výpaly napenených vzoriek

4.2.2 Stanovenie porozity

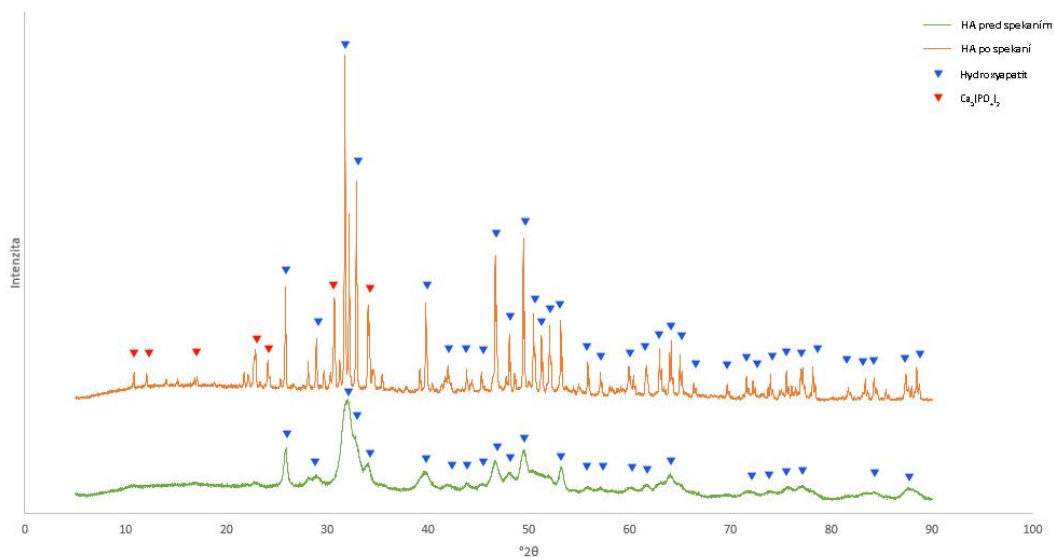
Vďaka Archimedovej metóde stanovenia hustoty keramických vzoriek sme boli schopní vypočítať porozitu napenených kompozitných vzoriek. Porozita sa pohybovala v rozmedzí 40 až 70 %. Najporéznejší materiál sa podarilo pripraviť v prípade čistého bioskla.

Tab. 4.3 namerané hodnoty hmotností, objemových hmotností, hustoty a porozity napenených vzoriek pomocou Archimedovej metódy merania hustoty

	Suchá vzorka [g]	Hmotnosť nasiaknutej vzorky [g]	Objemová Hmotnosť [g/cm ³]	Relatívna hustota [g/cm ³]	Objem otvorených pórov [%]	Objem uzavretých pórov [%]	Skutočná porozita (%)
HA	1,0135	1,2388	1,8240	59,2	40,7	0,1	40,8
K - 10/90	1,1467	1,4650	1,2748	47,6	35,5	17,0	52,5
K - 25/75	0,9944	1,5331	1,1062	36,3	60,1	3,6	63,7
K - 50/50	0,3523	0,5637	0,9312	31,4	56,0	12,6	68,6
45S5	1,0001	1,7652	0,8736	30,4	67,0	2,6	69,6

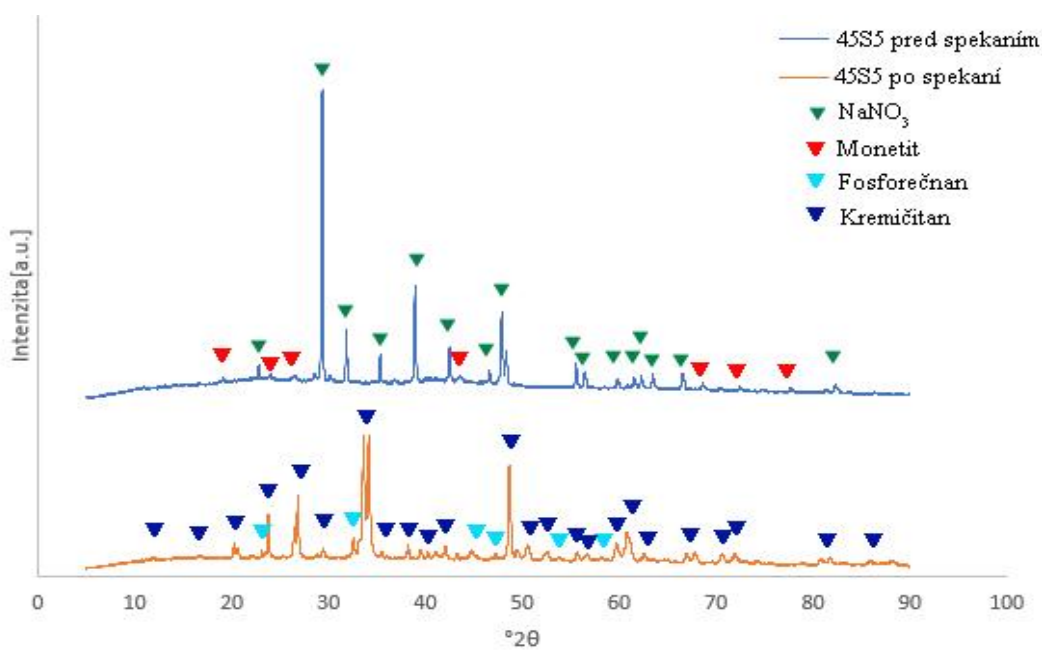
4.2.3 Pozorovanie fázových zmien v dôsledku spekania vzoriek

Po vypálení boli všetky vzorky podrobené XRD, aby sa zistili fázové premeny, ktoré sa uskutočnili počas spekania. V prípade HA môžeme na Obr. 30 pozorovať časť hydroxyapatitovej fáze premenenej na TCP fázu.

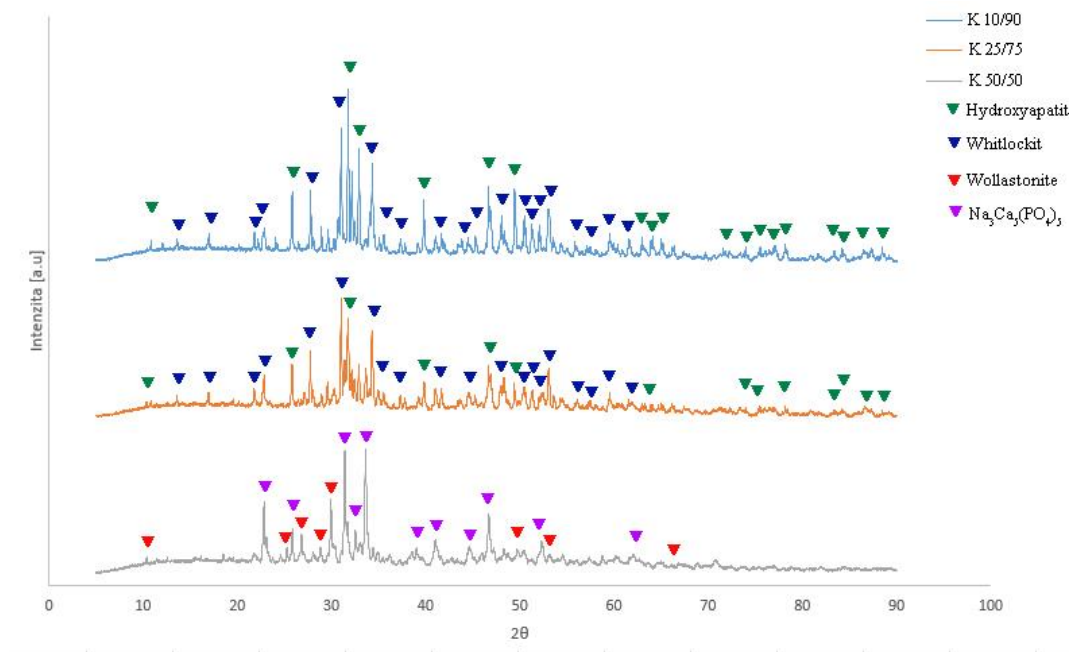


Obr. 30: porovnanie zložení fází pomocou XRD záznamov HA pred a po spekaní

V prípade 45S5 pozorujeme kompletne vymiznutie dusičnanu aj monetitu za vzniku neznámeho fosforečnanu a kremičitanu.



Obr. 31 porovnanie zložení fází pomocou XRD záznamov 45S5 pred a po spekaní



Obr. 32 porovnanie zložení fází pomocou XRD záznamov kompozitných materiálov po spekaní

V prípade kompozitných vzoriek pozorujeme po spekaní pri vzorkách K 10/90 a K 25/75 rovnaké majoritné fáze hydroxyapatit (HA) a whitlockit (WH). Obidva tieto minerály sa prirodzene nachádzajú v kostiach, pričom sa predpokladá synergický efekt týchto dvoch fází. HA dodáva materiálu potrebnú tvrdosť, zatiaľ čo WH zvyšuje schopnosť osteogenézy buniek. Pomer týchto dvoch fází v kosti dosahuje hodnotu 3:1 v prospech HA[70].

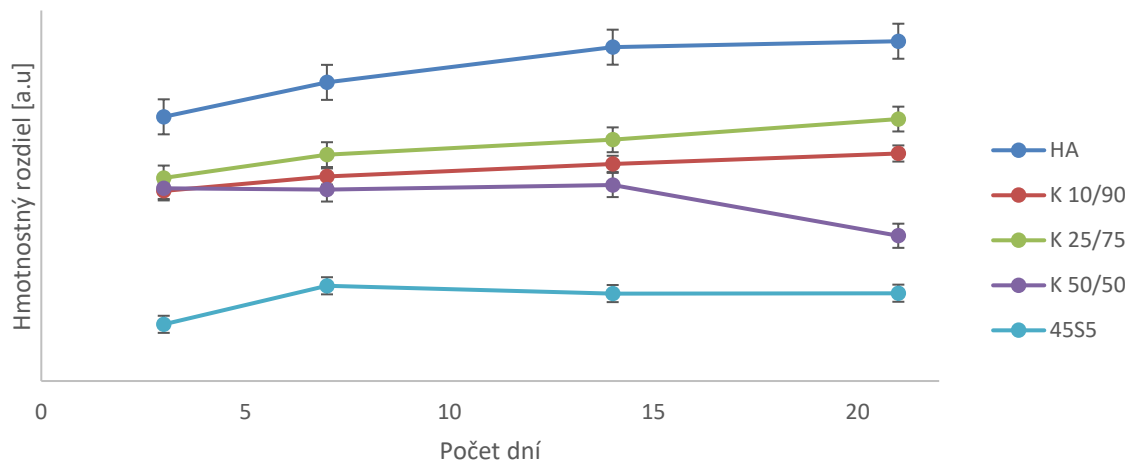
U vzorky K 50/50 došlo k najväčšiemu množstvu fázových premien, medzi ktorými dominujú wollastonite (WL) a neznámy fosforečnan sodno-vápenatý. V recesívnej forme sa tu nachádza aj WH rovnako ako u ostatných kompozitných vzoriek, avšak fáza HA po spekaní tejto vzorky úplne vymizla. U WL sa taktiež predpokladá vznik hydroxyapatitovej vrstvy po jeho vložení do SBF[71].

4.3 „Apatite ability“ test

Na ďalšie testovanie bolo potrebné pripraviť SBF (c-SBF), v ktorých sa testovala schopnosť rastu novej apatitovej vrstvy na povrchu pripravených vzoriek.

4.3.1.1 Kontrola hmotnosti vzoriek

Po vysušení boli vzorky odvážené, aby sa ich hmotnosti po inkubácii mohli porovnať s hmotnosťami pred vložением do SBF. Výsledné rozdiely v hmotnosti sú vyobrazené na Obr. 33.



Obr. 33: grafická závislosť hmotnostného rozdielu vzoriek na počte dní inkubovaných v SBF

Zo závislosti môžeme pozorovať nárast hmotnosti pri vzorkách HA, K 10/90 a K 25/75. Pri vzorke K 50/50 dochádzalo ku mechanickému poškodeniu vzhľadom ku slabej pevnosti a zvýšenej rozpustnosti bioskla.

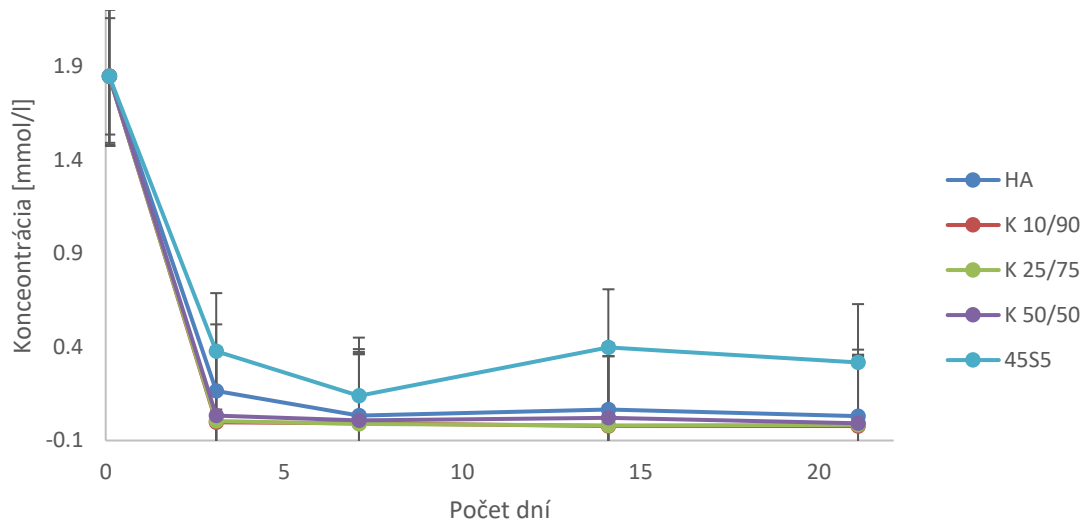
U vzorky 45S5 môžeme pozorovať mierny pokles hmotnosti po siedmych dňoch, čo si môžeme vysvetliť rozpustením bioskla a vzniknutím koloidu na spodku inkubačnej banky (Obr. 34). Vzniknutý koloid môžeme pozorovať u vzorky 45S5 po 14 a 21 dňoch. U kompozitov nebol tento jav pozorovaný.



Obr. 34: fotografia koloidu vzniknutého na spodku inkubačnej banky vzorky 45S5 (21 dní)

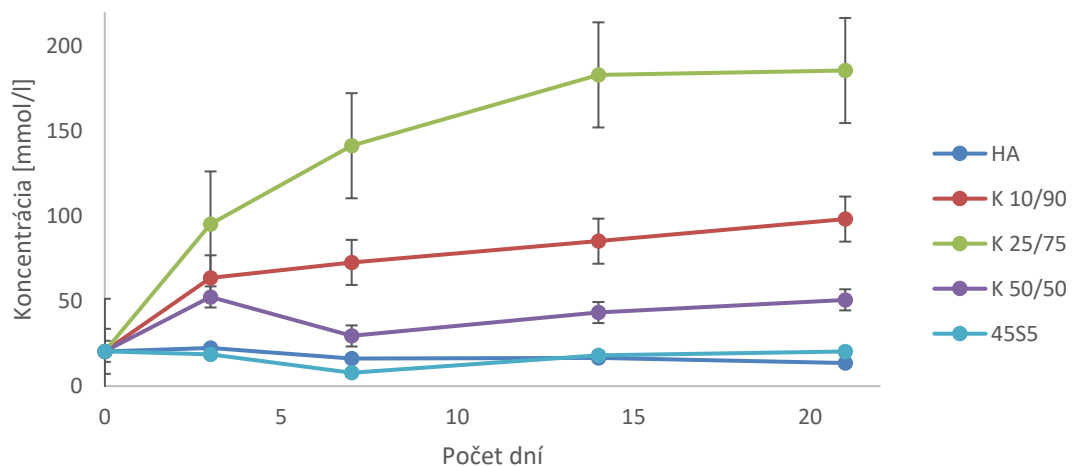
4.3.2 Zmena koncentrácie iónov v SBF

Vznikanie novej vrstvy na povrchu inkubovaných vzoriek bolo kontrolované pomocou zmeny koncentrácií PO_4^{3-} a Ca^{2+} v SBF pri každej vzorke a porovnávané s počiatočnými koncentraciami týchto iónov v SBF pred inkubovaním. Výsledné koncentrácie sú zobrazené na Obr. 35 a Obr. 36.



Obr. 35: grafická závislosť zmeny koncentrácie fosforečnanových iónov v SBF na počte dní inkubovaných vzoriek

Na Obr. 35 môžeme vidieť, že už po 3 dňoch došlo pri vzorkách K 10/90, K 25/75 a K 50/50 ku spotrebovaniu takmer všetkých PO_4^{3-} z SBF. U vzorky HA sa spotrebovali takmer všetky PO_4^{3-} ióny po siedmych dňoch. Pri 45S5 došlo pri 14 dňoch ku zvýšeniu koncentrácie v roztoku SBF, čo podporuje teóriu rozpustenia bioskla v SBF a vzniku koloidu na spodku inkubačnej banky.

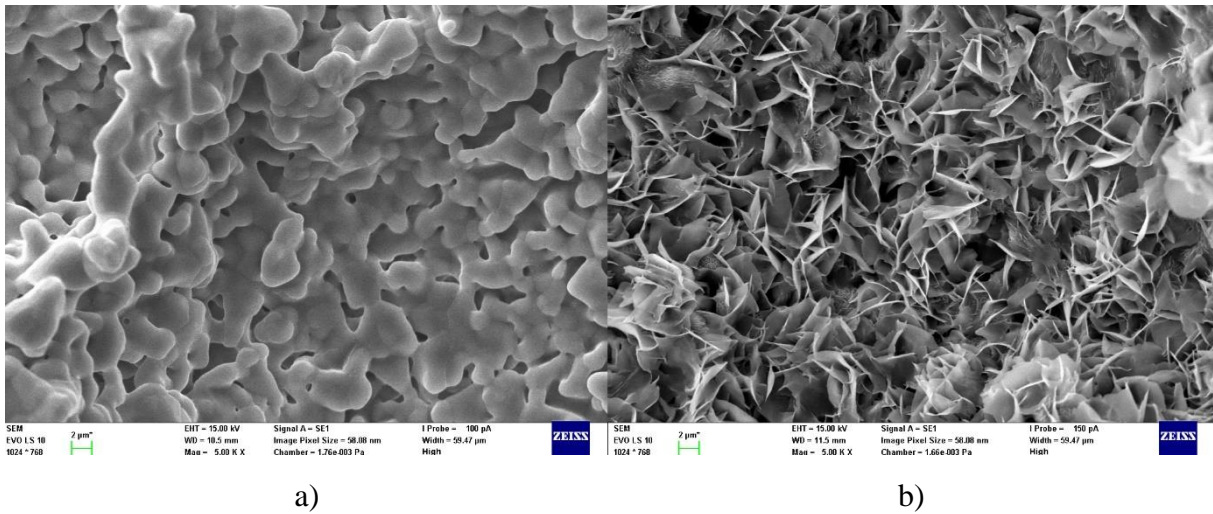


Obr. 36: grafická závislosť zmeny koncentrácie vápenatých iónov v SBF na počte dní inkubovaných vzoriek

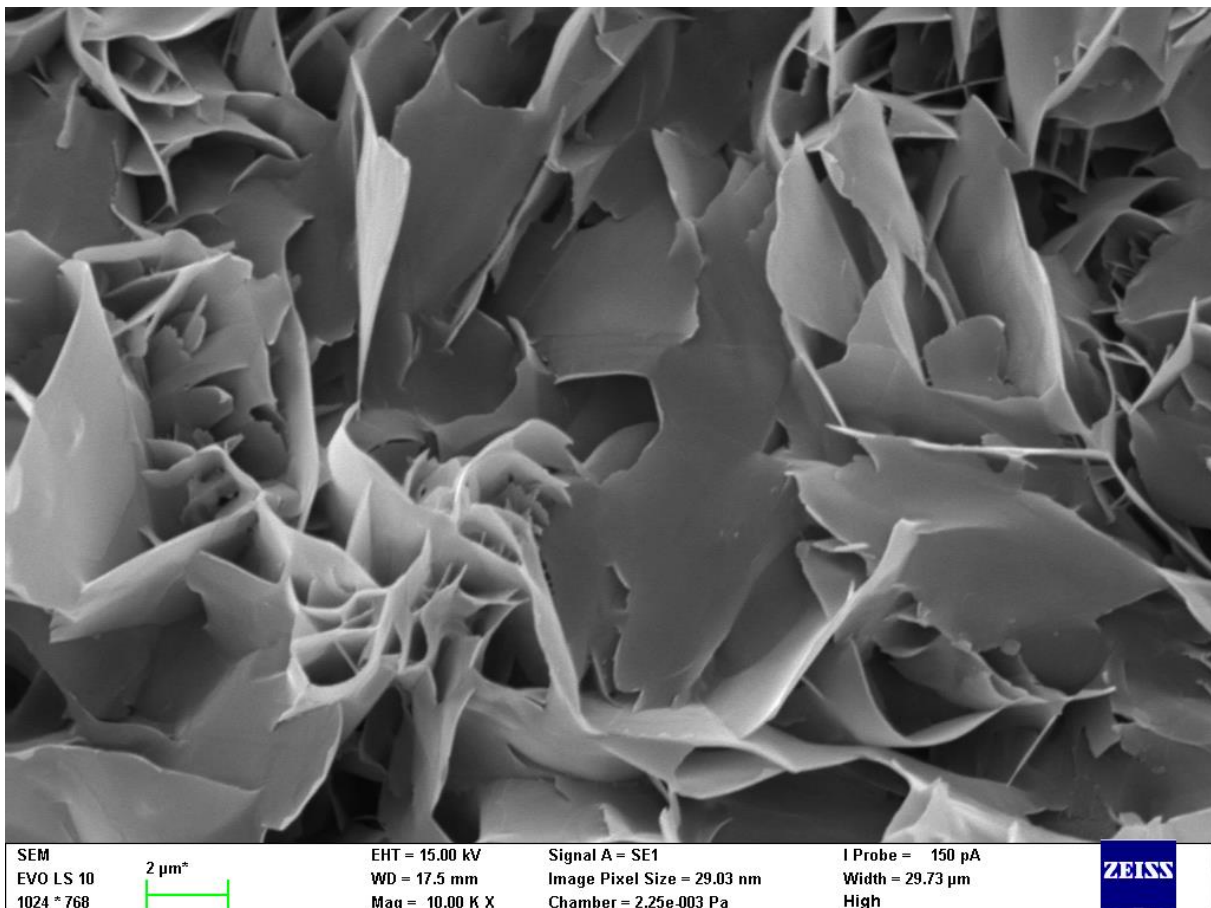
V prípade Ca^{2+} iónov sa koncentrácia pri vzorke HA udržiavala počas celých 21 dní na približne rovnakej hodnote bez výraznej zmeny. U 45S5 môžeme pozorovať pokles koncentrácie pri siedmych dňoch a následné stúpanie koncentrácie pri 14 a 21 dňoch, čo znova podporuje teóriu rozpustenia bioskla a tvorby koloidu. Podobný trend ukazuje aj vzorka K 50/50, u ktorej taktiež došlo ku klesnutiu koncentrácie testovaných iónov po siedmych dňoch a následnom stúpaní koncentrácie pri 14 a 21 dňoch. S menším podielom bioskla v testovaných vzorkách (K 10/90, K 25/75) môžeme sledovať nárast koncentrácie počas celého testovania.

4.3.3 SEM

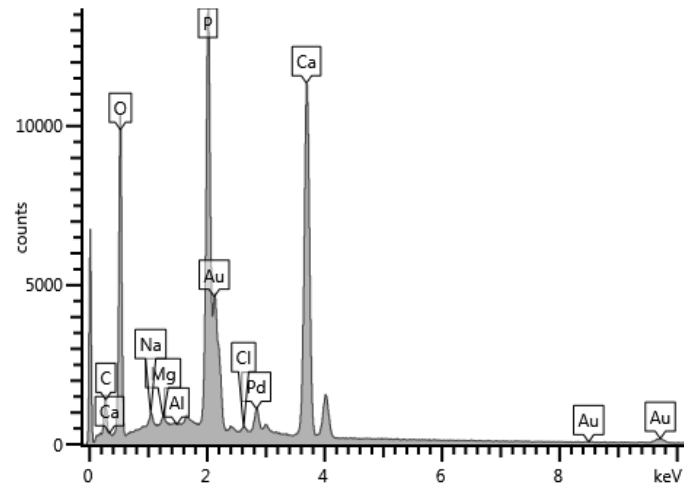
Ďalším krokom v štúdiu interakcie SBF s napenenými vzorkami bolo pozorovanie rastu novej vrstvy na povrchu vzoriek pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie.



