



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

OPTIMALIZACE BIOKOMPOZITU NA BÁZI POLY(3-HYDROXYBUTYRÁTU) S OHLEDEM NA TISKNUTELNOST A MECHANICKÉ VLASTNOSTI

OPTIMIZATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) BASED BIOCOMPOSITE WITH RESPECT TO ITS PRINTABILITY AND MECHANICAL PROPERTIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Chaloupková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1638/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Chaloupková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace biokompozitu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) s ohledem na tisknutelnost a mechanické vlastnosti

Zadání diplomové práce:

Provést rešerši na téma kostní tkáň, biomateriálů používaných v regenerativní medicíně pro jejich náhrady a možnosti využití 3D tisku. Návrh receptur kompozitních materiálů metodou plánovaného experimentu a příprava 3D tiskových strun pro FDM z těchto materiálů. Charakterizace tisknutelnosti a mechanických vlastností materiálů. U vybraných materiálů příprava tištěných 3D struktur a studium biologických vlastností.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Kateřina Chaloupková
studentka

Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předkládaná práce se věnuje přípravě a optimalizaci biokompatibilního materiálu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu). Dalšími složkami připravených vzorků jsou poly(kyselina mléčná), hydroxyapatit a komerční změkčovadlo Syncroflex3114. Jednotlivé složky byly vybrány na základě jejich biokompatibility a vlastností potenciálně využitelných v tkáňovém inženýrství. Obsahem teoretické části práce je zpracování obecného přehledu kostní tkáně a rešerše materiálů využívaných v regeneraci kostí. Část práce se také věnuje problematice scaffoldů. Součástí experimentální práce je plánovaný experiment, který slouží k optimalizaci směsi s ohledem na tisknutelnost a mechanické vlastnosti. Prvním krokem je příprava vzorků na základě navržených podmínek a jejich následné zpracování do formy filamentu s přesným průměrem 1,75 mm pro 3D tisk metodou modelování depozicí taveniny. Z připravených filamentů byla vytištěna testovací tělesa pro následující experimenty: teplotní věž, měření warping koeficientu, ohybová a tlaková zkouška. Data z těchto experimentů byla zpracována pomocí matematického modelu do formy rovnic a grafů, které znázorňují vliv složek materiálu na měřenou veličinu. Bylo zjištěno, že nejvýznamněji vlastnosti ovlivňuje množství změkčovadla ve vzorku. Tento vliv je ve všech případech negativní a zhoršuje vybrané hodnocené vlastnosti materiálu. Výsledkem plánovaného experimentu je také receptura optimalizovaná na co nejlepší tisknutelnost a mechanické vlastnosti (ohybový modul 3,3 GPa a tlakový modul 2,3 GPa). S ohledem na potenciální aplikaci materiálu ve tkáňovém inženýrství kostí byly pro vybrané vzorky provedeny první screeningové testy urychlené biodegradace. Výsledky urychlené degradace nejsou jednoznačné a je nutná jejich další optimalizace. Současně s diplomovou prací probíhalo biologické testování nosičů vytištěných na 3D tiskárně z vybraných připravených materiálů. Všechny testované vzorky byly shledány jako biokompatibilní.

ABSTRACT

The presented theses deals with preparation and optimization of biocompatible material based on poly(3-hydroxybutyrate). Other components of prepared samples are polylactid acid, hydroxyapatite and commercially available plasticizer Syncroflex3114. These components were chosen based on their biocompatibility and properties that can be possibly used in tissue engineering. Theoretical part of this theses contains general overview of bone tissue and review of materials used in bone tissue regeneration. Part of this thesis also deals with the problematics of scaffolds. Aim of the experimental part is a planned experiment, which is used to optimize the mixture with respect to printability and mechanical properties. The first step is the preparation of samples based on the proposed conditions and their subsequent processing into a filament with an exact diameter of 1,75 mm for 3D printing using the fused deposition modeling method. From the prepared filaments, test specimens were printed for the following experiments: temperature tower, warping coefficient measurement, bending and pressure test. Data from these experiments were processed using a mathematical model in the form of graphs and equations which show the effect of material components on the measured quantity. It was found that the amount of plasticizer in the sample affects the properties the most. This effect is negative in all cases and worsens the properties of the material. The result of the planned experiment is also a mixture optimized for the best possible printability and mechanical

properties (bending modulus 3,3 GPa and pressure modulus 2,3 GPa). With regard to the potential application of the material in bone tissue engineering, the first accelerated biodegradation screening tests were performed for selected samples. The results of accelerated degradation tests are ambiguous and further optimization is needed. Simultaneously with the diploma thesis, biological testing of scaffolds printed on a 3D printer from prepared samples took place. All tested samples were found to be biocompatible.

KLÍČOVÁ SLOVA

Poly(3-hydroxybutyrát), 3D tisk, FDM, modelování depozicí taveniny, tisknutelnost, plánovaný experiment, scaffold, urychlená biodegradace

KEYWORDS

Poly(3-hydroxybutyrate), 3D printing, FDM, printability, planned experiment, scaffold, accelerated biodegradation

CHALOUPKOVÁ, Kateřina. Optimalizace biokompozitu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) s ohledem na tisknutelnost a mechanické vlastnosti [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139590>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Radek Přikryl.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Obrovský dík patří celé Laboratoři konce života sídlící na Fakultě chemické v Brně. Jmenovitě bych pak chtěla poděkovat Mgr. Radku Přikrylovi, Ph.D. za inspiraci, důvěru a odborné vedení při vypracování diplomové práce. Neméně děkuji Ing. Veronice Melčové za nekonečnou trpělivost, podporu a čas, který mi věnovala. Za odborné rady v oblasti 3D tisku děkuji Ing. Přemyslu Menčíkovi, Ph.D. Děkuji i Bc. Štěpánu Krobotovi za spolupráci na experimentální části výzkumu. Děkuji i své rodině a nejbližším za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1.	ÚVOD	3
2.	Teoretická část.....	4
2.1.	Kost.....	4
2.1.1.	Kostní tkáň.....	4
2.2.	Biomateriály.....	6
2.2.1.	Biomateriály pro náhradu.....	7
2.2.2.	Biomateriály pro regeneraci	8
2.3.	Biodegradace a biokompatibilita PHA v lidském těle.....	14
2.4.	Scaffold.....	15
2.4.1.	Mechanické vlastnosti scaffoldů	17
2.4.2.	Biologické vlastnosti scaffoldů	18
2.5.	Metody výroby scaffoldů pro regeneraci kostní tkáně	19
3.	Současný stav poznání.....	20
4.	Experimentální část	22
4.1.	Materiály.....	22
4.2.	Plánovaný experiment.....	22
4.3.	Vzorky	23
4.4.	Příprava vzorků.....	24
4.5.	Výroba strun (filamentů) pro 3D tisk	25
4.6.	3D tisk.....	26
4.7.	Optimalizace tisknutelnosti materiálů	27
4.7.1.	Teplotní věže	27
4.7.2.	Warping	28
4.8.	Mechanické testy	29
4.8.1.	Příprava testovacích těles pro ohybovou zkoušku.....	29
4.8.2.	Ohybová zkouška	30
4.8.3.	Příprava testovacích těles pro tlakovou zkoušku.....	30
4.8.4.	Tlaková zkouška.....	30
4.9.	Biologické testy	31
4.9.1.	Test urychlené biodegradace	31
4.9.2.	Komplexní biologické testování.....	32
5.	Výsledky.....	33
5.1.	Plánovaný experiment.....	33
5.1.1.	Teplota tisku	33
5.1.2.	Warping koeficient	35
5.1.3.	Ohybová zkouška	37
5.1.4.	Tlaková zkouška.....	40
5.1.5.	Optimalizovaná receptura.....	43
5.2.	Biologické experimenty.....	43
5.2.1.	Test urychlené degradace	43
5.2.2.	Komplexní biologické testování.....	45
6.	Diskuze a závěr	48

7. Zdroje	51
Seznam symbolů a zkratk.....	59

1. ÚVOD

Vývoj nových materiálů bude vždy nedílnou součástí vědy, zvláště pokud se jedná o materiály, které lze potenciálně využít v medicíně. Regenerativní medicína je poměrně nový, multidisciplinární obor, jehož součástí je i regenerativní medicína kostí, ve které by měl najít uplatnění i materiál zkoumaný v této práci. Kostí tvoří oporu těla po celou dobu lidského života. Během této doby však může docházet ke zlomeninám, a to vlivem různých faktorů. Mohou to být úrazy, extrémní sporty, autonehody, onemocnění kostí nebo stárnutí. Ruku v ruce se stárnutím populace stoupá i četnost onemocnění muskuloskeletárního systému. Řešení některých defektů nabízí tkáňové inženýrství (TE). TE je jedním z konceptů regenerativní medicíny, který spojuje medicínu, biologii a materiálové vědy do jednoho multidisciplinárního celku. Cílem TE v kostních defektech je vytvoření podpůrného lešení, které se *in vitro* osadí buňkami nebo jinými podpůrnými faktory a vložením do těla vznikne implantát umožňující tkáňovou regeneraci. Je žádoucí použít materiál, který bude biokompatibilní, netoxický, bioaktivní a po době, kdy bude poskytovat podporu buňkám se postupně rozloží na netoxické produkty, které je lidské tělo schopno odbourat. Poptávka po materiálech, které by splňovaly tyto podmínky je obrovská, a právě poly(3-hydroxybutyrát) splňuje vše výše uvedené. Kombinací s vhodnými aditivami vznikne kompozit, který je biokompatibilní, bioaktivní a velkou výhodou je zpracovatelnost metodou rychlého modelování (rapid prototyping), konkrétně modelováním depozicí taveniny, čímž je získána možnost vytvořit řešení na míru přímo danému pacientovi v relativně krátkém časovém úseku.

2. Teoretická část

2.1. Kost

Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá materiály použitelnými pro náhrady kostí, je nezbytné popsat alespoň ve stručnosti základní vlastnosti kostí pro lepší pochopení dané problematiky. V těle dospělého člověka je 206 kostí a u kojence asi 270 kostí. Kostí sdružené do kostry mají v organismu tři základní funkce:

- a) Mechanická – opora těla a spolu s kosterními svaly umožnění pohybu;
- b) Ochranná – chrání vnitřní orgány těla před vnějšími vlivy;
- c) Metabolická – produkce krve červenou a žlutou kostní dření, skladování tuku ve žluté kostní dření, skladování minerálů, jako jsou vápník a fosfor, zajištění acidobazické rovnováhy absorpcí nebo uvolněním zásaditých solí (1)

Kostí jako orgány sestávají z kostní tkáně, kostní dřeně, krevních cév, epitelu a nervů. Termín kostní tkáň konkrétně odkazuje na minerální matrici, která tvoří tuhé části orgánu (1).

2.1.1. Kostní tkáň

Kostní tkáň je hlavní strukturální a podpůrnou tkání těla. To znamená, že základní funkcí této tkáně je vytvářet skelet pro celý organismus. Je jednou z nejtvrdějších tkání a je velmi odolná vůči tahu a tlaku (2). Základními prvky kostní tkáně jsou buňky a mezibuněčná hmota. Třemi základními druhy buněk, které můžeme v kostní tkáni pozorovat, jsou osteocyty, osteoblasty a osteoklasty (1).

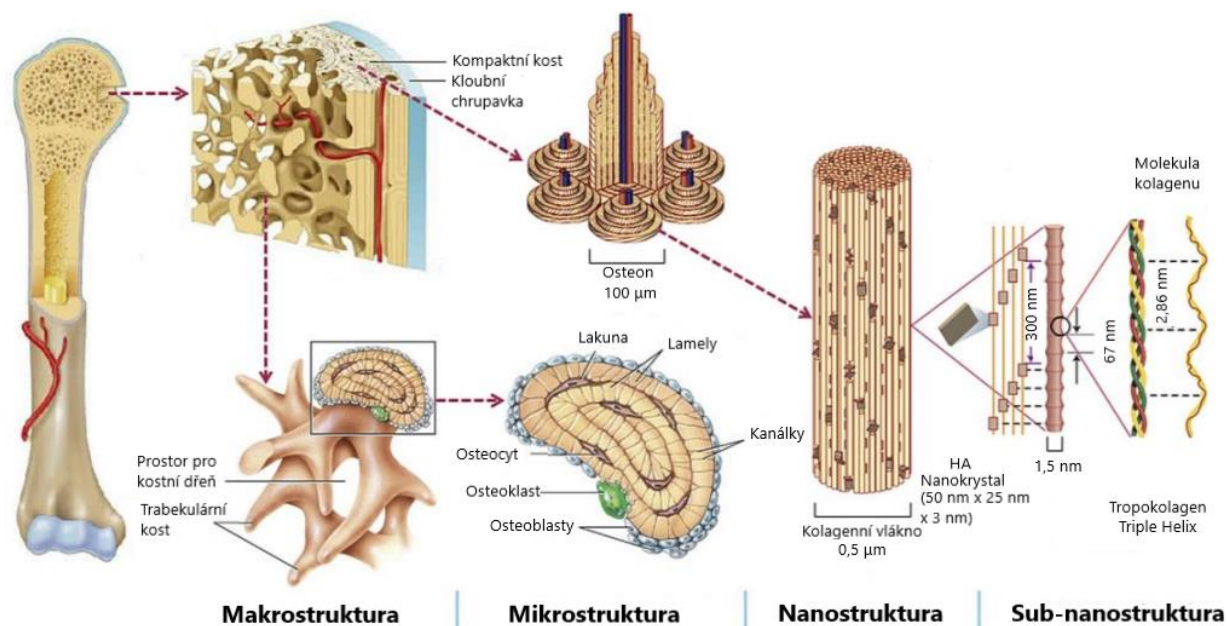
Z histologického hlediska rozlišujeme dva typy kostní tkáně: primární a sekundární. Oba typy jsou složeny ze stejných stavebních jednotek, ale liší se v uspořádání kolagenních vláken. V primární kostní tkáni jsou vlákna uspořádána náhodně, zatímco v sekundární jsou vlákna uspořádána do lamel. Primární (též vláknitá, fibrilární) se vytváří nejprve při každém růstu nebo hojení. Je pouze dočasná a postupně je nahrazována zralou sekundární kostí. Sekundární kost (také lamelární) se v organismu vyskytuje častěji než kost vláknitá. Je to dospělá kostní tkáň, která má kolagenní vlákna uspořádaná do lamel, které jsou seskupeny paralelně jedna vedle druhé, a to koncentricky kolem centrálního kanálku, který se nazývá Haversův kanál. Komplex lamel obklopujících centrální kanál se nazývá osteon (3).

Lamelární kost se vyskytuje ve dvou formách:

- a) hustá kompaktní kost
- b) porézní spongiózní kost

Tyto tkáně mají podobnou biologickou aktivitu; rozdíl tkví v geometrii, v uspořádání mikrostruktury. Vnější vrstva kosti je tvrdá a nazývá se kompaktní kost (též kortikální). Tato část tkáně dává kostem jejich hladký, bílý a pevný vzhled a tvoří 80% celkové kostní hmoty dospělé kostry. Název této tkáně vychází z velmi malých mezer ve srovnání s vnitřní spongiózní kostí. Spongiózní (také trabekulární nebo houbovitá) kost tvoří přibližně 15 % celkové kostní hmoty (3). Složení kosti je znázorněno na Obrázek 1.

Obratle a pánevní kosti obsahují relativně vysoké množství spongiózní tkáně a jsou běžnými místy osteoporotických zlomenin, zatímco dlouhé kosti (např. krk stehenní kosti) obsahují relativně vysoké množství kompaktní tkáně. Kompaktní kost tvoří v dlouhých kostech diafýzu, spongiózní kost se vyskytuje v epifýzách dlouhých kostí a v krátkých kostech (1,4).



Obrázek 1 Složení kostní tkáně (5)

2.1.1.1. Chemické složení kostní tkáně

Kostní tkáň je mineralizovaná pojivová tkáň. Kostí se skládají z anorganických složek, mezi které řadíme hydroxyfosforečnan vápenatý, známý také jako minerál apatit (nebo hydroxyapatit, někdy zkráceně HA nebo HAp) a uhličitan vápenatý. Apatity mají obecný vzorec $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, kde X můžeme nahradit různými skupinami. Pokud použijeme fluor F, vznikne fluorapatit, hydroxy skupinu OH, vznikne hydroxyapatit, nebo chlor Cl, čímž vzniká chlorapatit (1).

Hydroxyapatit je přirozeně se vyskytující forma apatitu vápenatého. Čistý prášek hydroxyapatitu je bílý, avšak existují přirozeně se vyskytující formy apatitu, které mohou mít také hnědé, žluté nebo zelené zbarvení. Odhaduje se, že až 50% sušiny kosti je tvořeno právě formami anorganického minerálu hydroxyapatitu. Hydroxyapatit se také používá jako biomateriál pro náhradu kostí a pro potahování kovových protéz ke zlepšení jejich biokompatibility (1).

Dalším minerálem přirozeně se vyskytujícím v kostní tkáni je fosforečnan vápenatý. Má podobné složení a strukturu, jako minerály ve skupině apatitů. Patří k biominerálům – minerálům, které jsou produkovány živými organismy. Fosforečnan vápenatý je široce používán v aplikacích regenerace kostí, protože vykazuje osteokonduktivní a v některých případech osteoinduktivní vlastnosti. Osteokonduktivní materiál je takový materiál, který svým složením a strukturou podporuje vrůstání okolních kostních buněk. Osteoinduktivní materiály svojí přítomností a svým působením vyvolávají růst buněk kostní tkáně (1).

Organickou složkou kostí je protein kolagen, který tvoří asi 20 % hmotnosti kosti. Většina kolagenu, který se nachází v kosti, je kolagen typu I (90 %). Dalšími typy, které se v kostech vyskytují jsou kolagen typu III, V, X a XII. Kolagen je vláknitý protein, jehož struktura je tvořena přibližně 1000 aminokyselinami s délkou asi 300 nm. Díky kolagenu je kostní tkáň poměrně flexibilní, zatímco přídavek minerálů zajišťuje kosti pevnost. Změnou distribuce mezi kolagenem a minerály má kost schopnost balancovat mezi různou pružností a tvrdostí. Stárnutím kostí dochází ke změně struktury kolagenu a zároveň se mění i celková struktura kostí, což zvyšuje náchylnost kostí ke zlomeninám. Dalšími organickými složkami kostí, jsou fibronektin, osteopontin, osteokalcin a kostní sialoprotein. Ačkoliv tyto organické složky tvoří pouze malé procento celkové organické matrice kosti, zajišťují důležité funkce při diferenciaci osteoblastů, mineralizaci tkáně, buněčné adhezi a remodelaci kostní tkáně (1,4).

2.2. Biomateriály

Biomateriály mají v dnešní medicíně nedílnou roli – obnovují funkci tkání a usnadňují hojení ran po zranění nebo nemoci. Biomateriály mohou být přírodní nebo syntetické a používají se v lékařských aplikacích k podpoře, posílení nebo nahrazení poškozené tkáně nebo biologické funkce (6). S rozvojem tkáňového inženýrství se portfolio bio materiálů rozšířilo o scaffoldy. Doslovně by se slovo scaffold mohlo přeložit jako nosič nebo lešení. Tento překlad je poměrně výstižný, neboť se jedná o těleso, které tvoří podporu pro růst a množení buněk (7).

V současnosti je již množství materiálů a nástrojů využíváno k léčbě zranění. Základem úspěšné implantace biomateriálu do lidského těla jsou tři faktory: vlastnosti a biokompatibilita implantátu, zdravotní kondice pacienta a schopnost chirurga, který náhradu implantuje. Existují čtyři kategorie medicínských zařízení, které se liší stupněm nebezpečí, kterému je pacient při implantaci vystaven. Klasifikace uvažuje mnoho aspektů, jako jsou invazivita zařízení, délka kontaktu s pacientem nebo část těla, která přijde se zařízením do kontaktu. Se zvyšující se třídou se zvyšují i požadavky na testování před uvedením do praxe (7). Jednotlivé třídy jsou:

- I. Třída – neinvazivní zařízení, nebo invazivní zařízení, které jsou v kontaktu s kůží po krátkou dobu (kolečková křesla, kompresní punčochy, obinadla, skalpely)
- II. Třída – invazivní zařízení pro krátkodobé použití (kontaktní čočky, zubní korunky, sáčky s krví)
- III. Třída – invazivní zařízení pro dlouhodobé použití (chirurgické implantáty, infúze)
- IV. Třída – invazivní zařízení pro krátkodobé i dlouhodobé použití v přímém kontaktu se srdcem, oběhovou nebo nervovou soustavou (stenty, náhrada kyčelního kloubu); zařízení vykonávající biologickou funkci nebo zařízení podléhající chemickým přeměnám (biodegradovatelná zařízení) (7).

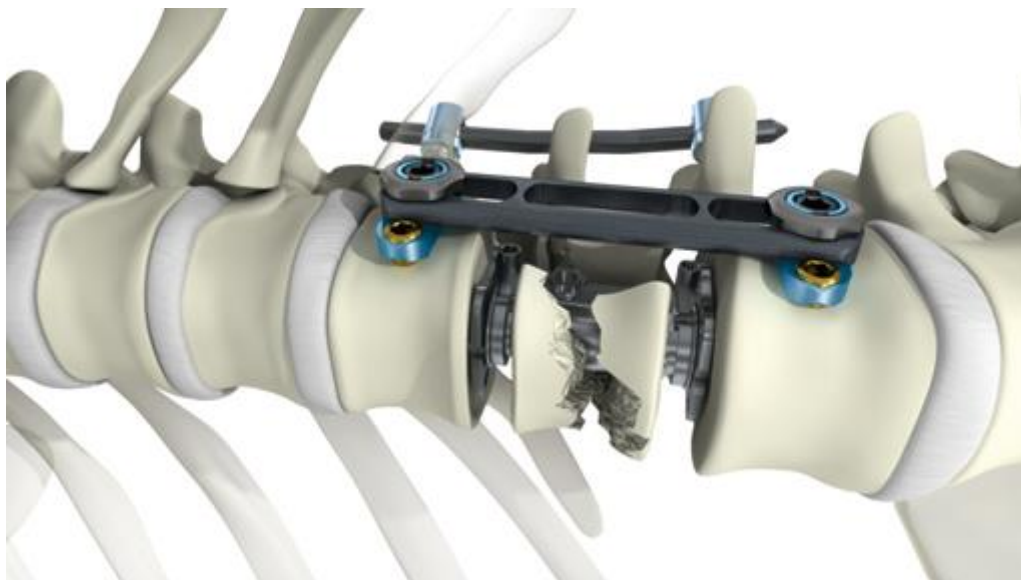
Biomateriály podle způsobu použití v těle dělíme na:

- a) Biomateriály pro náhradu, které se integrují do těla a zůstávají trvale uvnitř po implantaci, což způsobuje minimální zánět a tvorbu vláknité tkáně;
- b) Biomateriály pro regeneraci, které nabízejí počáteční podporu a stimulují tvorbu nové tkáně, ale nakonec se časem kontrolovaně odbourávají (7).

