



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

TESTOVÁNÍ BIOAKTIVITY BIOKERAMICKÝCH MATERIÁLŮ POMOCÍ SIMULOVANÉ TĚLNÍ TEKUTINY

BIOCERAMIC MATERIALS BIOACTIVITY TESTING VIA SIMULATED BODY FLUID

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Holbusová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1657/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eva Holbusová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. David Salamon, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Testování bioaktivity biokeramických materiálů pomocí simulované tělní tekutiny

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši o testování biokeramických materiálů pomocí simulované tělní tekutiny se zaměřením na vápenaté fosforečnany.
2. Experimentálně připravit biokeramické substráty a vhodnou simulovanou tělní tekutinu (SBF). Analyzovat přenos vápenatých iontů v systému biokeramika – SBF.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Eva Holbusová
studentka

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

V súčasnej dobe je možnosť implantácie kĺbnych náhrad, bežnejších zubných implantátov alebo regenerácie zlomenín kostí pomocou kostných štepov dostupnejšia ako v minulosti. Na tieto účely sú využívané biokeramické materiály.

Biokeramika je netoxický keramický materiál. Vyznačuje sa svojou bioaktivitou a biokompatibilitou. Testovanie bioaktivity biokeramiky je uskutočnené pomocou simulovanej telesnej tekutiny (SBF). Počas testovania je skúmaná zmena koncentrácie vápenatých iónov.

Cieľom práce bolo zistiť, či dochádza k uvoľňovaniu vápenatých iónov medzi biokeramikou a SBF. Experimentálne boli pripravené biokeramické materiály dvomi metódami, a to metódou freeze-casting a izostatickým lisovaním za studena. Vzorky boli namáčané do c-SBF pripravenej podľa Kokuba. Analýza SBF bola uskutočnená kolorimetrickou metódou s použitím reagentu roztoku Murexidu a reagentii zakúpeného KITu. Pomocou UV/VIS spektrofotometru bola meraná koncentrácia vápenatých iónov v SBF po namočení vzoriek v testovacom cykle 0, 3, 7, 14 a 21 dní. Na zistenie fázového zloženia materiálu bola využitá röntgenová difraktometria pred namáčaním do SBF.

Zmena koncentrácie vápenatých iónov počas testovacieho cyklu v systéme biokeramika – SBF bola potvrdená vďaka UV/VIS spektrofotometrii. Najväčší nárast koncentrácie bol zaznamenaný v tretí deň po vybratí. Predpoklad o vzniku apatitovej vrstvy na namáčanom biokeramickom materiále bol podporený zmenou koncentrácie vápenatých iónov SBF a zmenou hmotnosti materiálu po namočení. Bolo zistené, že pri nepriamom kolorimetrickom stanovení je použitie činidla Murexid vhodnejšie ako KIT.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

biokeramika, simulovaná telesná tekutina (SBF), UV/VIS spektrofotometria

ABSTRACT

These days, there is a possibility of joint replacement implantation, more common dental implants, or regeneration of bone fractures using bone graft replacements is more accessible than in history. Bioceramic materials are used for these purposes.

Bioceramics is a non-toxic ceramic material. It is characterized by its bioactivity and biocompatibility. Bioactivity testing of bioceramics is performed using simulated body fluid (SBF). In addition, the change in the concentration of calcium ions was investigated during the testing.

The aim of the work was to determine whether the concentration of calcium ions changes between bioceramics and SBF. Bioceramic samples were prepared by two methods, namely freeze-casting and cold isostatic pressing. What was soaked in c-SBF was prepared according to Kokubo. The analysis of SBF was performed using a colorimetric method with a reagent of Murexide solution and reagent KIT. The concentration of calcium ions in the SBF after soaking samples in a testing cycle 0, 3, 7, 14, and 21 days was measured using a UV/VIS spectrophotometer. In addition, X-ray diffractometry was used to determine the phase composition of the material before soaking in SBF.

The change in calcium ion concentration during the test cycle in the bioceramic – SBF system was confirmed with UV/VIS spectrophotometry. The most significant increase in concentration was recorded on the third day of soaking. The assumption of an apatite layer formation on the soaked bioceramic samples was supported by a change in the concentration of calcium ions SBF and the change in weight of the material after soaking. It was found that using indirect colorimetric determination delivered better results when the Murexide indicator was used instead of KIT.

KEYWORDS

bioceramics, simulated body fluid (SBF), UV/VIS spectrophotometry

HOLBUSOVÁ, Eva. *Testování bioaktivity biokeramických materiálů pomocí simulované tělní tekutiny* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-26]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138925>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce David Salamon.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením doc. Ing. Davida Salamona, PhD., a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som chcela poďakovať môjmu vedúcemu práce doc. Ing. Davidovi Salamonovi, Ph.D., za jeho odborné znalosti, trpezlivosť a poskytnutý čas pri riešení problematiky. Ďalej ďakujem Ing. Lucii Pejchalovej za čas, ktorý mi venovala individuálnym prístupom počas konzultácii a v laboratóriu. Celému tímu Pokročilých keramických materiálov ústavu CEITEC ďakujem za ochotu a pomoc pri praktickom plnení úloh. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine a priateľom, ktorí ma pri mojej práci podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Keramika	9
2.2	Biokeramika.....	9
2.2.1	Vápenaté fosforečnany	10
2.3	Metódy prípravy biokeramických materiálov tvarovaním	11
2.3.1	Suché tvarovacie metódy	11
2.3.2	Mokrú tvarovacie metódy.....	12
2.3.3	Tvarovanie bez použitia formy	12
2.4	Freeze-casting	13
2.4.1	Proces mrazenia.....	13
2.4.2	Výsledná štruktúra scaffoldu.....	14
2.4.3	Lyofilizácia.....	14
2.4.4	Sintrovanie	15
2.5	Testovanie biokeramických materiálov	15
2.5.1	Acelulárne testovanie	15
2.5.2	Detekcia vápenatých iónov	18
2.5.3	Fázové zloženie	18
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	19
3.1	Zoznam použitých chemikálii a prístrojov	19
3.2	Príprava biokeramickej suspenzie	20
3.3	Aplikácia metódy freeze-casting	21
3.3.1	Popísanie foriem.....	21
3.4	Vhodný proces sintrovania	21
3.5	Lisovanie	22
3.6	Meranie hustoty pripravených scaffoldov	22
3.7	Príprava simulovanej telesnej tekutiny (SBF)	23
3.7.1	Zloženie SBF	23
3.7.2	Testovací cyklus	24
3.8	Analýza vápenatých iónov.....	24
3.8.1	Kalibračné rady	24
3.8.2	UV/VIS Spektrofotometria	26
3.9	Analýza mikroštruktúry	26