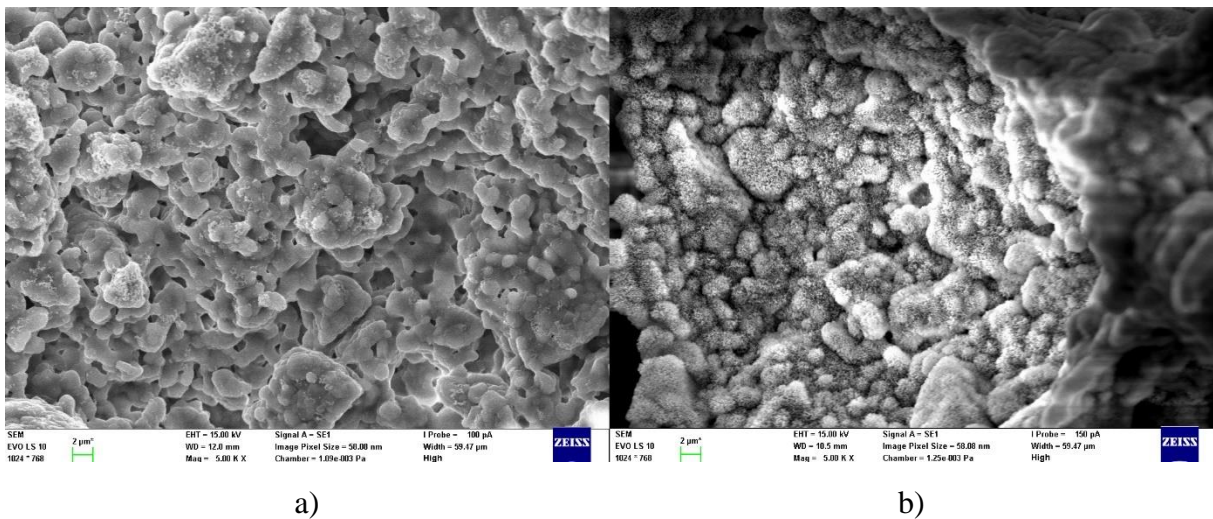
Obr. 37: porovnanie SEM snímok HA po a) 0, b) 7 dňoch v roztoku SBF, približenie 5000x



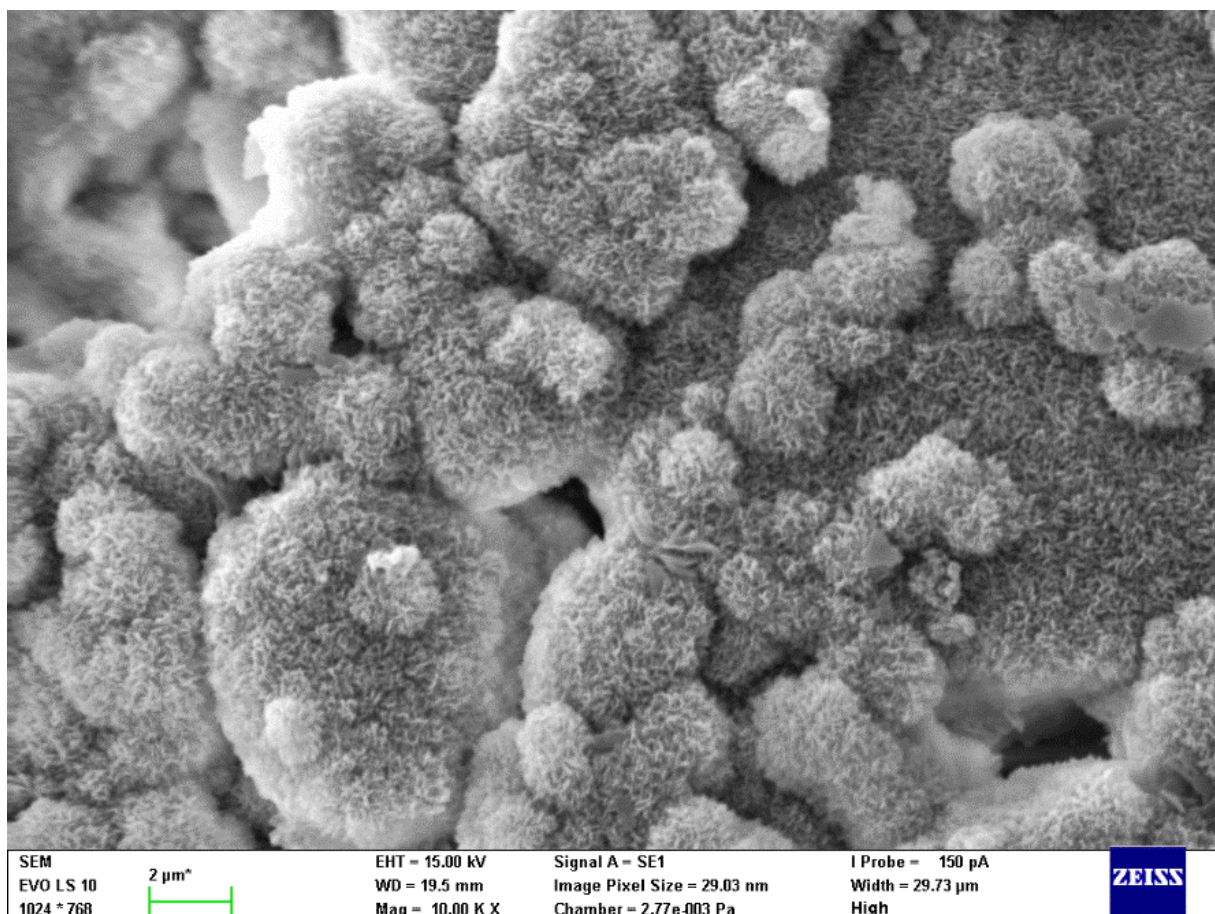
Na *Obr. 37* môžeme vidieť po 7 dňoch porastenú takmer celú vzorku novou vrstvou s hladkou, lamelárnou štruktúrou. Na kvalitatívne zhodnotenie vzniknutej štruktúry bolo na vzorkách po 14 dňoch prevedené EDS meranie, ktoré potvrdilo majoritnú prítomnosť Ca, P a O. Výsledky EDS analýzy sú zobrazené na *Obr. 39*. Na *Obr. 38* môžeme lepšie pozorovať nepravidelnosť vznikajúcej lamelárnej vrstvy.



Obr. 39: výsledky EDS analýzy HA po 14 dňoch

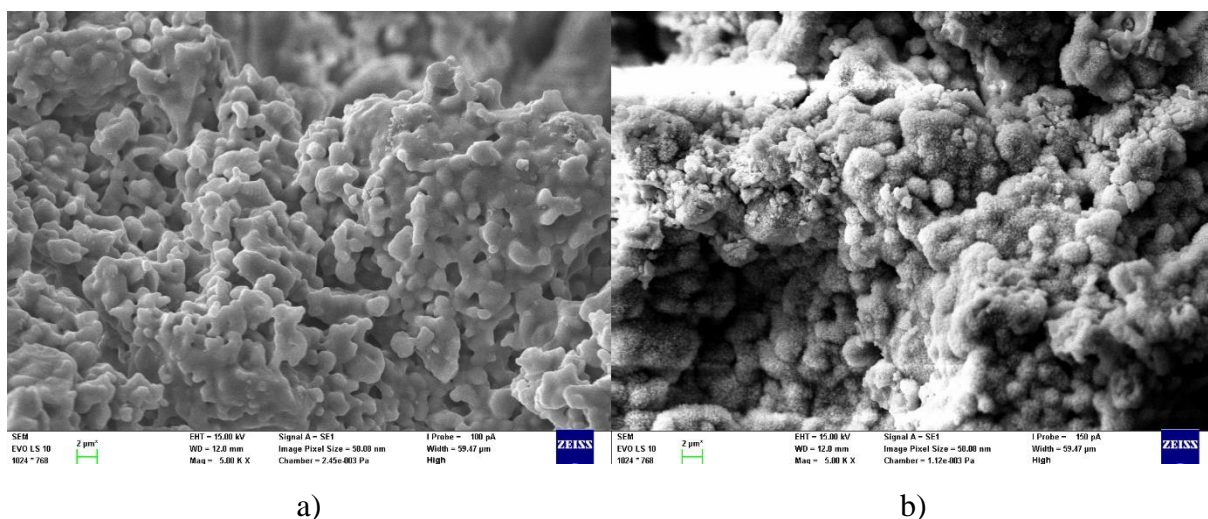


Obr. 40: porovnanie SEM snímok K 10/90 po a) 0, b) 7 dňoch v roztoku SBF, približenie 5000x

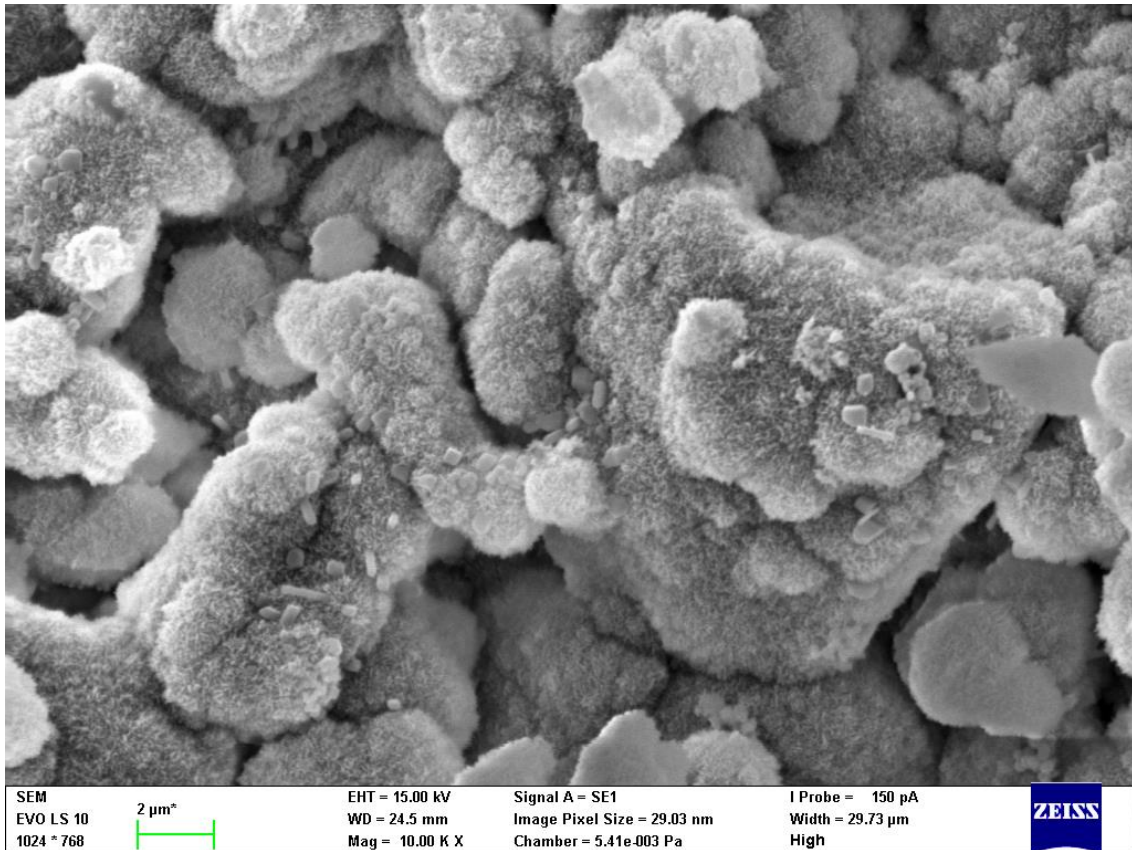


Obr. 41: snímka SEM K 10/90 po 21 dňoch v roztoku SBF, približenie 10000x

Na Obr. 40 môžeme pri K 10/90 sledovať novú vrstvu, ktorá má avšak po 7 dňoch omnoho jemnejšiu štruktúru ako samotný HA. Vrstva síce porástla po celej vzorke, no jej rozdielny charakter môžeme lepšie vidieť na Obr. 41, kde môžeme pozorovať miniatúrne lamely, ktoré tvoria „ochlpenie“ celého vzorku.

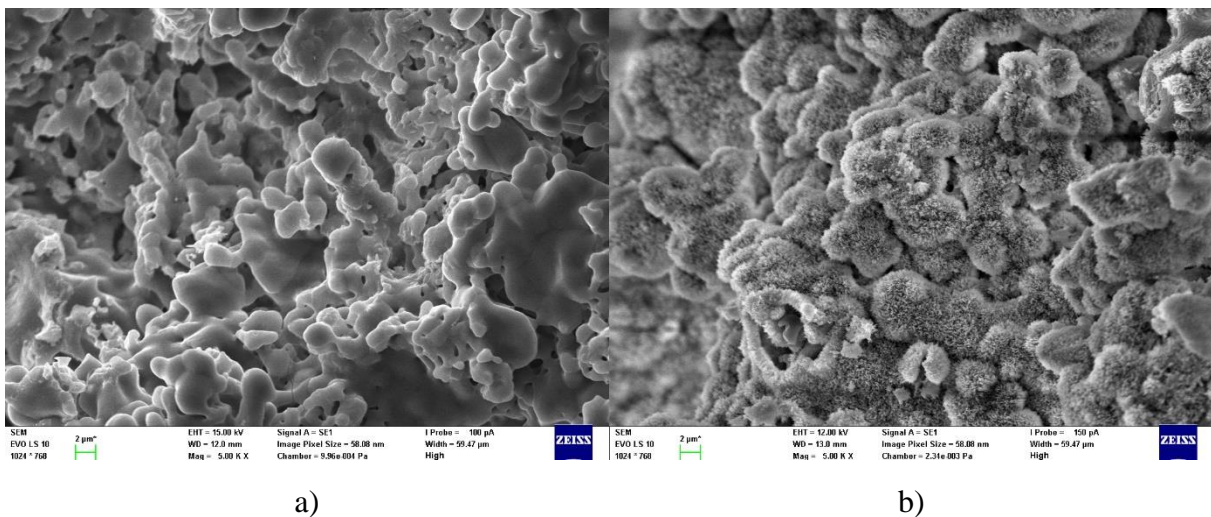


Obr. 42: porovnanie SEM snímok K 25/75 po a) 0, b) 7 dňoch v roztoku SBF, približenie 5000x



Obr. 43 snímka SEM K 25/75 po 21 dňoch v roztoku SBF, približenie 10000x

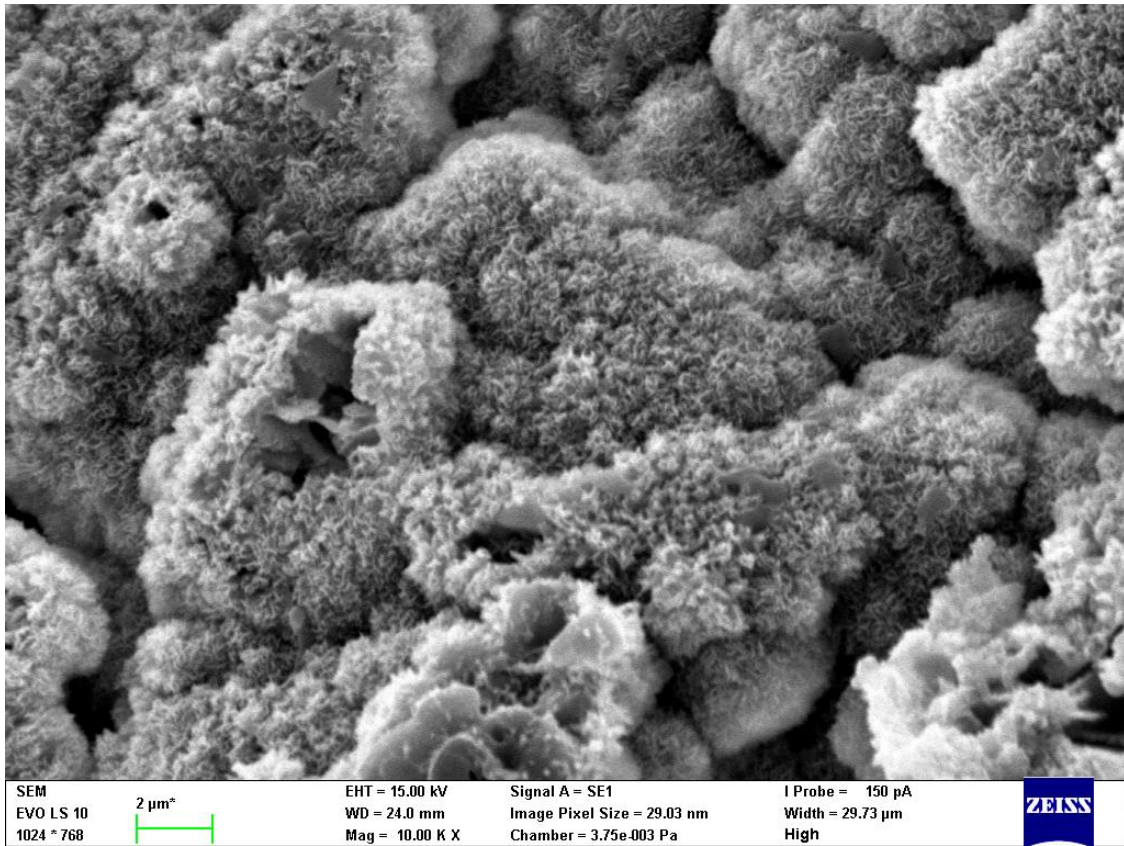
Na Obr. 42 a Obr. 44 môžeme pozorovať vznik rovnakej štruktúry ako pri K 10/90. S pridaným 45S5 v zmesi môžeme však vidieť viacero miest, ktoré nestihli byť pokryté novou vrstvou ani počas 21 dní v inkubátore. S väčším obsahom HA bola nová štruktúra schopná rásť aj v objeme vzorky.



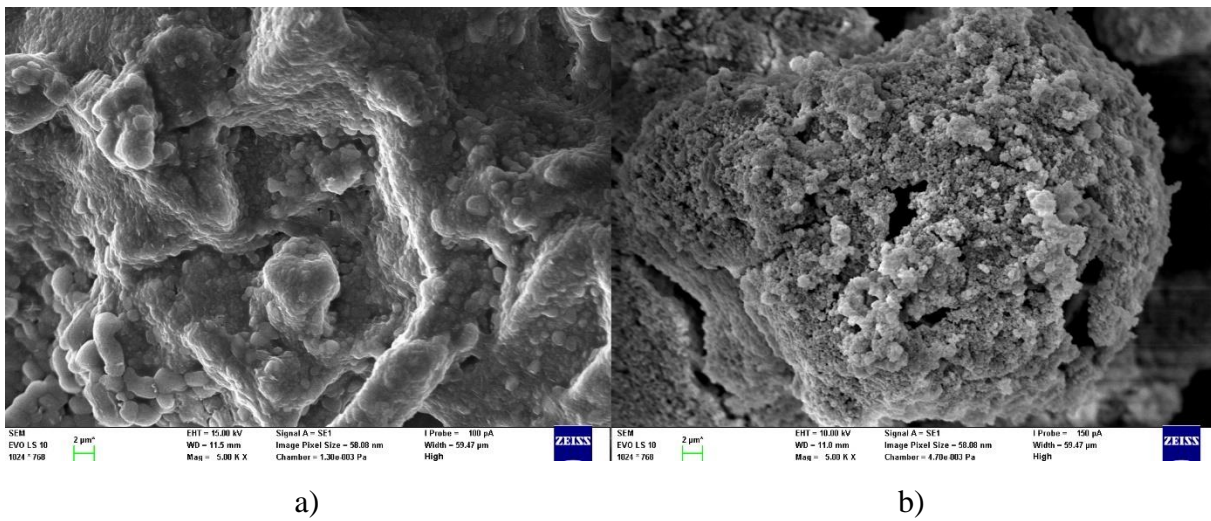
a)

b)

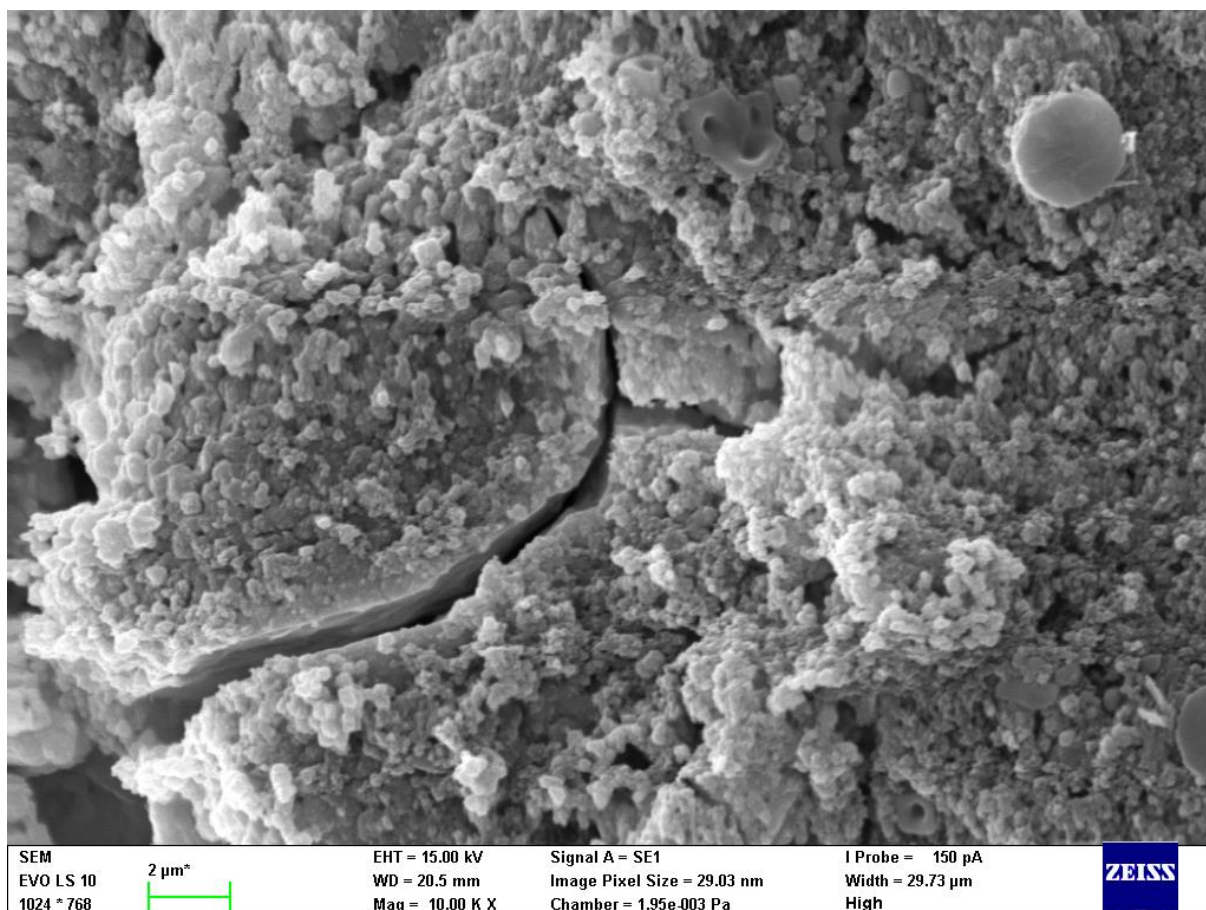
Obr. 44: porovnanie SEM snímok K 50/50 po a) 0, b) 7 dňoch v roztoku SBF, približenie 5000x



Obr. 45 snímka SEM K 50/50 po 21 dňoch v roztoku SBF, približenie 10000x



Obr. 46: porovnanie SEM snímok 45S5 po a) 0, b) 7 dňoch v roztoku SBF, približenie 5000x



Obr. 47 snímka SEM 45S5 po 21 dňoch v roztoku SBF, priblíženie 10000x

Na Obr. 46 máme porovnanie snímok vzorky 45S5 pred vložením do SBF a po 7 dňoch. Zo všetkých pripravených vzoriek bol práve na 45S5 najmenej pozorovateľný vznik vrstvy, ktorá na napenených vzorkách síce rástla, avšak ani po 21 dňoch nemala pokrytý celý povrch plochu novovzniknutou vrstvou.

Na detailnejších snímkach kompozitov s priblížením 10000x (Obr. 41, Obr. 43, Obr. 45) môžeme pozorovať lamelárnu štruktúru podobnú s tou vznikajúcou na vzorke HA, oproti ktorej sú vznikajúce lamely mnohokrát menšie. Vďaka výsledkom fázového zloženia kompozitných vzoriek po spekaní nameraného metódou XRD môžeme pozorovať rozdielnu štruktúru vznikajúcu na povrchu vzoriek HA, ktoré po spekaní obsahovali fázu hydroxyapatitu a TCP. Pri kompozitoch K 10/90 a K 25/75 obsahujúcich prevažne fáze HA a WH sa štruktúra vznikajúcej vrstvy líši od čistých vzoriek HA najmä veľkosťou vznikajúcich lamel. Vzorka K 50/50 dokázala schopnosť tvorby novej vrstvy na jej povrchu i keď po vypálení neobsahuje fázu HA. Túto schopnosť má pri testovanej vzorke na starosti pravdepodobne WL.

Testované vzorky 45S5 sa ako jediné nepreukázali vznikom typickej apatitovej štruktúry na povrchu vzoriek. V tomto prípade dochádzalo ku vzniku ostrovčekovitej štruktúry na rozdiel od všetkých ostatných vzoriek, kde bol pozorovaný vznik ucelenej vrstvy. Kvôli neznámym fázam po vypálení vzorky 45S5 avšak nemôžeme s určitosťou potvrdiť, ktorá fáza fungovala v našom prípade ako inhibitor.