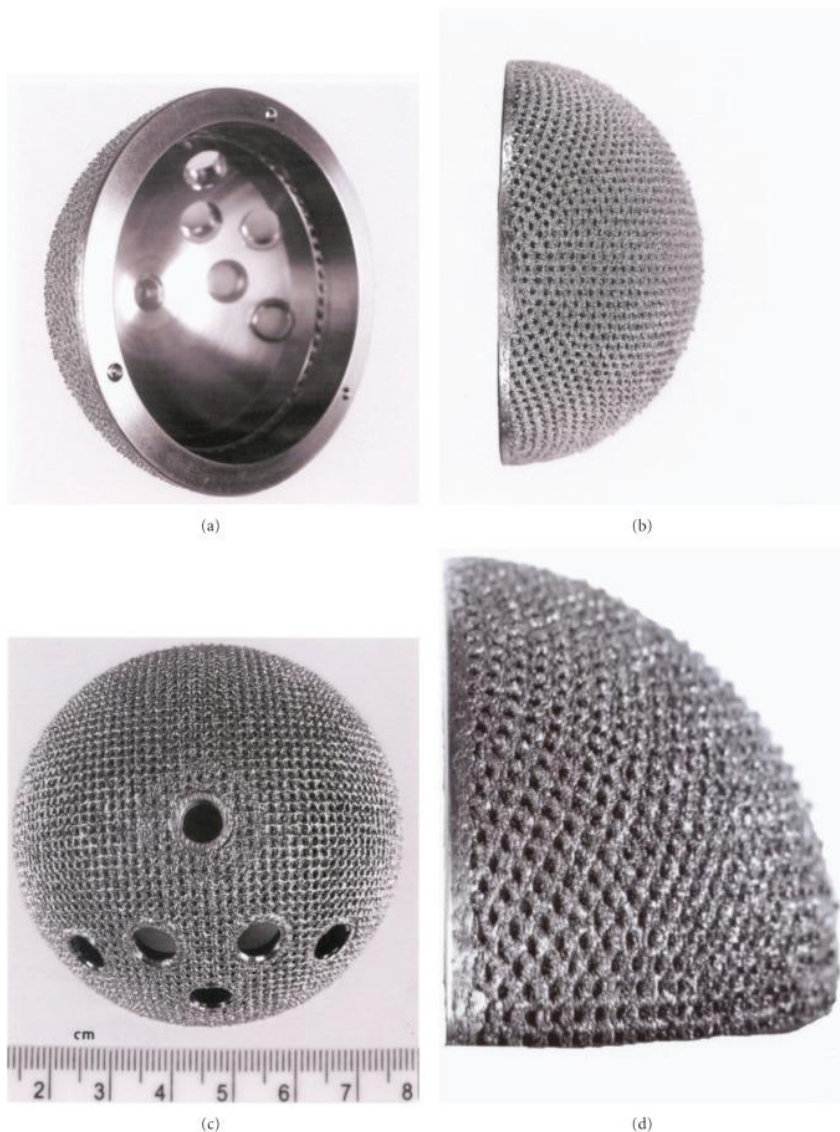
2.2.1. Biomateriály pro náhradu

Tento typ biomateriálů se obvykle využívá pro zhotovování dlouhodobých (> 20 let) nebo trvale implantovatelných zařízení. Jsou složeny z polymerů, keramiky nebo kovů, které jsou mechanicky velmi stabilní a po implantaci vykazují minimální reakci hostitele. Dříve byly preferovány biologicky inertní implantáty, které minimalizují interakce buněk a implantátů. Tyto implantáty mají na povrchu obvykle adsorbované nativní proteiny, které podporují tvorbu provizorní matrice a fungují jako pufr mezi bio materiálem a hostitelskou tkání (5).

Mezi nejčastěji používané materiály pro kostní implantáty patří slitiny titanu (Ti-6Al-4V), které se používají přibližně od roku 1980. Pro tuto aplikaci byly klíčovým materiálem z důvodu chemické inertnosti, dobré biokompatibility a dlouhodobé mechanické stability. Titanové implantáty se dělí na dvě hlavní skupiny: dlouhodobé a krátkodobé. Mezi krátkodobé implantáty se řadí šrouby a výztuže (Obrázek 2), které se obvykle po zahojení tkáně operativně odstraňují, aby se zabránilo nežádoucím vedlejším účinkům spojených s nehomogenním rozložením napětí mezi kostí a titanovým implantátem, který má výrazně vyšší Youngův modul pružnosti. Tento efekt může snížit stimulaci růstu nové kostní tkáně a remodelaci. Také může časem docházet k uvolňování implantátu, což je i případ implantátů kyčelního kloubu, které je následně nutné vyměnit. Dalšími důvody, které podněcují odstranění implantátu z lidského prostředí jsou komplikace spojené s tepelnou vodivostí, zvýšená citlivost vůči kovu, chemická karcinogeneze nebo vznik zánětu. Zároveň je použití dlouhodobých implantátů zapovězeno pro mladé pacienty, u kterých by mohlo dojít k zastavení procesu růstu kostí (8). Mezi dlouhodobé implantáty patří např. implantát kyčelního kloubu (Obrázek 3). Tento typ implantátů nevyžaduje následně operaci vyjmutí a je v těle trvale.



Obrázek 2 Přední modulární podpůrný systém pro stabilizaci hrudní a bederní páteře Aesculap® MACS TL II (9)



Obrázek 3 Titanový implantát pro náhradu kyčelního kloubu (10)

2.2.2. Biomateriály pro regeneraci

Vývojem biodegradovatelných a bioresorbovatelných materiálů se vědci snaží překonat nevýhody neoddělitelně spojené s použitím dlouhodobých implantátů. Nové materiály musí navíc být metabolizovatelné lidským tělem bez zanechání stop a postupně ztrácet svou mechanickou odolnost, zatímco se regeneruje nová tkáň. Tímto způsobem si nová kost zachová mechanické vlastnosti jako před poškozením. Aby bylo docíleno těchto výsledků, je nutné dodržet tři základní podmínky: dobré mechanické vlastnosti, kontrolu nad časem degradace a biokompatibilitu degradačních produktů (8). Tyto materiály by se měly rozkládat v období trvajícím několik dní až měsíců a zároveň podporovat regeneraci hostitelské tkáně (5).

Existuje řada biomateriálů, které byly zkoumány a klinicky použity pro léčbu a regeneraci kostí (11). Degradace implantátů je doprovázena nežádoucím poklesem mechanických vlastností. Pokud je však degradace řízená a postupná, pak se zatížení přenesou z implantátů na kostní tkáň a měkké tkáně, čímž se posílí kost a okolní tkáň a nedochází k oslabení tkání v okolí implantátu, jako se to děje při použití inertních implantátů. Vývoj biologicky odbouratelných desek, čepů, šroubů a stehových kotev v posledních letech významně pokročil. Třemi hlavními druhy studovaných a klinicky používaných biologicky odbouratelných materiálů jsou polymery, keramika a kovy (12).

2.2.2.1. Polymery

Polymery jsou makromolekuly, které se skládají z kovalentně vázaných opakujících se monomerů, které mohou být stejné nebo různé, tj. homopolymery a kopolymery. Tyto materiály mohou být amorfní nebo krystalické, přičemž jejich řetězce mohou být lineární, rozvětvené nebo zesíťované s jinými řetězci (13).

Biologicky odbouratelné polymery jsou jedněmi z prvních a běžně používaných biomateriálů pro léčbu kostí a v tkáňovém inženýrství. Jejich biologická odbouratelnost a kontrola nad rychlostí odbourávání jsou vysoce přínosné pro klinické aplikace (14). Degradaci polymerních materiálů lze upravit změnou jejich strukturního složení a způsobem výroby (13). Průběh a rychlost degradace jsou ovlivňovány různými faktory, jako je chemické složení, molekulová hmotnost (M_w) a krystalinita (15). Vzhledem k tomu, že krystalinita je mírou organizace, interakce a vnitřního uspořádání materiálu, tak ovlivňuje biodegradaci. Více krystalický materiál má silnější inter- a intra-molekulární vazbu, která se ve srovnání s amorfními polymery rozkládá pomalu (12).

Pro dosažení optimálního výsledku při tvorbě funkční tkáně je nutné, aby proběhla pozitivní interakce na buněčné a biochemické úrovni. Existuje několik kritérií pro biologicky odbouratelné polymery, aby je bylo možné úspěšně použít pro léčbu kostí a tkáňové inženýrství:

- 1) Povrch polymeru by měl umožňovat buněčnou adhezi a růst buněk;
- 2) Po implantaci *in vivo* by nemělo docházet k žádné zánětlivé nebo toxické reakci na polymer nebo produkty degradace;
- 3) Mají dostatečně vysokou pórovitost;
- 4) Mají velkou plochu a dostatečný prostor pro růst extracelulární matrice;
- 5) Musí být zcela rozložitelné s časově kontrolovatelnou resorpcí matrice scaffoldu (rychlost odbourávání se ideálně shoduje s regenerující se kostní tkání);
- 6) Polymerní materiál by měl být reprodukovatelně zpracovatelný do trojrozměrných (3D) struktur (12).

Na základě původu lze polymery dělit na přírodní nebo syntetické. Vzhledem k nízké pevnosti se přírodní polymery používají hlavně k opravě zlomenin drobných kostí, kde nevzniká vysoké zatížení implantátu. Pokud jde o syntetické polymery, úpravou struktury a syntézy lze připravit polymery s vylepšenými mechanickými vlastnostmi. Syntetické polymery mají také tu výhodu, že mají dobře kontrolovatelnou a reprodukovatelnou molekulární strukturu a jsou také neimunogenní (12).

a) Syntetické biodegradovatelné polymery

Nejrozsáhleji zkoumanými syntetickými biologicky odbouratelnými polymery jsou poly(α -hydroxykyseliny) známé také jako polyestery (12).

Nejrozsáhleji zkoumanými a používanými polymery ze třídy poly(α -hydroxykyselin) jsou poly(kyselina glykolová) (PGA), poly(kyselina mléčná) (PLA) a jejich kopolymer mléčné a glykolové kyseliny (PLGA) (11,16). Tyto polymery jsou považovány za vhodné kandidáty pro opravy a regeneraci kostí, protože jsou biologicky kompatibilní a odbouratelné v lidském těle (17). Pomocí těchto polymerů byla vyrobena implantovatelná zařízení pro vnitřní fixaci zlomenin. Poprvé vzbudily zájem před třemi desetiletími, kdy byly pro šicí materiály použity polyestery a stále zůstávají jedním z široce používaných syntetických biologicky odbouratelných polymerů. Jsou-li pro výrobu zařízení použity samotné polyestery, jsou mechanické vlastnosti vysoce porézních scaffoldů relativně slabé v porovnání s těmi, které jsou vyžadovány pro aplikace kostní tkáně. *In vivo* také snižují lokální pH kvůli degradačním produktům, což zase zvyšuje rychlost degradace implantátů do té míry, že omezuje jejich klinickou použitelnost. Další nevýhodou tohoto rychlého rozpadu je, že vedlejší produkty kyselé degradace vyvolávají zánětlivou reakci (12).

Poly(glykolová kyselina) je vysoce krystalický, syntetický polymer kyseliny glykolové (krystalinita 45–50 %). Díky vysoké krystalinitě, teplotě tání ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$), tažnosti a kontrolované rozpustnosti byla PGA jako první použita pro klinické aplikace ve formě vstřebatelných stehů. PGA má díky své hydrofilní povaze vysokou rychlost degradace a mechanická pevnost PGA 14 dní po implantaci obvykle klesá o 50 % a přibližně o 90 % po 28 dnech. Hlavními výhodami použití PGA jako rozložitelného biomateriálu jsou biodegradace a téměř žádná cytotoxická odpověď. PGA je vhodná pro výrobu zařízení použitelných pro vnitřní fixaci kostí. Jelikož PGA po implantaci časem ztrácí svoji pevnost, omezuje to použitelnost pro zlomené segmenty nesoucí velké napětí (12). PGA byla také vyztužena amorfním karbonovaným apatitem a použita jako implantát pro náhradu kostí, ale bylo zjištěno, že tento materiál je užitečný pouze v případě malých defektů nebo v situacích bez zatížení (18).

Poly(mléčná kyselina) byla poprvé použita pro lékařské aplikace ve formě stehů a prutů pro léčbu zlomenin dolní čelisti u psů a od té doby byla rozsáhle zkoumána. PLA je alifatický termoplastický polyester s lineárním polymerním řetězcem a *in vivo* podléhá biologické degradaci enzymatickými a hydrolytickými cestami. PLA má vynikající mechanické a tepelné vlastnosti. Je biokompatibilní, biologicky odbouratelná a je vyhovující pro biomedicínské aplikace. Zároveň pochází z obnovitelných zdrojů a velkou výhodou je cenová dostupnost díky čemuž je komerčně běžně používána. Kyselina mléčná je chirální molekula a existuje ve dvou stereoizometrických formách, které vedou k morfologicky odlišným polymerům L-PLA, D-PLA (semikrystalické); D,L-PLA a meso-PLA (amorfní) (19). Pro klinické aplikace se většinou používá krystalická L-PLA, která je odolná vůči hydrolýze, a amorfní D,L-PLA, která je naopak citlivější na hydrolýzu. *In vivo* se kyselina mléčná, uvolněná degradací PLLA, přeměňuje v játrech na glykogen nebo je inkorporována do cyklu trikarboxylových kyselin a je vyloučena z plic jako voda a oxid uhličitý (12).

Pro aplikace regenerace kostní tkáně jsou vyžadovány specifické vlastnosti materiálu, ze kterého jsou vyrobeny scaffoldy (např. mechanická odolnost), a proto je v ortopedických aplikacích upřednostňován L-PLA, protože splňuje většinu požadavků. Poly(kyselina L-mléčná) (PLLA) byla zkoumána jako biomateriál a byla zpracována ve scaffoldech loužením solí, fázovou separací a metodou zpěňování plynem. Těmito technologiemi lze vyrobit porézní polymery, které mají pórovitost pod 200 μm , neumožňují však kontrolu poréznosti v rozmezí velikostí pórů 200–500 μm , což je velikost nezbytná pro růst kostí a cév. Další metodou, která byla použita k výrobě scaffoldů z PLLA je přesná výroba vytlačováním (PEM Precise extrusion manufacturing). Pórovitost scaffoldů byla přibližně 60 %, a distribuce pórovitosti vedla ke zlepšeným mechanickým vlastnostem (8 MPa pevnost v tlaku, proti 50 MPa kortikální kosti viz Tabulka 1 v kapitole 2.4.1) (20). PLA byla také použita k vytvoření částečně odbouratelné kostní náhrady proximálního femuru. Vnější elastická vrstva byla tvořena D,L -PLA, hydroxyapatitem a uhličitánem vápenatým. Vnitřní vrstva byla tvořena titanem ponořeným do roztoků PLLA se suspendovanými vápenatými solemi. D,L -PLA je díky vysoké rychlosti degradace strategicky umístěna na vnější straně, aby podporovala biodegradaci a nahrazení novou kostní tkání. PLLA degraduje pomalu a poskytuje biokompatibilní rozhraní mezi biologickými tkáněmi a inertním kovovým jádrem implantátu, které poskytuje požadovanou mechanickou stabilitu (21).

V poslední době přitahují stále větší pozornost umělé materiály nahrazující kost na bázi kyseliny mléčné a glykolové. Výhoda tohoto kopolymeru v tkáňovém inženýrství kostí je biokompatibilita, biodegradace, vhodné mechanické vlastnosti a schopnost podporovat regeneraci tkáně. Další vlastností PLGA využívané v tkáňovém inženýrství je kontrola nad časem rozkladu, kterou je možné korigovat poměrem kyseliny mléčné a glykolové. Například poměr 50/50 má nejrychlejší dobu rozkladu. Scaffoldy na bázi PLGA byly zhodnoceny jako vhodné pro budoucí použití v tkáňovém inženýrství (22).

Poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) je alifatický, semikrystalický polyester. PCL byl zkoumán jako biomateriál pro ortopedické aplikace, je biologicky odbouratelný a biokompatibilní a používá se k opravě kostí a léčbě kostních defektů (23). Ukázalo se však, že PCL není pro tyto účely ideálním biomateriálem z důvodu pomalé rychlosti degradace a neideálním mechanickým vlastnostem (24).

b) Přírodní biodegradovatelné polymery

Kolagen (COL) je nejhojněji se vyskytující bílkovina v lidském těle a je hlavní složkou kostních a kožních tkání. Saska a kol. vytvořili nanokompozity na bázi COL, bakteriální celulózy (BC), apatitu (Ap) a osteogenního růstového peptidu pro regeneraci kostí (OGP). Žádný z připravených kompozitů nevykazoval cytotoxicitu, genotoxicitu ani mutagenitu. Kompozity stimulovaly růst buněk rychleji než vzorek čisté bakteriální celulózy. Přestože dochází ke snížení pevnosti v tahu kompozitu sterilizací gama zářením, může být kompozit (BC-COL)-Ap-OGP považován za potenciální materiál pro opravu kosti především díky vynikající biokompatibilitě (25).

Chitosan je lineární polysacharid běžně vyráběný částečnou deacetylací chitinu. Chitosan má široké použití v tkáňovém inženýrství díky své osteokonduktivitě, dobré biologické odbouratelnosti, pozoruhodné antibakteriální aktivitě a vynikající biokompatibilitě. Chen a kol. připravili kompozity na bázi organického chitosanu a sericinu z hedvábí a anorganického HAp. Mechanické vlastnosti kompozitů s obsahem organických složek méně než 50 % nebyly dostatečné, a to především kvůli křehkému hydroxyapatitu. Nejlepší kombinace modulu pružnosti a pevnosti v tlaku byla naměřena u kompozitů s 60 a 70 % organických složek. Nehledě na mechanické vlastnosti, kompozity podporují navázání a proliferaci osteoblastů při kultivaci na buňkách (26). Wu a kol. popsal ještě jeden problém, který omezuje použití chitosanových materiálů, a tím je doba degradace. Bylo zdůrazněno, že doba degradace mnoha biologicky rozložitelných přírodních polymerů, jako je kolagen, kyselina hyaluronová a chitosan, stále není dostatečně dlouhá. Klinicky doporučená doba pro degradaci scaffoldů doporučená lékaři je 4–6 měsíců (27).

Jedním z nejvíce studovaných materiálů pro kostní regeneraci je přírodní hedvábí. Je to přírodní protein, který je produkován larvami hmyzu na tvorbu kokonů (nejvýznamnějším producentem hedvábí jsou larvy bource morušového). Dalším producentem přírodního hedvábí jsou pavouci. Pavoučí hedvábí je velmi lehké a má vynikající mechanické vlastnosti. Použití tohoto typu hedvábí je však omezené jeho dostupností (28). Kokon bource morušového se skládá převážně ze dvou proteinů: hedvábného sericinu a hedvábného fibroinu. Čistý hedvábný sericin se pro regeneraci kostí nepoužívá z důvodu nedostačujících mechanických vlastností, nicméně je vhodné tento protein využít pro výrobu kompozitů pro regeneraci kostí díky vlastnosti stimulovat růst hydroxyapatitu na svém povrchu. Z hedvábného fibroinu je možné vyrobit ultratenké filmy, které se přibližují rozsahu mechanických vlastností lidské kosti. Youngův modul může dosáhnout 6–8 GPa s mezi pevnosti 100 MPa. Hedvábné filmy jsou však stále velmi křehké, a proto se výzkumné kolektivy pokouší překonat nedostatek mechanické pevnosti vytvářením kompozitních materiálů (29).

Významnými polymery přírodního původu jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA jsou biologicky odbouratelné polyestery organických kyselin. PHA jsou produkovány především biotechnologicky fermentací použitím některých bakterií. Bakterie a další prokariotické organismy produkují intracelulárně PHA jako zásobní zdroj energie a uhlíku za specifických růstových podmínek (30). Protože jsou tyto polymery v porovnání s polypropylenem poměrně drahé, velkoobjemové využití v obalovém průmyslu je neekonomické, při použití v tkáňovém inženýrství ale cena problém není. Pro tkáňové inženýrství a lékařské účely jsou vhodné především díky své dobré biokompatibilitě, variabilním mechanickým vlastnostem a dobré kontrole nad biodegradabilitou za fyziologických podmínek (31). Mezi zástupce této skupiny polymerů patří například P3HV (poly-3-hydroxyvalerát), P4HB (poly-4-hydroxybutyrát), P3HHx (poly-3-hydroxyhexanoát) a jejich kopolymery, nejčastěji PHBH (polyhydroxybutyrát-co-hexanoát) a PHBV (polyhydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát). Nejvýznamnějším zástupcem je P3HB (poly-3-hydroxybutyrát) (32). P3HB byl objeven v roce 1926 vědcem M. Lemoigne (33) a již v sedmdesátých letech 20. století byl tento materiál použit v lékařství jako jedna složka vstřebatelného švu. Během let byly polyhydroxyalkanoáty použity pro výrobu mnoha dalších lékařských zařízení včetně stehů, šroubů, nýtů, svorek, kostních destiček, náplastí,

stentů, náhrad kůže, náhrad kostí a mnoha dalších. Některá lékařská zařízení na bázi PHA jsou zobrazena na Obrázek 4. Prvním produktem na bázi PHA schváleným Americkou lékovou agenturou (FDA) pro klinické použití je vstřebatelný steh TephaFLEX® připravený z P4HB (34).