3.10	Analýza zloženia.....	27
4	VÝSLEDKY	28
4.1	Popis pripravených vzoriek	28
4.2	Relatívna hustota	28
4.3	Zmena hmotnosti	29
4.4	Zmena koncentrácie vápnika	30
4.5	Analýza mikroštruktúry	37
4.6	Fázová analýza	38
5	DISKUSIA	39
6	ZÁVER.....	42
7	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	43
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	47

1 ÚVOD

Biomateriál je definovaný ako materiál použitý k vytvoreniu štruktúry, ktorý bude slúžiť ako náhrada častí ľudského tela. Neživý materiál použitý v medicíne je určený k interakcii s biologickými systémami. Umelo vyrobené materiály so širokým spektrom vlastností, ktoré sú pre každé tkanivo špecifické, sa v klinickej praxi už dlhšiu dobu používajú ako náhrady poškodených, chorých či nevyvinutých častí skeletu, pre náhrady chýbajúcich častí tela, pre korekciu vrodených či patologických deformácií a traumatických poškodení [1].

Biokeramika sa osvedčila vo viacerých prípadoch využitia hlavne kvôli jej vhodným biologickým vlastnostiam, ktorými sú biokompatibilita, bioaktivita a bioinertnosť [2]. Bioaktívne materiály majú schopnosť sa viazať priamo na kosť, čo umožňuje rýchlejšiu stabilizáciu implantátu a dlhšiu funkčnú životnosť [1]. V súčasnej dobe je skúmané ich využitie pri liečbe rakoviny [3,4]. Biokeramické materiály, ktoré je možné použiť na výrobu implantátov rozdelujeme podľa pôsobenia na živé tkanivo. Poznáme bioaktívnu keramiku, ktorá je obvykle na báze fosforečnanu vápenatého $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Nachádza sa vo viacerých typoch, ako napríklad α -trikalciumfosfát (α -TCP), a taktiež β -TCP, čo je častejšie využívané kvôli jednoduchšej príprave. Nevýhodou β -TCP je pomalšia rozpustnosť, čo vedie k časovo dlhšej resorpcii ako u alfa formy, ktorý patrí medzi najviac rozpustné fosforečnany. Rýchlosť rozpustnosti závisí od typu a tvaru mriežky. Medzi neresorbovateľnú keramiku zaraďujeme biomateriál na báze oxidu hlinitého Al_2O_3 , ktorý je klasifikovaný aj ako bioinertná biokeramika vďaka nízkej hladine reaktivity v ľudskom tele. Do tejto skupiny patrí aj materiál na báze oxidu zirkoničitého ZrO_2 [1].

Na testovanie bioaktivity biomateriálov bola využívaná simulovaná telesná tekutina (SBF) s obsahom iónov podobným ľudskej plazme. Ide o acelulárne testovanie v *in vitro* simulovaných podmienkach, ktoré poskytnú výsledky správania sa biomateriálu v simulovanej telesnej tekutine. Po jej pôsobení na materiál je pozorovaná nová biologicky aktívna vrstva v podobe apatitov rôzneho tvaru a štruktúry [5].

Cieľom práce je výber vhodnej metódy prípravy biokeramického materiálu a jeho ďalšie testovanie v simulovanej telesnej tekutine. Zámerom je získanie aktuálnejších výsledkov prenosu vápenatých iónov z biokeramického materiálu v SBF pomocou UV/VIS spektrofotometrie. Na základe koncentrácie vápenatých iónov analyzovať vznik apatitových štruktúr na povrchu substrátu pomocou elektrónového mikroskopu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

Prvá časť práce sa zaoberá biokeramickými materiálmi, ich klasifikáciou a prípravou pomocou rôznych metód. Druhá časť je venovaná testovaniu biokeramických materiálov so zameraním na acelulárne testovanie *in vitro* pomocou simulovanej telesnej tekutiny (SBF).