5 ZÁVER

Cieľom práce bola solgel syntéza práškových materiálov, príprava rôzne poréznych kompozitných materiálov a sledovanie schopnosti rastu apatitovej vrstvy na povrchu pripravených materiálov interakciou v simulovanej telesnej tekutine.

Boli nasyntetizované vstupné suroviny pre nasledujúcu prípravu kompozitov – pomocou precipitačnej metódy hydroxyapatit so strednou veľkosťou častíc 19,95 μm a merným povrchom 77,23 m^2/g a pomocou solgel metódy biosklo na bázi 45S5 so strednou veľkosťou častíc 127,58 μm a merným povrchom 4,52 m^2/g , ktorých fázové zloženie sa overilo pomocou XRD. Pripravili sa zmesi zložené z HA a 45S5, následne boli všetky sady vzoriek podrobené ŽM a TGA na zistenie teplôt potrebných na spekanie, rovnako ako správanie vzoriek pri tepelnej úprave. Ako optimálna teplota pre spekanie napenených kompozitných vzoriek sa ukázala 1100 °C.

Všetky zmesi boli napenené priamym penením *in situ* a následne vypálené v kantalovej peci pri teplotách získaných z analýz TGA a ŽM. Vypálené vzorky boli znova podrobené XRD na štúdium fázových prechodov vzniknutých pri spekaní vzoriek.

Sledovanie schopnosti vzniku apatitovej vrstvy na povrchu pripravených poréznych nosičov bolo skúmané pomocou SEM. Po porovnaní výsledkov SEM môžeme konštatovať, že všetky vzorky vykazovali schopnosť rastu apatitovej vrstvy na ich povrchu. Z výsledných snímok je zrejmé, že najlepších výsledkov pri vzniku novej vrstvy dosiahli vzorky čistého HA a K 10/90, ktoré po 21 dňoch dosahovali najväčšie pokrytie pôvodného povrchu novou vrstvou.

U vzorky HA sa prírastok skladal z doštičkovitých lamel, ktoré sú pre apatit typické. Kompletné porastenie vzorky bolo pozorované už pri snímkach po 14 dňoch. V rovnakom období sme mohli pozorovať vznik menších lamel rovnakého typu na všetkých vzorkách kompozitov, z ktorých najlepšie pokrytie povrchu ukazoval práve kompozit K 10/90. Pri kompozitných vzorkách sme mohli pozorovať vplyv pomerov rôznych fáz po vypálení vzoriek rast novej apatitovej vrstvy. Pri testoch po 21 dňoch však boli rozdiely medzi K 25/75 a K 50/50 na pozorovaných vzorkách minimálne. Stále boli viditeľné miesta, ktoré sa jasne javili ako pozostatky niektorej z bližšie neurčených minoritných fáz vďaka zakomponovaniu 45S5 do kompozitných materiálov, avšak oproti pozorovaniu vzoriek po 14 dňoch sa ich počet náramne zmenšil.

Popri pozorovaní povrchu vzoriek boli sledované zmeny v ich hmotnostiach podľa počtu dní inkubovaných v simulovanej telesnej tekutine, rovnako ako zmeny koncentrácií iónov Ca^{2+} a PO_4^{3-} v použitých roztokoch simulovanej telesnej tekutiny. U vzoriek, kde bol v rámci pozorovania SEM potvrdený rast novej apatitovej vrstvy sme zaznamenali postupné a úplné spotrebovanie PO_4^{3-} iónov a zároveň nárast iónov Ca^{2+} . Tento jav bol pozorovaný najmä u HA a kompozitov K 10/90, K 25/75 a K 50/50, zatiaľ čo vzorky 45S5 mali odlišný trend.

U vzoriek 45S5 sme boli schopní pozorovať začiatok rozkladného mechanizmu bioskla, bližšie popísaného v kapitole 2.2.5. Prejavovalo sa to vznikom koloidu na dne inkubačných baniek. Túto teóriu potvrdili spektrometrické merania fosforečnanových iónov, kde pri 14 dňoch došlo k výraznému nárastu koncentrácie PO_4^{3-} v inkubovanej SBF.

Najlepších výsledkov vzniku novej vrstvy dosahovali vzorky, u ktorých prevládali fáze hydroxyapatitu, trikalcium fosfátu, whitlockitu a wollastonitu. Vzorky s týmto zložením sú vhodné na ďalšie pokračovanie v tejto práci na štúdium testovania in vitro a in vivo. Pre pokračovanie by bolo vhodné lepšie spoznať kinetiku rastových procesov na povrchu samostatných fáz rovnako ako zlepšenie mechanickej odolnosti či dopovanie prvkami na ďalšie zlepšenie pri použití v tkanivovom inžinierstve.

6 LITERATÚRA

- [1] DRAGÚŇOVÁ, Jana. *Tkanivové inžinierstvo - budúcnosť medicíny?* [online]. 17-31 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <http://www.uski.sk/files/2013-2-3-Dragunova-tkaninove-inziniersrstvo-medicina.pdf>
- [2] BUDDY R., Ranter. *A History of Biomaterials* [online]. [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.tup.tsinghua.edu.cn/upload/books/yz/013996-01.pdf>
- [3] LUMBAR INTERBODY FUSION CAGE / ANTERIOR / PRE-FILLED. In: *MedicalExpo* [online]. [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <http://www.medicaexpo.com/prod/medtronic/product-70691-715295.html>
- [4] HUEBSCH, Nathaniel a David J. MOONEY. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009, **462**(7272), 426-432. DOI: 10.1038/nature08601. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature08601>
- [5] Bioceramics – The Changing Role of Ceramics and Nanoceramics in Medical Applications. In: AZO Materials [online]. 2007 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=3855>
- [6] TRIPATHI, Garima a Bikramjit BASU. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International* [online]. 2012, **38**(1), 341-349 [cit. 2018-10-28]. DOI: 10.1016/j.ceramint.2011.07.012. ISSN 02728842. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884211006481>
- [7] TAPPA, Karthik a Udayabhanu JAMMALAMADAKA. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018, **9**(1). DOI: 10.3390/jfb9010017. ISSN 2079-4983. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/17>
- [8] RAHAMAN, Mohamed N., Delbert E. DAY, B. SONNY BAL, Qiang FU, Steven B. JUNG, Lynda F. BONEWALD a Antoni P. TOMSIA. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2011, **7**(6), 2355-2373. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.016. ISSN 17427061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001280>
- [9] JONES, Julian R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*. 2013, **9**(1), 4457-4486. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.07.019. ISSN 17427061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112003996>
- [10] HENCH, Larry L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991, **74**(7), 1487-1510. DOI: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>
- [11] KRISHNAN, Vidya a T LAKSHMI. *Bioglass: A novel biocompatible innovation*. 2013, **4**(2). DOI: 10.4103/2231-4040.111523. ISSN 2231-4040. Dostupné také z: <http://www.japtr.org/text.asp?2013/4/2/78/111523>
- [12] FAURE, J., R. DREVET, A. LEMELLE, N. BEN JABER, A. TARA, H. EL BTAOURI a H. BENHAYOUNE. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, **47**, 407-412. DOI: 10.1016/j.msec.2014.11.045. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114007462>

- [13] HENCH, Larry L. a Jon K. WEST. The sol-gel process. *Chemical Reviews*. 1990, **90**(1), 33-72. DOI: 10.1021/cr00099a003. ISSN 0009-2665. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00099a003>
- [14] CACCIOTTI, Ilaria, Mariangela LOMBARDI, Alessandra BIANCO, Antonio RAVAGLIOLI a Laura MONTANARO. Sol-gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012, **23**(8), 1849-1866. DOI: 10.1007/s10856-012-4667-6. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-012-4667-6>
- [15] SolGelTechnologyStages. In: *Wikimedia Commons* [online]. [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolGelTechnologyStages.svg>
- [16] ANDERSSON, Ö. H. a I. KANGASNIEMI. Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991, **25**(8), 1019-1030. DOI: 10.1002/jbm.x820250808. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820250808>
- [17] RIZWAN, M., M. HAMDÍ a W. J. BASIRUN. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, **105**(11), 3197-3223. DOI: 10.1002/jbm.a.36156. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.36156>
- [18] TILOCCA, A. a A. N. CORMACK. The initial stages of bioglass dissolution: a Car-Parrinello molecular-dynamics study of the glass-water interface. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2011, **467**(2131), 2102-2111. DOI: 10.1098/rspa.2010.0519. ISSN 1364-5021. Dostupné také z: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.2010.0519>
- [19] GERHARDT, Lutz-Christian a Aldo R. BOCCACCINI. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. 2010, **3**(7), 3867-3910. DOI: 10.3390/ma3073867. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/7/3867>
- [20] Chemical Properties. *Bioceramics: properties, characterizations, and applications*. New York: Springer, c2008, s. 192. ISBN 978-0-387-09544-8.
- [21] CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2008, **3**(Supplement 3), S131-S139. DOI: 10.2215/CJN.04151206. ISSN 1555-9041. Dostupné také z: <http://cjasn.asnjournals.org/cgi/doi/10.2215/CJN.04151206>
- [22] YOSHIKAWA, Hideki a Akira MYOUI. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*. 2005, **8**(3), 131-136. DOI: 10.1007/s10047-005-0292-1. ISSN 1434-7229. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10047-005-0292-1>
- [23] KIM, Hae-Won, Young-Hag KOH, Long-Hao LI, Sook LEE a Hyoun-Ee KIM. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(13), 2533-2538 [cit. 2018-10-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.041. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203007774>
- [24] KOBAYASHI, Satoshi a Takuma MURAKOSHI. Characterization of mechanical properties and bioactivity of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate composites. *Advanced*

- Composite Materials. 2013, 23(2), 163-177. DOI: 10.1080/09243046.2013.844897. ISSN 0924-3046. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09243046.2013.844897>
- [25] CUI, Fu-Zhai, Yan LI a Jun GE. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2007, **57**(1-6), 1-27. DOI: 10.1016/j.mser.2007.04.001. ISSN 0927796X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X07000526>
- [26] ZAMIRI, A. a S. DE. Mechanical properties of hydroxyapatite single crystals from nanoindentation data. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2011, **4**(2), 146-152. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2010.11.001. ISSN 17516161. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616110001633>
- [27] SARFRAZ, S., B. NASEEM, S. AMIN a M. MUJAHID. Synthesis and Characterization of Nano Hydroxyapatite. *Advanced Materials Research*. 2011, **264-265**, 1370-1375. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.264-265.1370. ISSN 1662-8985. Dostupné také z: <https://www.scientific.net/AMR.264-265.1370>
- [28] PRAMANIK, Sumit, Avinash Kumar AGARWAL, K.N. RAI a Ashish GARG. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. *Ceramics International*. 2007, **33**(3), 419-426. DOI: 10.1016/j.ceramint.2005.10.025. ISSN 02728842. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884205003081>
- [29] ZHAN, J., Y.-H. TSENG, J. C. C. CHAN a C.-Y. MOU. Biomimetic Formation of Hydroxyapatite Nanorods by a Single-Crystal-to-Single-Crystal Transformation. *Advanced Functional Materials*. 2005, **15**(12), 2005-2010. DOI: 10.1002/adfm.200500274. ISSN 1616-301X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.200500274>
- [30] IKOMA, Toshiyuki, Atsushi YAMAZAKI, Satoshi NAKAMURA a Masaru AKAO. Preparation and Structure Refinement of Monoclinic Hydroxyapatite. *Journal of Solid State Chemistry*. 1999, **144**(2), 272-276. DOI: 10.1006/jssc.1998.8120. ISSN 00224596. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002245969881208>
- [31] KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, **62**(4), 600-612. DOI: 10.1002/jbm.10280. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.10280>
- [32] PARK, Joon Bu. *Bioceramics: properties, characterizations, and applications*. New York: Springer, c2008. ISBN 978-0-387-09544-8.
- [33] ZHOU, Hongjian a Jaebeom LEE. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2011, **7**(7), 2769-2781. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.019. ISSN 17427061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001310>
- [34] HENCH, Larry L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991, **74**(7), 1487-1510. DOI: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>
- [35] ZHOU, Changchun, Youliang HONG a Xingdong ZHANG. Applications of nanostructured calcium phosphate in tissue engineering. *Biomaterials Science*. 2013, **1**(10). DOI:

- 10.1039/c3bm60058k. ISSN 2047-4830. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3bm60058k>
- [36] LIU, Meili, Gang ZHOU, Wei SONG, Ping LI, Haifeng LIU, Xufeng NIU a Yubo FAN. Effect of nano-hydroxyapatite on the axonal guidance growth of rat cortical neurons. *Nanoscale*. 2012, **4**(10). DOI: 10.1039/c2nr30072a. ISSN 2040-3364. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2nr30072a>
- [37] RODRÍGUEZ-RUIZ, Isaac, José Manuel DELGADO-LÓPEZ, Miguel A. DURÁN-OLIVENCIA, Michele IAFISCO, Anna TAMPIERI, Donato COLANGELO, Maria PRAT a Jaime GÓMEZ-MORALES. PH-Responsive Delivery of Doxorubicin from Citrate–Apatite Nanocrystals with Tailored Carbonate Content. *Langmuir*. 2013, **29**(26), 8213-8221. DOI: 10.1021/la4008334. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/la4008334>
- [38] FRITSCH, Andreas, Luc DORMIEUX, Christian HELLMICH a Julien SANAHUJA. Mechanical behavior of hydroxyapatite biomaterials: An experimentally validated micromechanical model for elasticity and strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, **88A**(1), 149-161. DOI: 10.1002/jbm.a.31727. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31727>
- [39] Scaffold Structure and Fabrication. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Berlin: Springer, 2009, s. 539-549. ISBN 978-3-540-77755-7.
- [40] BRETCANU, Oana, Claire SAMAILLE a Aldo R. BOCCACCINI. Simple methods to fabricate Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds exhibiting porosity gradient. *Journal of Materials Science*. 2008, **43**(12), 4127-4134. DOI: 10.1007/s10853-008-2536-y. ISSN 0022-2461. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10853-008-2536-y>
- [41] CHEN, Qizhi Z., Ian D. THOMPSON a Aldo R. BOCCACCINI. 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, **27**(11), 2414-2425. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205010422>
- [42] Photographs of two commercially available hydroxyapatite cylindrical scaffolds with different porosity produced by sponge replica method. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2015 [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/files/Articles/169485/fbioe-03-00202-HTML/image_m/fbioe-03-00202-g003.jpg
- [43] BARG, Suelen, Elisângela Guzi DE MORAES, Dietmar KOCH a Georg GRATHWOHL. New cellular ceramics from high alkane phase emulsified suspensions (HAPES). *Journal of the European Ceramic Society*. 2009, **29**(12), 2439-2446. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2009.02.003. ISSN 09552219. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221909000727>
- [44] MURRAY, Brent S. a Rammile ETTALAIE. *Foam stability: proteins and nanoparticles*. 2004, **9**(5), 314-320. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.09.004. ISSN 13590294. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029404000895>
- [45] LEONG, K.F., C.M. CHEAH a C.K. CHUA. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003, **24**(13), 2363-2378. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00030-9. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203000309>

- [46] SACHLOS, E a JT CZERNUSZKA. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*. 2003, **5**, 29-40. DOI: 10.22203/eCM.v005a03. Dostupné také z: <http://ecmjournal.org/journal/papers/vol005/pdf/v005a03.pdf>
- [47] MURR, Lawrence E. Examples of Natural Composites and Composite Structures. *Handbook of Materials Structures, Properties, Processing and Performance*. Cham: Springer International Publishing, 2021, 2014-6-12, 1-21. DOI: 10.1007/978-3-319-01905-5_25-1. ISBN 978-3-319-01905-5. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-01905-5_25-1
- [48] *Particulate composites*. New York, NY: Springer Science Business Media, 2016, s. 2-8. ISBN 978-3-319-29915-0.
- [49] DAHMAN, Yaser. Biocomposites as Implantable Biomaterials. *Biomaterials Science and Technology*. CRC Press, 2019, 2019-2-11, 93-132. DOI: 10.1201/9780429465345-5. ISBN 9780429465345. Dostupné také z: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429878350/chapters/10.1201/9780429465345-5>
- [50] SHEIKH, Zeeshan, Corneliu SIMA a Michael GLOGAUER. Bone Replacement Materials and Techniques Used for Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. *Materials*. 2015, **8**(6), 2953-2993. DOI: 10.3390/ma8062953. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/8/6/2953>
- [51] NORTHUP, Sharon J. Strategies for Biological Testing of Biomaterials. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016, **2**(1), 132-148. DOI: 10.1177/088532828700200104. ISSN 0885-3282. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088532828700200104>
- [52] OYANE, Ayako, Hyun-Min KIM, Takuo FURUYA, Tadashi KOKUBO, Toshiki MIYAZAKI a Takashi NAKAMURA. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, 65A(2), 188-195. DOI: 10.1002/jbm.a.10482. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10482>
- [53] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983, 65(1-2), 55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. ISSN 00221759. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
- [54] IRWANDI JASWIR. Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of *Padina australis* and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. 2011, 10(81), 18859. DOI: 10.5897/AJB11.2765. ISSN 16845315. Dostupné také z: [http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2011/16DecConf/Jaswir et al 2.htm](http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2011/16DecConf/Jaswir%20et%20al%202.htm)
- [55] What Does In Vivo and In Vitro Mean?: In Vivo vs In Vitro - Definition, Similarities and Differences. *Verywellhealth* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/what-does-in-vivo-and-in-vitro-mean-2249118>
- [56] VOJTÍŠEK, J. Pokročilá keramika pro tkáňové inženýrství. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 60 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.

- [57] JOUGHEHDOUST, S. a S. MANAFI. Synthesis and in vitro investigation of sol-gel derived bioglass-58S nanopowders. *Materials Science-Poland*. 2012, **30**(1), 45-52. DOI: 10.2478/s13536-012-0007-2. ISSN 2083-1331. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s13536-012-0007-2>
- [58] X-Ray Diffraction – XRD. *Particle Analytical* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://particle.dk/methods-analytical-laboratory/xrd-analysis/>
- [59] Diffraction of x-rays by crystals. In: *KSHITIJ EDUCATION INDIA* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.kshitij-iitjee.com/diffraction-of-x-rays-by-crystals/>
- [60] Empyreon. In: *Malvern Panalytical* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/empyrean-range/empyrean>
- [61] Měření plochy povrchu pevných látek a určování jejich porozity metodou sorpce plynu. In: *Portál moderní fyziky* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/ostatni/BET.pdf>
- [62] NOVA SURFACE AREA AND PORE SIZE BY GAS SORPTION. In: *Quantachrome Instruments* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: http://www.quantachrome.com/gassorption/nova_series.html
- [63] MIKROSKOPICKÉ METODY + PŘÍSLUŠENSTVÍ. In: *Fakulta chemická VUT* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www2.fch.vut.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristroje-a-metody/mikroskopicke-metody-prislusenstvi.html>
- [64] KOKUBO, Tadashi a Hiroaki TAKADAMA. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*. 2006, **27**(15), 2907-2915. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206000457>
- [65] MALÁT, Miroslav. Absorpční anorganická fotometrie. 1. vyd. Praha: nakladatelství Československé akademie věd, 1973
- [66] Zeiss EVO LS10 VP-SEM. In: *Gateway materials test center* [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <http://www.gatewaymaterialstestcenter.com/EVOPopup.html>
- [67] HAYES, T.L. a R.F.W. PEASE. *The Scanning Electron Microscope: Principles and Applications in Biology and Medicine*. Elsevier, 1968, 1968, , 85-137. Advances in Biological and Medical Physics. DOI: 10.1016/B978-1-4831-9928-3.50006-0. ISBN 9781483199283. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483199283500060>
- [68] Bioglasses Bioglasses and Bioglass Bioglass-ceramics. In: Cost [online]. [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <http://www.cost-newgen.org/wp-content/uploads/2016/06/3B-Bioglasses-and-glass-ceramics-S-Hampshire.pdf>
- [69] LI, J., B. FARTASH a L. HERMANSSON. Hydroxyapatite—alumina composites and bone-bonding. *Biomaterials*. 1995, **16**(5), 417-422. DOI: 10.1016/0142-9612(95)98860-G. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014296129598860G>
- [70] CHENG, Hao, Rosa CHABOK, Xiaofei GUAN, Aditya CHAWLA, Yuxiao LI, Ali KHADEMHOSEINI a Hae Lin JANG. Synergistic interplay between the two major bone minerals, hydroxyapatite and whitlockite nanoparticles, for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*. 2018, **69**, 342-351. DOI:

10.1016/j.actbio.2018.01.016. ISSN 17427061. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706118300278>

- [71] DE AZA, P. N., F. GUITIÁN, S. DE AZA a F. J. VALLE. Analytical control of wollastonite for biomedical applications by use of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *The Analyst*. **123**(4), 681-685. DOI: 10.1039/a708445e. ISSN 00032654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a708445e>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

HEPES = 2-(4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl)etánsulfónová kyselina

TRIS = tris(hydroxymetyl)aminometán

H₂SO₄ = kyselina sírová

TCP = trikalcium fosfát

HA – hydroxyapatit

SBF – simulovaná telesná tekutina

XRD – röntgenová difrakčná analýza

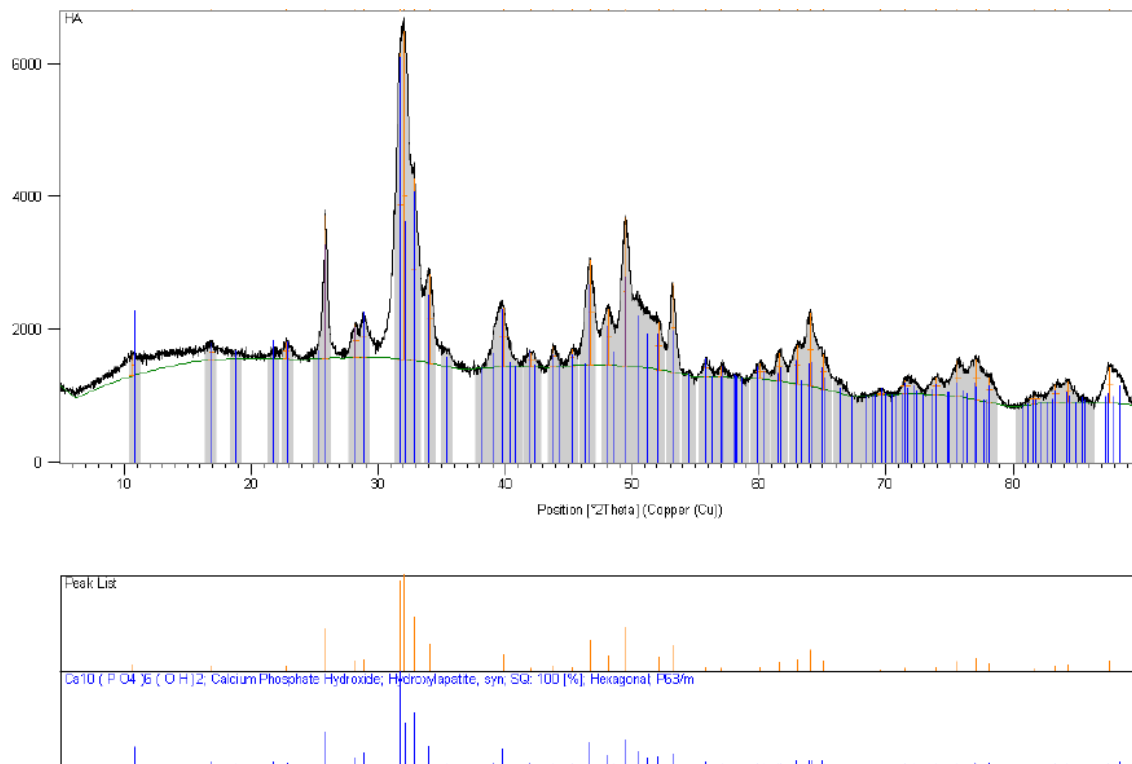
ŽM – žiarová mikroskopia

TG – termogravimetria

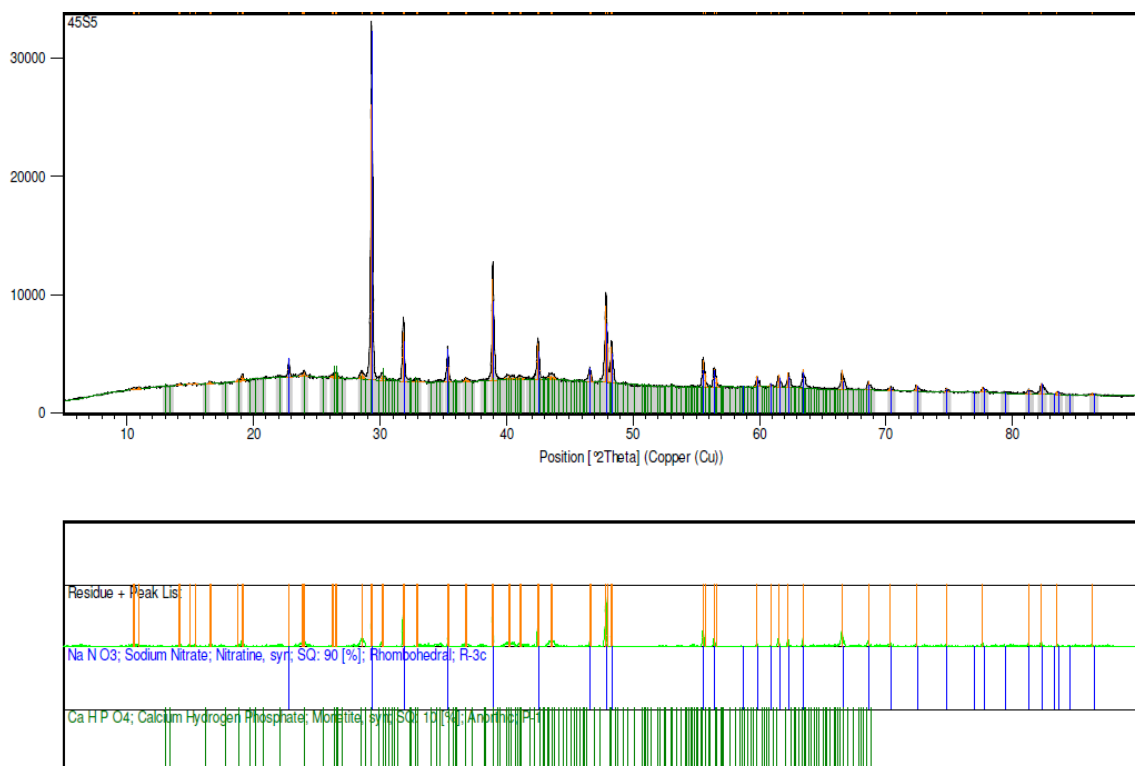
DTA – diferenčná termogravimetrická analýza