Obrázek 4 Lékařská zařízení založená na bázi syntetických a přírodních PHA používaných v lékařské praxi nebo v současné době vyvíjených (A-PGA vstřebatelné švy (Ethicon, Johnson & Johnson, USA); B- Osteotwin™ bioresorbovatelný šroub pro fixaci kostí na bázi PLA se změkčovadlem (Biomatlante, France; C- LAKTOSorb® bioresorbovatelné destičky na bázi PLGA pro fixaci kostí (Biomet, USA); D- ABSORB bioresorbovatelný koronární stent na bázi PLA (Abbott, USA); E- Phasix Plug bioresorbovatelná endoprotéza na bázi P4HB pro hernioplastiku (C.R. Bard Inc., USA); F- Gore Bio- bioresorbovatelná zátky na bázi PLA pro koloproktologické aplikace (W. L. Gore & Associates Inc., USA); G- Ultrapro Advanced™ částečně resorbovatelná síťovinová endoprotéza pro hernio plastiku na bázi tkaného materiálu z polypropylenových monofilamentů a PLGA (Ethicon, Johnson & Johnson, USA); H- GEM Neurotube síťovinová trubice na bázi tkaného PGA pro nervové spoje (Synovis Micro Companies Alliance, USA); I- Bioresorbovatelná svorka na bázi PLA pro automatizované sešívací zařízení pro kůži a měkké tkáně (Ethicon, Johnson & Johnson, USA); J- ElastoPHB bioresorbovatelná biopolymerní membrána na bázi PHBV pro opravu měkkých defektů a defektů chrupavčité tkáně (BIOMIR Service JSC, Krasnoznamensk, Russia)) (30)

Polyhydroxyalkanoáty je možné použít i ve tkáňovém inženýrství kostí, kde je na implantáty nebo scaffoldy působeno velkým napětím a je od nich vyžadována poměrně velká mechanická odolnost. V tomto případě mají největší potenciál PHA s krátkým řetězcem jako P3HB či P3HBV s přídavkem keramiky (HAp nebo TCP), která se přidává pro optimalizaci mechanických vlastností pro konkrétní použití (35). Galego a kol. testovali několik směsí na bázi PHB a HAp různými metodami a zjistili, že směs P(HB-co-8% HV)/HAp (30% hm.) má mechanickou pevnost v tlaku podobnou některým lidským kostem (62 MPa), vyvolává nižší zánětlivou odezvu a proto by mohl být využit v tkáňovém inženýrství kostí (36).

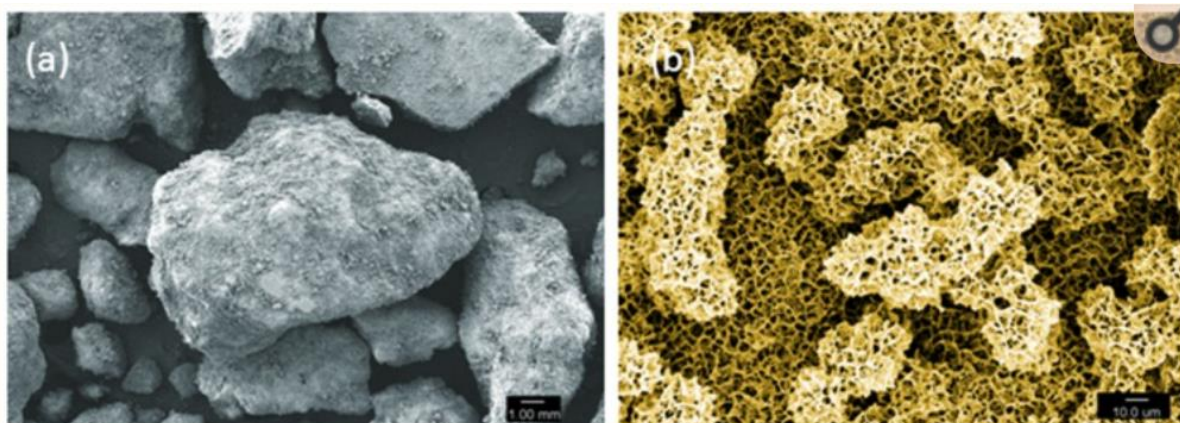
2.2.2.2. Biokeramika

Biomateriály z keramiky byly původně zkoumány a používány v oblasti ortopedické chirurgie jako alternativa ke kovovým materiálům. Biokeramika se v současné době používá

k vyplňování kostních defektů, opravě a stabilizaci zlomenin. Keramické materiály jsou biokompatibilní, odolné proti korozi a prokazují obrovskou bioaktivitu. Nevýhody biokeramiky jsou špatná lomová houževnatost, křehkost a extrémně vysoká tuhost (11).

Fosforečnan vápenatý (TCP) je vstřebatelný a bioaktivní keramický materiál. TCP se vyskytuje ve dvou krystalických formách: α -TCP a β -TCP. Krystalinita a chemické složení se velmi podobají minerální fázi kostní tkáně. TCP prokazuje vyšší rychlost biodegradace než HAp po implantaci *in vivo* (37). TCP vykazuje osteokonduktivitu a aktivní resorpci, to především díky mikroporozitě, která hraje zásadní roli v procesu remodelace mezi kostí a kostním implantátem. Preklinické experimenty prokázaly, že se TCP téměř úplně vstřebává (asi z 95 %) po měsíci a po půl roce od implantace holenní kosti u krysa a dochází k tvorbě nové kosti a reformaci kostní dřevě. Podobný růst kostí byl pozorován u implantace TCP do spongiózní kosti u psích modelů (38).

Hydroxyapatit je bioaktivní a biologicky vstřebatelný keramický materiál, který tvoří většinu anorganické složky kostní tkáně. HAp je možné připravit synteticky, vysokoteplotní reakcí. Tímto způsobem vzniká vysoce krystalický keramický materiál. Ačkoli se syntetický a přírodní HAp liší fyzickou mikrostrukturou, velikostí krystalů a pórovitostí, oba mají chemickou strukturu podobnou kostem a mají tedy osteokonduktivní potenciál (39). Bioresorpce HAp je pomalá a silně závisí na vlastnostech. Po implantaci do králičí stehenní kosti byla po 12 týdnech pozorována pouze minimální degradace a pomalá resorpce (40). Biokeramika na bázi HAp se používá k výplni malých kostních defektů po resekci nádoru nebo po úbytku kostní hmoty v důsledku zlomenin pažní kosti, holenní kosti, patní kosti a obratlů (12). Na Obrázek 5 je možné pozorovat částice hydroxyapatitu a β -TCP zobrazené skenovací elektronovou mikroskopií.



Obrázek 5 Mikroskopické zobrazení částic materiálů; a) β -TCP, zvětšení 50 \times ; b) Hydroxyapatit, zvětšení 5000 \times (12)

2.3. Biodegradace a biokompatibilita PHA v lidském těle

Biomateriály jsou biologicky rozložitelné a biokompatibilní polymery přírodního nebo syntetického původu. Biomateriály pro inženýrství kostní tkáně by měly splňovat následující požadavky (41, 42):

1. Mechanická pevnost odolávající hydrostatickému tlaku. Youngův modul kortikální kosti se nachází mezi 15 a 20 GPa a modul spongiózní kosti je mezi 0,1 a 2 GPa. Pevnost v tlaku se pohybuje mezi 100 a 200 MPa pro kortikální kost a mezi 2 a 20 MPa pro spongiózní kost (42). Velké rozdíly v mechanických vlastnostech a geometrii ztěžují návrh ideálního kostního scaffoldu.
2. Indukce tvorby nových tkání bez zánětu.
3. Povrchové vlastnosti, které vyhovují osteogenním buňkám. Pro růst je rozhodující proliferace a diferenciací buněk.
4. Osteoinduktivita pro podporu migrace osteogenních buněk a pro stimulaci diferenciací. Důležitou roli v osteoinduktivitě hraje chemické složení scaffoldu, pórovitost, povrchové vlastnosti a nano/mikro topografie.
5. Pórovitost umožňující růst buněk a neovaskularizaci.
6. Bioresorbce po degradaci scaffoldu, která umožňuje růst nové kostní tkáně. Scaffold by měl degradovat řízenou rychlostí resorpce, čímž se vytvoří prostor pro růst nové kostní tkáně. Produkty rozkladu by neměly způsobovat zánět okolní tkáně.

Vzhledem k tomu, že PHB je kandidátem pro použití v lidském kostním inženýrství, jsou četné studie zaměřeny na posouzení biokompatibility pomocí lidských osteoblastů. Hayati a kol. potvrdili biokompatibilitu kompozitních scaffoldů P3HB/HAp pomocí buněčné linie lidského osteosarkomu (MG-63). Morfologie navázaných buněk MG-63 v přímém kontaktu s povrchem scaffoldu prokázala vhodnou interakci mezi buňkou a scaffoldem (43). Bernd a kol. používali P3HB náplasti k pokrytí defektů přední lebky u miniprasátek. Po 3, 6 a 9 měsících byly implantované náplasti odstraněny a podrobeny testování biodegradace, histologii, přítomnosti mikroorganismů a elektronové mikroskopii. Po 9 měsících byl defekt přední základny lebky zcela uzavřen (44). Gredes a kol. studovali PHB náplasti po implantaci do chirurgicky vytvořených defektů na lebkách dospělých potkanů. Nebyly zjištěny žádné známky buněčného zánětu nebo jiné znaky odmítnutí P3HB. Dvanáct týdnů po operaci byla prokázána tvorba kosti ve všech defektech ošetřených P3HB náplastmi. Také byl pozorován výrazný vývoj krevních cév (45).

2.4. Scaffold

Scaffoldy jsou trojrozměrné biokompatibilní struktury, které napodobují vlastnosti extracelulární matrix (ECM) a tvoří předlohu, na kterou se připojují buňky a stimuluje tvorbu kostní tkáně *in vivo* (46). Požadavky na materiály pro výrobu scaffoldů jsou:

a) Povrchové vlastnosti

Scaffoldy s optimálními povrchovými vlastnostmi a složením vykazují zvýšenou adhezi, proliferaci a diferenciací buněk. Například v tkáňovém inženýrství kostí bylo zjištěno, že větší drsnost zlepšuje funkci osteoblastů (47).

b) Fyzikální vlastnosti

Scaffoldy by měly být třírozměrné, propojené, porézní struktury. Tvar a velikost pórů by měly zajišťovat ideální podmínky pro růst buněk, transport živin a odvod metabolického odpadu.

Dále by architektura měla umožňovat buňkám vstup do celého objemu scaffoldu, aby se zajistilo kompletní zhojení tkáně (48).

c) Mechanické vlastnosti

Dále je důležité vytvořit matici, která bude kopírovat vlastnosti okolního prostředí, do kterého je vložena (41). Například v inženýrství kostní tkáň naddimenzovaná matrice implantátu může aktivovat kostní resorpci, zatímco poddimenzovaná matrice může selhat ve své funkci mechanické podpory. Mechanické vlastnosti lze variovat správným výběrem materiálu, architekturou kompozitních konstrukcí a pórovitostí matrice (48).

d) Degradace

Scaffoldy by měly být degradovatelné a čas degradace by měl kopírovat rychlost růstu buněk/tkáň. Testy degradace mohou probíhat v simulovaných podmínkách za teploty 37 °C a kontrolovaným pH (48).

e) Sterilizovatelnost

Abychom zabránili zanesení možné infekce do organismu, musí být možné matici vysterilizovat. V případě použití některých běžných chemikálií určených ke sterilizaci by na povrchu vzorku mohly zůstat rezidua, které by mohly působit toxicky (např. ethylenoxid). Vhodnou alternativou k použití chemikálií je gama záření. Zároveň je však nutné počítat se změnami vlastností, které by mohla způsobit sterilizační technika použitému materiálu. Například v případě P3HB je prokázáno, že použití γ záření je možné a účinné, nicméně způsobuje mírné snížení molekulové hmotnosti. Další účinnou metodou sterilizace P3HB scaffoldů je použití UV záření po dobu 30 minut (49).

2.4.1. Mechanické vlastnosti scaffoldů

Mechanické vlastnosti scaffoldu jsou velmi důležité a je nutné je zohlednit při výrobě scaffoldu. Při aplikaci ve tkáňovém inženýrství kostí je nutné, aby mechanické vlastnosti scaffoldu imitovaly mechanické vlastnosti původní spongiózní kosti. Je tedy nejprve nutné zjistit mechanické vlastnosti kosti. Dvě základní složky kosti jsou křehký apatit, který zajišťuje pevnost a kolagen, který zajišťuje elasticitu. Chování kosti při tahu vychází právě z kombinace těchto dvou hlavních složek. Je také důležité vzít v úvahu fakt, že kostní tkáň je schopna přizpůsobit své vlastnosti a konfiguraci v závislosti na okolním mechanickém napětí, což žádný uměle připravený materiál nedokáže (48).

V případě použití spongiózní kosti jako předlohy pro tvorbu scaffoldu pro tkáňové inženýrství je nutné předem znát její strukturu a vlastnosti. Spongiózní kost je tvořena propojenou sítí plátů a prutů. Spongiózní kost je známa svou nízkou hustotou (relativní hustota se pohybuje mezi 0,05 – 0,70). Při kompresi by scaffold měl vykazovat lineární pružnost při nízkém namáhání, následované kolapsem stěn volných prostor, což způsobí zvýšení hustoty a napětí (48). Mechanické vlastnosti kostních tkání a dalších materiálů používaných při léčení kostí jsou znázorněny v Tabulka 1.

Tabulka 1 Mechanické vlastnosti materiálů (50)

Materiál	Youngův modul pružnosti [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Tažnost [%]
Kortikální kost	7–30	50–150	1–3
Spongiózní kost	0,05–0,5	10–20	5–7
Co-Cr slitiny	230	900–1540	10–30
Nerezová ocel	200	540–1000	6–70
Ti-6Al-4V	106	900	12,5
Hydroxyapatit	30–100	60–190	–
Polyethylen	1	30	≥300

2.4.2. Biologické vlastnosti scaffoldů

Ideální scaffold poskytuje podporu, která umožňuje navázání, proliferaci a diferenciaci buněk. Ihned po implantaci biomateriálu do organismu dochází k adsorpci proteinů na jeho povrch. K tomu dochází během několika sekund, dlouho předtím, než první buňky dosáhnou povrchu implantátu. V důsledku tohoto jevu buňky téměř nikdy nepřicházejí do přímého kontaktu s povrchem materiálu; spíše interagují s vrstvou adsorbovaných proteinů. Tato vrstva zprostředkovává buněčnou adhezi a také zajišťuje signály buňkám přes adhezní receptory buněk, především integriny. Tímto způsobem určuje buněčnou odezvu k biomateriálu (51). Typ, množství a geometrická konformace adsorbovaných proteinů silně závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu materiálu, jako je jeho chemické složení, elektrický náboj, smáčitelnost, drsnost a topografie (52).

Důležitou vlastností scaffoldu, která ovlivňuje buněčnou odpověď, je hydrofobicita či hydrofilita povrchu. Tato vlastnost je určena kontaktním úhlem. Pokud je úhel větší než 90° , je povrch považován za hydrofobní, pokud méně než 90° je povrch hydrofilní. Studie prokázaly, že buňky lépe prosperují na hydrofilním povrchu, který usnadňuje buněčnou adhezi a proliferaci (53,54).

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím adhezi a následné chování buněk je drsnost povrchu materiálu a topografie. V závislosti na měřítku nepravidlostí povrchu materiálu rozlišujeme makro drsnost (100 μm – milimetry), mikro drsnost (100 nm – 100 μm) a nano drsnost (méně než 100 nm), přičemž různé buňky reagují různě na drsnost povrchu (55).

Póry scaffoldu jsou zásadní pro umožnění biologických aktivit buňky zahrnujících migraci buněk, infiltraci, zásobování živinami a kyslíkem a výměnu odpadních produktů. Aby se usnadnila migrace a proliferace buněk, musí být velikost pórů scaffoldu větší než fyzická velikost buněk, přičemž průměrná velikost fibroblastů, osteoblastů a chondrocytů je 10 μm . Při menší velikosti pórů, než je velikost buněk, je zabráněno infiltraci a migraci buněk (56).

Porozita, důležitý faktor ovlivňující buněčnou infiltraci, je procento volného objemu ve scaffoldu. Při studiu kostních buněk bylo zjištěno, že růst kostních buněk se s rostoucí porozitou zvyšuje (57). Optimální porozita pro penetraci buněk se pohybuje v rozmezí 60–90 %. Proto je při výrobě scaffoldů rozhodující vysoká pórovitost a optimální velikost pórů (58).

2.5. Metody výroby scaffoldů pro regeneraci kostní tkáně

Výběrem vhodné metody výroby můžeme ovlivnit funkčnost výsledného scaffoldu, Je tedy nutné se zaměřit nejen na materiál, ale i na způsob výroby. Je žádoucí zajistit vhodnou 3D strukturu scaffoldu, aby se docílilo optimálního výsledku. Nejoblíbenější metody výroby scaffoldů jsou znázorněny v Tabulka 2 včetně jejich výhod a nevýhod.

Tabulka 2 Metody výroby scaffoldů (28)

Metoda	Výhody	Nevýhody
Odlévání	<ul style="list-style-type: none"> - Možnost vytvářet porézní struktury - Jednoduchost 	<ul style="list-style-type: none"> - Porozita vede ke snížení mechanických vlastností - Rezidua organických rozpouštědel mohou mít toxické účinky
Vstříkávání taveniny	<ul style="list-style-type: none"> - Výroba struktur různých tvarů a velikostí - Netřeba organických rozpouštědel 	<ul style="list-style-type: none"> - Neporézní struktury - Vysoká operační teplota
Elektrospining (zvlákňování)	<ul style="list-style-type: none"> - Jednoduchá kontrola fyzikálních vlastností 	<ul style="list-style-type: none"> - Malá velikost pórů - Příliš tenká vlákna
Hydrogely	<ul style="list-style-type: none"> - Nevyžaduje speciální přístroje - Nevyžaduje rozpouštědlo 	<ul style="list-style-type: none"> - Nedostatečná mechanická odolnost pro nosná zařízení - Smršťování gelu v důsledku ztráty vody
Zpěňování plynů	<ul style="list-style-type: none"> - Nevyžaduje organické rozpouštědlo 	<ul style="list-style-type: none"> - Nedostatečná kontrola nad velikostí pórů - Nedostatečná mechanická odolnost pro nosná zařízení
Lyofilizační sušení emulzí	<ul style="list-style-type: none"> - Kontrola nad velikostí pórů - Vyžaduje méně rozpouštědla - Krátkodobý proces 	<ul style="list-style-type: none"> - Vznik nestabilních emulzí, vyžadují surfaktant - Nedostatečná mechanická odolnost pro nosná zařízení
Rychlé modelování	<ul style="list-style-type: none"> - Schopnost vytvářet jedinečné díly na základě specifických potřeb pacientů 	<ul style="list-style-type: none"> - Nelze volit drsnost povrchu

Polymerní scaffoldy pro tkáňové inženýrství s 3D strukturou lze technologicky připravit několika způsoby, například odlitím roztoku nebo litím taveniny do forem, lyofilizací, pěněním, elucí porogenních částic nebo různými technikami elektrospiningu (59). V současné době se úspěšně používá relativně nová výrobní metoda 3D tisku (známá jako aditivní výroba). 3D tištěný produkt je vytvářen vrstvou po vrstvě podle digitálního 3D modelu. Největší výhodou této metody je schopnost produkovat složité tvary, včetně vnitřní porézní struktury v relativně krátkém časovém úseku a za nízké náklady (60).

Výhodou metod 3D tisku proti konvenčním technikám výroby scaffoldů je větší možnost kontroly a všestrannější použití. S pomocí počítačem podporovaných návrhů (CAD) lze scaffold reprodukovatelně vyrobit a v závislosti na technologii 3D tisku i s přesností v nanoměřítku. Za účelem vytvoření scaffoldu s vlastnostmi podobnými ECM musí být technologie 3D tisku schopna poskytnout kvalitní tisk struktur s řízenou velikostí pórů, vysokou mechanickou pevností, biologickou rozložitelností a schopností podporovat buněčný růst (61).

3D tisk je pojem, který zahrnuje více výrobních technologií. Mezi tyto technologie patří například stereolitografie (SLA), spékání prášku laserovým paprskem (SLS), tavení laserovým paprskem (SLM) nebo metoda modelování depozicí taveniny (FDM), která je využita v této práci (62). Principem této metody je vedení polymerního vlákna o přesném průměru do vyhřívané trysky, kde je roztaveno a vytlačeno na podložku, kde vytvoří první vrstvu objektu. Trajektorie trysky je získána ze softwaru, který dokáže 3D model rozložit na řezy představující jednotlivé vrstvy. FDM je v současné době jednou z nejpoužívanějších 3D tiskových technologií. Jedná se o levnou a dostupnou technologii (63). Filamenty materiálů, které se komerčně používají jsou obvykle akrylonitrilbutadienstyren (ABS), akrylonitrilstyrenakrylát (ASA), polyamid (PA), poly(mléčná kyselina) (PLA), polyethylentereftalát (PET). Filamenty samotných PHA dosud nejsou k dispozici na trhu. Důvodem není jen jejich vysoká cena, ale i jejich nízká tepelná stabilita při zpracování taveniny. Reologické vlastnosti a tepelná stabilita P3HB neumožňují přípravu filamentu pouze z P3HB bez dalších přidaných látek. Tepelně stabilnější, než P3HB je jeho kopolymer s 3-hydroxyvalerátem (3HV), P3HBV. Další variantou tisku P3HB je vytvoření směsi s PLA, která se může následně modifikovat změkčovadlem pro optimalizaci vlastností (64).

3. Současný stav poznání

Oblast tkáňového inženýrství kostí v posledních letech rychle pokročila. P3HB je polymer vyrobený bakteriemi, o kterém je známo, že je biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Nabízí se tedy myšlenka, že bude vhodným kandidátem pro výrobu scaffoldů pro regeneraci kostní tkáně. Vzhledem ke svým špatným mechanickým vlastnostem však musí být P3HB doplněn vhodnými aditivami, aby byl užitečný v biomedicínských aplikacích. Nejčastěji testovanými aditivami ke zlepšení vlastností jsou HAp (65, 66), biosklo (67) a chitosan (68). Dalšími aditivami jsou také PCL nebo PLA se změkčovadlem (64).

Kovalčík a kol. testovali vhodnost použití PHA na přípravu scaffoldů metodou FDM. Následně testovali mechanické, tepelné a biodegradační vlastnosti scaffoldů v porovnání s komerčně dostupnou a běžně používanou PLA. Extruzí vytvořili filamenty vzorků o průměru 1,60–1,75 mm. Z filamentů vytiskli testovací tělesa normovaného tvaru na testy mechanických vlastností a cytotoxicity. Tepelné vlastnosti byly testovány termogravimetrickou analýzou (TGA). Testy cytotoxicity byly provedeny dvěma způsoby. Nejprve byla provedena cytotoxicita výluhů vzorků, následně bylo provedeno osazení buněk přímo na scaffoldy. Dalším testem bylo měření degradace scaffoldů v uměle vytvořených žaludečních šťávách. Mezi několika studovanými PHA bylo zjištěno, že poly(hydroxybutyrát-ko-hydroxyhexanoát) má dostatečnou tepelnou stabilitu a reologické vlastnosti pro použití v FDM. Scaffoldy připravené z PHBH metodou FDM vykazují dobré mechanické a viskoelastické vlastnosti. Scaffoldy nevykazovaly žádnou cytotoxicitu. V cytotoxicitě byly pozorovány významné

rozdíly v porovnání PLA a PHBH scaffoldů. Na povrchu scaffoldu z PLA neprobíhala buněčná proliferace, zatímco povrch scaffoldu z PHBH umožnil proliferaci buněk srovnatelnou s kontrolou. Zároveň také scaffold z PHBH rychleji degradoval v simulovaných podmínkách v porovnání se scaffoldem z PLA. Z těchto důvodů byl PHBH shledán vhodným pro další výzkum pro použití v tkáňovém inženýrství (69).