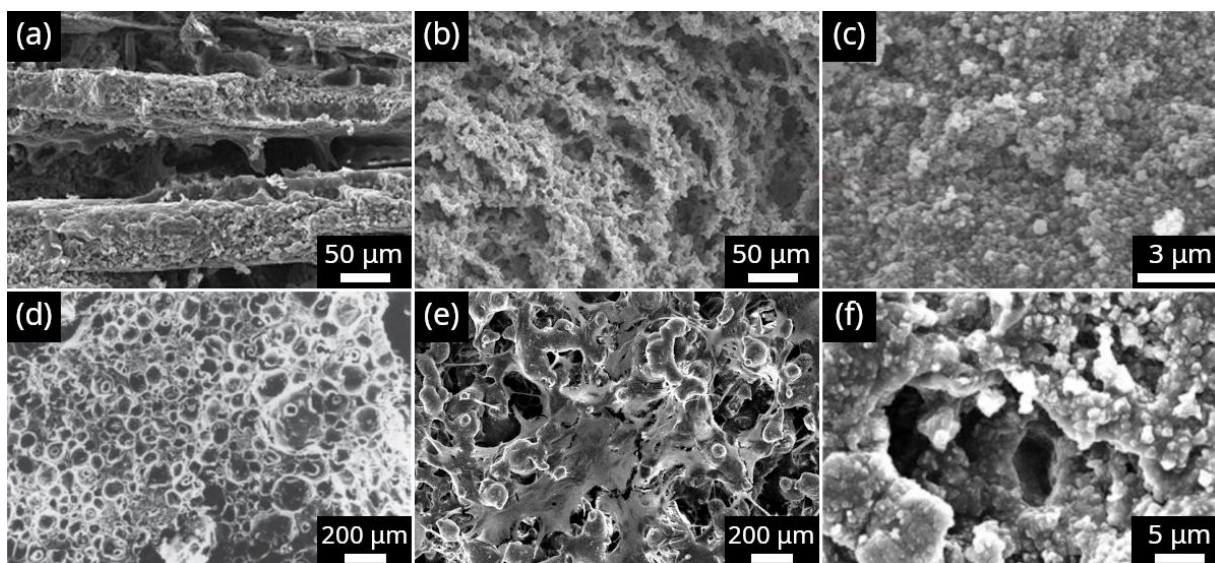
2.1 Keramika

Keramické materiály sú anorganické, nekovové materiály, podmienené okrem chemického a fázového zloženia aj mikroštruktúrou, ktorú možno ovplyvniť čistotou a zrnitosťou východiskových látok a ich technologickým spracovaním. Keramiku je možné definovať ako súdržnú, vo vode prakticky nerozpustnú polykryštalickú látku. Ide o zlúčeniny karbidov, nitridov, oxidov a komplexných zlúčenín, napríklad fosforečnany, hydroxyapatit atď. Keramický prášok je spracovaný do požadovaného tvaru pomocou tvarovacích techník a následne vypálený pri vysokej teplote. Počas vypálenia dochádza k procesu sintrovania, počas ktorého sa materiál spevní a je vytvorená určitá mikroštruktúra. Takto dôjde k vzniku kompaktného materiálu so špecifickými vlastnosťami. Keramika všeobecne vykazuje nízku tepelnú rozťažnosť. Ideálna štruktúra nastáva v prípade, ak je minimálny obsah pórov a prítomné chemické fázy sú rovnomerne rozložené. Medzi jej základné vlastnosti patrí pevnosť v tlaku, oteruvzdornosť, chemická odolnosť, žiaruvzdornosť a relatívne nízka hmotnosť. Keramika je odolná voči oxidácii a nepodlieha korózii. Niektoré druhy slúžia ako tepelný izolant alebo sú vodivé a používajú sa ako elektrotechnické súčiastky. Veľkou nevýhodou je jej krehkosť [5].

2.2 Biokeramika

Prvé zmienky v oblasti biokeramiky pochádzajú z 20-tych rokov minulého storočia, kde bola publikovaná štúdia o možnosti využitia vápenatých fosforečnanov v regeneračnej medicíne. V 70-tych rokoch prišiel profesor Larry Hench s veľkým objavom, kedy boli položené základy bioskla a došlo k vloženiu keramiky do kosti. Jeho cieľom bolo nájsť materiál, ktorý by odolal telesným tekutinám a zároveň bol pre ľudské telo ľahko prijateľný. Bioaktívne sklo je špeciálne sklo, ktoré je z prevažnej časti tvorené oxidmi kremíku. Pôvodná výroba „Bioglass 45S5“ sa zachovala a je využívaná dodnes [6].

Biokeramika je definovaná ako keramika používaná ako biomateriál. Keramické scaffoldy sú aplikované vďaka svojej biokompatibilite, odolnosti voči korózii, taktiež aj vďaka obsahu minerálnej zložky (predovšetkým hydroxyapatitu a vápenatých fosforečnanov). Ich vlastnosti sú podobné ľudskej kosti. Biokeramika je netoxická a má výborné využitie ako kompozit s čisto kovovými alebo polymernými materiálmi. Prakticky má uplatnenie v klinickej medicíne, či už v ortopédii, maxilofaciálnej chirurgii a stomatológii. Stretáme sa s ňou pri implantátoch v kraniálnych častiach lebky, otolaryngologických a dentálnych implantátoch, výmene bedrového alebo kolenného kĺbu (endoprotézy). Je využívaná aj vo forme kostného plniva a môže byť vyrobená v rôznych formách ako napr. pena, granule, povlak [1,7]. Obrázok 1 približuje zobrazenie týchto foriem pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM).



Obrázok 1: Zobrazenie rôznych foriem vyrobenej biokeraminy: (a,b) freeze-casting materiál [8], (c) materiál vyrobený 3D tlačou [9], (d) pena [1], (e) povlakovaný materiál [10] a (f) cement [11].

Biomateriály pri aplikácii do ľudského tela musia spĺňať základné podmienky, a to biokompatibilitu, bioaktivitu, mechanickú odolnosť (pevnosť v tlaku a ťahu), prípadnú resorbovateľnosť a vysokú chemickú a fázovú stabilitu. Biokompatibilita predstavuje mieru znášateľnosti ľudského tkaniva na daný implantát. Ide o dôležitú podmienku, kde si organizmus postupne vytvára protilátky pre svoju ochranu pred daným implantátom. Pokiaľ sa eliminuje riziko nebezpečenstva prenosu infekcie a imunitnej reakcie organizmu, je veľmi pravdepodobné, že organizmus prijme nový materiál v tele. Bioaktivita materiálu tvorí rozhranie medzi resorbovateľnosťou a inertnosťou použitých biomateriálov pri priamom naviazaní implantátu a tkaniva. Chemická inertnosť vedie k vytvoreniu tenkej vrstvy acelulárneho kolagénového puzdra na rozhraní, ktorá izoluje biomateriál od tela. Resorbovateľnosť pomáha pri obnove vlastného kostného tkaniva. Tieto materiály poskytujú stavebný materiál pri regenerácii a následne sú odstránené bunkovou aktivitou alebo sa rozpustia. Ak dané tkanivo reaguje tolerantne tak, že materiál nie je pre živé bunky toxický, nevyvoláva zápalové reakcie a nepôsobí mutagénne a karcinogénne, tým pádom celkový výsledok je úspešný [1,2,12].

V organizme dochádza k degradácii chemickej štruktúry implantátu a uvoľňovaniu iónov, ktoré umožnia plnohodnotne doplniť biogénne prvky vo fyziologickom prostredí ľudského organizmu. Medzi tieto ióny patria Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ . Ale taktiež dochádza k uvoľňovaniu toxických iónov, napríklad Al^{3+} a Ti^{2+} , avšak v bezpečných množstvách. Vlastnosti biokeramickej náhrady je možné porovnávať so živou kosťou, až na vyšší modul pružnosti oproti ľudskej kosti. Nastáva teda elastická nesúrodosť medzi kosťou a keramickým implantátom. Ak sú rozdiely priveľké nastáva aseptické uvoľnenie implantátu, tzv. „stress shielding“ [13].

2.2.1 Vápenaté fosforečnany

Pre vývin kosti je potrebný správny priebeh mineralizácie spojivového tkaniva. Záleží na syntéze amorfného CaP, ktorý predstavuje anorganickú zložku kosti. Dôležitý je vznik a metabolizmus fosforečnanov, na ktorom sa podieľa enzým alkalická fosfatáza (ALP).

Pre tvorbu hydroxyapatitu je potrebná zvýšená koncentrácia ALP. Tento enzým pomáha preniknúť hydroxyapatitu do kosti a zároveň uľahčuje jeho rast [14].