SEM – Rastrovacia elektronová mikroskopia

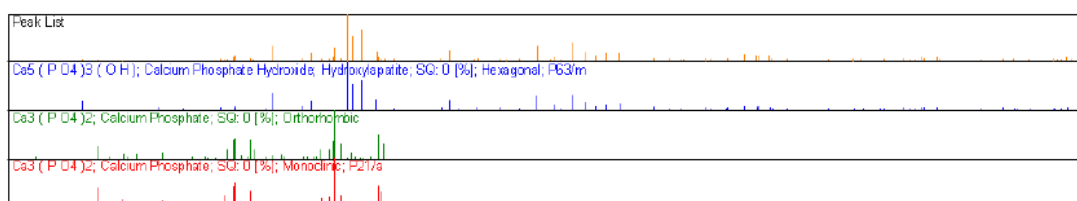
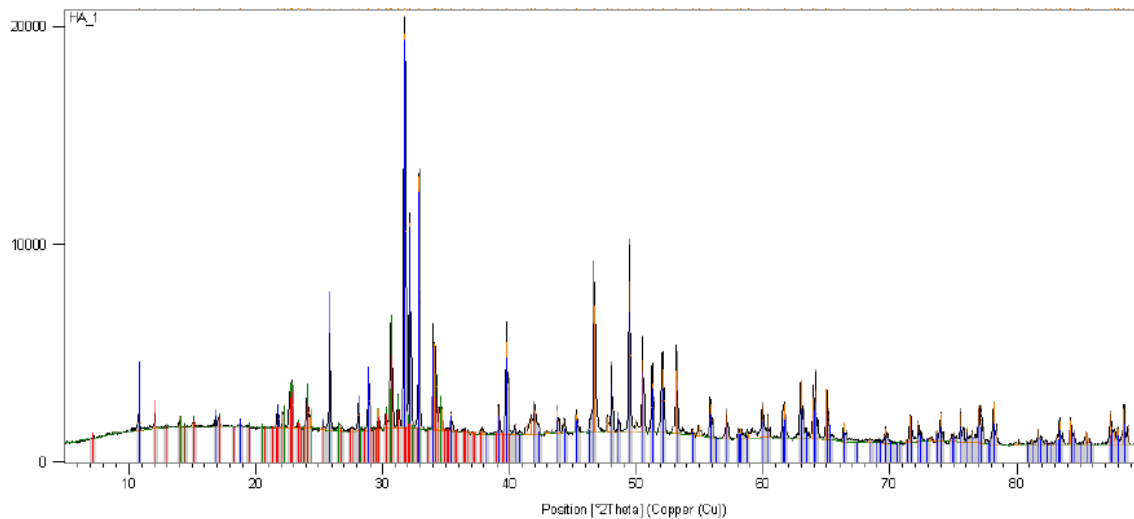
8 PRÍLOHY



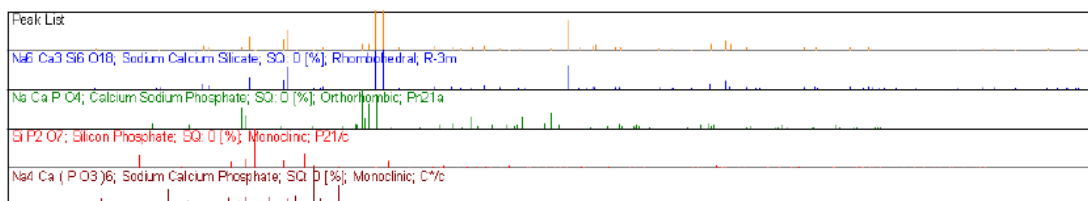
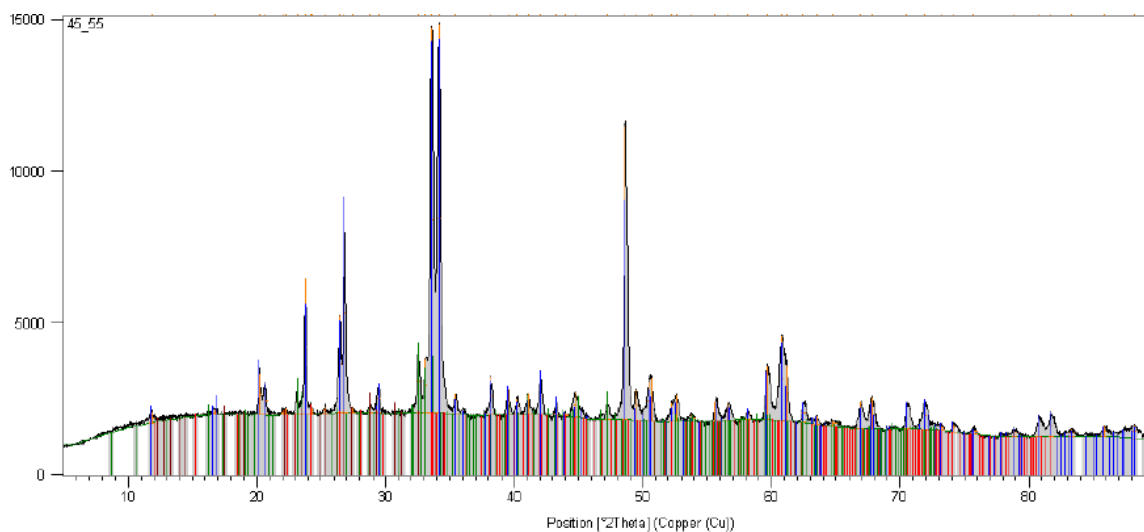
Obr. 1 Difraktogram pripraveného čistého prášku HA



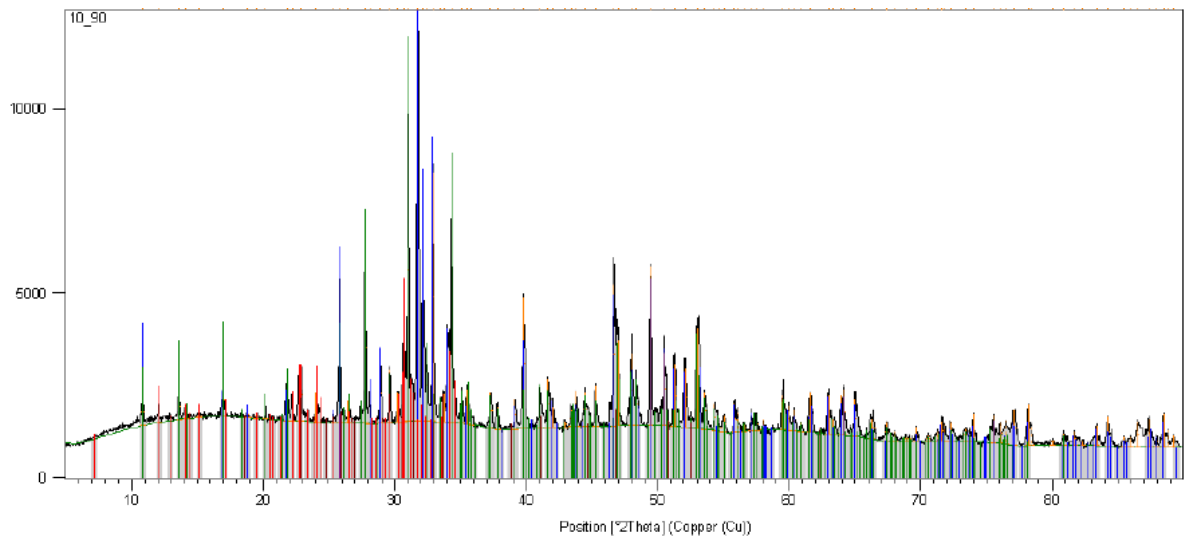
Obr. 2 Difraktogram pripraveného čistého prášku 45S5



Obr. 3 Difraktogram prášku HA po spekaní

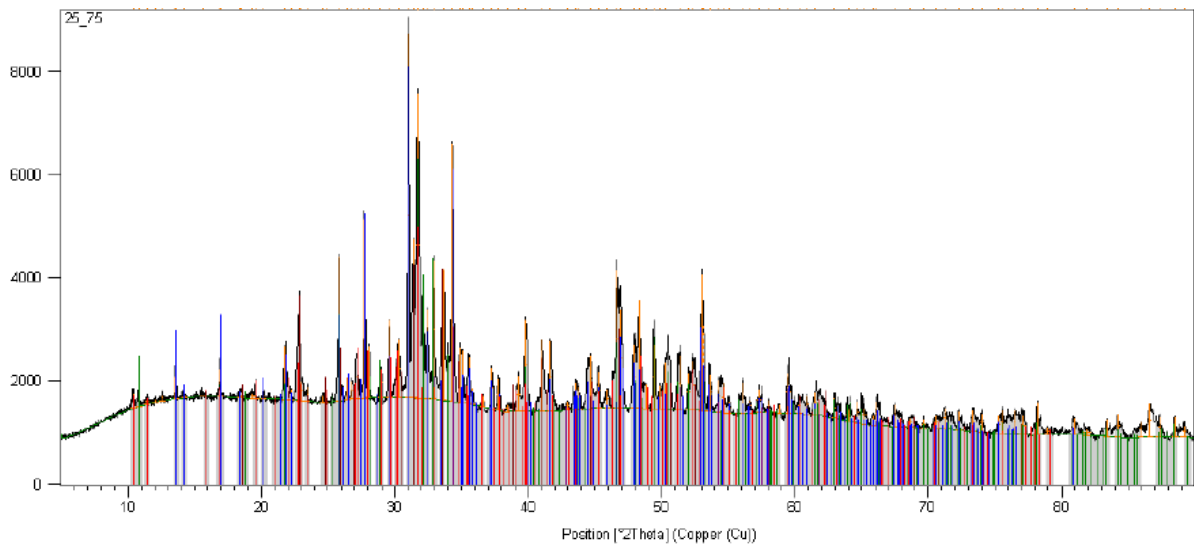


Obr. 4 Difraktogram prášku 45S5 po spekaní



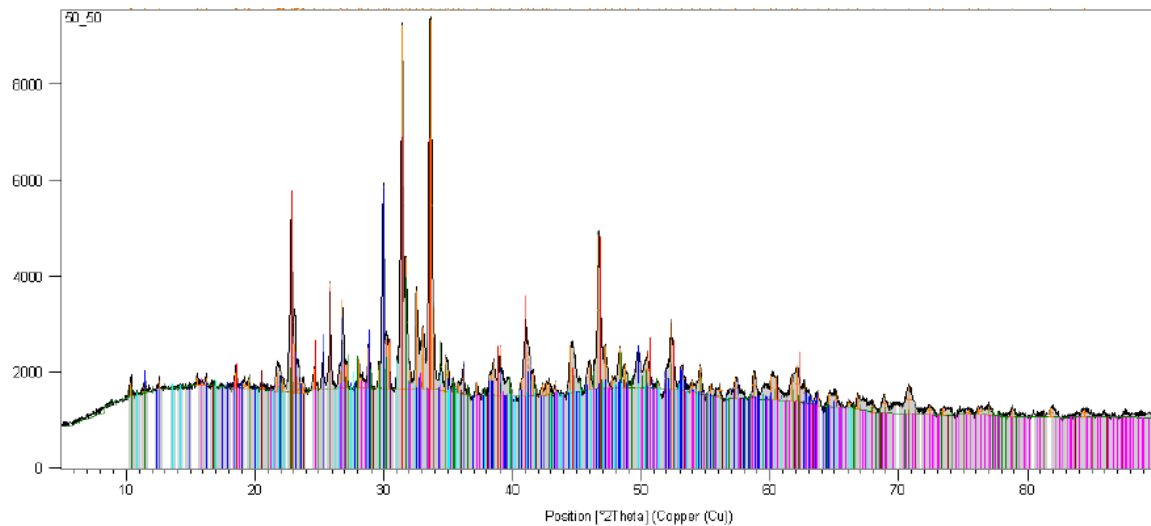
Peak List
Ca5 (P O4)3 (O H); Calcium Phosphate Hydroxide, Hydroxylapatite, SQ: 0 [%]; Hexagonal, P63/m
Ca2.993 H0.014 (P O4)2; Calcium Phosphate, Whiteite, syn, SQ: 0 [%]; Rhombohedra, R3c
Ca3 (P O4)2; Calcium Phosphate, SQ: 0 [%]; Orthorhombic
Na3 Ca6 (P O4)5; Sodium Calcium Phosphate, SQ: 0 [%]; Unknown

Obr. 5 Difraktogram kompozitu K 10/90 po spekaní



Peak List
Ca2.993 H0.014 (P O4)2; Calcium Phosphate, Whiteite, syn, SQ: 0 [%]; Rhombohedra, R3c
Ca5 (P O4)3 (O H); Calcium Phosphate Hydroxide, Hydroxylapatite, SQ: 0 [%]; Hexagonal, P63/m
Ca5 (P O4)2 Si O4; Calcium Phosphate Silicate, SQ: 0 [%]; Orthorhombic, Pmcn
Na3 Ca6 (P O4)5; Sodium Calcium Phosphate, SQ: 0 [%]; Unknown

Obr. 6 Difraktogram kompozitu K 25/75 po spekaní



Peak List
Ca Si O ₃ ; Calcium Silicate, Wollastonite, SQ: 0 [%], Arthric, P-1
Ca ₅ (P O ₄) ₂ Si O ₄ ; Calcium Phosphate Silicate, SQ: 0 [%], Orthorhombic, Pmcn
Na ₃ Ca ₆ (P O ₄) ₅ ; Sodium Calcium Phosphate, SQ: 0 [%], Unknown
Na ₂ Ca Si O ₄ ; Sodium Calcium Silicate, SQ: 0 [%], Cubic, P213
Ca ₃ (P O ₄) ₂ ; Calcium Phosphate, Whitlockite, syn, SQ: 0 [%], Rhombohedral, R-3c
Na ₂ (Si O ₅); Sodium Silicate, SQ: 0 [%], Orthorhombic, P21

Obr. 7 Difraktogram kompozitu K 50/50 po spekaní

MEASUREMENT PROTOCOL

Characteristic temperatures:

Sintering temperature:	850 °C
Deformation temperature:	n.d.
Deformation range:	n.d.
Sphere temperature:	n.d.
Hemisphere temperature:	n.d.
Flow range:	n.d.
Flow temperature:	n.d.

Heating profile:

Segm.	Heating rate	End temp.	Dwell time
1	5 °C/min	1600 °C	00:00
2			
3			
4			
5			
6			

DIN 51730 (1998-4) / ISO 540 (1995-03-15) Detemination of sphere temperature according to ISO 1711y for cones

Measurement parameters:

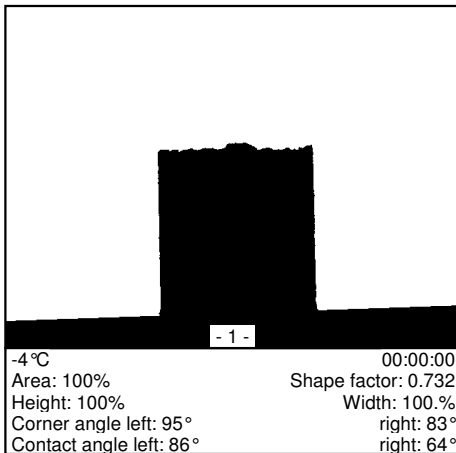
Images:	58
Measured data count:	1283
Tracked corner angle:	right
Operator:	Petr Ptacek
Device:	EMI1
Measured data folder:	D:\EMI2\Daten\G1107200\M1903040

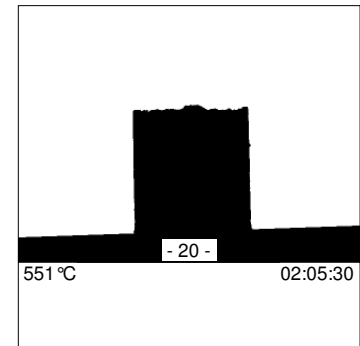
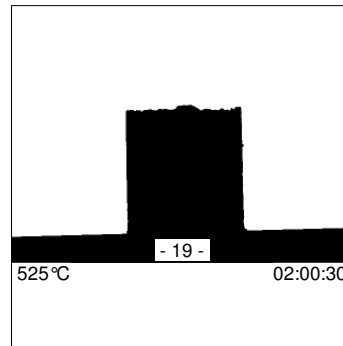
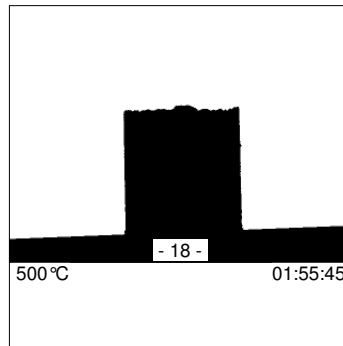
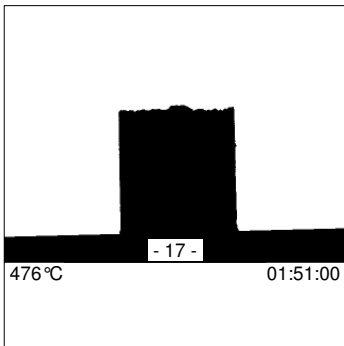
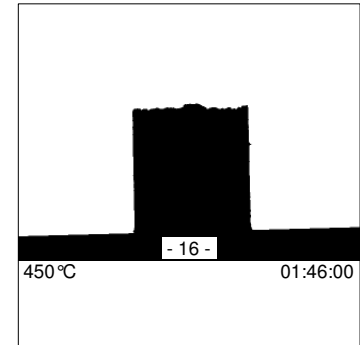
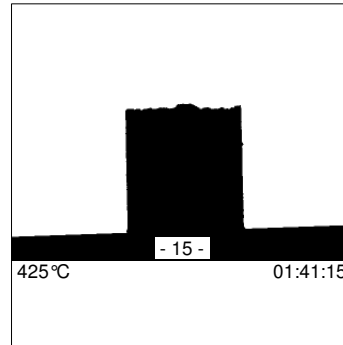
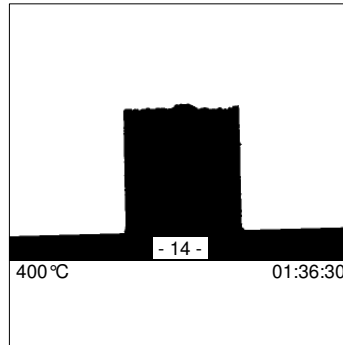
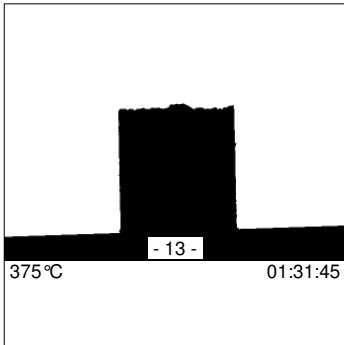
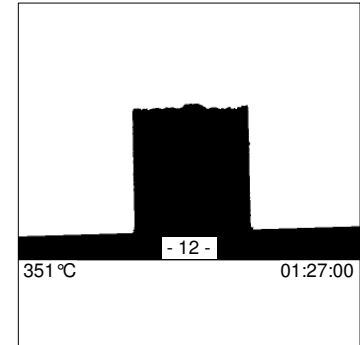
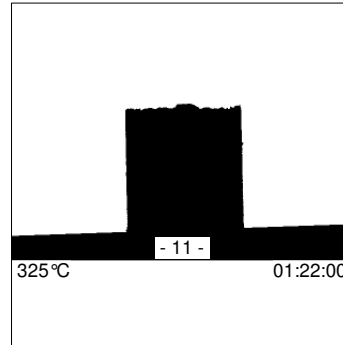
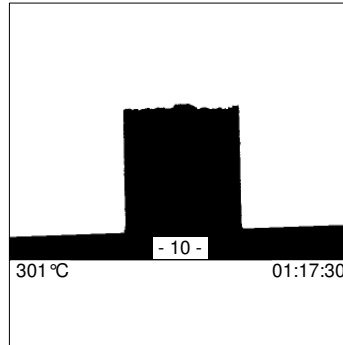
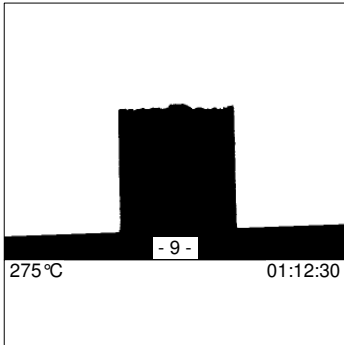
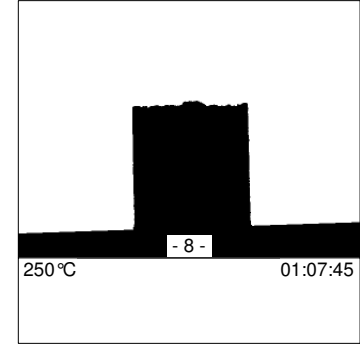
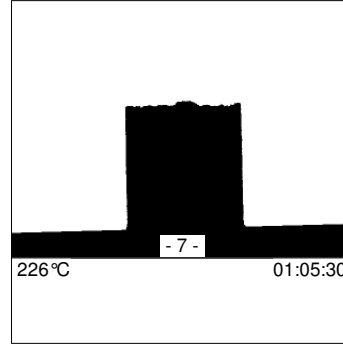
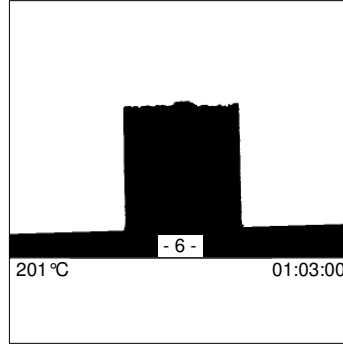
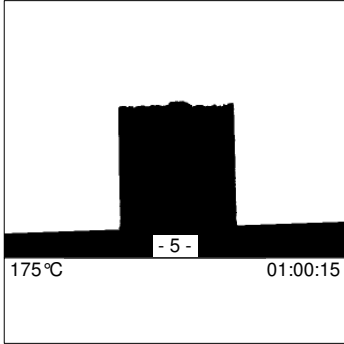
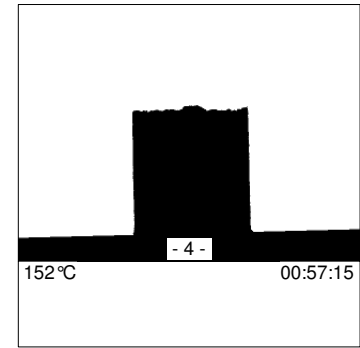
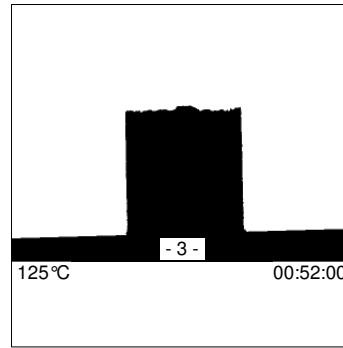
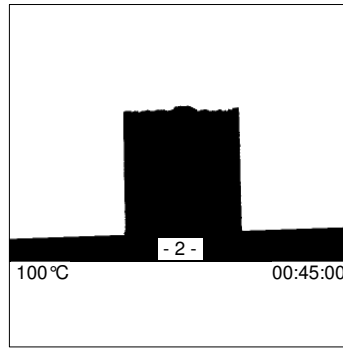
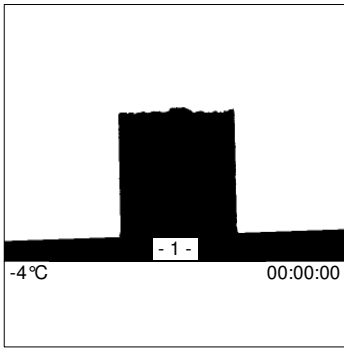
Conditions for new images:

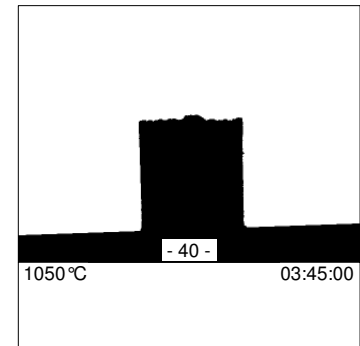
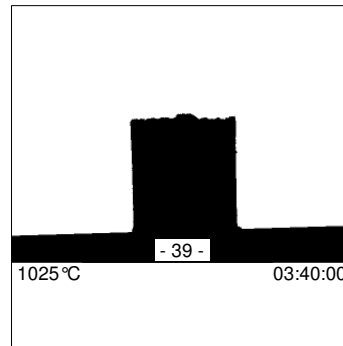
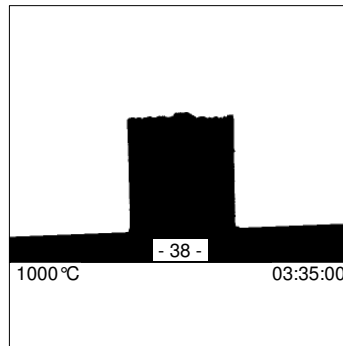
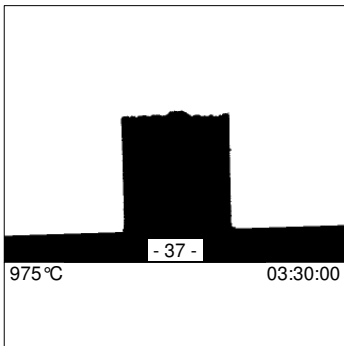
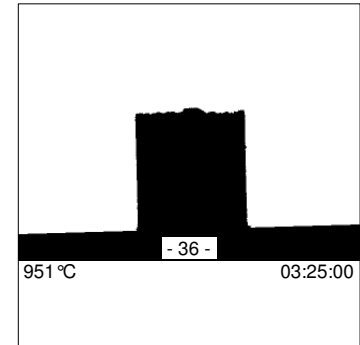
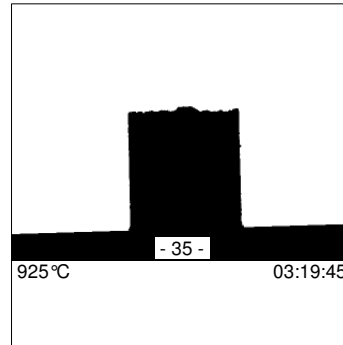
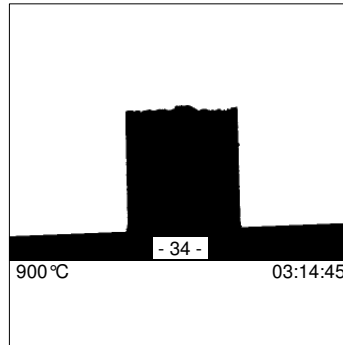
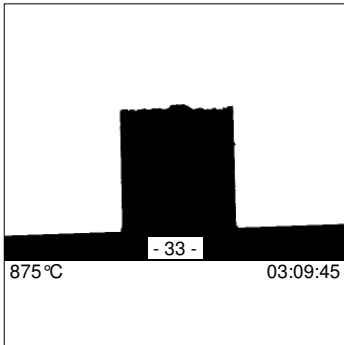
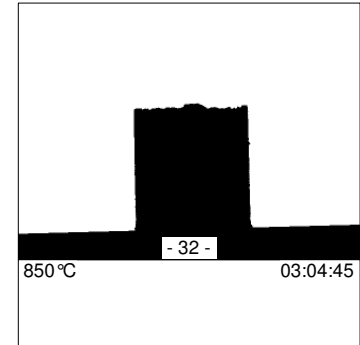
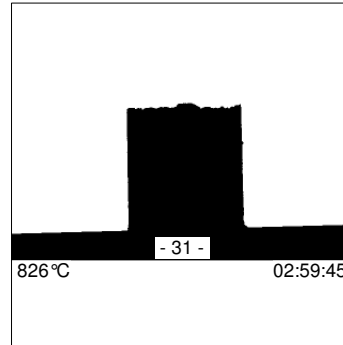
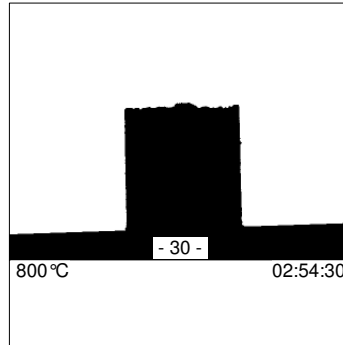
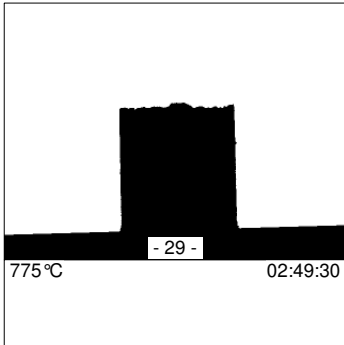
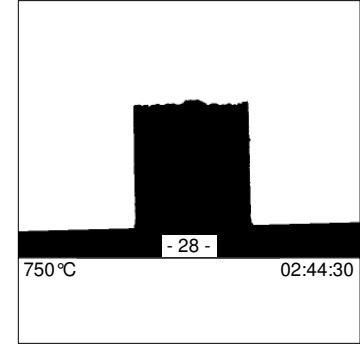
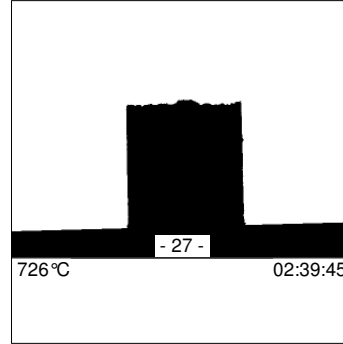
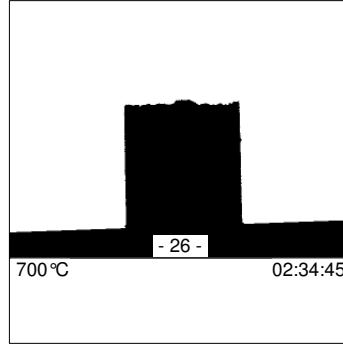
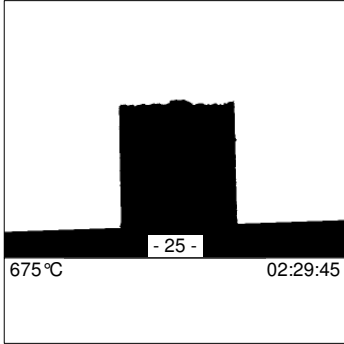
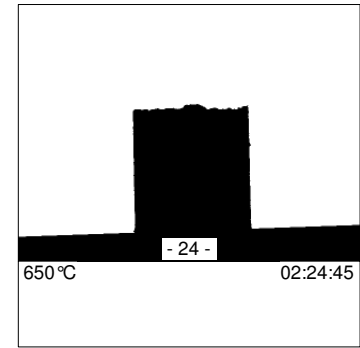
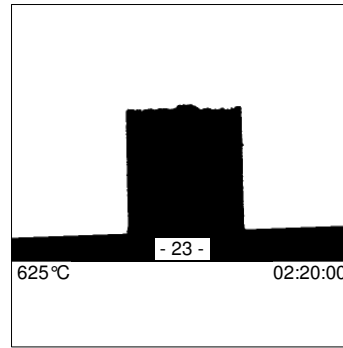
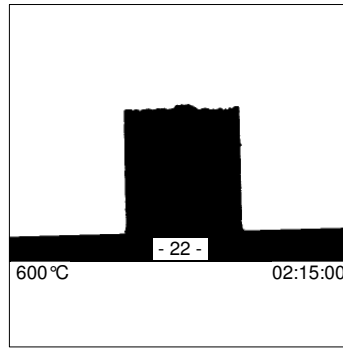
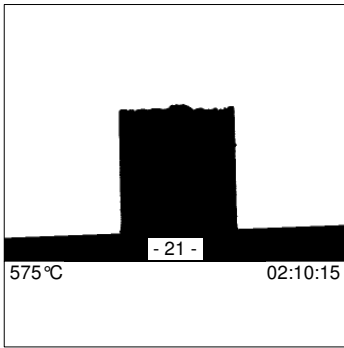
First image at:	100 °C
Images at least every	–
Area change:	5%
Corner angle change:	10%
Shape factor change:	5%
Temperature change:	25 °C

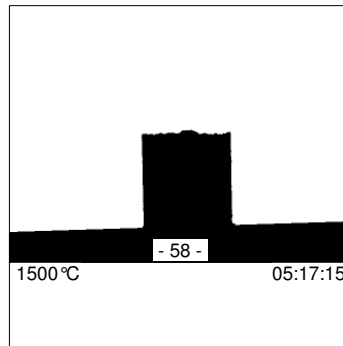
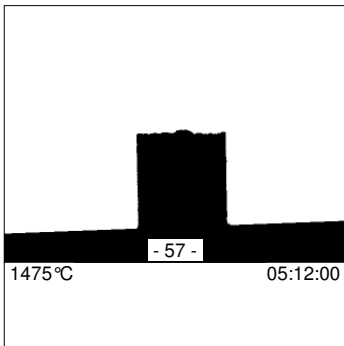
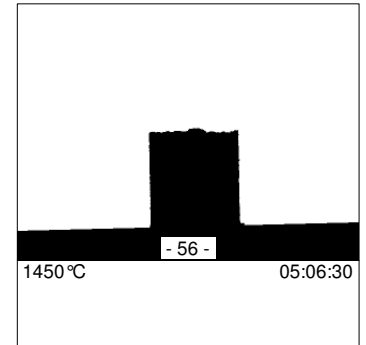
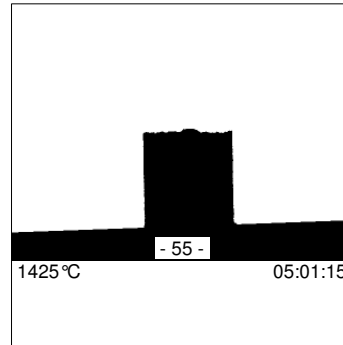
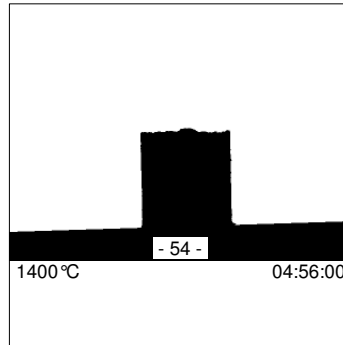
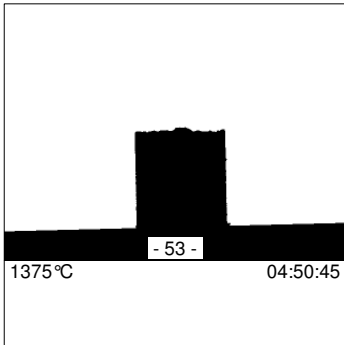
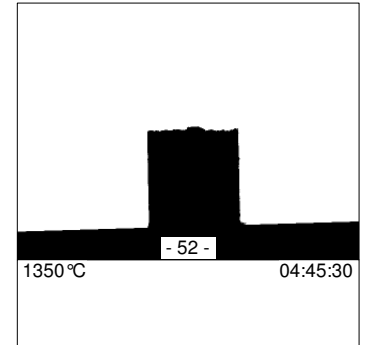
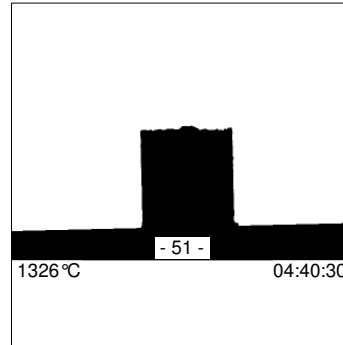
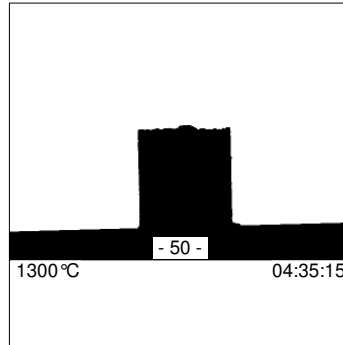
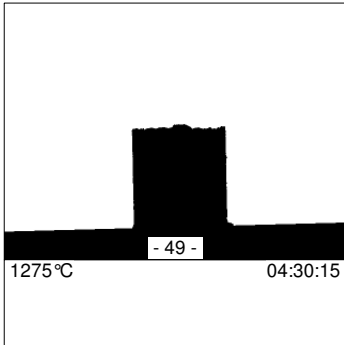
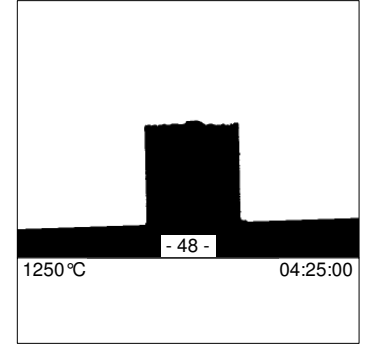
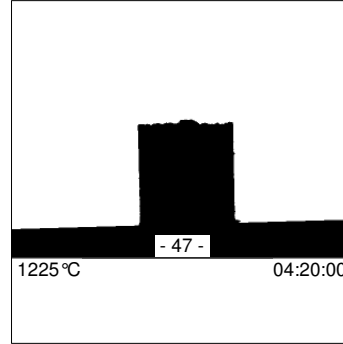
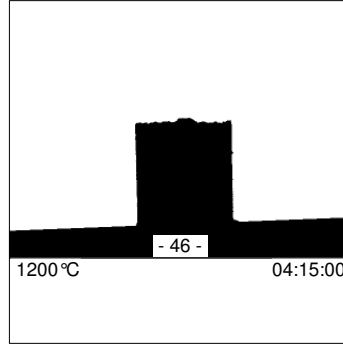
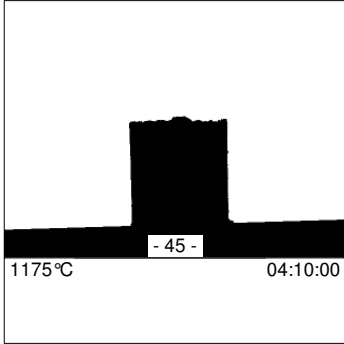
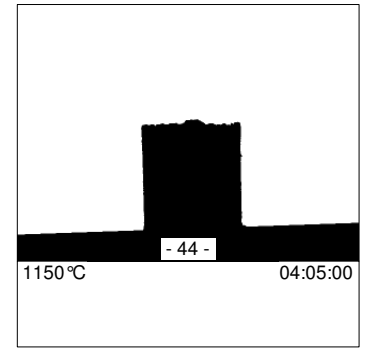
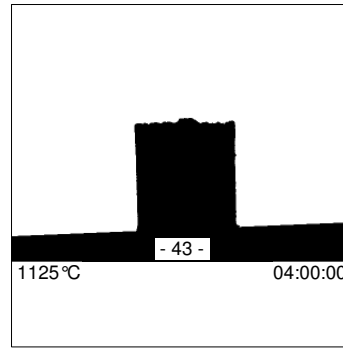
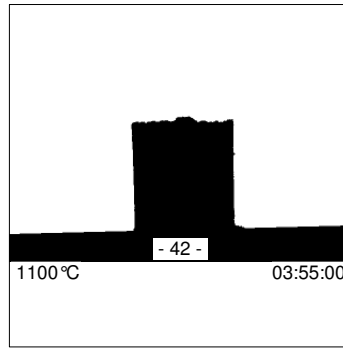
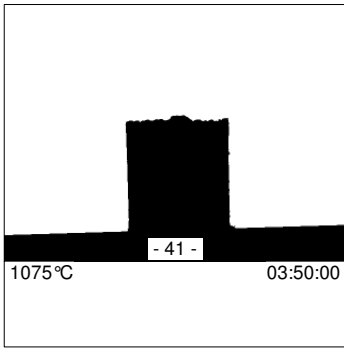
Notes:

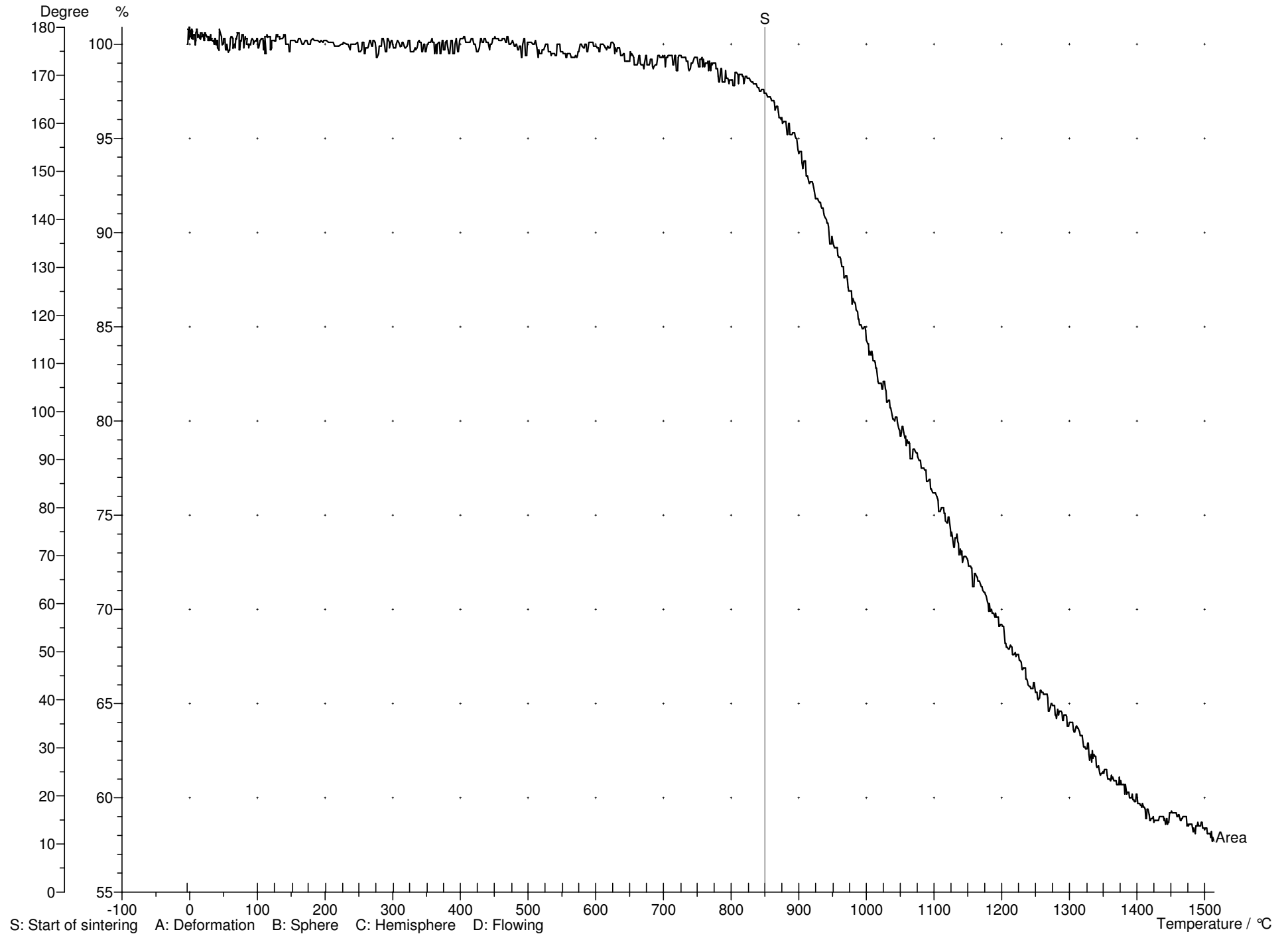
('n.d.' = 'not determined')











MEASUREMENT PROTOCOL

Characteristic temperatures:

Sintering temperature:	622 °C
Deformation temperature:	1075 °C Deformation range: n.d.
Sphere temperature:	n.d.
Hemisphere temperature:	n.d. Flow range: n.d.
Flow temperature:	n.d.

Heating profile:

Segm.	Heating rate	End temp.	Dwell time
1	5 °C/min	1600 °C	00:00
2			
3			
4			
5			
6			

DIN 51730 (1998-4) / ISO 540 (1995-03-15) Detemination of sphere temperature according to ISO 17171 for cones

Measurement parameters:

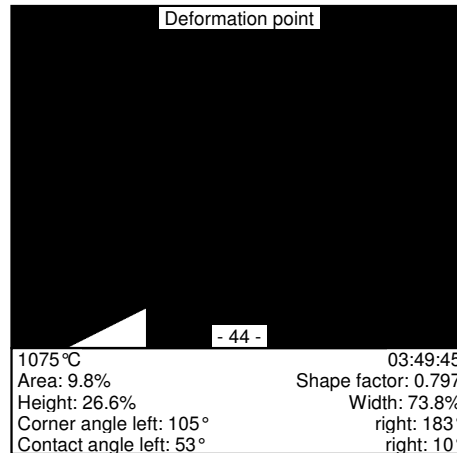
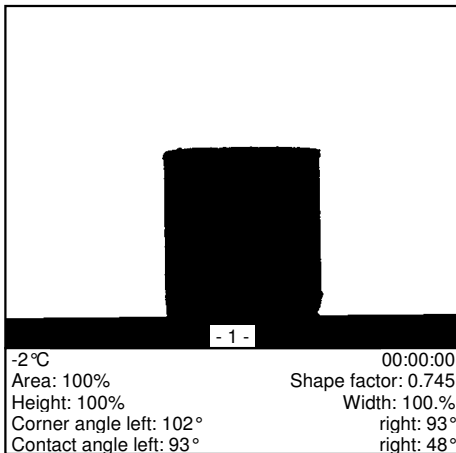
Images:	52
Measured data count:	937
Tracked corner angle:	right
Operator:	Petr Ptacek
Device:	EMI1
Measured data folder:	D:\EMI2\Daten\G1107200\M1903050

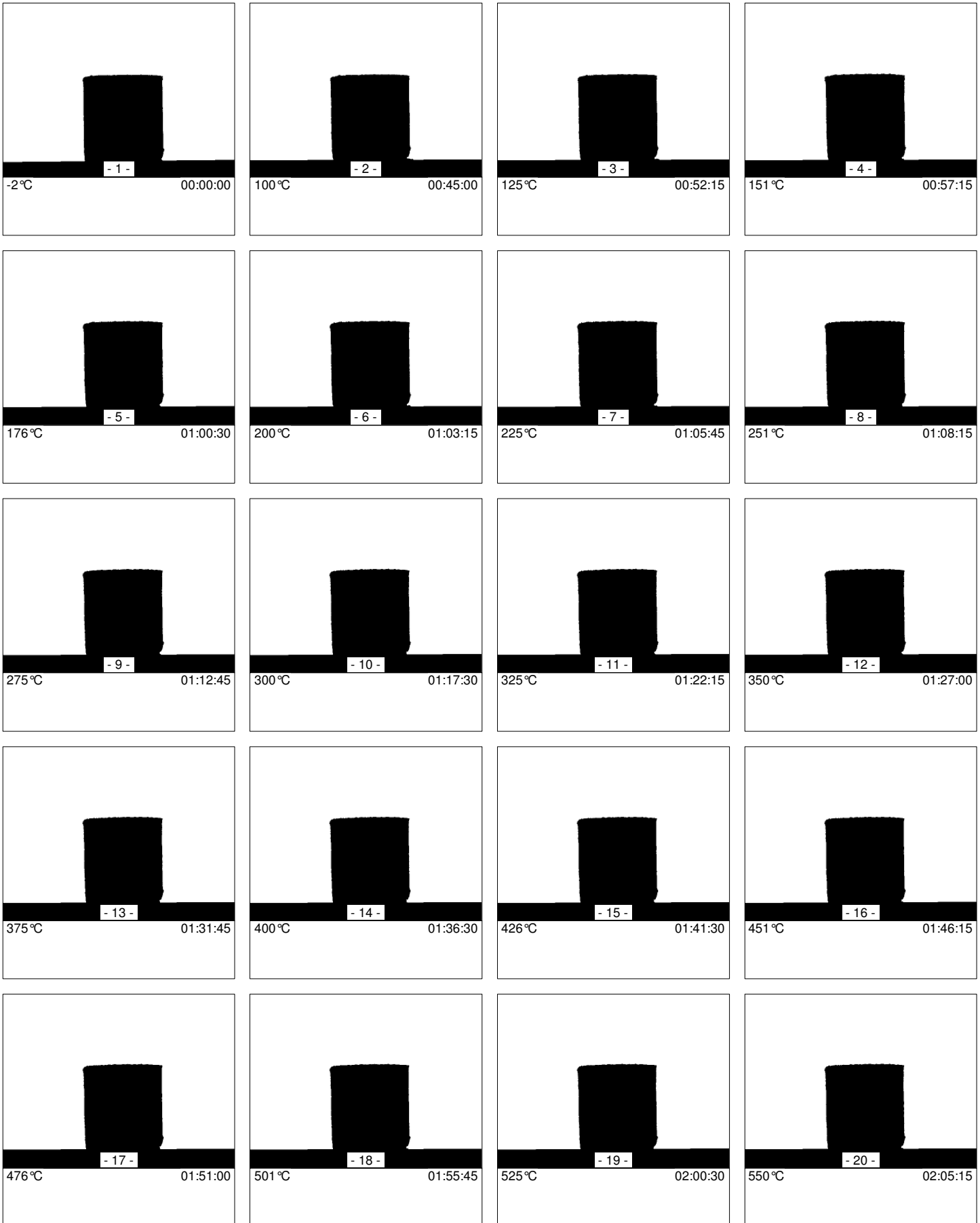
Conditions for new images:

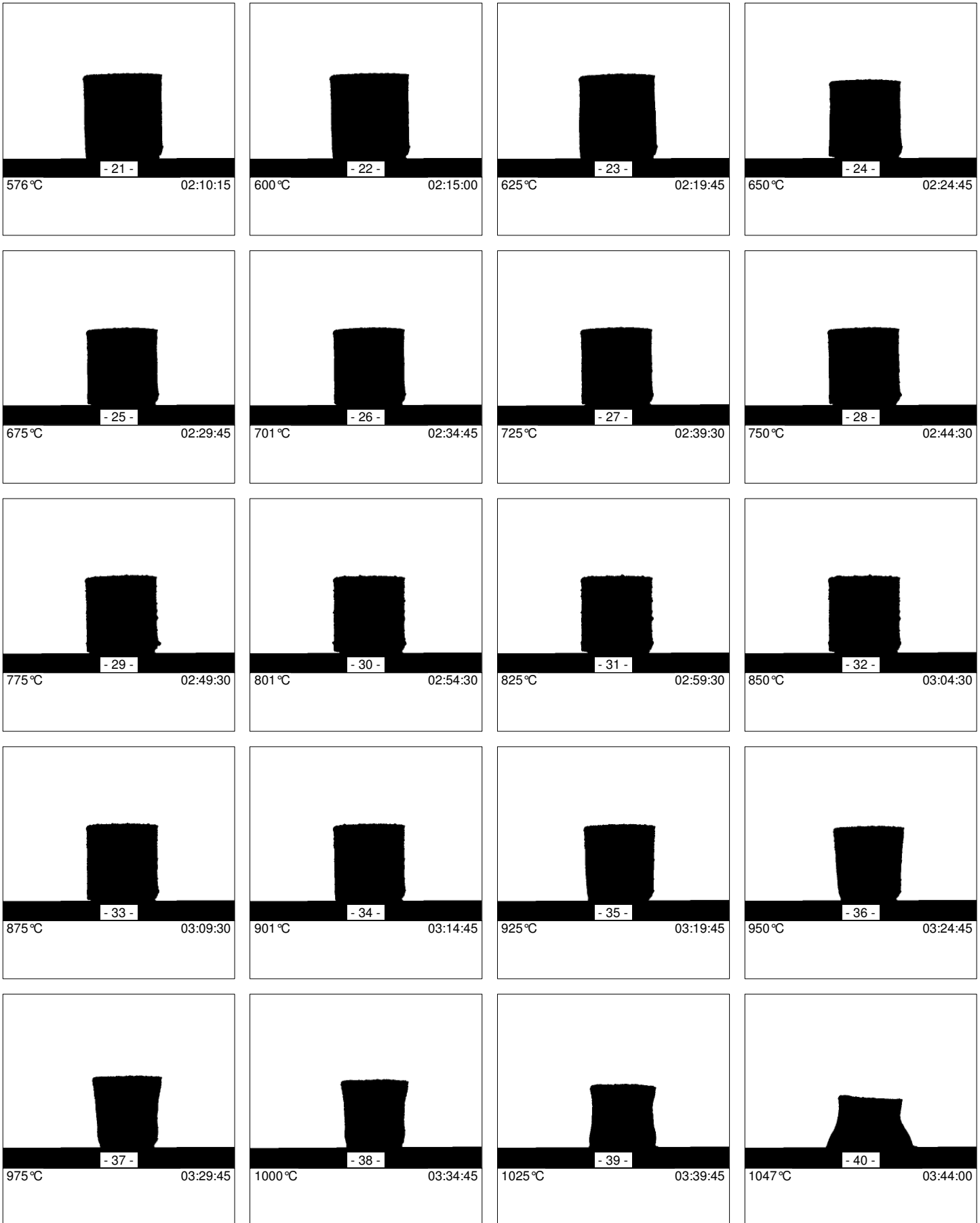
First image at:	100 °C
Images at least every	-
Area change:	5%
Corner angle change:	10%
Shape factor change:	5%
Temperature change:	25 °C

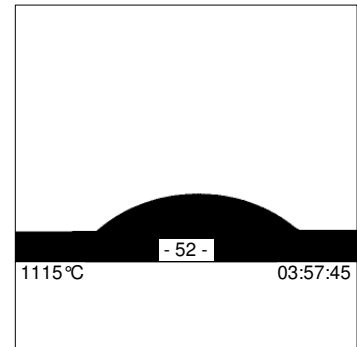
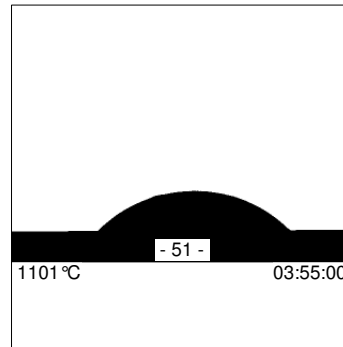
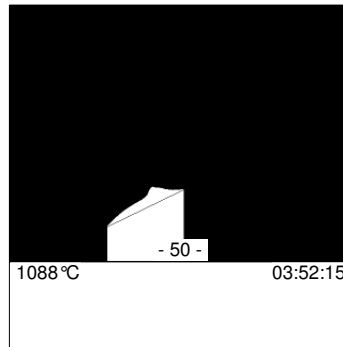
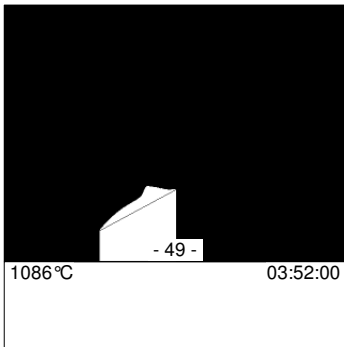
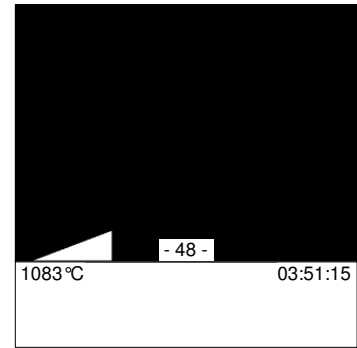
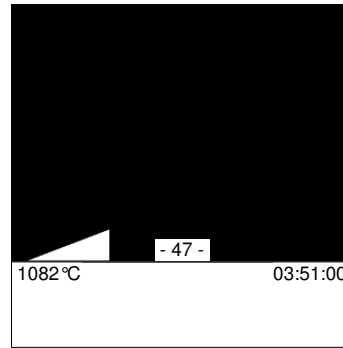
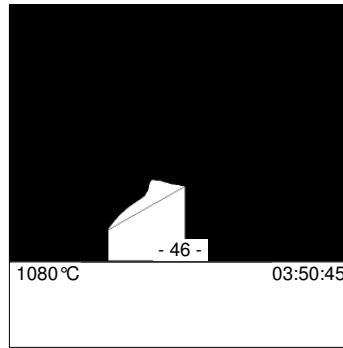
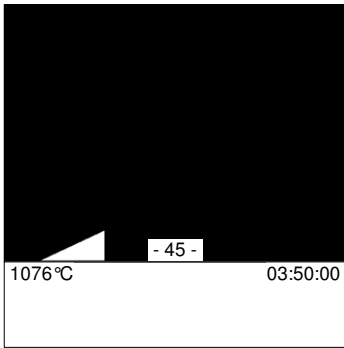
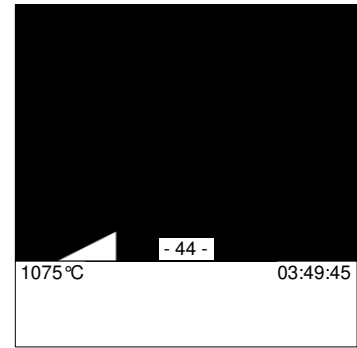
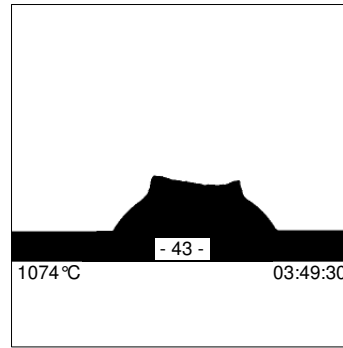
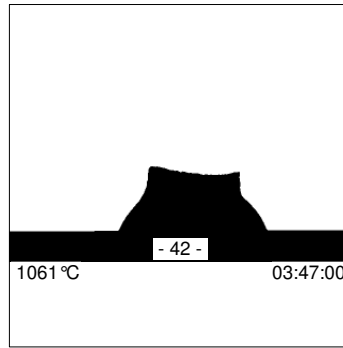
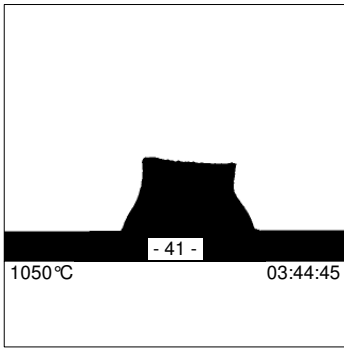
Notes:

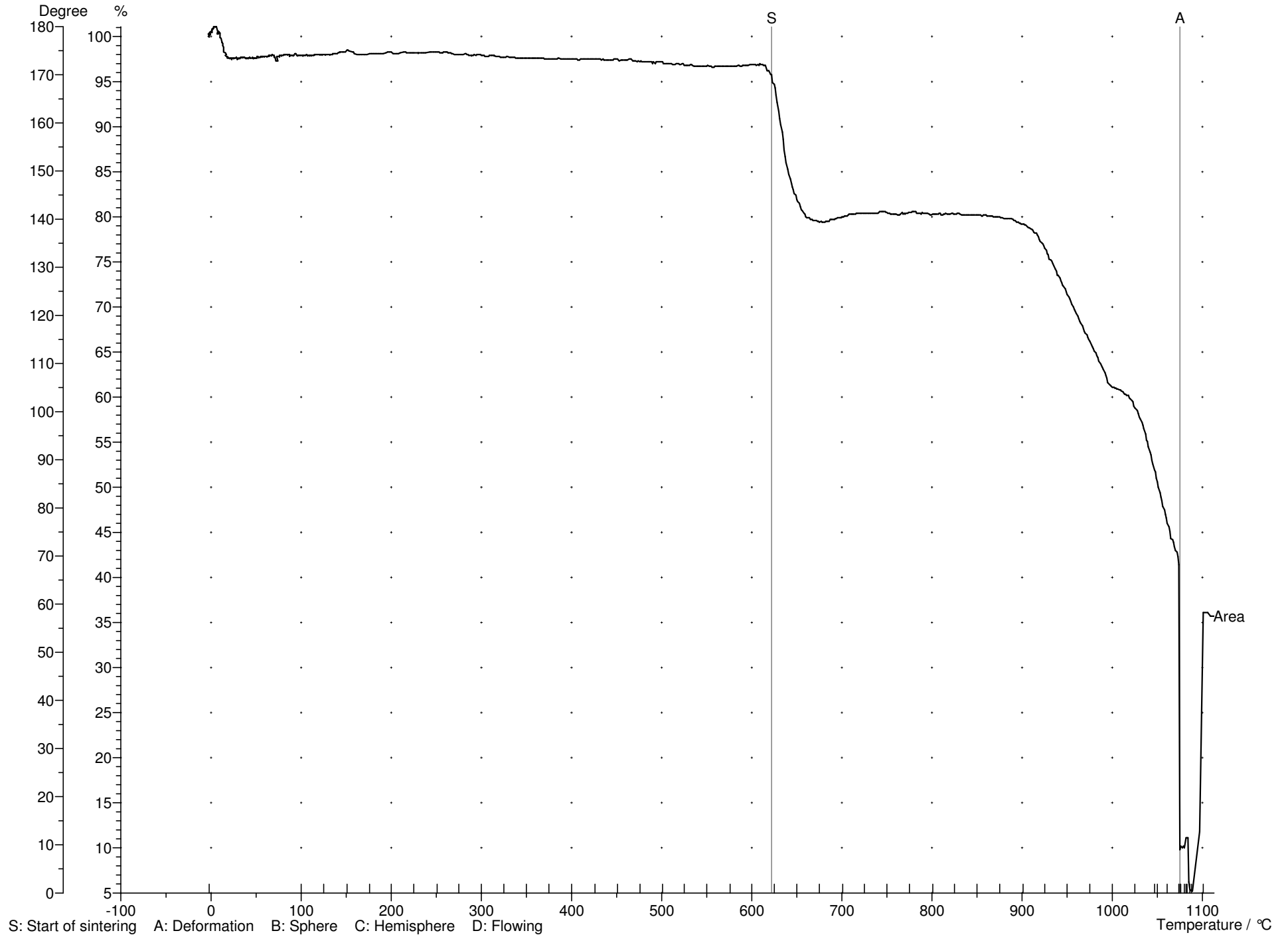
('n.d.' = 'not determined')











MEASUREMENT PROTOCOL

Characteristic temperatures:

Sintering temperature:	784 °C
Deformation temperature:	n.d.
Deformation range:	n.d.
Sphere temperature:	n.d.
Hemisphere temperature:	n.d.
Flow range:	n.d.
Flow temperature:	n.d.

Heating profile:

Segm.	Heating rate	End temp.	Dwell time
1	5 °C/min	1600 °C	00:00
2			
3			
4			
5			
6			

DIN 51730 (1998-4) / ISO 540 (1995-03-15) Detemination of sphere temperature according to ISO 17171 for cones

Measurement parameters:

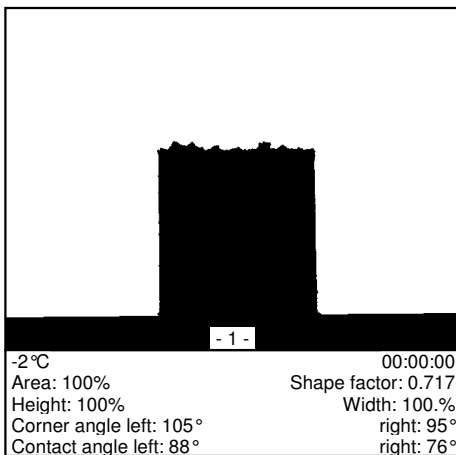
Images:	58
Measured data count:	1282
Tracked corner angle:	right
Operator:	Petr Ptacek
Device:	EMI1
Measured data folder:	D:\EMI2\Daten\G1107200\M1903060

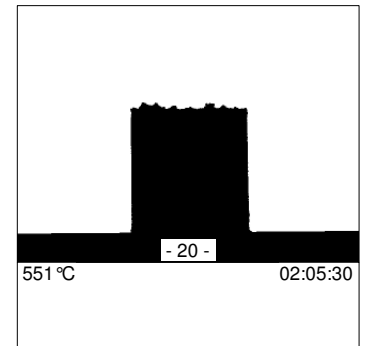
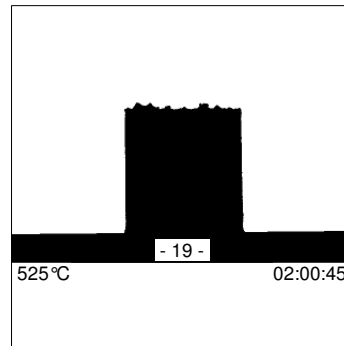
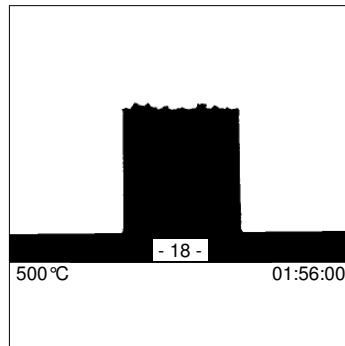
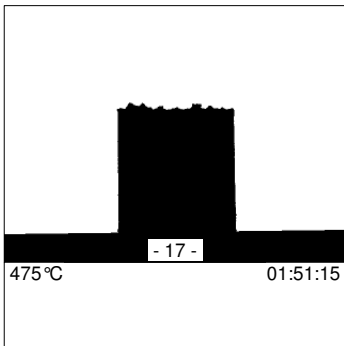
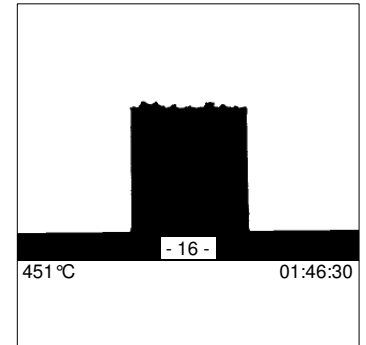
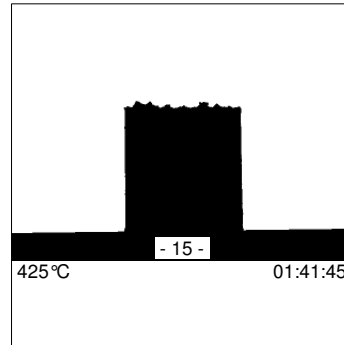
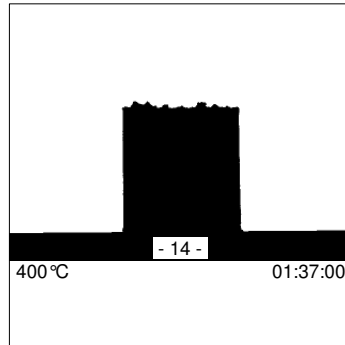
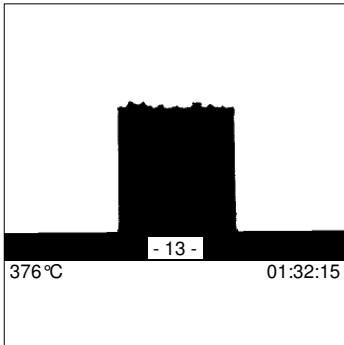
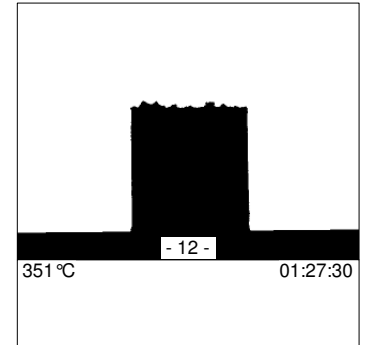
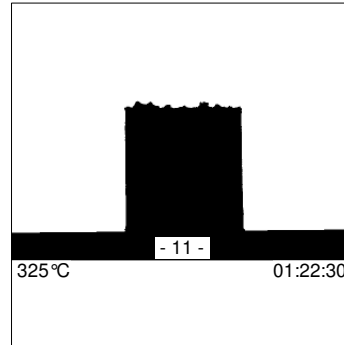
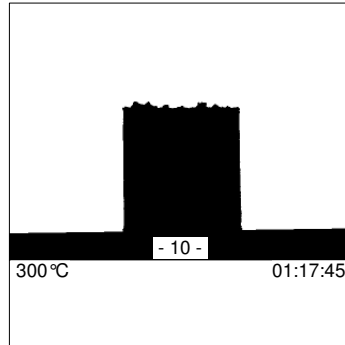
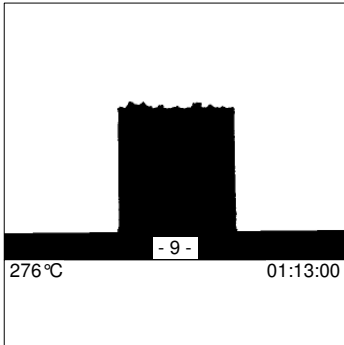
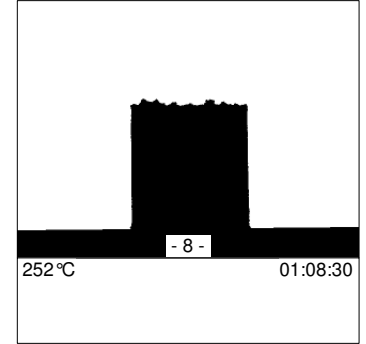
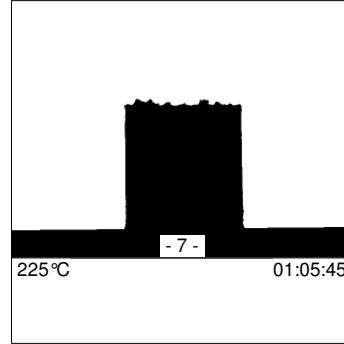
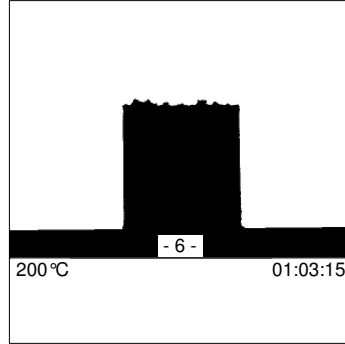
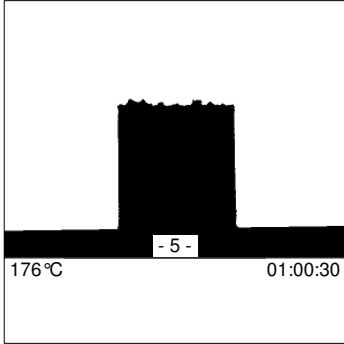
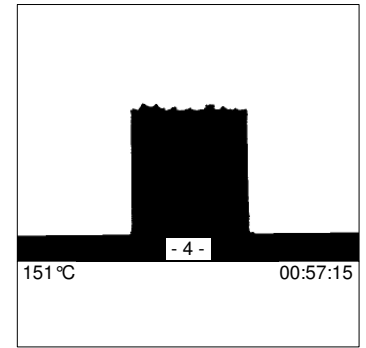
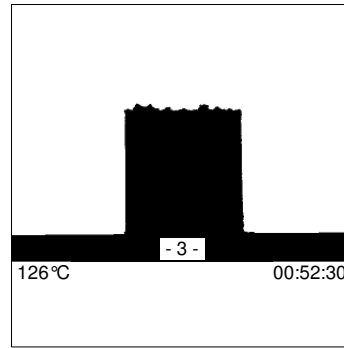
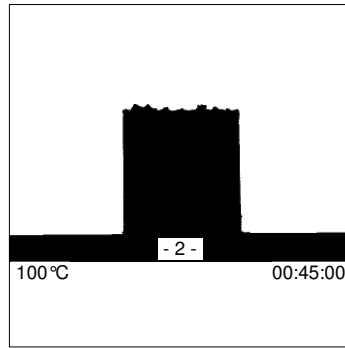
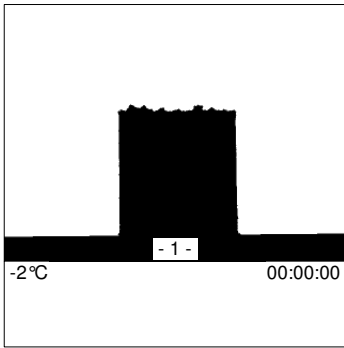
Conditions for new images:

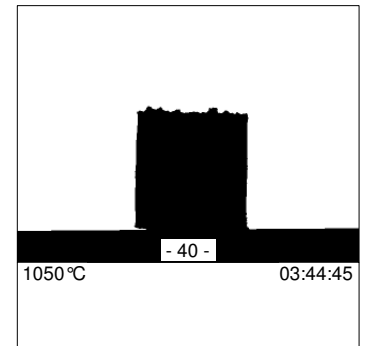
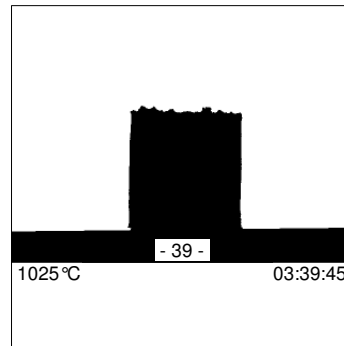
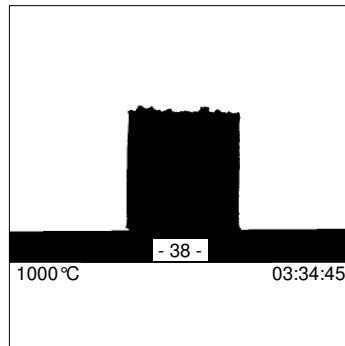
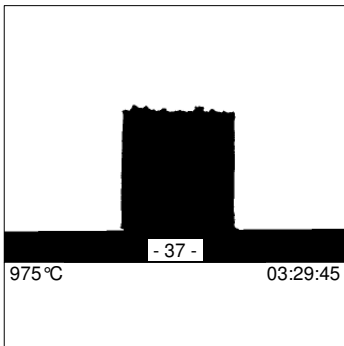
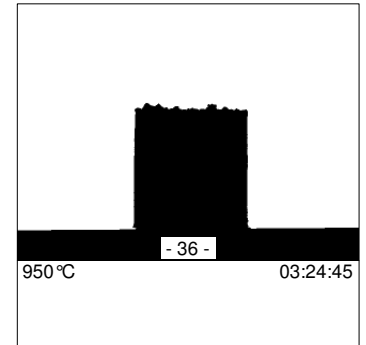
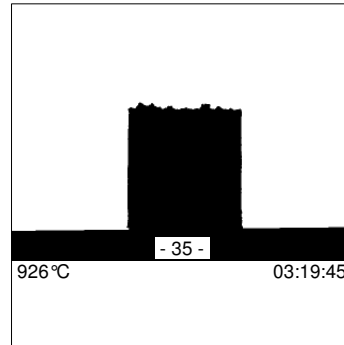
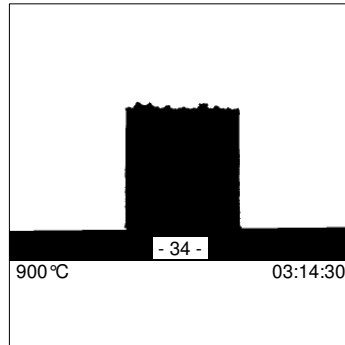
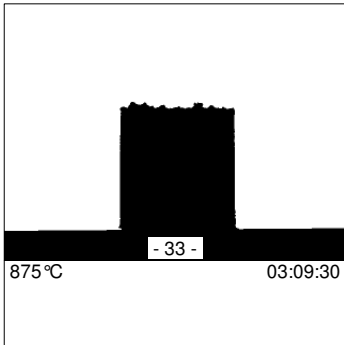
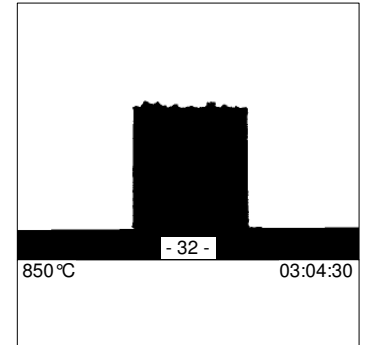
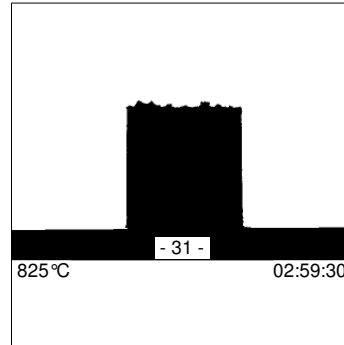
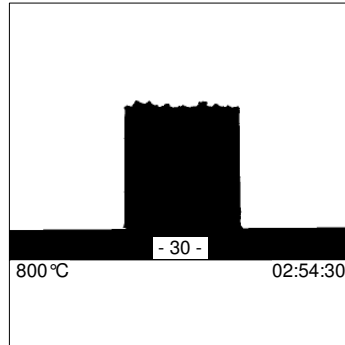
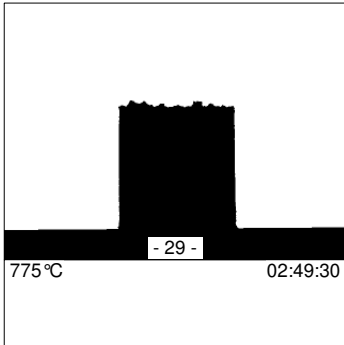
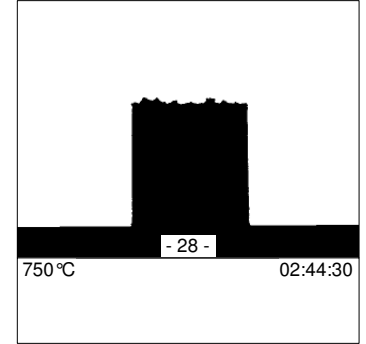
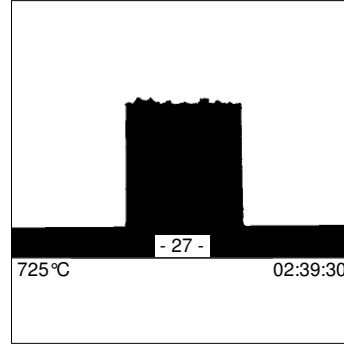
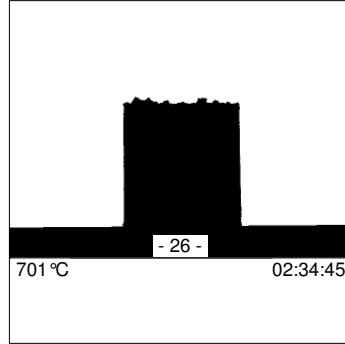
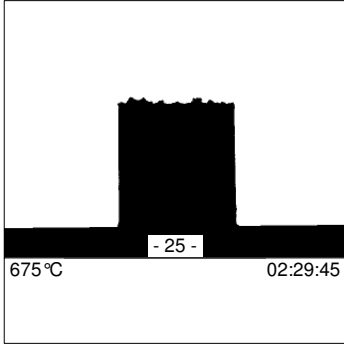
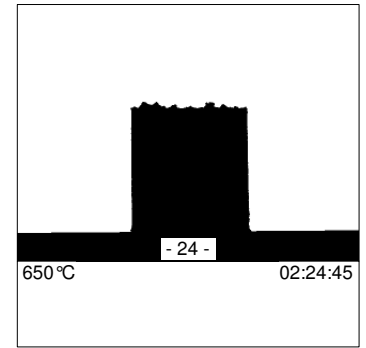
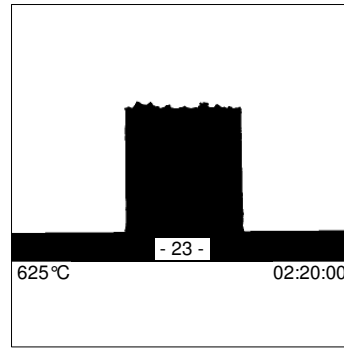
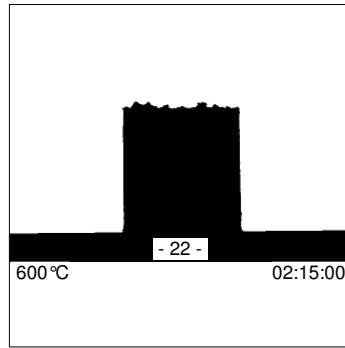
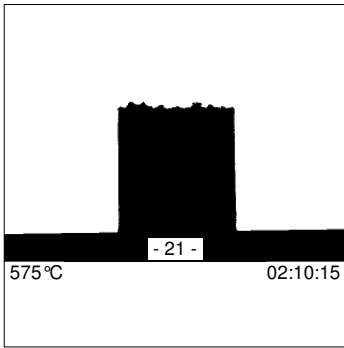
First image at:	100 °C
Images at least every	-
Area change:	5%
Corner angle change:	10%
Shape factor change:	5%
Temperature change:	25 °C

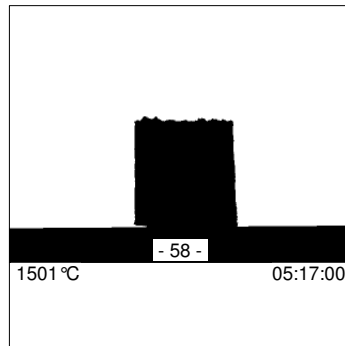
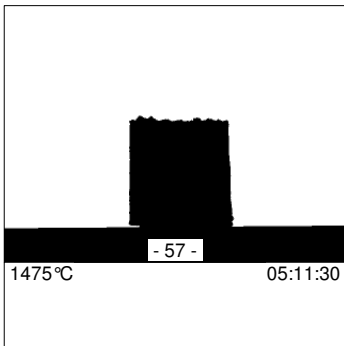
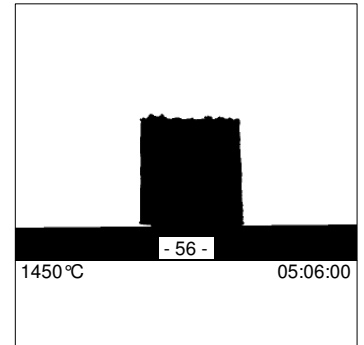
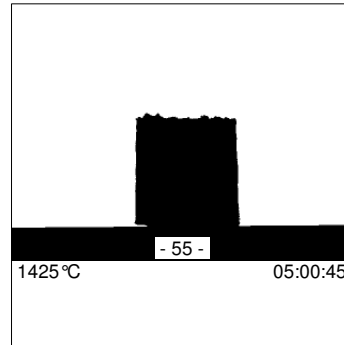
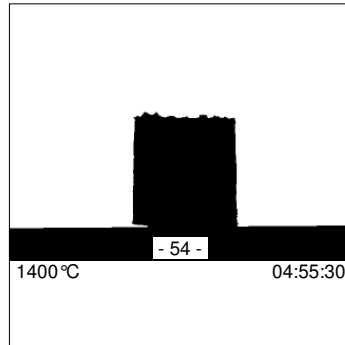
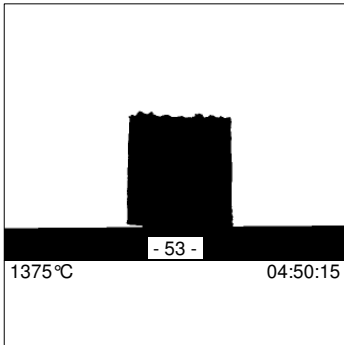
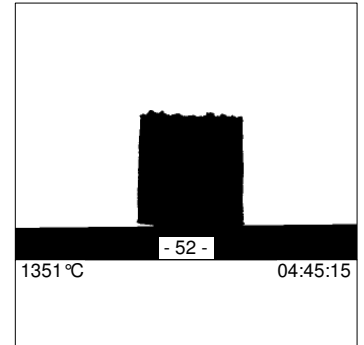
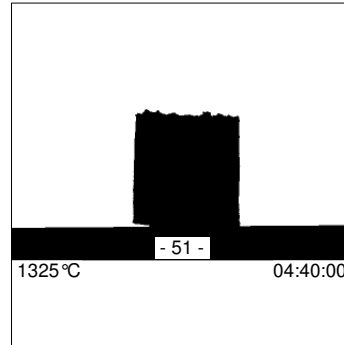
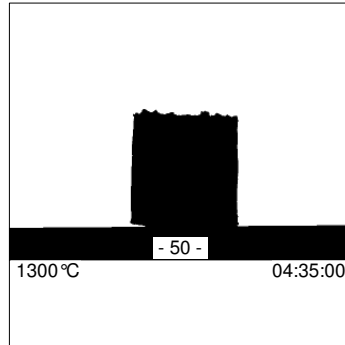
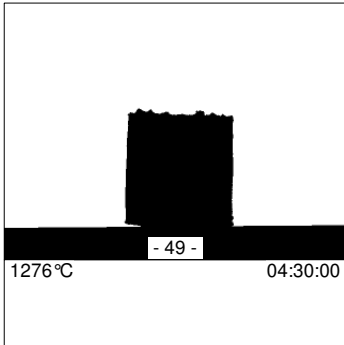
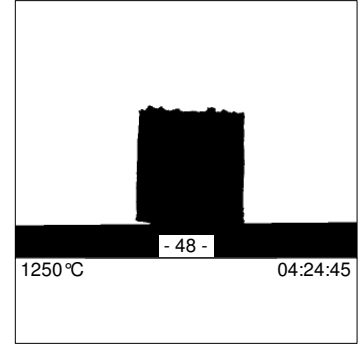
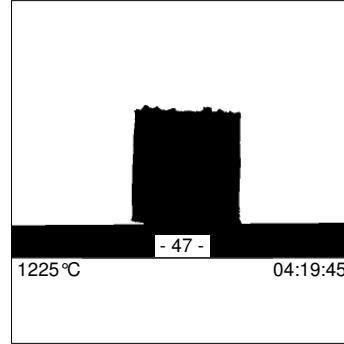
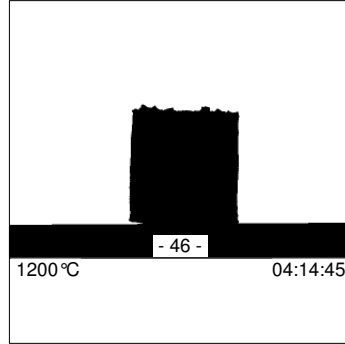
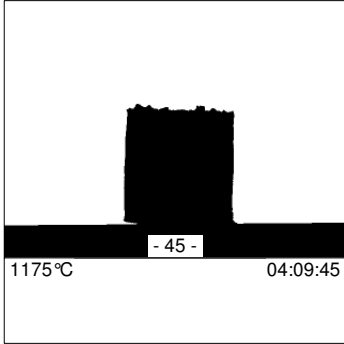
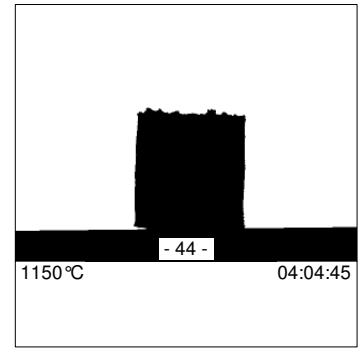
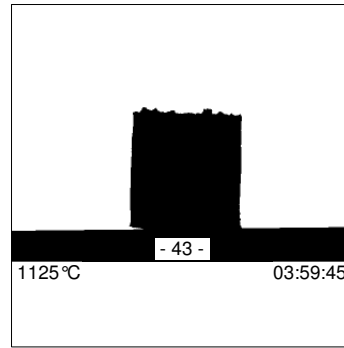
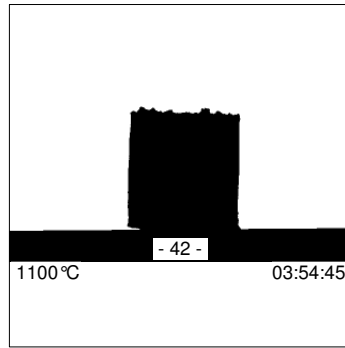
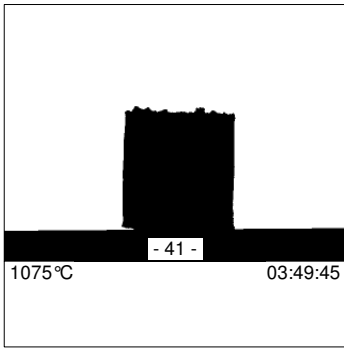
Notes:

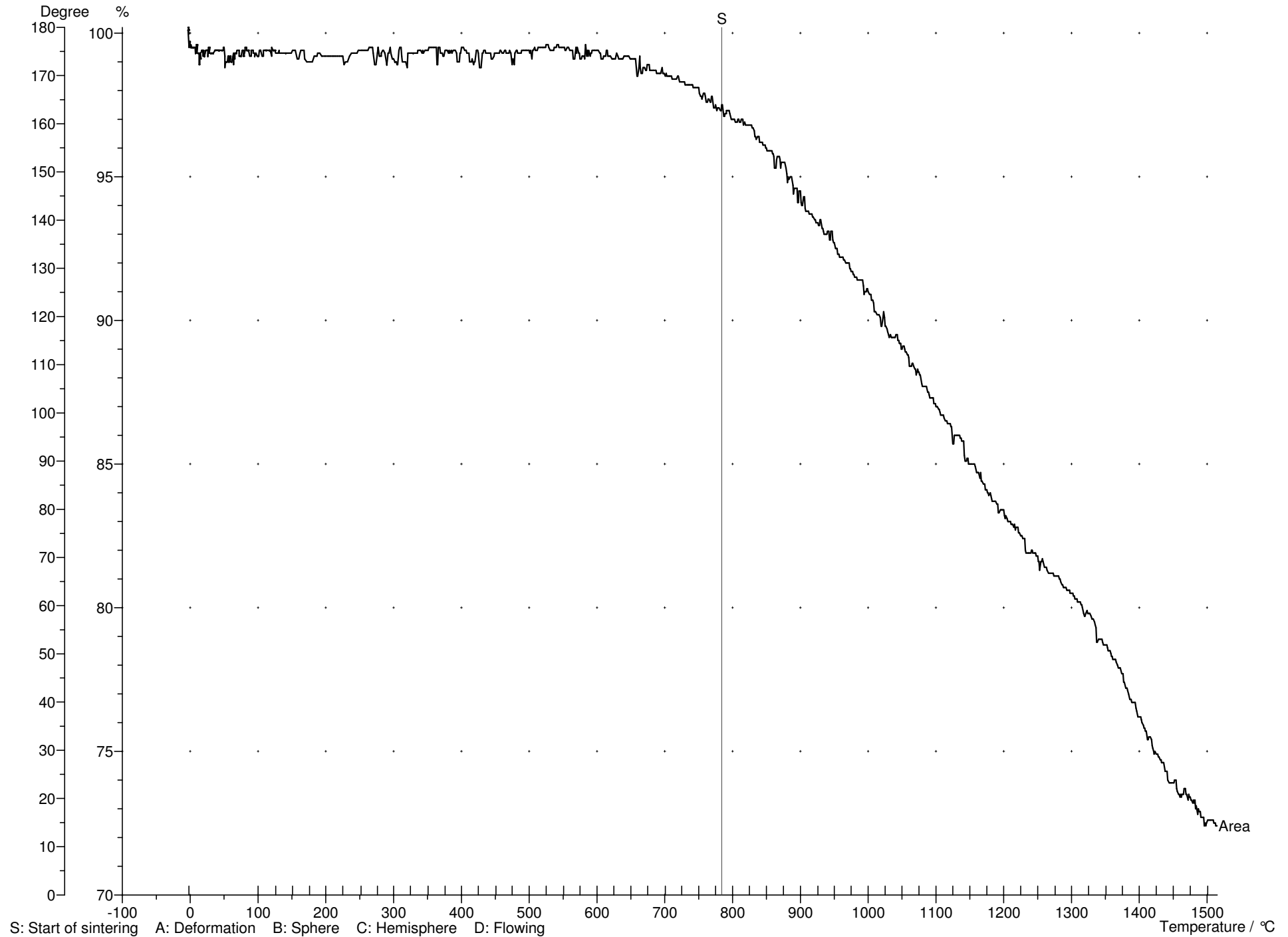
('n.d.' = 'not determined')











MEASUREMENT PROTOCOL

Characteristic temperatures:

Sintering temperature:	1384 °C
Deformation temperature:	859 °C Deformation range: n.d.
Sphere temperature:	n.d.
Hemisphere temperature:	n.d. Flow range: n.d.
Flow temperature:	n.d.

Heating profile:

Segm.	Heating rate	End temp.	Dwell time
1	5 °C/min	1600 °C	00:00
2			
3			
4			
5			
6			

DIN 51730 (1998-4) / ISO 540 (1995-03-15) Detemination of sphere temperature according to ISO 17171 for cones

Measurement parameters:

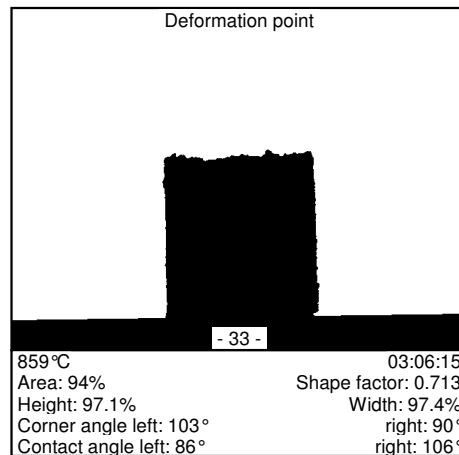
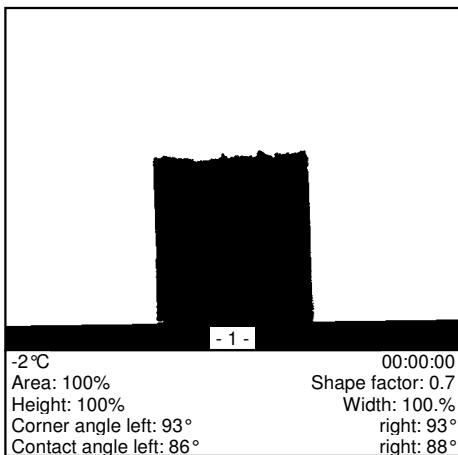
Images:	59
Measured data count:	1283
Tracked corner angle:	left
Operator:	Petr Ptacek
Device:	EMI1
Measured data folder:	D:\EMI2\Daten\G1107200\M1903070

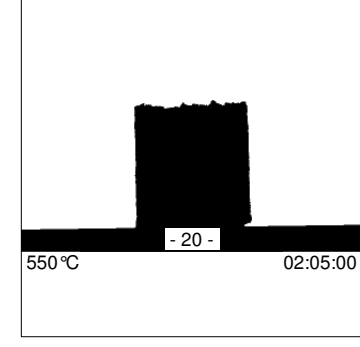
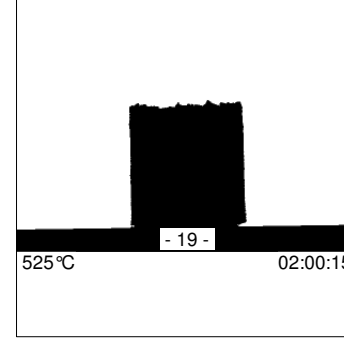
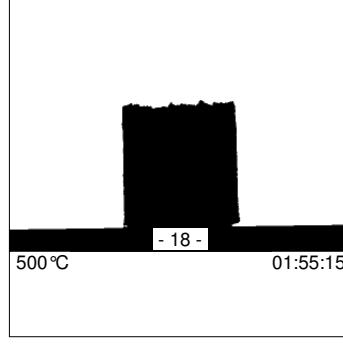
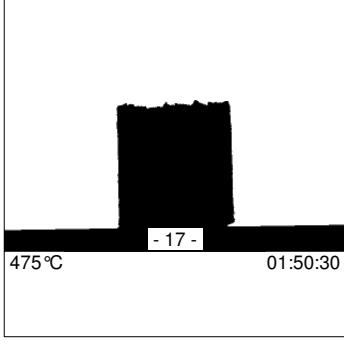
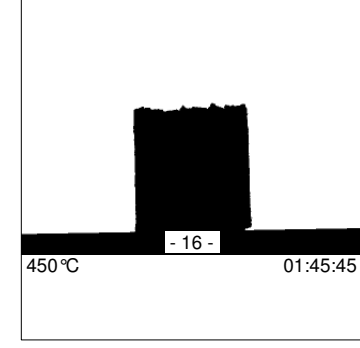
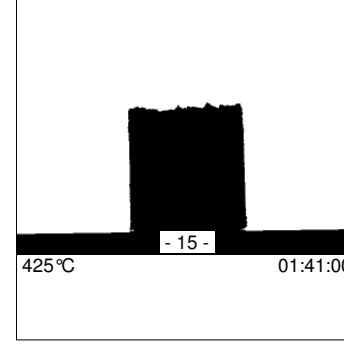
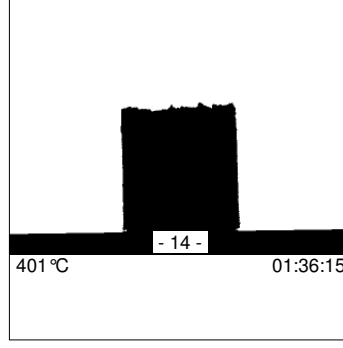
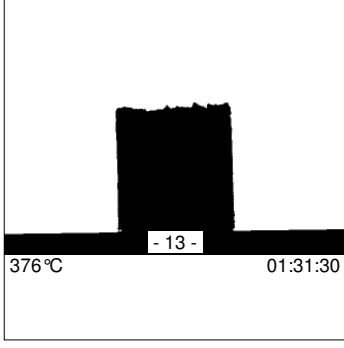
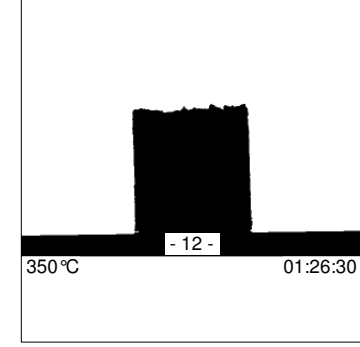
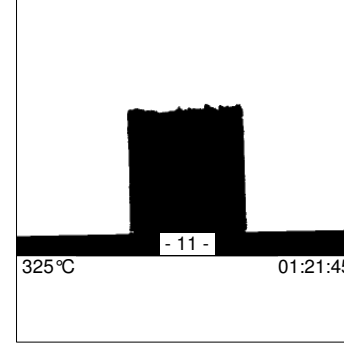
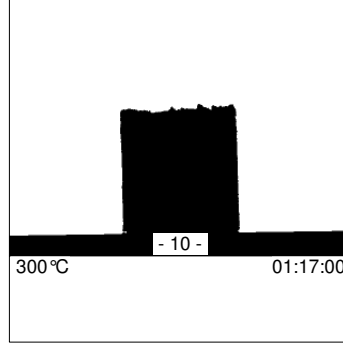
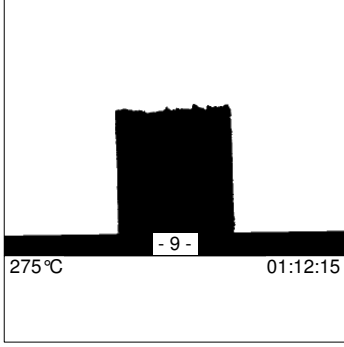
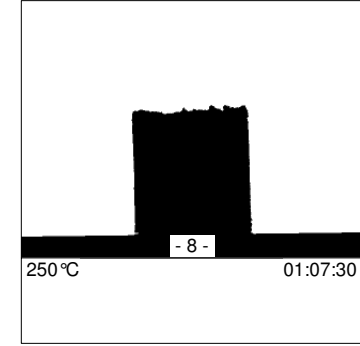
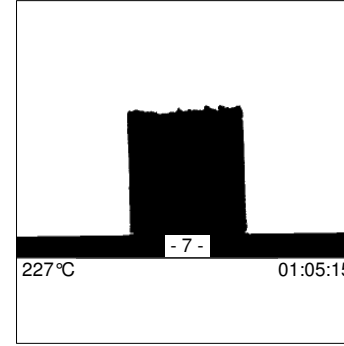
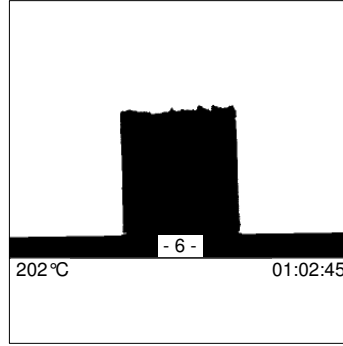
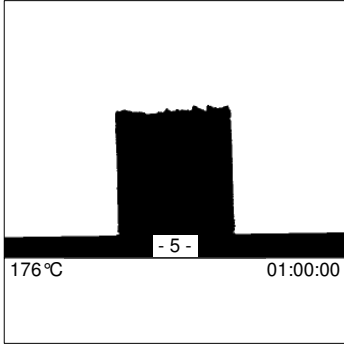
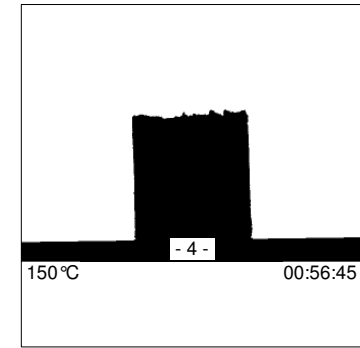
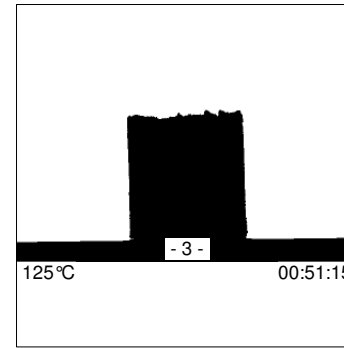
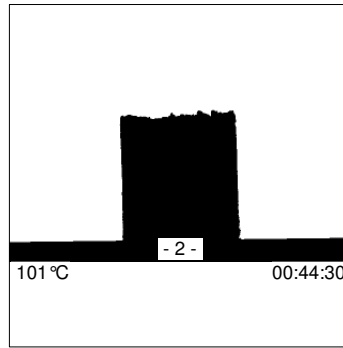
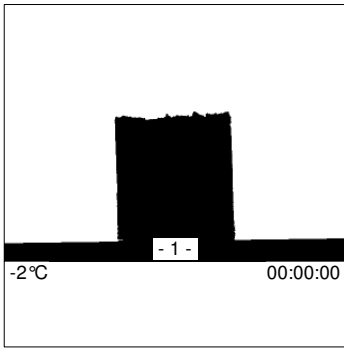
Conditions for new images:

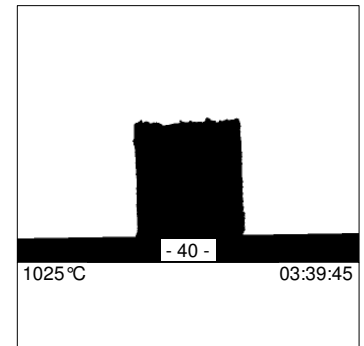
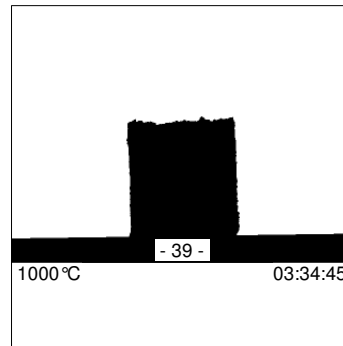
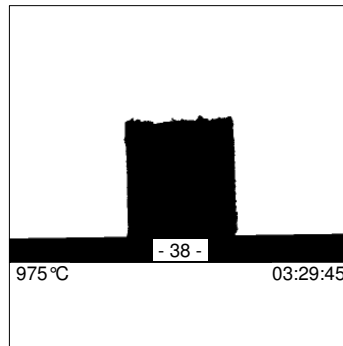
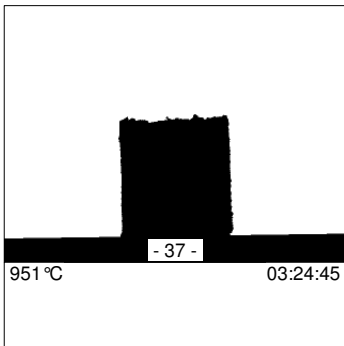
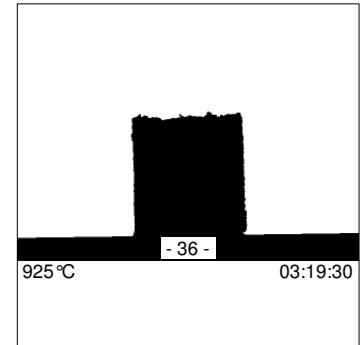
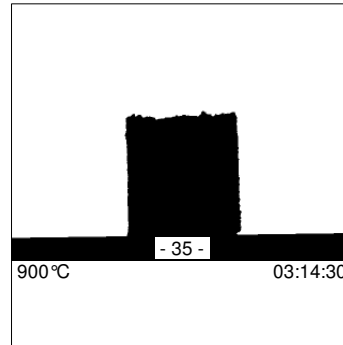
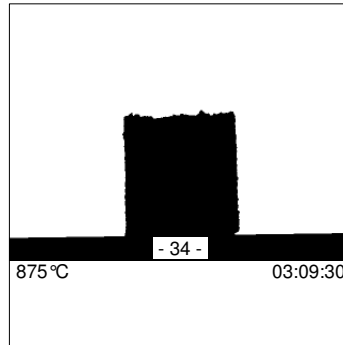
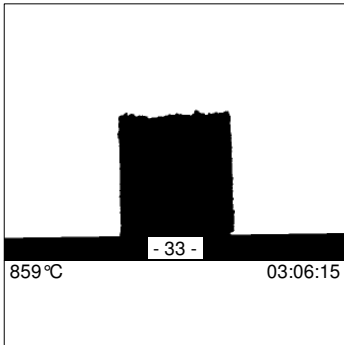
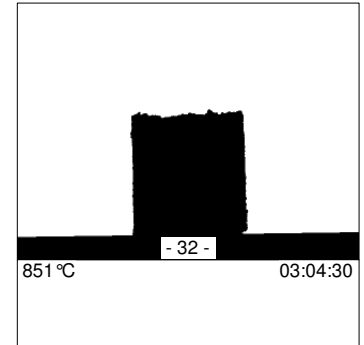
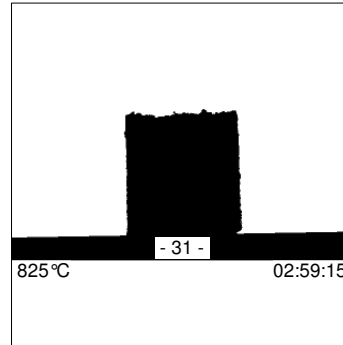
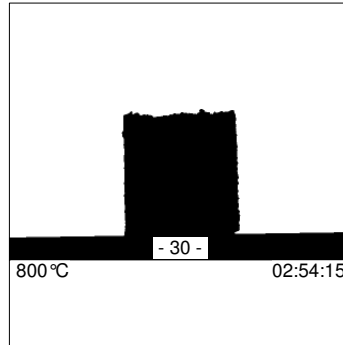
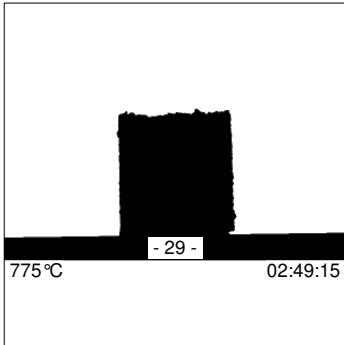
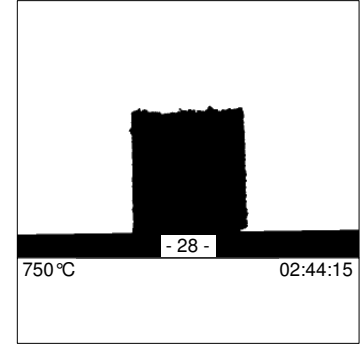
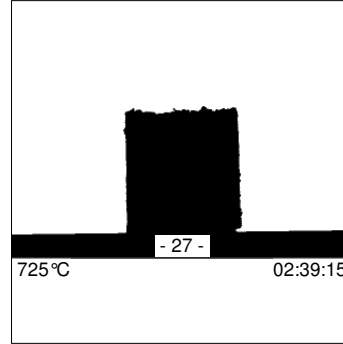
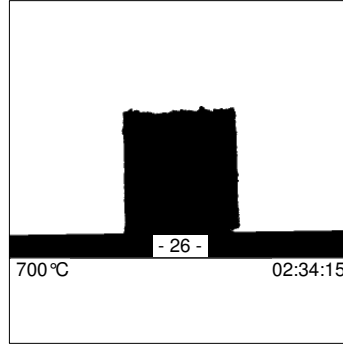
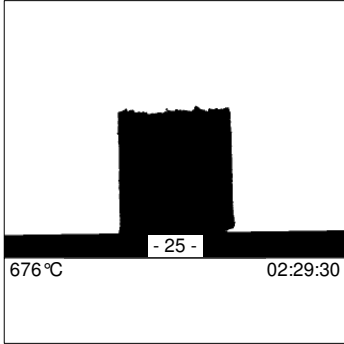
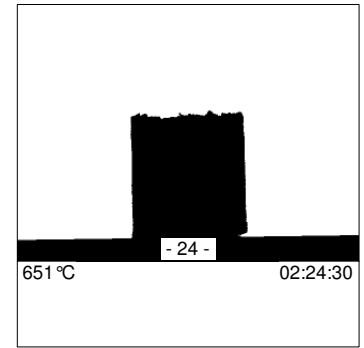
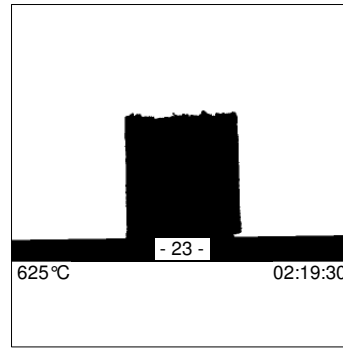
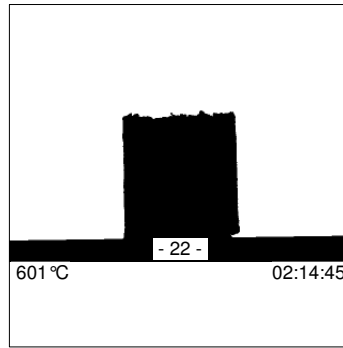
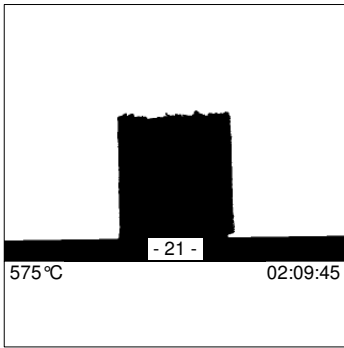
First image at:	100 °C
Images at least every	-
Area change:	5%
Corner angle change:	10%
Shape factor change:	5%
Temperature change:	25 °C

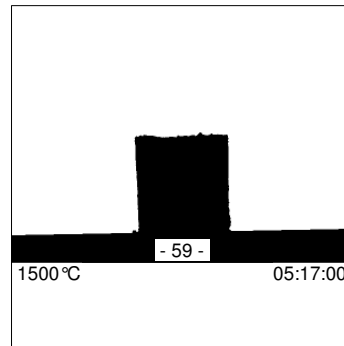
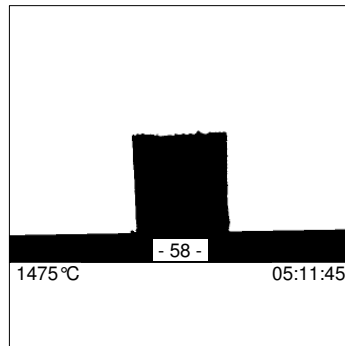
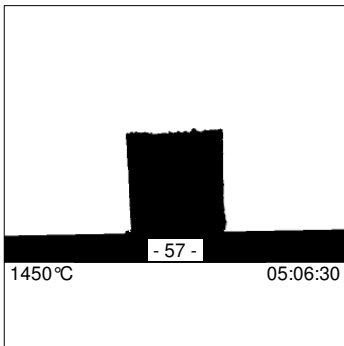
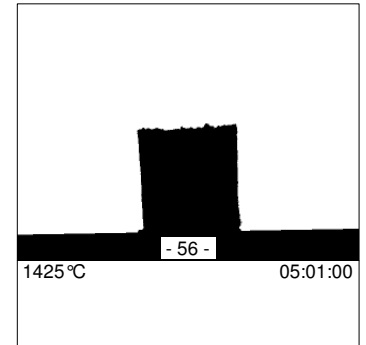
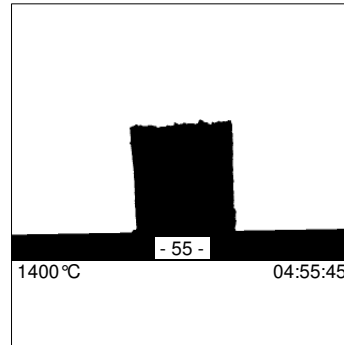
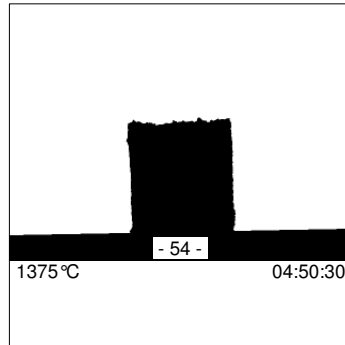
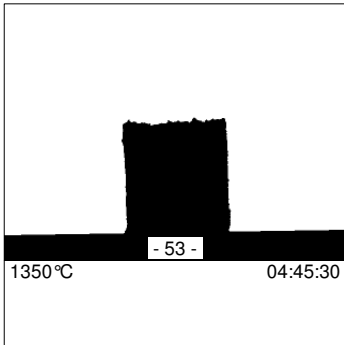
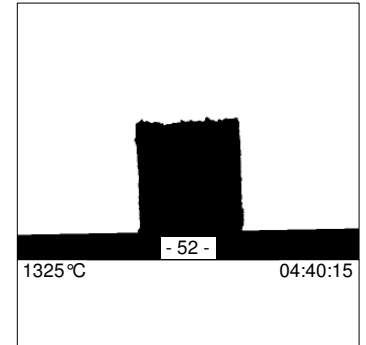
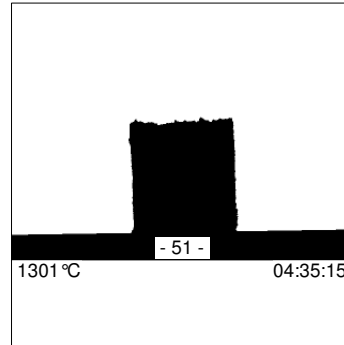
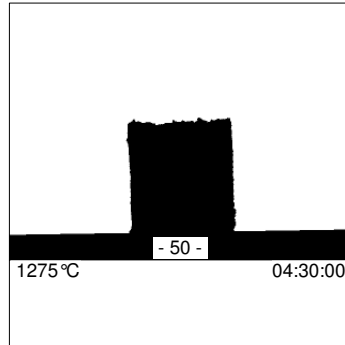
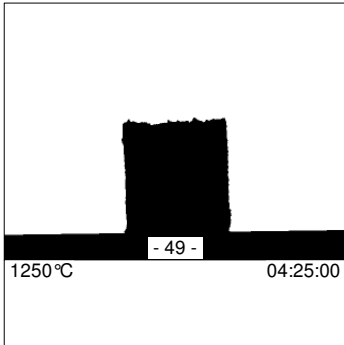
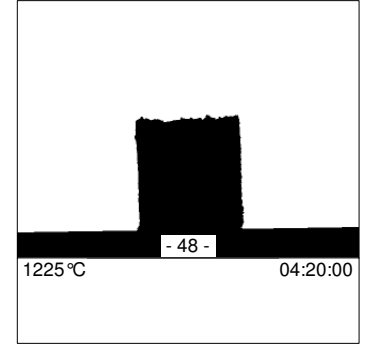
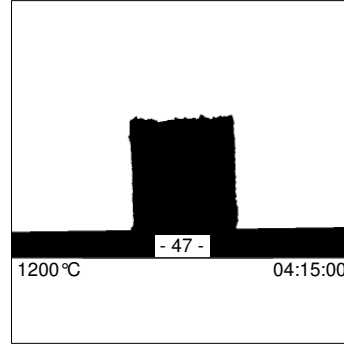
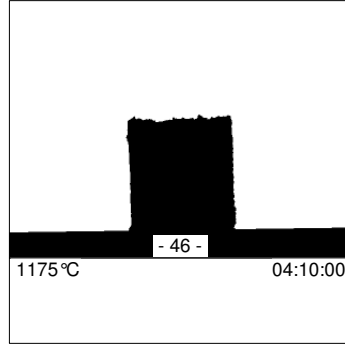
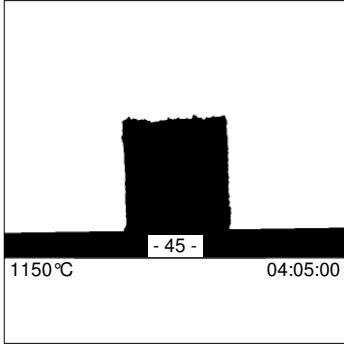
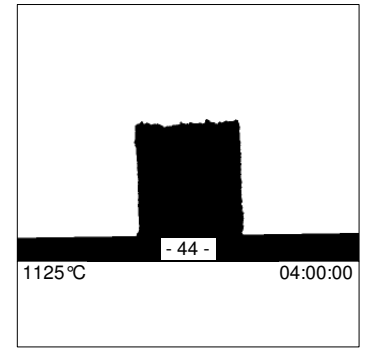
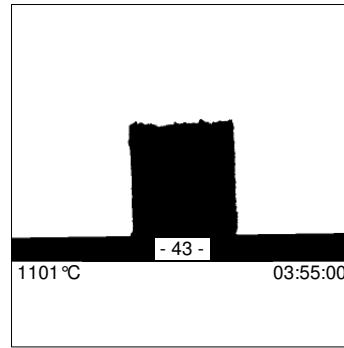
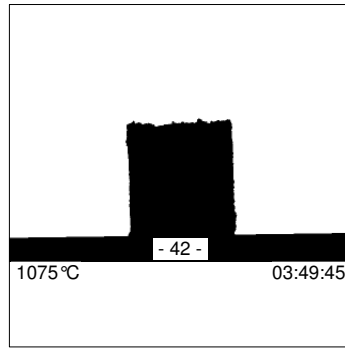
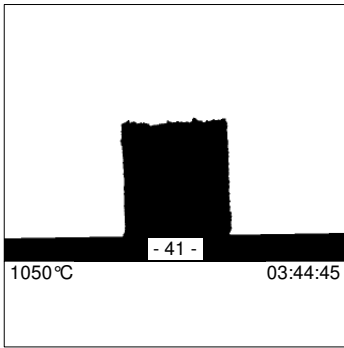
Notes:

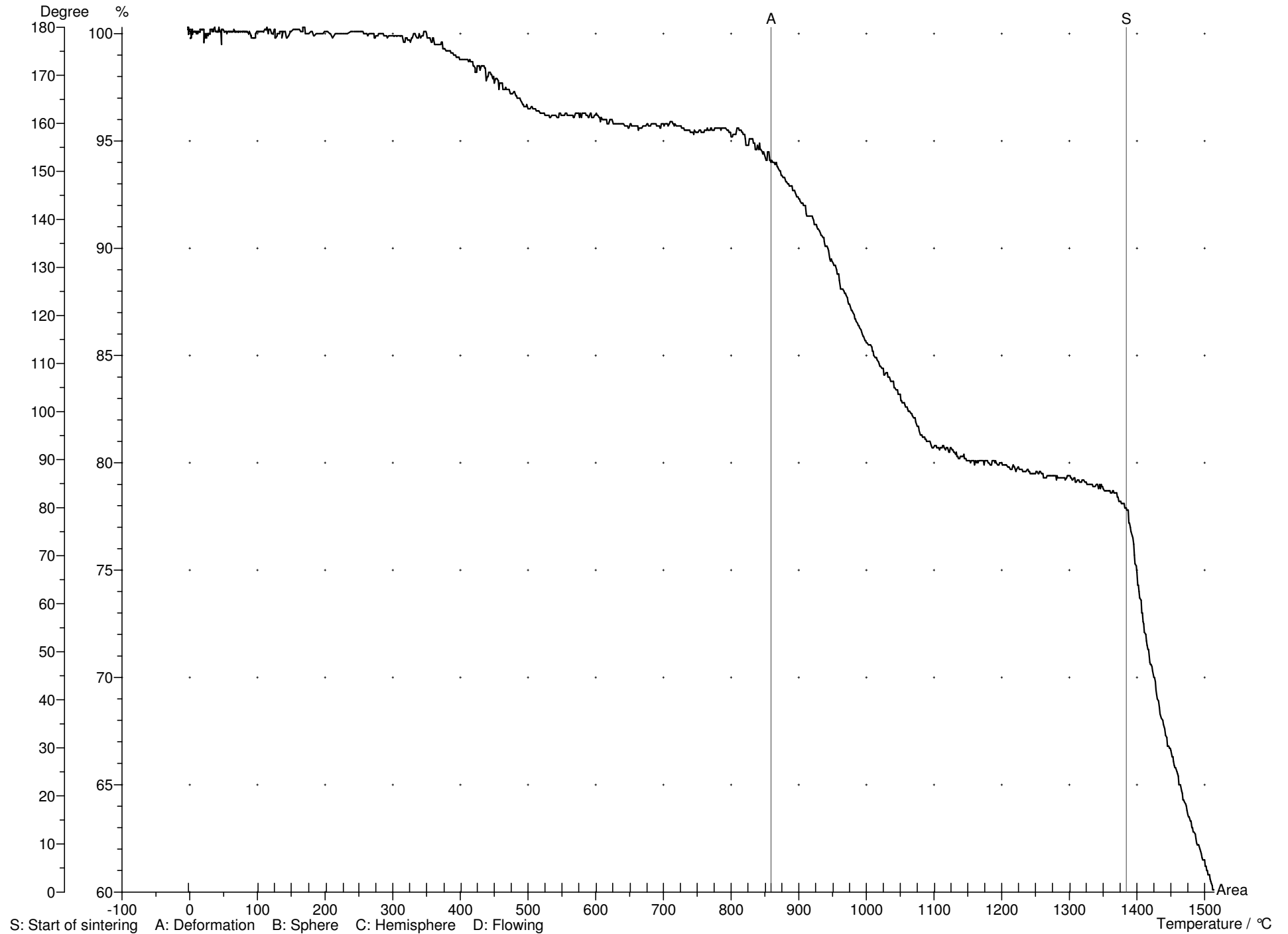
('n.d.' = 'not determined')











MEASUREMENT PROTOCOL

Characteristic temperatures:

Sintering temperature:	1229 °C
Deformation temperature:	715 °C Deformation range: n.d.
Sphere temperature:	n.d.
Hemisphere temperature:	n.d. Flow range: n.d.
Flow temperature:	n.d.

Heating profile:

Segm.	Heating rate	End temp.	Dwell time
1	5 °C/min	1600 °C	00:00
2			
3			
4			
5			
6			

DIN 51730 (1998-4) / ISO 540 (1995-03-15) Detemination of sphere temperature according to ISO 17171 for cones

Measurement parameters:

Images:	223
Measured data count:	1403
Tracked corner angle:	left
Operator:	Petr Ptacek
Device:	EMI1
Measured data folder:	D:\EMI2\Daten\G1107200\M1903080

Conditions for new images:

First image at:	100 °C
Images at least every	-
Area change:	5%
Corner angle change:	10%
Shape factor change:	5%
Temperature change:	25 °C

Notes:

('n.d.' = 'not determined')