4. Experimentální část

4.1. Materiály

Pro práci byly použity materiály P3HB, PLA, HAp a změkčovadlo Syncroflex3114 (dále jen S3114). Tyto materiály byly zvoleny na základě předchozích experimentů. P3HB bylo zvoleno jako hlavní testovaný polymer, ke kterému byly vybrány další složky za účelem potlačení některých negativních vlastností tohoto polymeru. Konkrétně byl použit P3HB šarže EDW 2394 Enmat™ zakoupený od firmy TiaAn Biopolymer. P3HB je velmi křehký materiál, proto byla jako další polymerní složka zvolena PLA, která je též biokompatibilní, ale vykazuje méně křehké chování. PLA typu Ingeo™ Biopolymer 4060D byla zakoupena od firmy NatureWorks LLC. Použitá PLA je směs L a D – izomerů, je tedy amorfní. Další složkou je HAp. Tato keramická složka je běžnou součástí kostí a zvyšuje jejich mechanickou odolnost. Za stejným účelem byl zvolen i v této práci. HAp byl zakoupen od firmy AppliChem. Velikost částic HAp je 2,80 μm a byla měřena laserovou difrakcí na zařízení Helios. Poslední složkou je změkčovadlo, které zajišťuje v polymeru volný objem, ve kterém se mohou makromolekuly lépe pohybovat. Změkčovadlo S3114 bylo poskytnuto firmou Croda. Charakteristické vlastnosti včetně číselných a hmotnostních středů molekulových hmotností M_n a teploty skelných přechodů P3HB a PLA jsou znázorněny v Tabulka 3.

Tabulka 3 Charakteristické vlastnosti použitých materiálů

	M_n [kg/mol]	T_g [°C]	T_m [°C]
P3HB	160000	0	170
PLA	180000	55–60	–

4.2. Plánovaný experiment

Hlavním cílem této práce je charakterizace vlastností materiálů složených ze čtyř složek, kterými jsou P3HB, PLA, HAp a S3114, v co nejširší škále kombinací hmotnostního složení. Tradiční metodou by s ohledem na množství složek systému bylo nutné připravit nereálné množství vzorků. Metoda plánovaného experimentu umožňuje dosáhnout stejného efektu a zároveň značně zredukovat množství připravovaných vzorků. Plánovaný experiment využívá matematický model, který dokáže z naměřených dat dopočítat a vytvořit kompletní plochu závislosti měřených vlastností na složení. Díky tomu, lze zjistit vlastnosti materiálů se složeními, které nebyly připraveny. Všechny složky systému významně ovlivňují výsledné vlastnosti. Proto jsme zvolili třífaktorový experiment s následujícími faktory:

1. Faktor 1 PLA/P3HB
2. Faktor 2 HAp/(P3HB+PLA)
3. Faktor 3 Změkčovadlo/(P3HB+PLA+HAp)

Prvním faktorem je poměr PLA/P3HB v rozsahu hmotnostních poměrů 50/50–95/5. Minimum bylo zvoleno tak, aby ve směsi byla vždy majorita P3HB. Maximum bylo zvoleno z důvodu tisknutelnosti a mechanických vlastností. Samotné P3HB by bylo příliš křehké a tedy netisknutelné. Ze stejného důvodu bylo zvoleno i maximum HAp ve druhém faktoru. Minimum bylo zvoleno tak, aby systém obsahoval vždy keramickou složku. Ve druhém faktoru je poměr HAp/(P3HB+PLA) v rozsahu hmotnostních poměrů 5/95–30/70. Třetí faktor byl zvolen jako

změkčovadlo/(P3HB+PLA+HAp) proto, že změkčovadlo interaguje se všemi třemi složkami systému. Množství změkčovadla se z předchozích experimentů osvědčilo v rozmezí 7–11 %. Aby bylo toto rozmezí pokryto bylo zvoleno rozmezí poměrů 5,6/94,4–12,4/87,6.

Výsledky experimentů byly statisticky zpracovány a pro vykreslení ploch závislosti měřené veličiny na jednotlivých faktorech byl použit matematický rozvoj ve formě rovnice 1.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_{11}^2 + b_{22}x_{22}^2 + b_{33}x_{33}^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{32}x_3x_2 \quad (1)$$

Přičemž platí, že:

$$x_1 = \frac{\text{PLA}}{\text{P3HB}}; x_2 = \frac{\text{HAp}}{\text{PLA/P3HB}}; x_3 = \frac{\text{změkčovadlo}}{\text{PLA} + \text{P3HB} + \text{HAp}}$$

Výsledkem statistického zpracování jsou koeficienty s obecným označením b_{xy} , kde x a y nabývají hodnot 1–3 podle toho, ke kterému faktoru se vztahují. Koeficienty b_1 , b_2 a b_3 určují lineární vliv. Koeficienty b_{11} , b_{22} a b_{33} určují míru kvadratického vlivu a koeficienty b_{12} , b_{13} a b_{32} kombinují vliv dvou faktorů. Matematický model vyhodnotí všechny tyto koeficienty a vyznačí ty, které jsou statisticky významné. Pokud by systém vyhodnotil jako statisticky významný například pouze koeficient b_1 , znamenalo by to, že je pro měřenou veličinu významný pouze faktor 1, v našem případě poměr polymerů PLA/P3HB. A tento vliv by byl lineární.

Z kódovaných hodnot a vyhodnocených koeficientů byly vytvořeny grafy znázorňující vliv faktorů na měřenou veličinu. Je tedy možné odhadnout složení vzorků s konkrétní hodnotou měřené veličiny. Spolehlivost experimentu je 95 %.

4.3. Vzorky

V rámci experimentu bylo připraveno celkem 20 vzorků. Každý vzorek se skládá z P3HB, PLA, HAp a změkčovadla v různých poměrech. Vzorky i s procentuálním zastoupením jednotlivých materiálů jsou uvedeny v Tabulka 4. Hmotnost všech připravených vzorků byla 700 g Jako označení vzorku bylo zvoleno zkrácené složení vzorku udávající poměr P3HB/PLA, následně množství plniva (HAp) a poslední číslo názvu udává množství změkčovadla ve vzorku. Ráda bych zmínila, že vzorky s číselným označením 9–14 mají ve svém složení vždy jeden faktor v krajnosti experimentu. Vzorky s číselným označením 15–20 mají shodné složení a tyto vzorky byly připraveny za účelem stanovení experimentální chyby v plánovaném experimentu.

Tabulka 4 Připravované vzorky

Číslo vzorku	Označení vzorku	P3HB [%]	PLA [%]	S3114 [%]	HAp [%]
1	80/20-11-7	66	16	7	11
2	55/45-11-7	46	37	7	11
3	80/20-24-7	55	14	7	24
4	55/45-24-7	38	31	7	24
5	80/20-10-11	63	15	11	10
6	55/45-10-11	44	35	11	10
7	80/20-23-11	53	13	11	23
8	55/45-23-11	36	29	11	23
9	95/5-18-9	70	4	9	18
10	50/50-18-9	37	37	9	18
11	66/34-5-9	57	30	9	5
12	66/34-27-9	42	22	9	27
13	66/34-18-6	50	26	6	18
14	66/34-17-12	46	24	12	17
15	66/34-18-9_1	48	25	9	18
16	66/34-18-9_2	48	25	9	18
17	66/34-18-9_3	48	25	9	18
18	66/34-18-9_4	48	25	9	18
19	66/34-18-9_5	48	25	9	18
20	66/34-18-9_6	48	25	9	18

4.4. Příprava vzorků

Navážky materiálů byly kompaundovány do formy granulí pomocí dvoušnekového extrudéru značky LabTech. Průměr šneků je 16 mm a poměr L/D (délka/šířka) je 40. Nastavení teplot extrudéru od násypky po trysku je znázorněno v Tabulka 5. Otáčky extrudéru byly nastaveny na 150 rpm.

Tabulka 5 Nastavení teplot extrudéru

Zóny	Tryska	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Teplota [°C]	60	120	180	190	190	190	190	170	160	160

4.5. Výroba strun (filamentů) pro 3D tisk

Připravené granule materiálu byly převedeny do jednošnekového extrudéru, ze kterého vycházela struna. Struna byla vedena vanou s vodou temperovanou na 60 °C následně byl optickým snímačem kontrolován její průměr, který se nachází v rozmezí 1,75–1,80 mm, aby mohla být struna využita pro 3D tisk. Extrudér je od firmy HAAKE Rheomex OS (Haake Technik GmbH). Nastavení teplot extrudéru od násypky po trysku je znázorněno v Tabulka 6. Průměr šneku je 19 mm. Poměr L/D je 30.

Tabulka 6 Nastavení teplot extrudéru

	Tryska	Zóna	Zóna	Pod násypkou	Tavenina	Kroutící moment	Otáčky	Odtah
	°C	°C	°C	°C	°C	M [Nm]	n [1/min]	jednotky
80/20-11-7	170	180	185	180	168,7	18–19	20	105
55/45-11-7	170	180	185	180	168,7	25–27	20	105
80/20-24-7	170	180	185	180	169,8	18–20	20	102
55/45-24-7	170	180	185	180	168,7	27–29	20	105
80/20-10-11	170	180	190	180	168,8	13–14	20	106
55/45-10-11	170	180	190	180	168,7	17–19	20	106
80/20-23-11	170	180	185	180	168,8	16–18	20	105
55/45-23-11	170	180	185	180	168,8	19–22	20	105
95/5-18-9	170	185	185	180	173,3	11–12	20	105
50/50-18-9	170	180	185	180	168,7	26–28	20	105
66/34-5-9	170	180	190	180	168,7	23–25	30	140
66/34-27-9	170	185	185	180	173,0	18–22	20	105
66/34-18-6	170	180	185	180	168,8	12	20	102
66/34-17-12	170	180	185	180	168,8	17	20	105
66/34-18-9_1	170	180	185	180	168,8	17	20	105
66/34-18-9_2	170	180	185	180	168,8	19–22	20	105
66/34-18-9_3	170	180	185	180	168,8	20–22	20	105
66/34-18-9_4	170	180	185	180	168,8	22–25	20	106
66/34-18-9_5	170	180	185	180	168,8	20–22	20	105
66/34-18-9_6	170	180	185	180	169,0	19–22	20	106

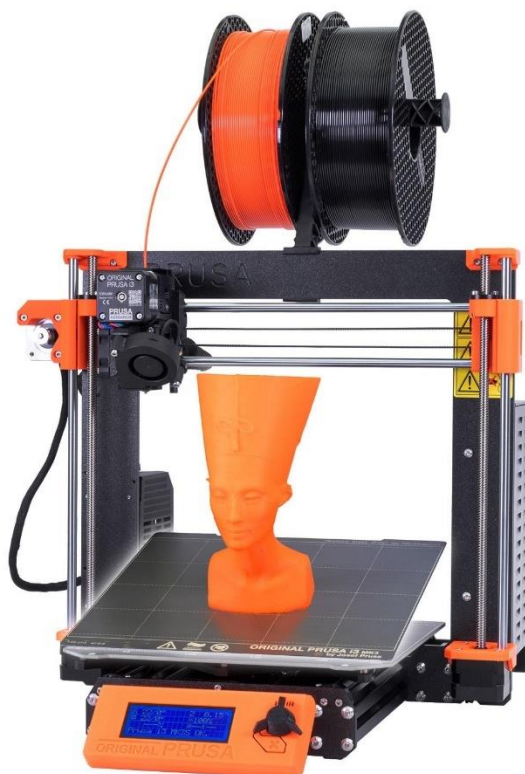
Problematické materiály při výrobě filamentů byly 80/20-10-11, 55/45-10-11, 95/5-18-9 a 66/34-5-9. Je zajímavé, že zde není patrná korelace mezi procentuálním zastoupením složek a zpracovatelností.

4.6. 3D tisk

Pro všechny experimenty byla využita FDM tiskárna Original Prusa i3 MK3s, která je zobrazena na Obrázek 6. Maximální tiskový prostor této tiskárny je 250×210×200 mm ($x \times y \times z$), rozlišení osy x a y je 10 μm a rozlišení osy z je 5 μm . Základní tiskové parametry použité tiskárny jsou uvedeny v Tabulka 7.

Tabulka 7 Základní tiskové parametry

Průměr filamentu	1,75 mm
Průměr trysky	0,4 mm
Výška vrstvy	0,2 mm
Šířka tisknuté vrstvy	0,45 mm
Rychlost tisku perimetrů	45 mm/s
Rychlost tisku výplně	200 mm/s
Teplota vyhřívání podložky	20 °C
Výkon chladicího větráku	100 %



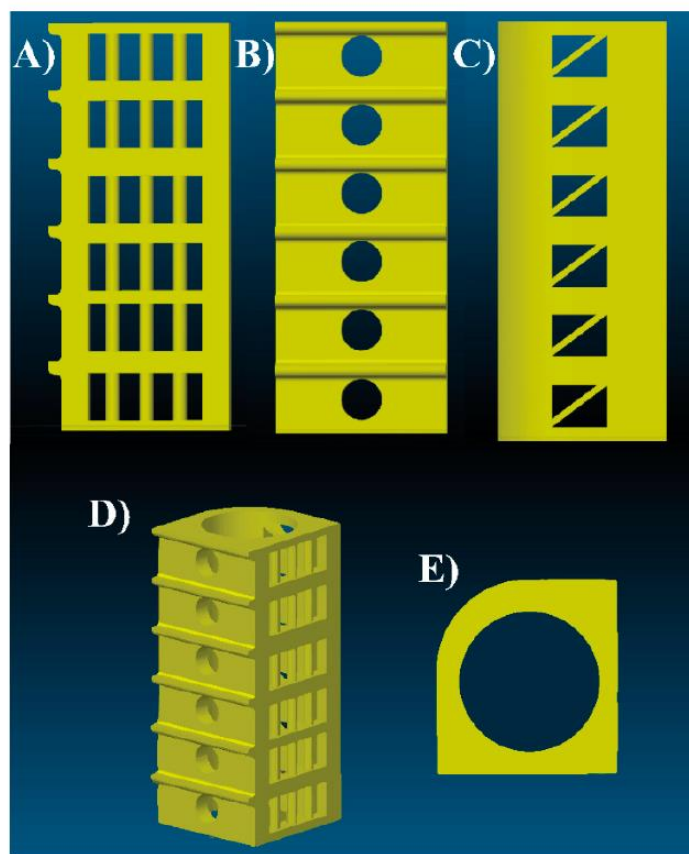
Obrázek 6 FDM tiskárna Prusa i3 MK3s (70)

4.7. Optimalizace tisknutelnosti materiálů

Tisknutelnost materiálů není obecně definovaný pojem a neexistují obecné specifikace, které by tisknutelnost dokázaly popsat. To je pravděpodobně způsobeno velkým množstvím typů tiskáren, metod a nastavení parametrů tisku a tím, že se jedná o poměrně novou technologii. Proto byly naší výzkumnou skupinou navrženy testy tisknutelnosti využitelné pro všechny materiály a FDM tiskárny a jsou popsány v následujících kapitolách (71).

4.7.1. Teplotní věže

Prvním provedeným testem tisknutelnosti materiálu je teplotní věž. Teplotní věž je těleso, které je složeno z identických pater a každé patro obsahuje řadu geometrických elementů, přičemž každé patro se pak tiskne při jiné teplotě. S ohledem na použitý materiál byly vytvořeny g-kódy na tři věže v celkovém teplotním rozmezí 220–150 °C. První věž byla vytištěna v intervalu teplot 220–195 °C (první patro teplotou 220 °C, každé další patro o 5 °C nižší teplotou a poslední patro 195 °C), druhá v teplotním intervalu 195–170 °C a poslední věž v intervalu 170–150 °C. Teplotní věže jsou tištěny s cílem stanovení optimální teploty tisku pro daný materiál. Elementy každého vytištěného patra jsou podrobeny subjektivnímu vyhodnocení, jehož výstupem je zjištění optimální teploty tisku. Mezi pozorovanými elementy byly kolonáda a mosty mezi patry, horizontální otvor ve tvaru kruhu, převis mezi patry, diagonála, zakulacení vnější stěny a vertikální otvor ve tvaru kruhu. Tyto elementy je možné pozorovat na Obrázek 7. Dalším důležitým pozorovaným parametrem je barva vytištěného patra. Tmavší odstín se objevuje především při tisku vyššími teplotami, je způsoben degradací materiálu a je důvodem nepoužitelnosti dané teploty.

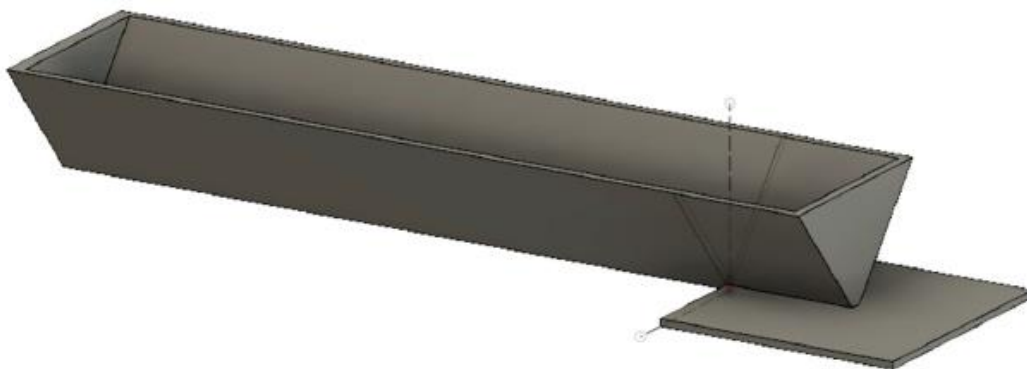


Obrázek 7 Trojrozměrný model teplotní věže

Zhodnocením teplotních věží byly pro každý vzorek vybrány dvě teploty, při kterých byly nejlépe vytištěny všechny elementy. Tyto dvě teploty byly zvoleny jako nejvyšší a nejnižší teplota, při níž se vytisknou všechny elementy teplotní věže. Nejvyšší teplota byla zvolena z toho důvodu, že je nejvhodnější pro tisk větších těles. Tiskem vyšší teplotou dochází k optimálnímu slinování vrstev a tělesa mají nejlepší mechanické vlastnosti. Nejnižší teplota byla naopak zvolena k tisku malých těles, například scaffoldů. Tiskem nižší teplotou získáme lepší detail.

4.7.2. Warping

Warping neboli kroucení je nežádoucí jev, který nastává při 3D tisku. Obvykle je způsoben tím, že zahříváme filament nad teplotu tání, čímž se roztaví a zvětší svůj objem. Po nanesení se materiál ochladí, ztuhne a dojde ke smrštění, které je kombinací smrštění vlivem teploty a v případě semikrystalických polymerů, jako je P3HB, také krystalizačního smrštění. Tento jev se obvykle projevuje odlepováním rohů tělesa od podložky a způsobí deformaci tištěného tělesa. Pro warping neexistuje standardizované těleso popisující warping, proto si náš tým vytvořil vlastní těleso pro měření warpingu. Těleso je tvořené čtvercovou základnou (20×20 mm) a trnem, který k podložce přiléhá pouze jedním perimetrem, jak je možné vidět na Obrázek 8. Vlivem warpingu se v průběhu tisku začne od podložky odpojovat bod trnu nejvzdálenější od čtvercové základny. V tu chvíli je zaznamenána hodnota z , tedy výška výtisku, kdy došlo k odlepení od podložky.



Obrázek 8 Trojrozměrný model testovacího tělesa pro warping

Pro zjištění warping koeficientu je celková výška modelu (10 mm) vydělena naměřenou hodnotou z (rovnice 2). Čím později se začne projevovat negativní fenomén warping, tím nižší je hodnota warping koeficientu a tím tisknutelnější je testovaný materiál. Na základě teplotních věží byly pro každý materiál zvoleny dvě teploty, při kterých byla vytištěna testovací tělesa pro warping. Od každé teploty byla vytištěna tři tělesa pro statistické zpracování. Teplota první vrstvy byla vždy nastavena na 195 °C kvůli lepší adhezi k podložce.

$$\text{warping koeficient} = \frac{\text{výška navrženého modelu testovacího tělesa}}{\text{naměřená výška tištěného testovacího tělesa}} \quad (2)$$

Testy tisknutelnosti bylo získáno optimální nastavení tiskárny pro každý vzorek a tímto nastavením byla dále vytištěna testovací tělesa pro ohybovou a tlakovou zkoušku. Dále byla vytištěna tělesa pro biologické experimenty.

4.8. Mechanické testy

S ohledem na uplatnění testovaných materiálů v lidském těle při náhradách kostní tkáně byly zvoleny takové mechanické experimenty, které umožní otestování vlastnosti materiálů na zátěž vyvíjenou právě na tuto tkáň. Prvním experimentem je ohybová zkouška, která simuluje ohyb kostní tkáně. Druhým experimentem je tlaková zkouška.