Keramické kompozity na báze apatitu a jeho derivátov, predovšetkým hydroxyapatitu zaraďujeme medzi biokeramiku. Apatit je základná anorganická zlúčenina, ktorá je prírodnou zložkou oporného systému stavovcov. V kostiach cicavcov, a teda aj človeka, ich je približne 60%, v zubnej sklovine dokonca až 90%. Biologický apatit patrí medzi stavebné zložky ľudskej kosti spolu s organickou makromolekulou kolagénom.

Hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ je zatiaľ jeden z najdôležitejších implantovaných materiálov do ľudských tkanív vďaka svojej biokompatibilite, bioaktivite a podpore osifikačného procesu. Medzi negatívne vlastnosti hydroxyapatitu patrí krehkosť a nízka ťažnosť. Toto je dôvod, prečo implantáty majú malé rozmery alebo sa používa ako povlak na kovovú protézu. Hydroxyapatit sa využíva vo forme sférických častíc v objemovej keramike, ale viac známe sú v medicíne hydroxyapatitové granule, ktoré sú aplikované ako pevná výplň kosti. Najčastejšie sa využíva vo forme doštičkových teliesok po rôznych poúrazových operáciách alebo pri náhrade kostného tkaniva [15]. Významnou aplikáciou je tzv. „bio-oko“, čo je očná protéza, kde sú očné svaly schopné sa naviazať na bioaktívny implantát. Okohybné svaly sa správajú k implantátu ako k zdravému oku [16,17].

Medzi vápenaté fosforečnany zaraďujeme aj biokeramiku s obsahom trikalciumfosfátu (TCP). Vyskytuje sa v dvoch formách α -TCP a β -TCP kryštalickej štruktúry. Sú využívané vďaka osteokonduktivite a osteoinduktivite na regeneráciu kostných defektov. Stabilita α -TCP je silne ovplyvnená iónovými substitúciami, je rýchlejšie rozpustný ako β -TCP. Napriek tomu je viac využívaná forma β -TCP vďaka jej rýchlejšej a jednoduchšej príprave a väčšej stabilite [18,19].

Rozpustnosť vápenatých fosforečnanov závisí na pomere Ca/P. Závisí aj od pórovitosti materiálu, kde sa môže po sintrovaní zvýšiť rozpustnosť týchto fáz. TCP sa rozpúšťa v tele, kde je nahradený okolitým tkanivom [1].

2.3 Metódy prípravy biokeramických materiálov tvarovaním

Pripraviť biokeramický materiál je možné viacerými spôsobmi. Podľa využitia a umiestnenia materiálu sa vyberá najvhodnejšia metóda. Každá metóda poskytuje výslednému materiálu iné špecifické vlastnosti, ako napríklad rôzna veľkosť pórov, zrnitosť, tvrdosť či záverečná hustota. Chyby, ktoré vznikli počas tvarovacieho procesu sú trvalé, nie je ich možné odstrániť.

S rastúcimi aplikáciami keramiky sa zvyšujú nároky na tvarovacie metódy, ktoré musia byť schopné pripraviť dokonalý keramický produkt s homogénnou a jemnou štruktúrou. Podľa stavu v akom sa nachádza prášok, môžeme rozlišovať metódy na suché, mokré alebo plastické tvarovanie. Špeciálnou metódou je tvarovanie bez foriem „solid freeform fabrication“ [20].

2.3.1 Suché tvarovacie metódy

Jednou z najčastejších tvarovacích metód je lisovanie za sucha. Produkt drží pohromade vďaka vnútorným silám a malému množstvu spojiva, ktoré je obsiahnuté v prášku. Podľa pôsobenia síl, ktoré vo forme tvarujú teleso, rozlišujeme typy lisovania [21]:

Jednoosé lisovanie

V prípade jednoosého lisovania je prášok stlačený v oceľovej forme pomocou sily, ktorá pôsobí iba na jednej osi. Produkt získava tvar formou, na ktorú je vyvíjaná sila. Táto metóda je určená k jednoduchému tvarovaniu a je využívaná vďaka nízkym nákladom a možnosti jednoduchej automatizácie. Nevýhodou je, že telesá sú stlačené nehomogénne a nie je možné pripraviť komplexnejšie prípadne detailnejšie tvary [1].

Izostatické lisovanie za studena (CIP-cold isostatic pressing)

CIP je používané ak je potrebné homogénnejšie stlačenie prášku. Ten je nasýpaný do tlakovej nádoby a vystavený všestrannému tlaku. Médium v tlakovej nádobe môže byť kvapalné (olej) alebo plynné (argón, hélium). Nevýhodou je deformácia produktu v gumovej forme [21].

2.3.2 Mokrú tvarovacie metódy

Z keramického prášku je pripravená stabilná suspenzia s rôznym obsahom polymerného spojiva, ktorá je následne za pomoci rôznych nástrojov tvarovaná.

Slip casting

Suspenzia je odliata do poréznej formy, zväčša tvorená sadrou ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Z časti suspenzie, ktorá je v kontakte s formou, začína dôsledkom kapilárnych síl vznikajúcich v póroch formy vzniká pevná vrstva keramického materiálu. Keď produkt dosiahne požadovanú hrúbku, zbytok suspenzie je vyliaty a produkt sa nechá vysušiť. Suspenzné liatie je vhodná metóda pre formovanie dielov s tenkými stenami a pre komplexné tvary [1].

Gel casting

Základom tohto procesu je suspenzia keramických častíc dispergovaných v roztoku monomérov. Tento roztok je naliaty do formy, v ktorom monoméry polymerizujú a vytvoria spojovaciu fázu, tzv. gél. Polotovár tak získava pevnosť a je možné ho ešte vlhký vytiahnuť z formy. Následne je vysušený a vhodnou metódou je odstránené spojivo. Metóda je využívaná pre vznik tvarovo zložitejších homogénnych produktov [22].

Tape casting

Táto metóda je vhodná pre tvarovanie tenkých pásov pomocou liatia. Tieto pásy vznikajú sklznutím keramickej suspenzie po hladkom povrchu. Následne nôž nazývaný „doctor blade“ rovnomerne vytvára tenký film keramickej suspenzie o hrúbke približne 0,1 – 2 mm [1].

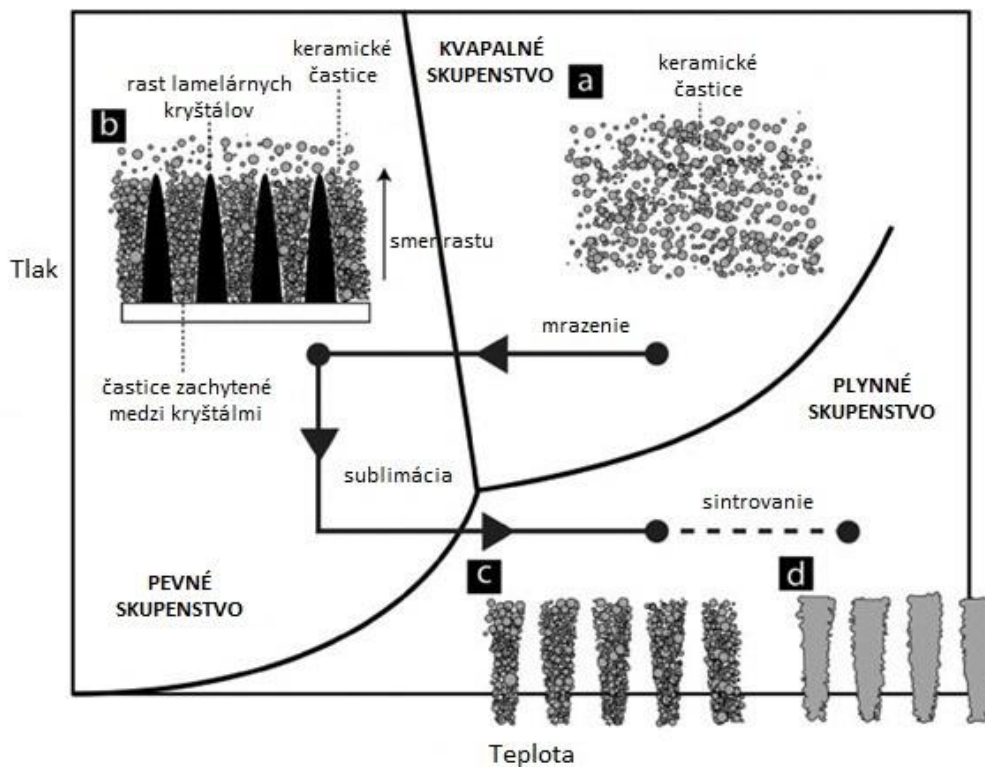
2.3.3 Tvarovanie bez použitia formy

Solid freeform fabrication je metóda používaná u spracovateľných technológií, ktoré umožňujú výrobu polotovarov s istou geometrickou zložitou priamo bez použitia formy. Väčšinou ide o tvarovanie z dopredu vytvoreného virtuálneho modelu a následná depozícia materiálu priamo na miesto, kde je to požadované. Do tejto skupiny metód patrí aj 3D tlač. Predstavuje metódu vytvárania 3D keramických predmetov bez využitia formy, kde sa postupne nanášajú jednotlivé vrstvy keramickej suspenzie. Vďaka tomuto postupu je implantát vyrobený priamo na mieru pacienta [22].

2.4 Freeze-casting

Metóda známa aj pod pojmom „ice-templing“. Predstavuje proces odlievania keramickej suspenzie pri kontrolovanom mrazení. Túto metódu je možné využiť pre množstvo rozdielnych keramických materiálov. Častice pripravovaných materiálov musia byť dobre dispergované v suspenzii. Problémom môže byť sedimentácia suspenzie alebo nežiadúca chemická reakcia častíc s ostatnými zložkami.

Na Obrázku 2 je postup spracovania metódou freeze-casting. Na začiatku sú častice dispergované v suspenzii. Následne je suspenzia zamrazená, kde je pozorovaný vznik kryštálov rozpúšťadla, ktoré sú orientované kolmo na mrazený substrát. Navzájom rovnobežné častice sa šíria v smere teplotného gradientu, ktorý je v optimálnom stave. Čo znamená, že teplota ostáva v rôznych častiach pevnej látky konštantná nezávisle od času. Mrznutie prebieha väčšinou iba v jednom smere. Porézna štruktúra je dosiahnutá zväčšovaním kryštálov, ktoré koncentrujú keramicke častice do strán. Ľadové kryštály sú odstránené vo vákuu pomocou lyofilizácie. Scaffold, ktorý vznikol je následne sintrovaný, aby materiál dosiahol požadované mechanické vlastnosti [23,24].



Obrázok 2: Spracovanie metódou freeze-casting [8].

2.4.1 Proces mrazenia

Vznik ľadových kryštálov a ich rast závisí na rýchlosti zmrazenia. Tým pádom narastá koncentrácia keramických častíc. Počas tuhnutia môže dôjsť k neúplnému vytesneniu častíc, kedy sa uzavrujú medzi rastúcim ľadom. V takom prípade vznikajú poškodené scaffolds s chybou poréznu štruktúrou. Výslednú štruktúru a mechanické vlastnosti keramickeho materiálu najviac ovplyvňuje teplotný gradient. Keramicke častice sú počas mrazenia

ovplyvňované interakciami príťažlivých a odpudivých síl, ktoré vznikajú na rozhraní skupenstiev pevná látka-kvapalina (Obrázok 2). Hodnota pomeru príťažlivých a odpudivých síl je udávaná veličinou kritickej rýchlosti mrazenia, ktorá hovorí či budú častice zachytené v narastajúcom ľade alebo nie [25,26].

Proces mrazenia keramickej suspenzie má tri zóny. V počiatočnej zóne dochádza k veľmi rýchlemu rastu ľadových kryštálov, pretože suspenzia sa nachádza v nestabilnom podchladenom stave. Vzniká hutná vrstva keramických častíc a ľadu. V prechodnej zóne dochádza k ustáleniu rýchlosti tvorby kryštálov na konštantnú, rast ľadových kryštálov je spomalený a nastáva zmena mikroštruktúry. Častice začínajú byť koncentrované do strán, kde kryštály rastú v dvoch smeroch. Rast v radiálnom smere je postupne zmenený na rast za vzniku lamelárnej štruktúry, ktorý vzniká v smere mrznutia [27,28]. Poslednou fázou je zóna rastu pravidelnej lamelárnej štruktúry, pretože je energeticky aj termodynamicky prispôsobená teplotnému gradientu. Pomocou rýchlosti mrazenia je možné ovplyvniť hrúbku lamiel [29].