4.8.1. Příprava testovacích těles pro ohybovou zkoušku

Vzorky byly na 3D tiskárně vytištěny do tvaru normovaných zkušebních těles tvaru trámců o rozměrech 80×10×4 mm teplotou získanou z teplotních věží. Od každého vzorku bylo vytištěno 6 testovacích těles. Podmínky tisku testovacích těles jsou uvedeny v Tabulka 8

Tabulka 8 Podmínky tisku zkušebních těles pro mechanické experimenty

Označení vzorku	Teplota první vrstvy [°C]	Teplota dalších vrstev [°C]	Označení vzorku	Teplota první vrstvy [°C]	Teplota dalších vrstev [°C]
80/20-11-7	195	195	66/34-5-9	195	195
55/45-11-7	195	195	66/34-27-9	195	195
80/20-24-7	195	195	66/34-18-6	195	195
55/45-24-7	195	195	66/34-17-12	195	175
80/20-10-11	195	195	66/34-18-9_1	195	200

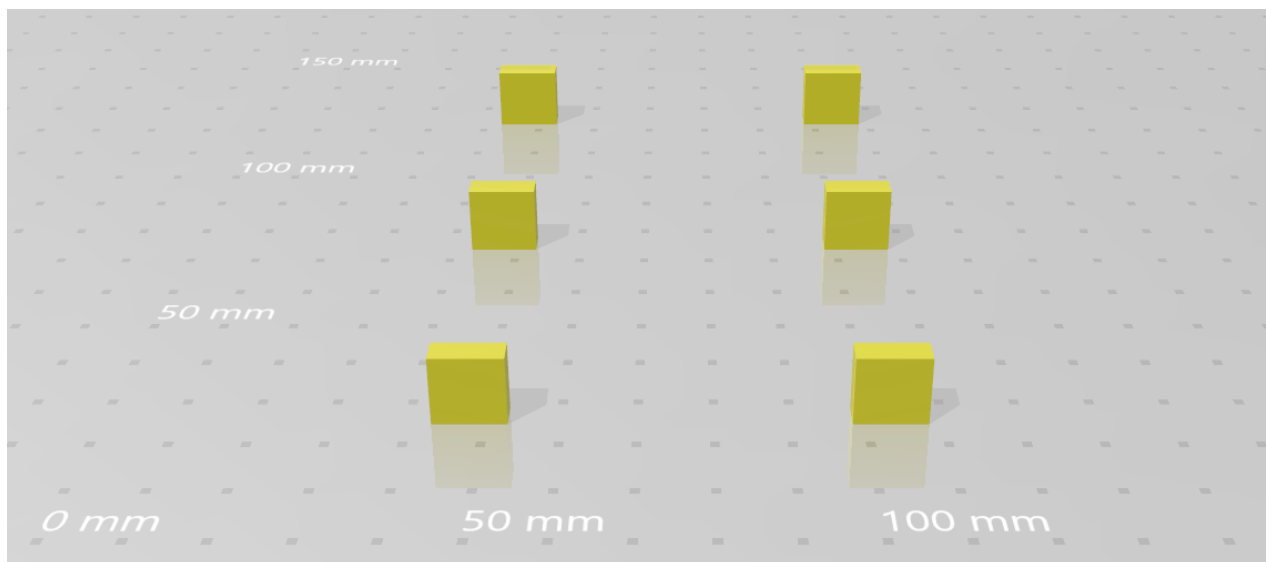
55/45-10-11	195	200	66/34-18-9_2	195	200
80/20-23-11	195	195	66/34-18-9_3	195	200
55/45-23-11	195	180	66/34-18-9_4	195	200
95/5-18-9	195	195	66/34-18-9_5	195	200
50/50-18-9	195	175	66/34-18-9_6	195	200

4.8.2. Ohybová zkouška

Všechny připravené vzorky byly podrobeny třibodovému ohybu podle normy ISO 178 metoda A s využitím Univerzálního zkušebního zařízení ZWICK Z 010 firmy Zwick – Roell se siloměrnou hlavou 1 kN. Rádus podpurných a zatěžovacího trnu byl 5 mm, vzdálenost spodních podpěr 64 mm. Modul pružnosti v ohybu byl stanoven z oblasti deformace 0,05–0,25 %. Rychlost posuvu byla nastavena na 2 mm/min. Limitní deformace byla nastavena na 5 %. V průběhu měření byla s ohledem na chování vzorků limitní deformace zvýšena na 6 %. Při dosažení této hodnoty byl experiment ukončen.

4.8.3. Příprava testovacích těles pro tlakovou zkoušku

Vzorky byly na 3D tiskárně vytištěny do tvaru normovaných zkušebních těles tvaru malého kvádrů o rozměrech 10×4×10°mm. Trojrozměrný model testovacích těles je zobrazen na Obrázek 9. Od každého vzorku bylo vytištěno 6 těles. Podmínky tisku testovacích těles jsou v Tabulka 8.



Obrázek 9 Trojrozměrný model testovacích těles pro tlakovou zkoušku

4.8.4. Tlaková zkouška

Pro všechny vzorky byla provedena tlaková zkouška podle normy ISO 604 s využitím Univerzálního zkušebního zařízení ZWICK Z 010 firmy Zwick – Roell se siloměrnou hlavou 10 kN. Čelisti pro tlakovou zkoušku jsou dvě rovné plochy, mezi které se vkládá právě testovaný vzorek. Vzorek byl před experimentem změřen a připraven. Příprava spočívala v seříznutí horních rožků tělesa, které přechínaly nad rovinou zbylého vzorku. Tento jev vznikl při tisku v důsledku warpingu. Tato příprava je nutná k tomu, aby siloměrná hlavice dosedla na celou plochu vzorků, a nikoliv na tyto čtyři přechínající špičky a přístroj začal měřit ve správný

okamžik. Modul byl na rozdíl od normy stanovován z hodnot deformace 1,25–1,5 % z důvodu zakřiveného počátku křivky u všech vzorků. V oblasti za 1 % jsou všechny křivky lineární.

4.9. Biologické testy

S ohledem na zamýšlené uplatnění vytvořených materiálů je vhodné otestování jejich chování v prostředí simulujícím živé systémy. K tomu byly zvoleny dva hlavní experimenty. Prvním je test urychlené degradace v kyselém prostředí a druhým komplexní biologické testování v živném médiu s buňkami na pracovišti Ústavu experimentální medicíny AVČR. Pro biologické testy byly zvoleny vzorky s nejvyšším (95/5-18-9) a nejnižším (50/50-18-9) množstvím P3HB, nejnižším (66/34-5-9) a nejvyšším množstvím HAp (66/34-27-9), nejnižším (66/34-18-6) a nejvyšším (66/34-17-12) množstvím změkčovadla a kontrolní vzorek se střední hodnotou (66/34-18-9_1). Pro první screening urychlené biodegradace byl vybrán pouze vzorek se střední hodnotou (66/34-18-9_1). Pro všechna tištěná tělesa byla teplota tisku první vrstvy nastavena na 195 °C, teplota dalších vrstev 190 °C.

4.9.1. Test urychlené biodegradace

Pro testování degradace byl zvolen zrychlený experiment, který dokáže přiblížit chování materiálu při jeho resorpci v lidském těle. Jedná se o prvotní experiment vytvořeného materiálu v tomto směru, a proto byl nejprve zvolen test s kontrolou pH vycházející ze studie A. Diez-Escudero a kol (72). V této studii se věnují degradaci fosforečnanu vápenatého v kyselém prostředí. Kyselé prostředí bylo zvoleno za účelem simulace prostředí osteoklastů, tedy buněk zodpovědných za resorpci kostí. Je tomu tak proto, že resorpce osteoklasty probíhá počátečním vytvořením těsné prstencové adhezivní zóny, na které osteoklasty vytvářejí kyselé prostředí, které může dosáhnout hodnot pod pH 3, což vede k rozpuštění materiálu pod touto vrstvou (73).

Pro všechny biodegradací experimenty bylo připraveno médium složené z 0,01 M kyseliny chlorovodíkové (HCl) a 0,14 M chloridu sodného (NaCl) (73). pH bylo vždy měřeno na pH metru Mi 160 značky Milwaukee. Inkubováno bylo na 37 °C pro simulaci teploty lidského těla s využitím inkubátoru CO2cell značky MMM. Prvním testem biodegradace bylo zvoleno pravidelné odebírání média pro zjištění pH pro vzorek 66/34-18-9_1 po dobu 8 hodin. Zároveň byla během testu zaznamenána změna hmotnosti měřených vzorků. Pokud dochází ke změně pH, je pravděpodobné, že dochází i k degradaci vzorků. Bylo vytištěno 12 testovacích těles ve tvaru kolečka s průměrem 9 mm a výškou 2 mm. Nejprve byla zvážena hmotnost vzorků v suchém stavu. Následně byly vzorky po dobu 10 minut ponořené v médiu pro jejich nasáknutí a zvážena hmotnost v mokřém stavu. Poté bylo médium vylito a ke vzorkům bylo přidáno 20 ml média. Vzorky byly po dobu 2 hodin inkubovány na 37 °C a následně byly zváženy a změřeno pH média. Médium bylo následně vyměněno za nové. Tento proces byl ještě třikrát zopakován a po 8 hodinách byl experiment ukončen. Posledním zbývajícím krokem bylo zvážení vzorků v suchém stavu. Vzorky byly ponechány v sušárně nastavené na teplotu 60 °C po dobu 12 hodin a následně byly vzorky zváženy. Protože délka testu nebyla dostatečná, bylo nutné provést delší, 48hodinový experiment.

Další test biodegradace byl 48hodinový experiment s výměnou média a průběžným měřením pH média a záznamem úbytku hmotnosti měřených těles. Pro tento test byl opět zvolen materiál s označením 66/34-18-9_1. Bylo vytištěno 9 testovacích těles ve tvaru kolečka s průměrem

9 mm a výškou 2 mm. Byla změřena hmotnost testovacích těles v suchém stavu a následně byla tělesa vložena do vialek s 20 ml média. pH média bylo měřeno po 6 hodinách, potom po 24 hodinách a 48 hodinách od počátku experimentu. Vždy při měření pH média bylo médium vyměněno. Po 6, 24 a 48 hodinách byla 3 tělesa vložena do sušárny nastavené na 60 °C, ponechána 12 hodin a následně zvážena hmotnost v suchém stavu. Po 48 hodinách nebyl zaznamenán úbytek hmotnosti, byl proto proveden 6denní experiment.

Posledním biodegradačním testem byl 6denní experiment s kontrolním měřením pH. Pro testování urychlené degradace byly zvoleny vzorky s extrémí ve složení. Z vybraných vzorků byla vytištěna testovací tělesa ve tvaru kolečka s průměrem 9 mm a výškou 1 mm. Od každého vzorku bylo vytištěno 6 testovacích těles. Byla zvážena jejich hmotnost v suchém stavu a ke každému tělesu bylo přidáno 20 ml média. Bylo změřeno pH média. Vzorky byly ponechány v inkubátoru nastaveném na teplotu 37 °C. První odběr byl proveden po 72 hodinách. Bylo změřeno pH média všech vzorků. 3 testovací tělesa každého vzorku byla vložena do sušárny nastavené na 60 °C a tato tělesa byla následně po 12 hodinách zvážena v suchém stavu. Druhé a poslední měření bylo provedeno za dalších 72 hodin. Bylo změřeno pH média vzorků a tělesa byla vysušena v sušárně a po 12 hodinách zvážena jejich suchá hmotnost.

4.9.2. Komplexní biologické testování

Z vybraných vzorků byla na 3D tiskárně vytvořena testovací tělesa ve tvaru kolečka s průměrem 6 mm a výškou 1,5 mm. Zároveň byly z materiálů 95/5-18-9, 50/50-18-9 a 66/34-18-9_1 vytvořeny planární vzorky pomocí lisu. Z nich byla následně raznicí vyražena kolečka s průměrem 6 mm. Tato kolečka byla souběžně testována totožnými experimenty z důvodu podezření negativního vlivu 3D tisku na cytotoxicitu nosičů, která může být způsobena termickou degradací P3HB. Z tohoto důvodu byly pro výrobu kontrolních vzorků vybrány vzorky obsahující nejvyšší, nejnižší a střední hodnotu obsaženého P3HB.

5. Výsledky

5.1. Plánovaný experiment

5.1.1. Teplota tisku

První experiment tisknutelnosti odhalil některé komplikace při tisku filamentů z testovaných materiálů. Prvním problémem je přítomnost nečistoty ve vzorcích a tyto nečistoty ucpávají trysku 3D tiskárny. Tato nečistota je více patrná ve vzorcích, které mají větší procentuální zastoupení P3HB, což potvrzuje domněnku toho, že se jedná o zbytky biomasy. Tento problém jsem se pokusila vyřešit použitím trysky o větším průměru (0,6 mm), nebyl však patrný žádný efekt a musela jsem pokračovat v tisku s funkcí Výměna filamentu a vždy, když byl objeven viditelný kus biomasy, přerušit tisk a tento kus vystříhnout. Fotka s biomasou vyizolovanou ze vzorku je možné pozorovat na Obrázek 10. Další komplikací je křehkost vzorků vysoce plněných HAp a jejich nevhodný návin. Protože byly tyto filamenty navinuty na cívce tvaru pětiúhelníku a přejaly tento tvar, docházelo vždy k tomu, že když byly tiskárnou vedeny do vyhřívané trysky, došlo v místě ohybu k jejich prasknutí a tisk se přerušil. Tento problém byl vyřešen narovnáním navinutého filamentu za zvýšené teploty použitím horkovzdušné pistole. Výsledné teploty jsou znázorněny v Tabulka 9. Optimální teplota tisku 1 značí nižší teplotu, při které se nejlépe vytiskly všechny elementy a je tedy použitelná pro menší tělesa, např. scaffoldy. Optimální teplota tisku 2 je vyšší teplota použitelná pro větší tělesa.

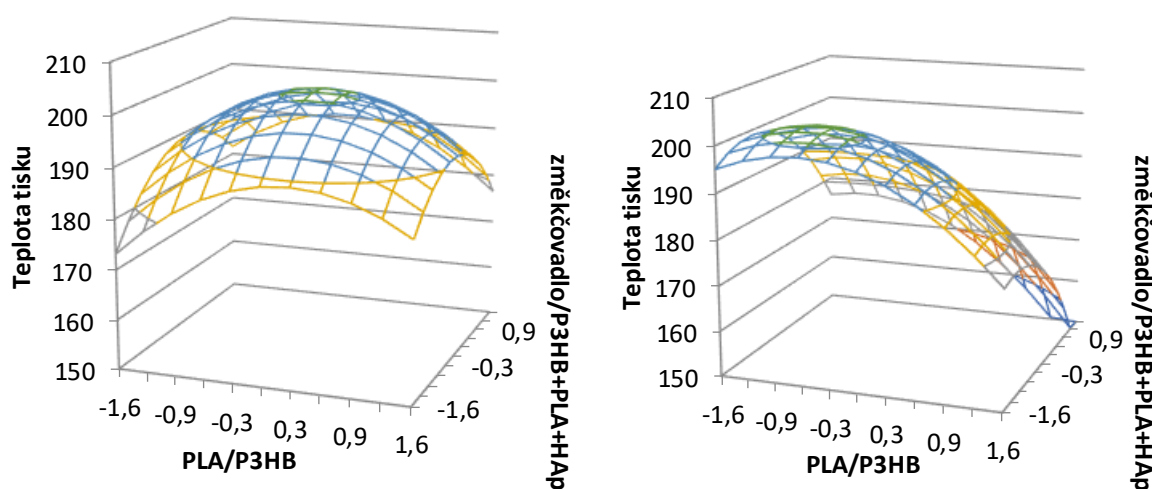
Tabulka 9 Výsledky teplotní studie

Označení vzorku	Optimální teplota tisku 1 [°C]	Optimální teplota tisku 2 [°C]	Označení vzorku	Optimální teplota tisku 1 [°C]	Optimální teplota tisku 2 [°C]
80/20-11-7	170	195	66/34-5-9	170	195
55/45-11-7	170	195	66/34-27-9	170	195
80/20-24-7	170	195	66/34-18-6	170	195
55/45-24-7	170	195	66/34-17-12	170	175
80/20-10-11	170	195	66/34-18-9_1	170	200
55/45-10-11	170	200	66/34-18-9_2	170	200
80/20-23-11	165	195	66/34-18-9_3	170	200
55/45-23-11	170	180	66/34-18-9_4	170	200
95/5-18-9	170	195	66/34-18-9_5	170	200
50/50-18-9	170	175	66/34-18-9_6	170	200



Obrázek 10 Biomasa vyizolovaná ze vzorku

Výsledné teploty byly statisticky zpracovány viz kapitola 4.2 a bylo zjištěno, že všechny koeficienty b_{xy} jsou statisticky významné. Největší vliv mají shodně faktor 1 a faktor 3, oba vlivy jsou kvadratické a záporné, proto je na Obrázek 11 možné pozorovat plochu s maximem. Obě plochy na Obrázek 11 znázorňují závislost ideální teploty tisku na faktoru 1 (poměr PLA/PHA) a faktoru 3 (množství S3114 ve směsi) se zafixovanou hodnotou faktoru 2 (množství HAp). Vlevo na Obrázek 11 je plocha pro nejnižší testované množství HAp, a naopak vpravo je plocha pro nejvyšší testované množství HAp. Dalším významným příspěvkem jsou efekty lineárních koeficientů souvisejících s poměrem PLA/P3HB a změkčovadla. Lineární efekty je možné pozorovat na Obrázek 11 vpravo. Plocha lineárně klesá směrem k nejvyšším hodnotám změkčovadla. Dvakrát menší význam, než kvadratické koeficienty mají kombinované faktory.



Obrázek 11 Plocha teploty tisku při nejnižším testovaném množství HAp (vlevo) a nejvyšším testovaném množství HAp (vpravo)

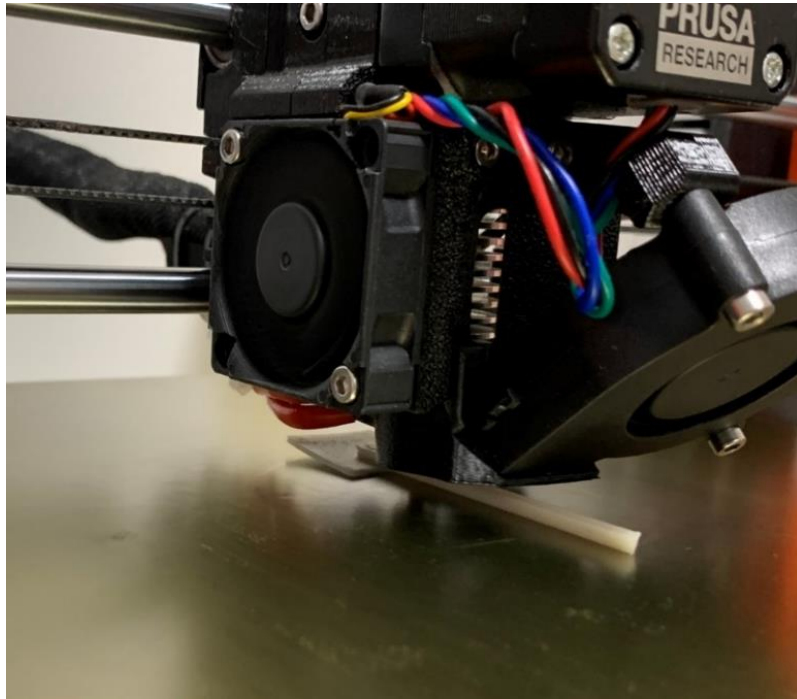
5.1.2. Warping koeficient

Pro všechny vzorky byl proveden test na warping. Od každého vzorku byla vytištěna 3 testovací tělesa a zapsána výška vytištěného tělesa. Tyto tři výšky byly zprůměrovány a použity pro výpočet warping koeficientu. Výška modelu byla vydělena průměrem výšek vytištěných testovacích těles podle rovnice 1, čímž byl získán warping koeficient. Warping koeficient byl vypočítán z výšky těles vytištěných vyšší optimální teplotou zjištěnou z teplotních věží z toho důvodu, že při nižší teplotě některé vzorky warpovaly natolik, že nebylo možné zkušební těleso vytisknout (je možné pozorovat na Obrázek 12). Nadále už se nižší teplota tisku v tomto experimentu nepoužívala. Jedním z obtížně tisknutelných vzorků byl 80/20-23-11. U tohoto vzorku jsem se pokusila nejprve zahřát podložku na 50 °C, nicméně tento pokus zůstal bez efektu. V Tabulka 10 se nacházejí výsledky warpingové studie. Protože neexistují standardizované zkoušky warpingu, vyvinula naše výzkumná skupina test vlastní. Není tedy možné najít hodnoty warping koeficientu pro jiné komerčně dostupné materiály. Pro srovnání je však možno uvést hodnoty pro komerčně dostupný filament PLA (Prusa Research, Prague, Czech Republic), který má hodnotu warping koeficientu $2,9 \pm 0,1$.

Tabulka 10 Výsledky warpingové studie

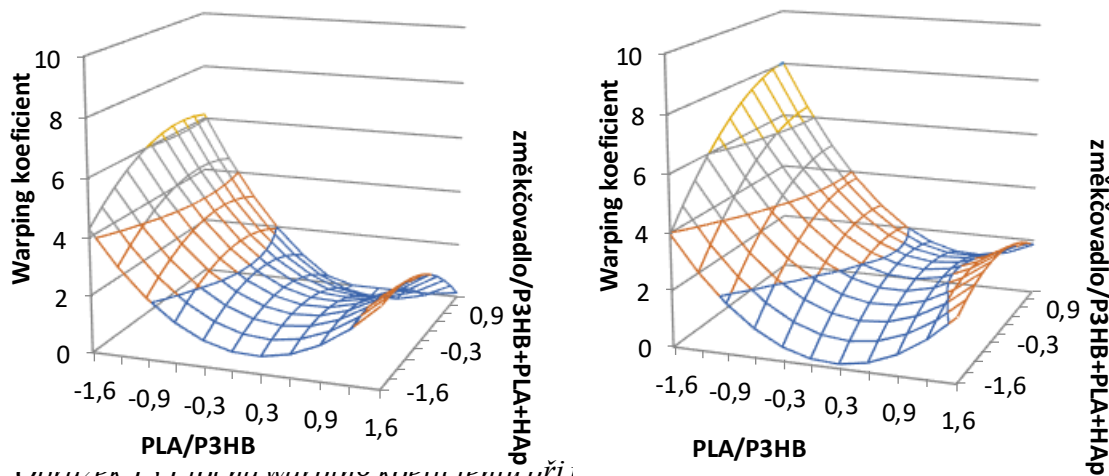
Označení vzorku	Warping koeficient	Označení vzorku	Warping koeficient
80/20-11-7	$2,31 \pm 0,12$	66/34-5-9	$2,00 \pm 0,20$
55/45-11-7	$1,70 \pm 0,31$	66/34-27-9	$2,78 \pm 0,20$
80/20-24-7	$3,41 \pm 0,12$	66/34-18-6	$1,90 \pm 0,12$
55/45-24-7	$2,17 \pm 0,20$	66/34-17-12	$2,27 \pm 0,00$
80/20-10-11	$2,94 \pm 0,20$	66/34-18-9_1	$2,24 \pm 0,12$
55/45-10-11	$1,83 \pm 0,42$	66/34-18-9_2	$2,21 \pm 0,12$
80/20-23-11	$4,29 \pm 0,06$	66/34-18-9_3	$2,27 \pm 0,00$
55/45-23-11	$1,95 \pm 0,31$	66/34-18-9_4	$2,24 \pm 0,12$
95/5-18-9	$10,0 \pm 0,00$	66/34-18-9_5	$2,38 \pm 0,00$
50/50-18-9	$1,95 \pm 0,12$	66/34-18-9_6	$2,28 \pm 0,20$

Z rovnice 2 vyplývá, že existuje nepřímá úměra mezi reálně vytištěnou výškou tělesa a warping koeficientem. To znamená, že čím více vrstev vytiskneme, tím nižší bude warping koeficient a materiál tedy tisknutelnější. Z testovaných vzorků byl nejlépe tisknutelný vzorek 55/45-11-7, což bylo očekávané z důvodu složení vzorku. Tento materiál obsahuje poměr P3HB/PLA 55/45. PLA se zde nachází v dostatečném množství a potlačí efekt krystalizace P3HB, který způsobuje warping. Dále vzorek obsahuje 11 % HAp, což je množství, které ještě nezpůsobí přílišnou křehkost materiálu. Poslední složkou je změkčovadlo, které je zastoupeno v 7 % a zdá se, že toto množství bylo dostatečné pro změkčení směsi. Nejhůře tisknutelný byl naopak materiál s označením 95/5-18-9. Poměr P3HB ku PLA je zde opravdu vysoký a způsobuje vysokou křehkost materiálu. Zároveň s velkým obsahem P3HB roste i množství přítomné nečistoty ve formě biomasy ve vzorku. Tyto dvě skutečnosti způsobily to, že byl materiál obtížně zpracovatelný a značně komplikovaly tisk testovacích těles.