2.4.2 Výsledná štruktúra scaffoldu

Celková štruktúra výsledného scaffoldu je z väčšej časti lamelárnej štruktúry. Výslednú štruktúru je možné výrazne ovplyvniť. Vzhľadom na to aký typ rozpúšťadla je použitý, je ovplyvnený rast ľadových kryštálov. Pokiaľ bola ako rozpúšťadlo zvolená voda, je dôležité aby pri zamrzaní bol dodržaný iba jeden rast kryštálov a vznikla tak správne orientovaná lamelárna štruktúra. Pri použití terc-butylalkoholu (TBA) ako rozpúšťadla vzniká iný druh pórov, hexagonálne póry. Pokiaľ je použitý kamfen, vznikajú celulárne póry. Štruktúru vie ovplyvniť aj veľkosť keramických častíc. V prípade častíc s nedostačujúcou veľkosťou môže nastať stav kedy vzniká nedokonalá štruktúra vďaka časticiam uviaznutých v ľade. Pri zvýšenej koncentracii keramických častíc sa znižuje výsledná porozita scaffoldu.

Ako aditíva vo vodných keramických suspenziách je možné pridávať kryoprotektanty, ktoré obvykle posúvajú bod tuhnutia vody. Veľkosť pórov ovplyvňujú znižovaním veľkosti vznikajúcich pórov. Vhodný pomer prídavku glycerolu prispieva k zníženiu bodu tuhnutia a objemovej rozťažnosti vody. Pomocou sacharózy, ktorá je do suspenzie pridaná ako aditívum, je možné ovplyvniť vznik medzilamelárnych mostíkov, ktoré ovplyvňujú mechanickú odolnosť výsledného materiálu. Všetky pridané látky sú odstránené počas procesu slinovania scaffoldu [23,29,30].

2.4.3 Lyofilizácia

Súčasťou celého spracovania po metóde freeze-casting, je proces sublimácie ľadu zo zamrznutého materiálu vo vákuu. Vzniknuté ľadové kryštály sú počas lyofilizácie odstránené bez poškodenia štruktúry.

Celý proces sa delí na dve časti. V prvej časti počas sublimácie ľadu je za zníženého tlaku privádzané teplo do keramického materiálu. Vodná para je následne odvádzaná preč vývevou. V druhej časti procesu nastáva desorpcia vody zo scaffoldu, ktorá nezamrzla a ostala v materiáli [31].

2.4.4 Sintrovanie

Spracovanie keramického materiálu pokračuje procesom sintrovania. Inak nazývaným ako spekanie alebo slinovanie. Je to metóda kedy je surová keramika zahriata na vysokú teplotu, ale zároveň pod jej teplotu topenia. Dochádza k difúzii častíc v pevnej fázi. Ide o proces zhutňovania a formovania tuhej hmoty. Týmto procesom je možné znížiť pórovitosť a zlepšiť pevnosť materiálu.

Pred procesom sintrovania je potrebné prášok pripraviť požadovanou metódou prípravy keramického materiálu. Všeobecne materiál, ktorý nie je sintrovaný sa nazýva „green body“. Nasleduje zahrievanie pri nízkej teplote, aby sa spálili všetky nadbytočné pridané látky okrem keramického plniva. Aby sa spojili keramické častice nastáva sintrovanie pri vysokej teplote [1].

2.5 Testovanie biokeramických materiálov

Na overenie vlastností biomateriálu musí byť biokeramický materiál testovaný viacerými druhmi testov. Aby bola zabezpečená účinnosť a bezpečnosť materiálu je potrebné vykonať komplexné *in vitro* testy, nasledované *in vivo* testovaním. Pokiaľ materiál prešiel úspešne pokračuje na klinické testy a po jeho schválení je využívaný v praxi.

2.5.1 Acelulárne testovanie

Testovanie bioaktivity biokeramických materiálov je prevedené v *in vitro* simulovaných podmienkach. Je to základnou požiadavkou pre implantáciu biomateriálu, aby sa na jeho povrchu bola schopná vytvoriť vrstva kostného apatitu a tým sa naviazal na živú kosť. Tvorbu apatitovej vrstvy je možné reprodukovať v simulovanej telesnej tekutine (SBF) o koncentrácií iónov takmer rovnakých ako v ľudskej krvnej plazme, vďaka čomu je možné predpokladať vznik apatitu pri implantácii na ľudskú kosť [5].

Ako prvý sa o testovanie biokeramických materiálov s možnosťou využitia SBF zaslúžil Kokubo et al. [33]. Prišiel s názorom, že na povrchu materiálu je schopný skúmať vznik apatitovej vrstvy po ponorení v SBF. Musí byť však zachovaná teplota a fyziologické pH. Vďaka mikro röntgenovej difrakcii bola identifikovaná vrstva kryštalického apatitu. Nezávisle na sebe bola potvrdená tvorba apatitu na Bioglass 45S5 doktorom Kokubom aj profesorom Henchom. Vďaka tenkovrstvovej röntgenovej difrakcii, infračervenej spektroskopii s Fourierovou transformáciou, SEM a TEM bolo zistené, že štruktúra aj zloženie je podobné kostnému apatitu. V pôvodnej SBF neboli zahrnuté ióny SO_4^{2+} , ktoré sa taktiež nachádzajú aj v ľudskej krvnej plazme. V ďalšom skúmaní SBF, už tieto ióny boli pridané (c-SBF). Časom vznikali iné typy SBF o rôznej koncentrácií iónov ako je možné vidieť v Tabuľke 1. Pre dosiahnutie rovnakej celkovej koncentrácie iónov v SBF ako v krvnej plazme vznikla r-SBF. Zhodná koncentrácia disociovaných iónov sa nachádza v i-SBF. V prípade, že koncentrácie HCO_3^- má odpovedať hodnote nasýtenej tekutiny, tak zbytok iónov bude odpovedať krvnej plazme. Takto bola pripravená modifikovaná SBF [5,34].

Tabuľka 1: Koncentrácie iónov ľudskej krvnej plazmy a rôznych typov SBF v mM [34].