Obrázek 12 Warping testovacího tělesa vzorku G_80/20-23

Statistickým zpracováním bylo zjištěno, že statisticky významné jsou všechny koeficienty kromě b_{12} . Největší vliv (přibližně 2–3× větší) má faktor 1, tedy poměr polymerů PLA/P3HB. Uplatňuje se zde kombinace lineárního a kvadratického příspěvku, což je patrné na Obrázek 13. Na Obrázek 13 jsou znázorněny dvě plochy závislosti ideální teploty tisku na faktoru 1 (poměr PLA/PHA) a faktoru 3 (množství S3114 ve směsi) se zafixovanou hodnotou faktoru 2 (množství HAp). Vlevo je plocha pro nejnižší testované množství HAp, a naopak vpravo je plocha pro nejvyšší testované množství HAp. Efekt b_1 je záporný, faktor 1 tedy snižuje warping koeficient, který významně klesá směrem k nejvyšším hodnotám poměru PLA/P3HB. Vlivem kvadratického koeficientu b_{11} , který je kladný, existuje v závislosti minimum, jak vidět na Obrázek 13. Tento experiment má praktický efekt, protože víme, že existuje minimální warping, kterého jsme schopni dosáhnout.



Obrázek 13 Plochy warping koeficientu při nejnižším (vlevo) a nejvyšším testovaném množství HAp (vpravo)

5.1.3. Ohybová zkouška

Kost je nejpevnější tkáň lidského těla, pokud je však aplikováno lokální napětí přesahující pevnost tkáně, dochází k jejímu narušení a vzniku zlomenin. Proto jsme z mechanických experimentů zvolili právě ohybovou a tlakovou zkoušku, které simulují napětí přirozeně působící na kosti a zároveň pomohou charakterizovat vytvořené materiály.

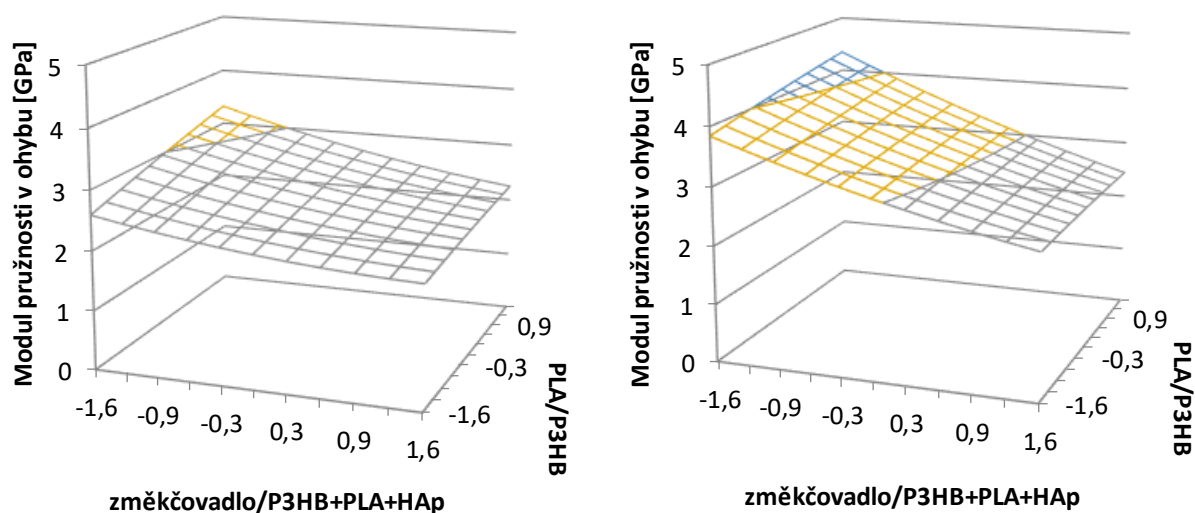
Vyhodnocením výsledků ohybové zkoušky bylo zjištěno, že se modul pružnosti měřených vzorků pohybuje v rozmezí 2,3–3,7 GPa. Nejvyšší hodnoty modulu pružnosti v ohybu mají vzorky 55/45-24-7, 66/34-18-6 a 80/20-24-7. Hodnota modulu pružnosti u těchto vzorků se pohybovala v rozmezí 3,4–3,7 GPa. Jsou to vzorky, které obsahují vysoké množství keramické složky HAp a zároveň nízké množství změkčovadla (6–7 hm. %). Vzorek s nejvyšším zastoupením HAp (66/34-27-9) má také vysoký modul pružnosti, ale nedosahuje nejvyšších hodnot (3,2 GPa). Vyšší množství plniva než 25 hm. % by tedy již pravděpodobně modul nezvyšovalo a způsobovalo spíše komplikace při tisku z důvodu vysoké křehkosti. Další složkou, která ovlivňuje modul, je obsah změkčovadla, což je patrné ze vzorků 80/20-23-11 a 55/45-23-11. Tyto vzorky obsahují vyšší množství změkčovadla, konkrétně 11 hm. %. Z výsledků vyplývá, že pro získání nejvyššího modulu by vzorek neměl obsahovat větší množství změkčovadla než 9 hm. %. Nejnižší hodnota modulu (2,3 GPa) byla naměřena u vzorku 80/20-10-11, který obsahuje 11 hm. % změkčovadla a relativně nízké množství HAp. Výsledky ohybové zkoušky se nacházejí v Tabulka 11.

Tabulka 11 Výsledky ohybové zkoušky

	Označení vzorku	Modul pružnosti v ohybu [GPa]	Pevnost v ohybu [MPa]
1	80/20-11-7	2,7 ± 0,1	51,9 ± 1,7
2	55/45-11-7	3,1 ± 0,3	58,9 ± 1,2
3	80/20-24-7	3,4 ± 0,2	44,2 ± 1,4
4	55/45-24-7	3,7 ± 0,7	55,5 ± 1,3
5	80/20-10-11	2,3 ± 0,2	45,0 ± 2,3
6	55/45-10-11	2,4 ± 0,1	47,6 ± 1,8
7	80/20-23-11	2,6 ± 0,1	39,3 ± 0,7
8	55/45-23-11	2,7 ± 0,1	43,6 ± 1,0
9	95/5-18-9	2,7 ± 0,1	35,9 ± 1,3
10	50/50-18-9	3,1 ± 0,1	51,1 ± 1,4
11	66/34-5-9	2,5 ± 0,1	54,1 ± 1,5
12	66/34-27-9	3,2 ± 0,2	43,6 ± 1,9
13	66/34-18-6	3,7 ± 0,1	58,7 ± 0,9
14	66/34-17-12	2,3 ± 0,1	42,2 ± 1,2
15	66/34-18-9_1	2,8 ± 0,1	48,6 ± 0,9
16	66/34-18-9_2	2,9 ± 0,1	49,9 ± 1,3
17	66/34-18-9_3	2,9 ± 0,1	50,3 ± 1,1
18	66/34-18-9_4	2,9 ± 0,1	48,7 ± 1,0
19	66/34-18-9_5	2,9 ± 0,2	49,7 ± 0,8
20	66/34-18-9_6	2,8 ± 0,1	48,4 ± 1,4

Výsledné hodnoty byly následně statisticky zpracovány a bylo zjištěno, že na modul pružnosti v ohybu má největší vliv faktor změkčovadla. Koeficient b_3 má zápornou hodnotu, což znamená, že přídavek změkčovadla snižuje modul pružnosti. Statisticky významné jsou koeficienty spojené s faktory PLA/P3HB a množství HAp. Tyto však mají menší vliv ($1-2\times$) a jsou kladné, tedy modul zvyšují. Na Obrázek 14 můžeme porovnat získané plochy vytvořené matematickým modelem. Obě plochy znázorňují závislost modulu pružnosti v ohybu na faktoru 1 (poměr PLA/P3HB) a faktoru 3 (množství S3114 ve směsi) se zafixovanou hodnotou faktoru 2 (množství HAp). Vlevo na Obrázek 14 je plocha pro nejnižší testované množství, a naopak vpravo je plocha pro nejvyšší testované množství. Obě plochy lineárně klesají směrem k nejvyššímu množství změkčovadla a zároveň nejvyššímu množství PLA/P3HB. Rozdíl v plochách leží v tom, že čím větší množství HAp použijeme, tím vyššího modulu můžeme dosáhnout. Při stejných množstvích změkčovadla a PLA/P3HB, pouze se zvýšeným množstvím HAp, dosáhneme o 1 GPa vyššího modulu. Dalšími statisticky významnými faktory jsou faktory b_{13} a b_{23} kombinující vliv změkčovadla se zbylými dvěma faktory, což značí to, že změkčovadlo interaguje nejen s polymery, ale i s keramickým HAp. Oba kombinované faktory jsou negativní a snižují modul pružnosti v ohybu.

Výsledek statistického zpracování koreluje s výsledky odvozenými z naměřených hodnot, které jsou popsány výše. Z obou zpracování vyšlo, že největší vliv na modul má faktor změkčovadla. Je jasné, že tento vliv je negativní a modul pružnosti snižuje. Naopak faktor HAp má pozitivní účinky na modul pružnosti. V čem se zpracování liší je, že matematický model dokázal odhalit vliv poměru polymerů PLA/P3HB. Jednoduché zpracování naměřených hodnot zde není dostatečné, protože nedokážeme posoudit takto komplikované složení vzorků.

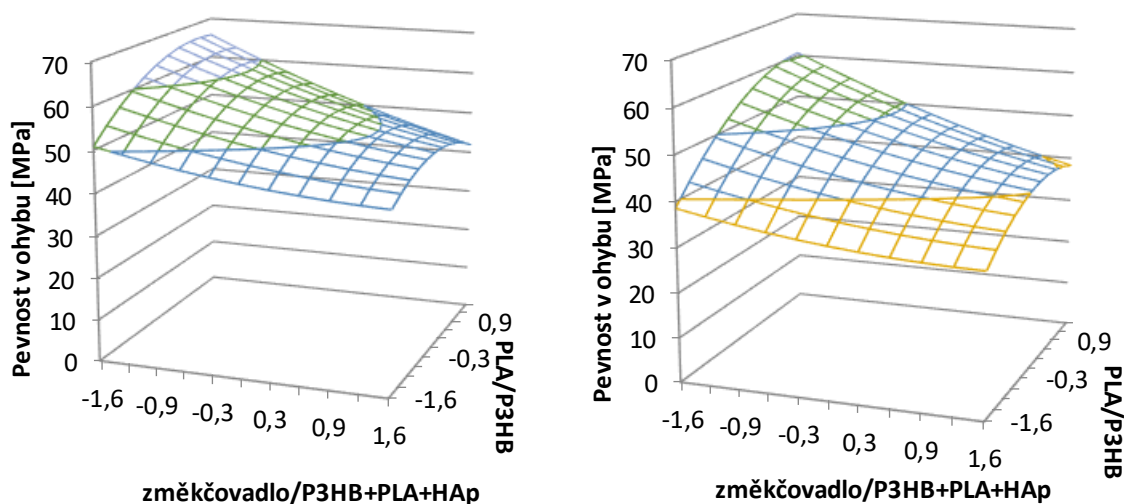


Obrázek 14 Plocha modulu pružnosti při nejnižším testovaném množství HAp (vlevo) a nejvyšším testovaném množství HAp (vpravo)

Dalším výsledkem ohybové zkoušky je pevnost v ohybu. Pevnost v ohybu měřených vzorků se pohybuje v rozmezí 35,9–58,9 MPa. Nejvyšší hodnoty pevnosti v ohybu byly naměřeny u vzorků 55/45-11-7 a 66/34-18-6. Tyto vzorky jsou složeny z podobného poměru P3HB/PLA a velmi nízkého množství změkčovadla (6–7 hm. %). Další vzorky, u nichž byla naměřena vysoká hodnota pevnosti v ohybu, jsou 80/20-11-7, 55/45-24-7, 50/50-18-9 a 66/34-5-9. Jak je

již z názvů patrné, tyto vzorky jsou složeny z rozdílného poměru P3HB/PLA a liší se i v množství obsaženého HAp. Společným znakem pro tyto materiály je, že všechny obsahují nízké množství změkčovadla (7–9 hm. %). Naopak vzorky, které obsahují vysoké množství změkčovadla (11–12 hm. %) patřily k těm s nejnižší pevností v ohybu. Vliv změkčovadla je patrný z porovnání vzorků 15–20 a 13. Tyto vzorky mají stejné složení pouze vzorek 13 obsahuje nejnižší měřené množství změkčovadla (6 hm. %). Pevnost tohoto vzorku je téměř o 10 % vyšší, než u vzorků 15–20. Subjektivní zhodnocení pevnosti v ohybu nepřineslo příliš zjevný výsledek. Výsledky jsou nejednoznačné a jednotlivé složky spolu interagují natolik, že není možné nalézt tímto způsobem trendy vlivu samostatných složek.

Naměřené hodnoty pevnosti v ohybu byly statisticky zpracovány a byly vytvořeny plochy vlivu jednotlivých faktorů. V pevnosti má znovu největší vliv faktor změkčovadla a tento vliv je opět záporný. Dalším negativním faktorem je množství HAp, tento vliv je však poloviční ve srovnání s vlivem změkčovadla. Jediným pozitivním faktorem je poměr PLA/P3HB, který významně zvyšuje pevnost v ohybu. Dalším významným příspěvkem je kvadratický koeficient b_{11} . Na Obrázek 15 je možné pozorovat porovnání vlivu faktoru 3 (množství S3 I 14 ve směsi) a faktoru 1 (poměr PLA/PHA) na pevnost při zafixované hodnotě množství HAp. Obě plochy lineárně klesají k nejvyššímu množství změkčovadla. Zároveň je zde patrný kvadratický příspěvek faktoru 1.



Obrázek 15 Plocha pevnosti v ohybu při nejnižším (vpravo) a při nejvyšším testovaném množství HAp (vlevo)

5.1.4. Tlaková zkouška

Dalším testem používaným k charakterizaci nově vyvíjeného materiálu je tlaková zkouška. Působením tlaku na testovací těleso můžeme získat cenné informace. Výsledky tlakové zkoušky jsou zobrazeny v Tabulka 12.

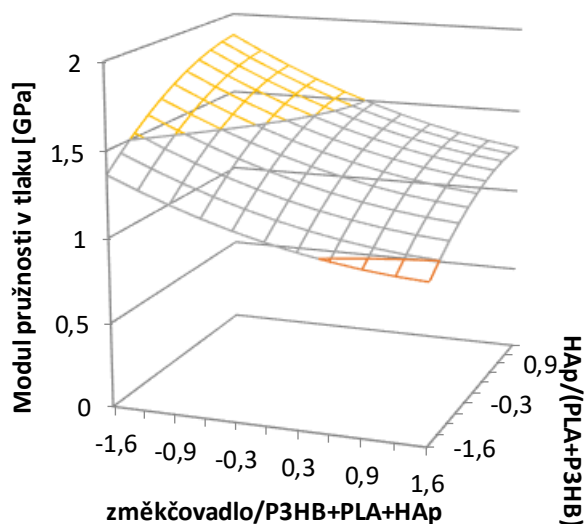
Tabulka 12 Výsledky tlakové zkoušky

	Označení vzorku	Modul pružnosti v tlaku [GPa]	Napětí při 1 % deformace [MPa]	Mez kluzu
1	80/20-11-7	1,2 ± 0,1	4,3 ± 0,7	Ne
2	55/45-11-7	1,3 ± 0,2	4,6 ± 0,8	Ano
3	80/20-24-7	1,5 ± 0,1	7,4 ± 1,9	Ne
4	55/45-24-7	1,8 ± 0,0	10,0 ± 1,3	Ano
5	80/20-10-11	1,2 ± 0,1	4,4 ± 0,4	Ne
6	55/45-10-11	0,9 ± 0,0	2,0 ± 0,4	Ne
7	80/20-23-11	1,2 ± 0,1	7,8 ± 1,3	Ne
8	55/45-23-11	1,5 ± 0,0	8,8 ± 2,3	Ne
9	95/5-18-9	1,2 ± 0,1	5,5 ± 1,4	Ne
10	50/50-18-9	1,6 ± 0,1	6,9 ± 2,4	Ano
11	66/34-5-9	1,2 ± 0,1	4,6 ± 0,9	Ne
12	66/34-27-9	1,4 ± 0,2	8,3 ± 1,9	Ne
13	66/34-18-6	1,8 ± 0,1	9,9 ± 3,0	Ano
14	66/34-17-12	1,2 ± 0,1	5,3 ± 2,1	Ne
15	66/34-18-9_1	1,5 ± 0,1	7,0 ± 2,8	Ne
16	66/34-18-9_2	1,1 ± 0,4	4,2 ± 2,6	Ne
17	66/34-18-9_3	1,4 ± 0,1	6,8 ± 1,8	Ne
18	66/34-18-9_4	1,3 ± 0,1	5,1 ± 0,7	Ne
19	66/34-18-9_5	1,4 ± 0,1	6,8 ± 1,8	Ne
20	66/34-18-9_6	1,4 ± 0,1	5,5 ± 2,3	Ne

Na první pohled patrným rozdílem modulu pružnosti v tlaku v porovnání s modulem pružnosti v ohybu je výrazně nižší odolnost připravených materiálů v tlaku než v ohybu. Zatímco v ohybové zkoušce se naměřený modul pohyboval v rozmezí 2,3–3,7 GPa, v tlakové zkoušce je modul téměř o polovinu nižší. Naměřený modul se pohybuje v rozmezí 0,9–1,8 GPa. Nejvyšší hodnota modulu pružnosti byla shodně naměřena pro vzorky 55/45-24-7 a 66/34-18-6. Opět se jedná o vzorky obsahující nízké množství změkčovadla a střední hodnoty HAp. Nejnižší hodnota modulu byla naměřena pro vzorek 55/45-10-11. Tento vzorek obsahuje velké množství změkčovadla a málo HAp. Vzorky s vysokým množstvím změkčovadla mají jedny z nejnižších naměřených hodnot modulu pružnosti. Tento fakt je opět potvrzen porovnáním vzorků s číslem 15–20 a 13, které se ve složení liší pouze množstvím změkčovadla. Vzorek 13 (66/34-18-6) má naměřenou nejvyšší hodnotu modulu a obsahuje nejnižší měřené množství změkčovadla (6 hm.%), zatímco vzorky 15–20 mají o čtvrtinu nižší hodnoty modulu a obsahují 9 hm.% změkčovadla.

Statistickým zpracováním bylo zjištěno, že vliv na modul pružnosti mají pouze faktor 3 (množství změkčovadla ve složení) a faktor 2 (poměr HAp/(PLA+P3HB)). Vliv těchto dvou faktorů je téměř shodný, rozdíl je v tom, že faktor 3 má zápornou hodnotu, snižuje tedy modul pružnosti. Faktor 2 má naopak kladnou hodnotu a modul zvyšuje. Oba tyto faktory jsou lineární. Na Obrázek 16 je znázorněna plocha modulu pružnosti při zafixované střední hodnotě

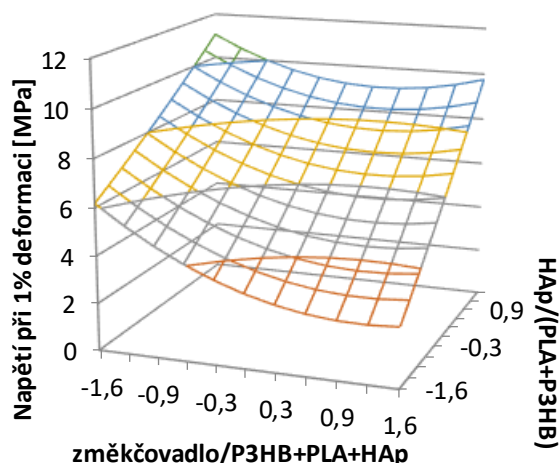
PLA/P3HB. Protože faktor PLA/P3HB není statisticky významný, je zobrazena pouze jedna plocha, protože při zafixování jiné hodnoty by se nezměnila. Plocha modulu pružnosti lineárně klesá směrem k největšímu množství změkčovadla a roste se zvyšujícím se množstvím HAp.



Obrázek 16 Plocha modulu pružnosti v tlaku při střední hodnotě poměru PLA/P3HB

Další hodnotou získanou z tlakové zkoušky je napětí při 1% deformaci. Hodnoty naměřeného napětí se pohybují v rozmezí 2,0–10,0 MPa. Největší hodnoty napětí byly naměřeny pro vzorky 55/45-24-7 a 66/34-18-6. Tyto vzorky mají nejvyšší hodnoty ve všech mechanických experimentech. Výrazně nejnižší hodnota napětí byla naměřena pro vzorek 55/45-10-11, stejně jako u modulu pružnosti v tlaku. Pouze 4 testované vzorky mají i mez kluzu. Jedná se o vzorky 55/45-11-7, 55/45-24-7, 50/50-18-9 a 66/34-18-6. Analogie těchto vzorků leží v podobném obsahu PLA a změkčovadla.

Statistickým zpracováním bylo zjištěno, že na napětí při 1% deformaci mají statisticky významný vliv pouze dva faktory, podobně jako u tlakového modulu. Faktor 2 (poměr HAp/(PLA+P3HB)) je kladný a významně vyšší, než faktor 3 (množství změkčovadla ve složení), který je záporný. Oba tyto faktory jsou lineární. Na Obrázek 17 je možné pozorovat plochu znázorňující vliv faktoru 2 a faktoru 3 na napětí při 1% deformaci při zafixované střední hodnotě poměru PLA/P3HB. Faktor PLA/P3HB je statisticky nevýznamný, je proto zafixován při jedné hodnotě. Plocha napětí roste směrem k nejnižším hodnotám množství změkčovadla ve vzorku a zároveň nejvyšším hodnotám HAp/(PLA+P3HB).