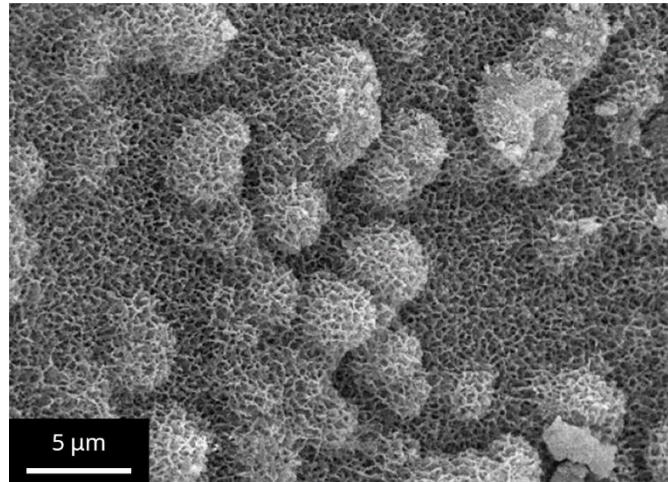
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Krvná plazma*	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Pôvodná SBF**	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,0
Upravená (c-SBF)**	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Tas-SBF**	142,0	5,0	1,5	2,5	125,0	27,0	1,0	0,5
Bigi-SBF***	141,5	5,0	1,5	2,5	124,5	27,0	1,0	0,5
Revidovaná (r-SBF)***	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Modifikovaná (m-SBF)***	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	10,0	1,0	0,5
Ionizovaná (i-SBF)***	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5
Vylepšená (n-SBF)**	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5

pozn. *nebol použitý žiadny puľrovací roztok, **TRIS, ***HEPES

Zmena koncentrácie zložiek a posun rovnováhy SBF je zapríčinený stretom s bioaktívnou látkou. V prípade získania výsledkov o zmene koncentrácie iónov bola r-SBF a i-SBF uzatvorená v nádobe so vzorkou pri 36,5 °C. Bolo preukázané, že počas dvoch týždňov koncentrácia iónov ani pH nezmenili svoju hodnotu. V priebehu ďalších dní, nasledoval proces, kedy sa v SBF znižuje koncentrácia HCO₃⁻ a dochádza k zvýšeniu pH. Pri použití rovnakých podmienok pre c-SBF a m-SBF došlo k zmene koncentrácie a pH až po dobe ôsmich týždňov. Čo znamená, že v závislosti na zmene koncentrácie iónov sú c-SBF a m-SBF oproti r-SBF a i-SBF stabilnejšie [34].

Typ Tas-SBF a Bigi-SBF sa líši iným puľrovacím roztokom, ktorý bol pri príprave použitý. Tas-SBF vytvára apatitovú vrstvu podobnú podsade a na jej vrchu sa nachádzajú guľôčky CaP. Revidovaná SBF nie je schopná vytvoriť podkladovú vrstvu. V prípade, že materiál bol vložený do SBF vertikálne, bol eliminovaný nepravidelný vznik guľôčok a zlepšenie apatitového povlaku. Napriek tomu bolo zistené, že Tas-SBF vykazuje najlepšie výsledky vzniku CaP povlakov, pretože sú vhodné na prichytenie a rast kostných bunie - osteoblastov v porovnaní s c- a r-SBF. Tieto testy boli prevedené na materiále Ti₆Al₄V, ktorý bol horizontálne ponorený v c-SBF, r-SBF a Tas-SBF [35].

Aby boli zlepšené mechanické a biologické vlastnosti scaffoldu z β-TCP, do skeletu boli pridané nano častice SiO₂ a MgO. Testovaním pomocou SBF bola preukázaná strata hmotnosti scaffoldov a vytvorenie apatitovej vrstvy. Na Obrázku 3 je vidieť vznik apatitovej vrstvy vo forme, ktorá sa nazýva „cauliflower“ [36].



Obrázok 3: Obrázok SEM materiálu β -TCP/SiO₂ po 4 týždňoch ponorenia v SBF [36].

Vznik apatitovej vrstvy závisí od rozpustnosti bioaktívneho materiálu ponoreného v SBF, ktorý je ovplyvnený fázovým zložením, teplotou alebo pH. Dôležitá je kinetika rozpúšťania v závislosti na porozite, veľkosti kryštálov biokeramického materiálu, ale aj výbere zloženia a použitia imerzného roztoku. Imerzný roztok silne ovplyvňuje resorpciu skúmaného materiálu. Pri vzniku apatitu je pravdepodobná aj konverzia použitého materiálu či zrážanie vďaka inej rýchlosti rozpustnosti látok v danom materiáli. Vo fyziologických podmienkach majú vápenaté fosforečnany viaceré fázy rozpustnosti (CaO » α -TCP » β -TCP » amorfný fosforečnan vápenatý » tetrakalcium fosfát » oxyhydroxyapatit/oxyapatit » hydroxyapatit) [37]. Podľa Gallo a kol. nastávajú najrýchlejšie a najvýraznejšie zmeny pri použitom väčšom množstve média, čo súvisí s množstvom iónov, ktoré môžu byť rozpustené v médiu, pred tým ako dôjde k nasýteniu alebo opätovnému vyzrážaniu [38].

Judith A. Juhasz a kol. vykonala experiment, kde pomocou röntgenovej difraktometrie (XRD) zistila, že pokiaľ bolo do SBF namočené TCP, prítomnosť špičiek hydroxyapatitu bolo pozorované po siedmych dňoch ponorenia. Pri ponorení hydroxyapatitu do SBF nebola pozorovaná významná stopa v XRD so zvyšujúcim sa časom ponorenia. Využitie SEM dokázalo, že na povrchu bola vytvorená apatitová štruktúra, ktorá sa prejavovala vo viacerých podobách. Bolo zistené, že s nárastom času ponorenia by mal mať biomateriál kineticky stabilnejšiu štruktúru [39].

Pre vznik apatitovej vrstvy pre väzbu ku kosti je dôležitá povrchová chemická reakcia materiálu, vďaka funkčným skupinám materiálu. Bolo zistené, že vznik apatitu závisí od negatívnej skupiny OH⁻ a PO₄³⁻. Zabezpečujú veľké množstvo záporných iónov na povrchu, čo má počas inkubácie pozitívny vplyv na reakciu s Ca²⁺ iónmi z SBF. Kladne nabité ióny v SBF sú priťahované záporným povrchom materiálu čo vedie k vzniku apatitovej vrstvy. Bolo zistené, že kryštáliky zo začiatku rastú oddelene, čo znamená, že pórovitosť v jednotlivých zrnách sa zvyšuje, a tým pádom sa zvyšuje aj bioaktivita skúmaného materiálu. Tvorba fáz vzniku vrstvy bola identifikovaná pomocou XRD po 30 a 50 dňoch [40].