Obrázek 17 Plocha napětí při 1% deformaci při střední hodnotě poměru PLA/P3HB

5.1.5. Optimalizovaná receptura

Na začátku experimentu byly zvoleny podmínky, které má splnit ideální materiál pro výrobu scaffoldů do kostních tkání. Tyto podmínky byly minimální warping, maximální ohybová pevnost a maximální tlakový modul. Vyhodnocením plánovaného experimentu byla nalezena směs, která tyto podmínky splňuje a je to receptura obsahující 35,2 % P3HB, 30,8 % PLA, 28,3 % HAP a 5,6 % S3114. Teoretické vlastnosti této směsi jsou znázorněny v Tabulka 13. Tato směs nejvíce odpovídá testované směsi 55/45-24-7, která nevykazovala problematické chování v žádném z experimentů.

Tabulka 13 Teoretické vlastnosti směsi

Modul pružnosti v tlaku [GPa]	Napětí při 1% deformaci [MPa]	Pevnost v ohybu [MPa]	Modul pružnosti v ohybu [GPa]	Warping koeficient [-]
2,3	14,1	59,7	3,3	1,0

5.2. Biologické experimenty

5.2.1. Test urychlené degradace

Prvním experimentem testujícím schopnost degradace materiálu byla zvolena urychlená degradace v kyselém prostředí. Cílem bylo zjistit, zda se během osmi hodin experimentu změní pH nebo hmotnost vzorku, což by indukovalo degradaci materiálu. Jako testovací materiál byl zvolen vzorek 66/34-18-9_1, který obsahuje 18 % HAp, 9 % změkčovadla a poměr P3HB/PLA je 66/34. Tento vzorek je snadno tisknutelný a bez extrémů ve složení.

Výsledek 8hodinové studie je poměrně nejednoznačný. Hmotnost vzorků se po 2 hodinách mírně zvýšila, materiál tedy ještě stále nasákal médium. Po 6 hodinách experimentu se pH média po mírném zvýšení při měření po 2 hodinách upravilo na původní hodnotu, což je známka toho, že nedošlo k degradaci v předchozím odběru. Po 8 hodinách již vidíme mírný pokles pH, v měření hmotnosti v mokřém stavu je změna oproti hmotnosti ve 2 h (doba, kdy vzorek vstřebal nejvíce média) zanedbatelná. Po vysušení však můžeme pozorovat, že k mírnému

snížení v hmotnosti vzorků opravdu došlo, a to o $0,49 \pm 0,10$ % Výsledky experimentu se nachází v Tabulka 14. Tyto výsledky naznačily, že materiál začíná pravděpodobně degradovat až po 6 hodinách měření, a proto byl proveden delší experiment.

Tabulka 14 Výsledky 8hodinové degradační studie

	Změna mokré hmotnosti v porovnání s časem 0 h [%]				
Čas (h)	1	2	3	Průměr	pH
2	0,92	0,06	0,69	$0,56 \pm 0,45$	2,58
4	0,55	0,66	0,13	$0,45 \pm 0,28$	2,72
6	0,67	0,42	0,44	$0,51 \pm 0,14$	2,41
8	0,61	0,30	0,50	$0,47 \pm 0,16$	2,38
	Změna suché hmotnosti v porovnání s časem 0h [%]				
8	-0,43	-0,60	-0,45	$-0,49 \pm 0,10$	

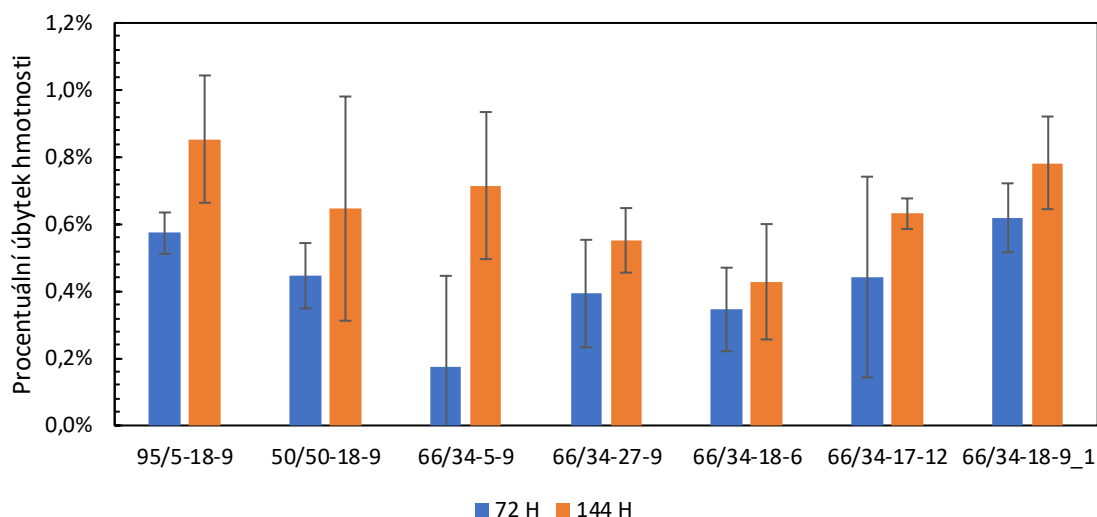
Dalším testem byl 48hodinový experiment s průběžnou kontrolou pH. Kontrola proběhla v delších intervalech, a to po 6, 24 a 48 hodinách. Pro tento experiment byl znovu použit vzorek 66/34-18-9_1. Ani výsledek po 48 hodinách se nejeví jako dostačující, výsledky se nachází v Tabulka 15. Nejeví žádný trend a mezi jednotlivými vzorky je obrovský rozptyl. Suchá hmotnost vzorků ani pH po 48 h neklesá, což značí, že nedochází k degradaci materiálu nebo degradace probíhá procesem hydrolytické degradace. Při hydrolytické degradaci dochází nejprve k náhodnému přerušení esterových vazeb, přičemž je tento proces doprovázen snížením molekulové hmotnosti. Jakmile se sníží molekulová hmotnost přibližně na $10000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, projeví se i úbytek hmotnosti (74). Dalším krokem v optimalizaci biodegradace je 6denní test se dvěma záznamy pH a kontrolou hmotnosti materiálu vzorků s extrémou ve složení.

Tabulka 15 Výsledky 48hodinového degradačního experimentu

	Změna mokré hmotnosti v porovnání s časem 0 h [%]			
Čas (h)	1	2	3	Průměr
24	-1,26	-3,72	1,12	$-1,28 \pm 2,42$
48	-6,12	-4,16	-2,19	$-4,16 \pm 1,96$
	Změna suché hmotnosti v porovnání s časem 0h [%]			
	1	2	3	Průměr
6	-0,18	-7,98	-0,25	$-2,81 \pm 4,48$
24	6,55	0,19	0,06	$2,27 \pm 3,71$
48	-0,06	2,27	-0,13	$0,69 \pm 1,36$

Ani v případě šestidenního experimentu nedochází k významnému poklesu hmotnosti nebo pH. Změny hmotnosti jsou v obou měřeních minimální a mohou být způsobeny vysokou nepřesností měření. Výsledky 6denního experimentu i s chybovými úsečkami jsou znázorněny na Obrázek 18. Vhodným postupem by v tuto chvíli bylo provedení gelové permeační chromatografie (GPC) a zjištění molekulové hmotnosti měřených vzorků. Tento krok je předmětem dalšího testování. V tuto chvíli probíhá optimalizace provedení tohoto experimentu,

včetně přípravy vzorků na GPC. Příprava vyžaduje eliminaci částic HAp, které mohou ucpávat kolonu.



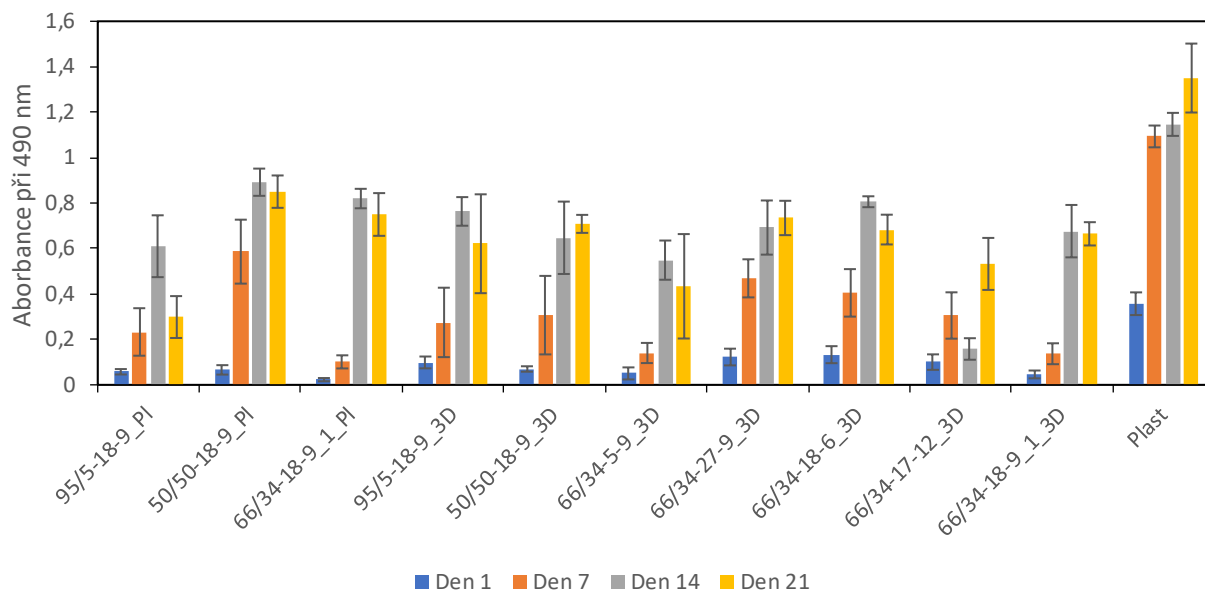
Obrázek 18 Procentuální úbytek hmotnosti měřených vzorků po 6 dnech experimentu

5.2.2. Komplexní biologické testování

Komplexní biologické testování bylo provedeno na pracovišti Ústavu experimentální medicíny AVČR a ráda bych pro úplnost práce uvedla stručné výsledky v této kapitole.

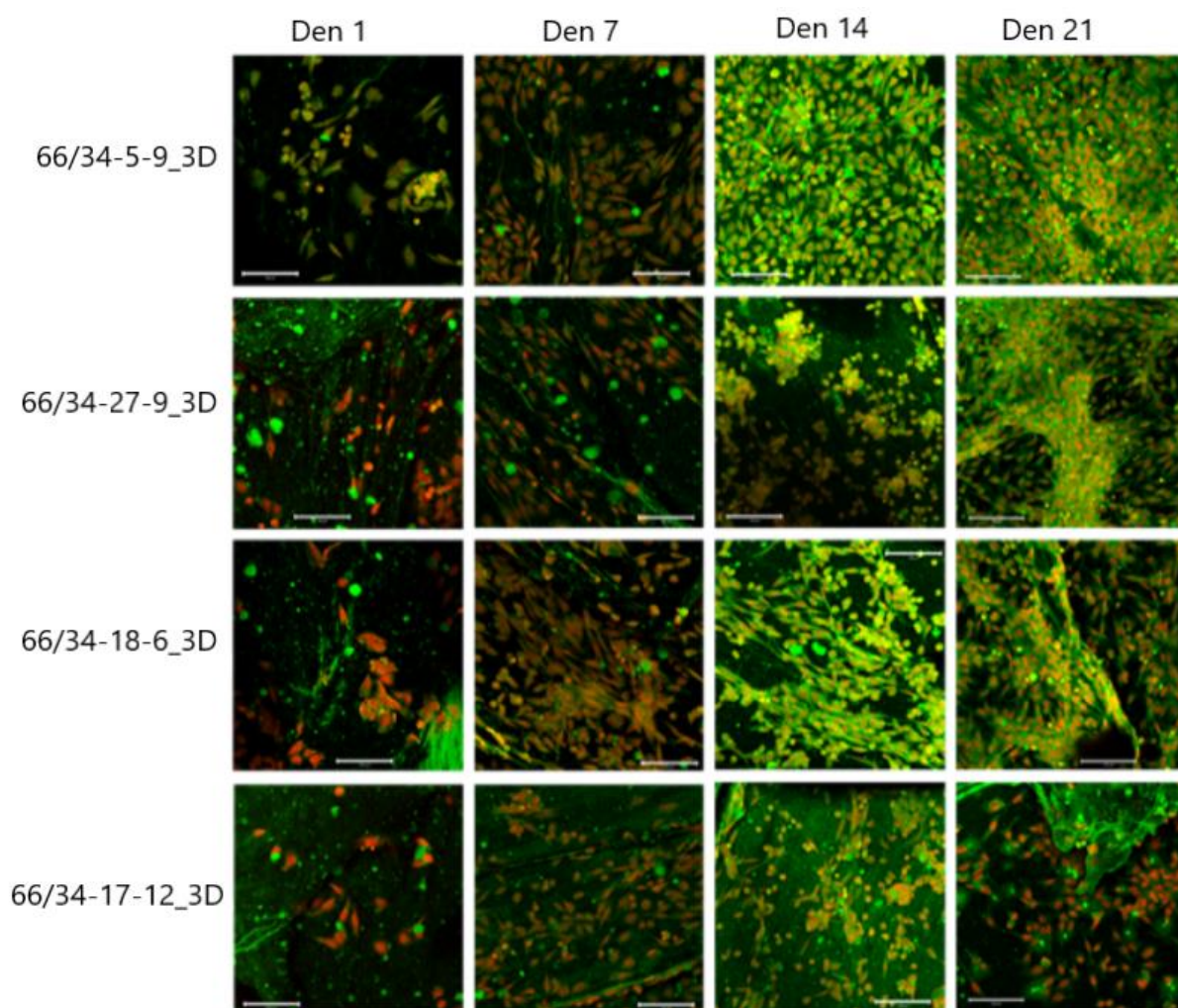
V rámci experimentu bylo provedeno testování metabolické aktivity, měření proliferace, vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie, měření diferenciac buněk a mineralizace nosičů. Nosiče byly osazeny Saos-2 osteosarkomovou linií.

Po sedmi dnech experimentu žádný z připravených vzorků nedosahoval hodnot metabolické aktivity srovnatelných s pozitivní kontrolou, což je běžné vzhledem k tomu, že kontrolní plast je ošetřen a optimalizován pro růst a adhezi buněk. Nejbližší kontrole byly vzorky 66/34-5-9 a 66/34-27-9 s poloviční metabolickou aktivitou. Diferenciace po 7 dnech probíhá obdobně jako u kontroly. Ani po 14 dnech experimentu hodnoty metabolické aktivity měřených vzorků nedosahují hodnoty kontroly, nicméně se snižuje rozdíl mezi naměřenou hodnotou kontroly a většiny vzorků. U všech měřených vzorků aktivita stoupá, pouze u vzorku 66/34-17-12 došlo k poklesu metabolické aktivity mezi dny 7 a 14. Diferenciace po 14 dnech probíhá stejně jako u kontroly. Po 21 dnech experimentu byla mezi většinou vzorků absorbance při měření metabolické aktivity vyrovnána, ačkoliv stále nižší, než byla absorbance naměřená na kontrole. Vzorek s nejnižší aktivitou je jednoznačně 95/5-18-9_P1. Výsledky měření je možné pozorovat na Obrázek 19. Diferenciace u všech měřených vzorků probíhá obdobně jako u kontroly.



Obrázek 19 Metabolická aktivita buněk měřená MTS

Buňky byly následně vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (na Obrázek 20 červeně) a intracelulární membrány DiOC6(3) (na obrázku zeleně). Po 21 dnech experimentu byl povrch všech vzorků pokryt silnou vrstvou buněk. Nejméně buněk bylo pozorováno na vzorcích 95/5-18-9_PI a 66/34-17-12_3D. Výsledky vizualizace korelují s měřením buněčné proliferace. Vzorky, které vykazovaly nejnižší hodnoty pro proliferaci, mají i nejméně vizualizovaných buněk.



Obrázek 20 Vizualizace pomocí konfokální mikroskopie, měřítko 100 μ m

6. Diskuze a závěr

V rámci experimentu bylo připraveno 20 vzorků ze čtyř složek, kterými jsou poly-3-hydroxybutyrát, poly(kyselina mléčná), hydroxyapatit a změkčovaadlo Syncroflex3114. Přesné složení vzorků bylo určeno plánovaným experimentem, na základě vytvořených hranic (extrémů) jednotlivých faktorů. Ty byly nastaveny tak, aby byla ve vzorcích vždy majorita P3HB a zároveň, aby byl otestován maximální možný obsah plniva. Z těchto složek byly na dvoušnekovém extrudéru připraveny granule materiálu. Z těch byly následně vytvořeny filamenty pro 3D tisk na jednošnekovém extrudéru. Z připravených filamentů byla vytištěna testovací tělesa pro optimalizaci podmínek 3D tisku; teplotní věže a tělesa na warping. Optimalizovanými podmínkami byla následně připravena tělesa pro mechanické testy. Pro charakterizaci mechanických vlastností materiálu byla zvolena ohybová a tlaková zkouška. S ohledem na plánovanou aplikaci pro resorpci v lidském těle byl proveden test urychlené biodegradace v kyselém prostředí.

Součástí diplomové práce je i statistické vyhodnocení naměřených dat pomocí matematického modelu, přičemž výsledkem jsou koeficienty vztahující se k jednomu ze tří zvolených faktorů (poměry PLA/P3HB, HAp/(P3HB+PLA), S3114/(P3HB+PLA+HAp)). Tyto koeficienty určují míru vlivu daného koeficientu na měřenou hodnotu. Součástí výsledku je i trojrozměrné grafické znázornění závislosti měřené veličiny na jednotlivých faktorech. V rámci plánovaného experimentu byly vyhodnoceny tyto zkoušky: teplotní věž, warping, ohybová a tlaková zkouška.

Prvním optimalizačním krokem tisknutelnosti připravených materiálů je teplotní věž. Pomocí tohoto 3D tištěného tělesa dokážeme odhadnout optimální teplotu pro tisk dalších testovacích těles. Zhodnocením jednotlivých prvků věže byla vybrána optimální teplota pro každý vzorek. Interval optimálních teplot tisku se nachází v rozmezí 180–200 °C. Zároveň se jedná o první zpracování připravených materiálů pomocí 3D tisku a po této zkušenosti můžeme konstatovat, že jsou některé z připravených vzorků velmi obtížně zpracovatelné a nejsou tedy pro běžné použití využitelné. Jsou to především vzorky 80/20-24-7, 80/20-23-11 a 95/5-18-9. Tyto vzorky jsou jedny z největších extrémů z hlediska množství obsaženého P3HB. Tyto vzorky jsou velmi křehké a z důvodu obsažené biomasy v P3HB často ucpávaly trysku 3D tiskárny. Statistickým vyhodnocením bylo zjištěno, že vliv na teplotu tisku mají všechny faktory. Největší vliv však mají shodně kvadratické koeficienty faktoru 1 (poměr PLA/P3HB) a faktoru 3 (množství změkčovaadla ve vzorku).

Druhým optimalizačním experimentem je otestování tzv. warpingu. Warping je negativní jev přítomný u 3D tisku. Česky ho můžeme nazvat například kroucení a důsledkem tohoto jevu jsou odlepující se rohy tělesa od tiskové podložky. V extrémních případech může dojít k úplnému odlepení tělesa. Úplné zabránění warpingu nelze provést, ale můžeme tento efekt minimalizovat optimálním nastavením tiskárny a teploty tisku. Například u komerčně dostupné PLA se vliv warpingu snižuje zahřátím podložky na 60 °C. U testovaných vzorků však zahřátí podložky nemělo žádný efekt. Testování bylo provedeno s využitím speciálního testovacího tělesa. Ve chvíli, kdy došlo k odlepení části tělesa od podložky byla zaznamenána výška vytištěného tělesa a porovnána s 3D modelem. Výsledkem této studie je warping koeficient, který určuje míru kroucení u testovaného materiálu. Čím je vyšší hodnota warping koeficientu,

tím hůře je materiál tisknutelný. Nejvyšší hodnotu warping koeficientu má jednoznačně vzorek 95/5-18-9, kdy se vzorek odlepil prakticky hned po vytisknutí čtvercové základny testovacího tělesa. Naopak nejnižší hodnotu má vzorek 55/45-11-7, který má hodnotu warping koeficientu $1,7 \pm 0,3$. Statisticky vyhodnocené hodnoty warping koeficientu odhalily, že významný vliv na warping mají téměř všechny koeficienty. Největší vliv však má faktor 1 (poměr PLA/P3HB) a to téměř shodně kvadratický i lineární příspěvek.

Při vývoji nového materiálu je třeba otestovat mechanické vlastnosti. V této práci byly zvoleny dva experimenty, a to ohybová a tlaková zkouška. Vyhodnocením výsledků ohybové zkoušky bylo zjištěno, že se modul pružnosti měřených vzorků pohybuje v rozmezí 2,3–3,7 GPa. Porovnáním těchto výsledků s hodnotami naměřenými při tlakové zkoušce bylo zjištěno, že modul pružnosti v tlaku má téměř o polovinu nižší hodnoty. Materiály jsou tedy podstatně odolnější v ohybu než v tlaku. Nejvyšší hodnotu modulu pružnosti mají shodně vzorky 55/45-24-7 a 66/34-18-6 a to i v ohybu i v tlaku. Zajímavé je, že v obou experimentech byly také naměřeny stejné hodnoty pro oba materiály. Modul pružnosti v ohybu je 3,7 GPa a v tlaku 1,8 GPa pro oba vzorky. Srovnáním naměřených hodnot s modulem pružnosti lidské kosti bylo zjištěno, že se tyto hodnoty velice liší. Kost sice nemá přesnou hodnotu modulu pružnosti, protože nezáleží pouze na tom, jaká kost těla je měřena, ale zároveň záleží na tom, v jakém místě kosti měření probíhá, ale z rešerše víme, že se modul pohybuje v nižších desítkách GPa (75, 76, 77). Zároveň je měření ovlivněno stářím kosti, resp. věkem člověka a také jeho pohlavím. Další hodnotou měřenou při ohybové zkoušce je pevnost. Naměřené hodnoty pevnosti se pohybují v rozmezí 35,9–58,9 MPa. Vzorky s nejvyšší pevností jsou 55/45-11-7 a 66/34-18-6. Naměřené hodnoty je opět možné porovnat s pevností lidské kosti, ale opět platí, že pevnost kosti závisí na mnoha faktorech, jak je zmíněno výše u modulu pružnosti kosti. Pevnost kosti může variovat mezi 90–209 MPa u kortikální kosti, u houbovité 1,5–45 MPa (78). Další hodnotou získanou z tlakové zkoušky je napětí při 1% deformaci. Hodnoty naměřeného napětí se pohybují v rozmezí 2,0–10,0 MPa. Největší hodnoty napětí byly naměřeny pro vzorky 55/45-24-7 a 66/34-18-6. Statistickým vyhodnocením dat naměřených ohybovou zkouškou bylo zjištěno, že největší vliv na modul pružnosti má množství změkčovadla ve směsi. Vliv změkčovadla byl znázorněn se záporným koeficientem, změkčovadlo tedy působí negativně na modul pružnosti. Tento vliv je 1–2× větší, než pozitivní vliv poměru PLA/P3HB a množství HAp ve směsi. Další naměřenou hodnotou při ohybové zkoušce je pevnost. Pevnost největší mírou ovlivňuje také změkčovadlo ve směsi a znovu je tento vliv negativní. Nicméně je zde důležité zmínit i pozitivní vliv poměru PLA/P3HB, který je jen o čtvrtinu nižší, než vliv změkčovadla. Poloviční vliv, než množství změkčovadla má i množství HAp ve směsi.

Zhodnocením celkového plánovaného experimentu můžeme konstatovat, že testované meze vstupních parametrů experimentu byly vhodně nastaveny na základě předchozí zkušenosti s podobnými materiály. Vzorky s extrémy v jednom z faktorů byly velmi obtížně tisknutelné a pravděpodobně by nebylo možné vytisknout vzorky o složení za hranicemi tohoto experimentu. Na testované vlastnosti materiálu má obecně největší vliv množství změkčovadla ve vzorku a ve všech případech je tento vliv negativní. Vyhodnocením plánovaného experimentu byla vybrána směs, která má optimální složení pro přípravu scaffoldů. Její složení je 35,2 % P3HB,

30,8 % PLA, 28,3 % HAP a 5,6 % S3114, což nejlíže odpovídá testovanému vzorku 55/45-24-7, který nevykazoval problematické chování při žádném z testů.

V rámci diplomové práce byl proveden první screening biodegradace v kyselém prostředí. Prvním experimentem byl 8hodinový test, kde nebyl pozorován žádný úbytek hmotnosti nebo změna pH. Proto byl zvolen delší, 48hodinový experiment. Ani při prodlouženém testu se však neprokázala výraznější změna hmotnosti. Byl proveden ještě 6denní experiment pro vzorky s extrémě ve složení, avšak ani v tuto chvíli nebyly pozorovány jasné úbytky hmotnosti ani změny pH, přestože byla zvolena poloviční výška vzorku. Předpokládané zdůvodnění, proč ke snížení hmotnosti nedochází, je to, že degradace probíhá procesem hydrolytické degradace v objemu tělesa. Nejprve se náhodně štěpí esterové vazby a snižuje se molekulová hmotnost. Jakmile se molekulová hmotnost sníží pod hodnotu $10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, dojde i ke snížení hmotnosti. Pro potvrzení tohoto předpokladu je vhodné provést gelovou permeační chromatografii pro zjištění molekulové hmotnosti. Tento experiment bude předmětem dalšího testování.

Na externím pracovišti bylo provedeno biologické testování vzorků, jehož výsledkem bylo zjištění, že jsou všechny testované vzorky biokompatibilní a nenesou známky cytotoxicity. Protože byly testovány vzorky o složení definovaném parametry na extréměch experimentálního prostoru, je očekáváno, že jsou biokompatibilní i zbylé připravené materiály. Zároveň byl porovnáním výsledků na nosičích vytištěných na 3D tiskárně a vylisovaných v lisu vyvrácen předpoklad nevhodnosti metody FDM pro výrobu scaffoldů. Naopak se z výsledků jeví drsný povrch 3D tištěných vzorků jako optimálnější, než lesklý povrch vylisovaných těles.

7. Zdroje

1. WOJNAR, Ryszard. Bone and Cartilage – its Structure and Physical Properties. ÖCHSNER, Andreas a Waqar AHMED. Biomechanics of Hard Tissues: Modeling, Testing, and Materials [online]. 1. Copyright © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010, s. 1-75 [cit. 2021-04-12]. ISBN 978-3-527-63273-2. Dostupné z: https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527324313_c01.pdf
2. SHARIR, Amnon, Meir Max BARAK a Ron SHAHAR. Whole bone mechanics and mechanical testing. The Veterinary Journal. 2008, 177(1), 8-17. ISSN 10900233. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.012
3. BOCCACCINI, Aldo R., Liliana LIVERANI a Peter X. MA. Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers. 1. Woodhead Publishing, 2021. ISBN 978-0-12-820508-2.
4. M. PAWELEC, Kendell a Josep A. PLANELL. Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications. Druhé vydání. Woodhead Publishing, 2019. ISBN 978-0-08-102451-5.
5. WANG, Xiaojian, Shanqing XU, Shiwei ZHOU, et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. Biomaterials. 2016, 83, 127-141. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.012
6. Biomaterials. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NIBIB) [online]. [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials>
7. MIGONNEY, Véronique. Biomaterials [online]. Paříž: John Wiley, 2014 [cit. 2021-5-13]. ISBN 9781119043676.
8. THAKUR, Vijay Kumar, Manju Kumari THAKUR a Michael R. KESSLER. Handbook of Composites from Renewable Materials. 1. Scrivener Publishing, 2017. ISBN 9781119224365.
9. Operace páteře jsou velmi složité, ale výsledek stojí za to. Braunoviny [online]. B. Braun Melsungen, 2022 [cit. 2022-03-19]. Dostupné z: <https://www.braunoviny.cz/operace-patere-jsou-velmi-slozite-ale-vysledek-stoji-za>
10. MURR, Lawrence E., Sara M. GAYTAN, Edwin MARTINEZ, Frank MEDINA a Ryan B. WICKER. Next Generation Orthopaedic Implants by Additive Manufacturing Using Electron Beam Melting. International Journal of Biomaterials. 2012, 2012, 1-14. ISSN 1687-8787. Dostupné z: doi:10.1155/2012/245727
11. RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 2. Elsevier, 2004. ISBN 9780080470368.
12. SHEIKH, Zeeshan, Shariq NAJEEB, Zohaib KHURSHID, Vivek VERMA, Haroon RASHID a Michael GLOGAUER. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. Materials. 2015, 8(9), 5744-5794. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma8095273
13. MILLER, Robert A., John M. BRADY a Duane E. CUTRIGHT. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with

- changes in PLA/PGA copolymer ratios. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1977, 11(5), 711-719. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.820110507
14. BERTESTEANU, Serban, Mariana CHIFIRIUC, Alexandru GRUMEZESCU, et al. Biomedical Applications of Synthetic, Biodegradable Polymers for the Development of Anti-Infective Strategies. *Current Medicinal Chemistry*. 2014, 21(29), 3383-3390. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867321666140304104328
 15. VERT, Michel. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything. *Biomacromolecules*. 2005, 6(2), 538-546. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0494702
 16. SEAL, B. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 34(4-5), 147-230. ISSN 0927796X. Dostupné z: doi:10.1016/S0927-796X(01)00035-3
 17. VERT, M., S. M. LI, G. SPENLEHAUER a P. GUERIN. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1992, 3(6), 432-446. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/BF00701240
 18. LINHART, W, F PETERS, W Lehmann, LEHMANN, K SCHWARZ, A F SCHILLING, M AMLING, J M RUEGER a M EPPLE. Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Re*. 2001, 54(2), 162-171. Dostupné z: doi:10.1002/1097-4636(200102)54:2<162::aid-jbm2>3.0.co;2-3
 19. RAZAK, Saiful Izwan Abd, Noor Fadzliana Ahmad SHARIF a Wan Aizan Wan Abdul RAHMAN. Biodegradable polymers and their bone applications: A review. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*. 2012, 12(1).
 20. XIONG, Zhuo, Yongnian YAN, Renji ZHANG a Lei SUN. Fabrication of porous poly(l-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Materialia*. 2001, 45(7), 773-779. ISSN 13596462. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6462(01)01094-6
 21. LAGOA, Ana L. C., Christian WEDEMEYER, Marius VON KNOCH, Franz LÖER a Matthias EPPLE. A strut graft substitute consisting of a metal core and a polymer surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, 19(1), 417-424. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-006-0022-0
 22. ZHAO, Duoyi, Tongtong ZHU, Jie LI, Ligu CUI, Zhiyu ZHANG, Xiuli ZHUANG a Jianxun DING. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioactive Materials*. 2021, 6(2). ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2020.08.016
 23. COOMBES, A.G.A., S.C. RIZZI, M. WILLIAMSON, J.E. BARRALET, S. DOWNES a W.A. WALLACE. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*. 2004, 25(2), 315-325. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00535-0
 24. RAMAKRISHNA, S, J MAYER, E WINTERMANTEL a Kam W LEONG. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science*

- and Technology. 2001, 61(9), 1189-1224. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(00)00241-4
25. SASKA, Sybele, Lucas Novaes TEIXEIRA, Larissa Moreira Spinola DE CASTRO RAUCCI, et al. Nanocellulose-collagen-apatite composite associated with osteogenic growth peptide for bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 103, 467-476. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.086
 26. CHEN, Li, Jingxiao HU, Jiabing RAN, Xinyu SHEN a Hua TONG. A novel nanocomposite for bone tissue engineering based on chitosan–silk sericin/hydroxyapatite: biomimetic synthesis and its cytocompatibility. *RSC Advances*. 2015, 5(69), 56410-56422. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA08216A
 27. WU, Chaoxi, Hengjie SU, Anastasios KARYDIS, Kenneth M ANDERSON, Najib GHADRI, Shunqing TANG, Yifei WANG a Joel D BUMGARDNER. Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration: biomimetic synthesis and its cytocompatibility. *Biomedical Materials*. 2018, 13(1), 56410-56422. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-605X/aa853c
 28. KASHIRINA, Anastasiia, Yongtao YAO, Yanju LIU, Jinsong LENG, Najib GHADRI, Shunqing TANG, Yifei WANG a Joel D BUMGARDNER. Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomaterials Science*. 2019, 7(10), 3961-3983. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C9BM00664H
 29. MELKE, Johanna, Swati MIDHA, Sourabh GHOSH, Keita ITO a Sandra HOFMANN. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2016, 31, 1-16. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2015.09.005
 30. DWIVEDI, Ruby, Rahul PANDEY, Sumit KUMAR a Divya MEHROTRA. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2020, 10(1), 389-392. ISSN 22124268. Dostupné z: doi:10.1016/j.jobcr.2019.10.004
 31. CHEN, Guo-Qiang a Qiong WU. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005, 26(33), 6565-6578. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
 32. BONARTSEV, A. P., G. A. BONARTSEVA, I. V. RESHETOV, K. V. SHAITAN a M. P. KIRPICHNIKOV. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae*. 2019, 11(2), 4-16. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi:10.32607/20758251-2019-11-2-4-16
 33. LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926, 8, 770–782
 34. WU, Qiong, Yang WANG a Guo-Qiang CHEN. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2009, 37(1), 1-12. ISSN 1073-1199. Dostupné z: doi:10.1080/10731190802664429

35. CHEN, L.J. a M. WANG. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer. *Biomaterials*. 2002, 23(13), 2631-2639. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00394-5
36. GALEGO, Norma, Chavati ROZSA, Rubén SÁNCHEZ, Juan FUNG, ANALÍA VÁZQUEZ a Julio SANTO TOMÁS. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing*. 2000, 19(5), 485-492. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9418(99)00011-2
37. OGOSE, Akira, Tetsuo HOTTA, Hiroyuki KAWASHIMA, Naoki KONDO, Wenguang GU, Takeshi KAMURA a Naoto ENDO. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2005, 72B(1), 94-101. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.30136
38. CUTRIGHT, Duane E., Surindar N. BHASKAR, John M. BRADY, Lee GETTER a William R. POSEY. Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1972, 33(5), 850-856. ISSN 00304220. Dostupné z: doi:10.1016/0030-4220(72)90457-4
39. GHOSH, Samir K., Samit K. NANDI, Biswanath KUNDU, Someswar DATTA, Dipak K. DE, Sujit K. ROY a Debabrata BASU. In vivo response of porous hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008, 86B(1), 217-227. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31009
40. TAN, Lili, Xiaoming YU, Peng WAN a Ke YANG. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. 2013, 29(6), 503-513. ISSN 10050302. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmst.2013.03.002
41. GOONOO, Nowsheen, Archana BHAW-LUXIMON, Pearl PASSANHA, Sandra R. ESTEVES a Dhanjay JHURRY. Third generation poly(hydroxyacid) composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017, 105(6), 1667-1684. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33674
42. BOSE, Susmita, Mangal ROY a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. 2012, 30(10), 546-554. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005
43. NEMATI HAYATI, Amir, S.M. HOSSEINALIPOUR, H.R. REZAIE a M.A. SHOKRGOZAR. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2012, 32(3), 416-422. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2011.11.013
44. BERND, Hans Edgar, Carmen KUNZE, Thomas FREIER, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) patches for covering anterior skull base defects – an animal study with minipigs. *Acta Oto-Laryngologica*. 2009, 129(9), 1010-1017. ISSN 0001-6489. Dostupné z: doi:10.1080/00016480802552493

45. GREDES, Tomasz, Tomasz GEDRANGE, Claudia HINÜBER, Michael GELINSKY a Christiane KUNERT-KEIL. Histological and molecular-biological analyses of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) patches for enhancement of bone regeneration. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2015, 199, 36-42. ISSN 09409602. Dostupné z: doi:10.1016/j.aanat.2014.04.003
46. BOSE, Susmita, Sahar VAHABZADEH a Amit BANDYOPADHYAY. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*. 2013, 16(12), 496-504. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2013.11.017
47. LIU, Huinan, Elliott B. SLAMOVICH a Thomas J. WEBSTER. Increased osteoblast functions among nanophase titania/poly(lactide-co-glycolide) composites of the highest nanometer surface roughness. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006, 78A(4), 798-807. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.30734
48. DENG, Ying a Jordan KUIPER. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications* [online]. Woodhead Publishing, 2018 [cit. 2022-02-04]. ISBN 978-0-08-100980-2. Dostupné z: file:///C:/Users/matya/Downloads/Functional3DTissueEngineeringScaffolds.PDF
49. LUCCHESI, Carolina, Betina M. P. FERREIRA, Eliana A. R. DUEK, Arnaldo R. SANTOS a Paulo P. JOAZEIRO. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, 19(2), 635-643. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-007-0169-3
50. NAZIN, Sultana. *Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering* [online]. 1. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013 [cit. 2022-02-04]. ISBN 978-3-642-34802-0. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/321515013_Biodegradable_Polymer-Based_Scaffolds_for_Bone_Tissue_Engineering
51. THOMAS, C H, C D MCFARLAND, M L JENKINS, A REZANIA, J G STEELE a K E HEALY. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997, vol.37(1), 81-93. Dostupné z: doi:10.1002/(sici)1097-4636(199710)37:1<81::aid-jbm10>3.0.co;2-t
52. KESELOWSKY, B. G., D. M. COLLARD a A. J. GARCIA. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, 102(17), 5953-5957. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0407356102
53. GODDARD, J.M. a J.H. HOTCHKISS. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32(7), 698-725. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
54. WEI, Jianhua, Toshio IGARASHI, Naoto OKUMORI, Takayasu IGARASHI, Takashi MAETANI, Baolin LIU a Masao YOSHINARI. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomedical Materials*. 2009, 4(4). ISSN 1748-6041. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/4/4/045002

55. VAGASKÁ, B, L BAČÁKOVÁ, E FILOVÁ a K BALÍK. Osteogenic Cells on Bio-Inspired Materials for Bone Tissue Engineering. *Physiological Research*. 309-322. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.931776
56. YANG, Ya-li, Stéphanie MOTTE a Laura J. KAUFMAN. Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells. *Biomaterials*. 2010, 31(21), 5678-5688. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.039
57. TOTH, Jeffrey M., Howard S. AN, Tae-Hong LIM, Yujun RAN, Nicholas G. WEISS, William R. LUNDBERG, Rong-Ming XU a Kenneth L. LYNCH. Evaluation of Porous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Anterior Cervical Interbody Fusion in a Caprine Model. *Spine*. 1995, 20(Supplement), 2203-2210. ISSN 0362-2436. Dostupné z: doi:10.1097/00007632-199510001-00005
58. INGBER, Donald E. Mechanical Signaling and the Cellular Response to Extracellular Matrix in Angiogenesis and Cardiovascular Physiology. *Circulation Research*. 2002, 91(10), 877-887. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.0000039537.73816.E5
59. CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA a Vaclav BABUSKA. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*. 2019, 12(4). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12040568
60. BALLETTI, Caterina, Martina BALLARIN a Francesco GUERRA. 3D printing: State of the art and future perspectives. *Journal of Cultural Heritage*. 2017, 26, 172-182. ISSN 12962074. Dostupné z: doi:10.1016/j.culher.2017.02.010
61. DO, Anh-Vu, Behnoush KHORSAND, Sean M. GEARY a Aliasger K. SALEM. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*. 2015, 4(12), 1742-1762. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201500168
62. NGO, Tuan D., Alireza KASHANI, Gabriele IMBALZANO, Kate T.Q. NGUYEN a David HUI. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*. 2018, 143, 172-196. ISSN 13598368. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesb.2018.02.012
63. LIGON, Samuel Clark, Robert LISKA, Jürgen STAMPFL, Matthias GURR a Rolf MÜLHAUPT. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chemical Reviews*. 2017, 117(15), 10212-10290. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.7b00074
64. KOVALCIK, Adriana. Recent Advances in 3D Printing of Polyhydroxyalkanoates: A Review. *The EuroBiotech Journal*. 2021, 5(1), 48-55. ISSN 2564-615X. Dostupné z: doi:10.2478/ebtj-2021-0008
65. WANG, Ya-Wu, Qiong WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials*. 2005, 26(8), 899-904. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.035
66. SADAT-SHOJAI, Mehdi, Mohammad-Taghi KHORASANI, Ahmad JAMSHIDI a Shiva IRANI. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. *Materials*

- Science and Engineering: C. 2013, 33(5), 2776-2787. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2013.02.041
67. HAJIALI, Hadi, Mohammad HOSSEINALIPOUR, Saeed KARBASI a Mohammad Ali SHOKRGOZAR. The influence of bioglass nanoparticles on the biodegradation and biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds. *The International Journal of Artificial Organs*. 2012, 35(11), 1015-1024. ISSN 0391-3988. Dostupné z: doi:10.5301/ijao.5000119
68. MEDVECKY, L. Microstructure and Properties of Polyhydroxybutyrate-Chitosan-Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds. *The Scientific World Journal*. 2012, 2012, 1-8. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1100/2012/537973
69. KOVALCIK, Adriana, Leire SANGRONIZ, Michal KALINA, Katerina SKOPALOVA, Petr HUMPOLÍČEK, Maria OMASTOVA, Norbert MUNDIGLER a Alejandro J. MÜLLER. Properties of scaffolds prepared by fused deposition modeling of poly(hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 161. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.022
70. 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+. Prusa research by Josef Prusa [online]. [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: <https://www.prusa3d.com/cs/produkt/3d-tiskarna-original-prusa-i3-mk3s-3/>
71. KONTÁROVÁ, Soňa, Radek PŘIKRYL, Veronika MELČOVÁ, et al. Printability, Mechanical and Thermal Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate)-Poly(Lactic Acid)-Plasticizer Blends for Three-Dimensional (3D) Printing. *Materials*. 2020, 13(21). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13214736
72. DIEZ-ESCUADERO, A., M. ESPANOL, S. BEATS a M.-P. GINEBRA. In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition. *Acta Biomaterialia*. 2017, 60, 81-92. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.07.033
73. SILVER, I. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*1. *Experimental Cell Research*. 1988, 175(2), 266-276. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/0014-4827(88)90191-7
74. KURCOKY, Piotr, Marek KOWALCZUK, Grazyna ADAMUS, Zbigniew JEDLINSKI a Robert W. LENZ. *Degradable Polymers, Recycling, and Plastics Waste Management* [online]. 1. CRC Press, 1995 [cit. 2022-05-08]. ISBN 9780429073731.
75. ASHMAN, Richard B. a JAE YOUNG RHO. Elastic modulus of trabecular bone material. *Journal of Biomechanics*. 1988, 21(3), 177-181. ISSN 00219290. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9290(88)90167-4
76. MORGAN, Elise F., Ginu U. UNNIKISNAN a Amira I. HUSSEIN. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2018, 20(1), 119-143. ISSN 1523-9829. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-121139
77. ZYSSET, Philippe K, X EDWARD GUO, C EDWARD HOFFLER, Kristin E MOORE a Steven A GOLDSTEIN. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of Biomechanics*.

1999, 32(10), 1005-1012. ISSN 00219290. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9290(99)00111-6

78. PLANELL, Josep A., Serena M. BEST, Damien LACROIX a Antonio MEROLLI. Bone Repair Biomaterials. Woodhead Publishing, 2009. ISBN 978-1-84569-385-5.

Seznam symbolů a zkratk

TE	Tkáňové inženýrství
HAp	Hydroxyapatit
PGA	Poly(kyselina glykolová)
PLA	Poly(kyselina mléčná)
PLGA	Kopolymer mléčné a glykolové kyseliny
PLLA	Poly(kyselina L-mléčná)
PEM	Precise extrusion manufacturing
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
COL	Kolagen
BC	Bakteriální celulóza
Ap	Apatit
OGP	Osteogenní růstový peptid pro regeneraci kostí
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
P3HV	Poly-3-hydroxyvalerát
P4HB	Poly-4-hydroxybutyrát
P3HHx	Poly-3-hydroxyhexanoát
PHBH	Polyhydroxybutyrát-co-hexanoát
PHBV	Polyhydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát
P3HB	Poly-3-hydroxybutyrát
FDA	Americká léková agentura
TCP	Fosforečnan vápenatý
ECM	Extracelulární matrix
CAD	Počítačem podporovaný návrh
FDM	Modelování depozicí taveniny
SLA	Stereolitografie
SLS	Spékání prášku laserovým paprskem
SLM	Tavení laserovým paprskem
TGA	Termogravimetrická analýza

PHBH	Poly(hydroxybutyrát-ko-hydroxyhexanoát
ABS	Akrylonitrilbutadienstyren
ASA	Akrylonitrilstyrenakrylát
PA	Polyamid
PET	Polyethylentereftalát
3HV	3-hydroxyvalerát
S3114	Syncroflex3114
HCl	Kyselina chlorovodíková
NaCl	Chlorid sodný
GPC	Gelová permeační chromatografie