Bolo zistené, že pre vznik apatitovej vrstvy je dôležitá štruktúra materiálu. Pri použití nanokryštalickej štruktúry je k dispozícii väčší počet miest pre tvorbu apatitu kvôli vysokej povrchovej energii na okrajoch zrn, čo prispieva k rýchlejšej kryštalizácii. Záleží aj na type podmienok. Pri dynamických podmienkach, kedy bol nastavený prietok média 2 ml/h počas

4 dní testovania amorfný HAP nepreukázal vznik apatitovej vrstvy, avšak kryštalický HAP indukoval vznik tejto vrstvy [37,41].

2.5.2 Detekcia vápenatých iónov

Počas inkubácie skúmaného materiálu dochádza k reakcií vápenatých iónov. Pre overenie je možné použiť viaceré metódy a na potvrdenie využiť rôzne analyzátory.

Nepriame spektrofotometrické stanovenie vápenatých iónov bolo určené pomocou nepriameho stanovenia cez molekulu. Je potrebné využiť reagent, vďaka ktorému bude analyzátor schopný zachytiť zmenu absorbancie oproti blanku. Jednoduchým riešením je zakúpenie kitu, ktorý obsahuje vhodné reagentie o potrebnom zložení pre danú detekciu. Dôležitý faktor je koncentračný rozsah vhodný pre skúmanú látku. Časovo náročnejším riešením je vlastná príprava reagentu. Overenou kolorimetrickou metódou už od 1953 je využitie purpurátu amónneho inak nazývaného murexid. Tvorba farebného komplexu medzi simulovanou tekutinou a murexidom je zvislá na pH roztoku, preto počas spektrofotometrického merania musí byť dodržané rovnaké pH. Bolo zistené, že so zvyšujúcim sa pH stabilita murexidu klesá. Pri príprave roztoku murexidu je dôležité pomalé rozpúšťanie práškoveho murexidu pomocou etanolu vo vode, ktorý poskytuje najpomalší rozklad [42].

2.5.3 Fázové zloženie

Ako bolo spomínané vyššie na určenie kryštalických fáz v biomateriále sa využíva metóda röntgenová difraktometria (XRD).

Bolo zistené, že na fázové zloženie má vplyv veľkosť zŕn, morfológia, hustota neslinutého materiálu, či jeho povrch, ale aj technika tvarovania materiálu. Počas spekania dochádza k fázovej premene HAP na β -TCP, kde zohráva hlavnú úlohu difúzia. Hydroxyapatit a β -TCP majú rozdielne chemické zloženie, rozpustnosť a rýchlosť degradácie, ktorá je výrazne ovplyvnená teplotou. Komplexná fázová transformácia vyžaduje teplotu nad 1100 °C [43].

Analýza XRD vykonaná na kalcinovanom prášku, ktorý obsahuje 60 % HAP, ukázala, že množstvo HAP počas kalcinácie kleslo o 30% oproti pôvodnému prášku, ktorý obsahoval najmenej 90% HAP. Pomocou XRD bolo zistené, že vzorky izostaticky lisované za studena majú fázové zloženie spomedzi všetkých skúmaných materiálov najvyšší obsah β -TCP [44].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V tejto časti práce je súbor prakticky získaných poznatkov z výskumného laboratória a popis vykonávanej činnosti.

3.1 Zoznam použitých chemikálii a prístrojov

Chemikálie pre suspenziu freeze-casting

- *Polývinyľalkohol (PVA)*, výrobca: Sigma-Aldrich, $M_r= 61,00$
- *Dolapix CE64*, výrobca: Zschimmer & Schwary GmbH & Co. KG
- *Oktanol*, výrobca: Fluka AG-Honeywell Research Chemicals
- *Sacharóza*, výrobca: (konzumný cukor kryštálový)
- *Hydroxyapatit prášok (HAP)*, výrobca: Sigma-Aldrich

Chemikálie pre SBF

- *Chlorid sodný (NaCl)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Hydrogénuhličitan sodný (NaHCO₃)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Chlorid draselný (KCl)*, výrobca: PENTA s.r.o.
- *Trihydrát fosforečnanu draselného (K₂HPO₄·3H₂O)*, výrobca: PENTA s.r.o.
- *Hexahydrát chloridu horečnatého (MgCl₂·6H₂O)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Kyselina chlorovodíková 1M (HCl 35%)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Chlorid vápenatý (CaCl₂)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Síran sodný (Na₂SO₄)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.
- *Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)*, výrobca: Lach-Ner, s.r.o.

Prístroje

- analytické váhy METTLER TOLEDO
- chladiaca doska Medite
- lyofilizátor
- vysokoteplotná pec CLASIC
- unaxiálny lis BSML 21
- isostatický lis (CIP) KIP 300 E
- magnetická miešačka
- pH meter METTLER TOLEDO
- termostat Orbital Shaker-Incubator ES-20
- váhy pre analytické stanovenie hustoty METTLER Density Kit
- UV/VIS spektrofotometer V-10 Plus ONDA
- skenovací elektrónový mikroskop s vysokým rozlíšením FEI Verios 460L (VERIOS)
- röntgenový práškový difraktometer Rigaku SmartLab 3kW (RIGAKU3)

3.2 Príprava biokeramickej suspenzie

Medzi často využívané spojivo patrí polyvinylalkohol (PVA), ktorý poskytuje vysokú pevnosť a mechanickú stabilitu neslinutému keramickému telesu „green body“. Keramickej suspenzii dodáva vyššiu stabilitu.

Ako disperzant v pripravovanej HAP suspenzii bol použitý Dolapix CE64. Jeho funkciou je kontinuálne rozloženie hydroxyapatitových častíc v suspenzii.

Oktanol slúži na elimináciu bublín, ktoré sa vytvárajú počas miešania v suspenzii.

Pri procese vytvárania lamiel pri mrazení napomáha sacharóza, bežne využívaný kuchynský cukor. Pri jej použití vznikajú lamely s lepšimi mechanickými vlastnosťami a väčším množstvom medzilamelárných mostíkov.

Poslednou zložkou je keramický prášok a tým je hydroxyapatit. Použitý prášok bol upravený kalcináciou. Ide o proces eliminácie uhličitanov z komerčne predávaného prášku. Celý proces kalcinácie trvá 1 hodinu a je prevedený v peci pri teplote 800 °C.

Presné zloženie biokeramickej suspenzie je popísané v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Zloženie keramickej suspenzie 15% HAP.

Chemikálie	Hmotnosť [g]	Obj. zastúpenie [% obj.]
Hydroxyapatit	30,0	15,1
Polyvinylalkohol	51,6	80,7
Dolapix CE64	2,0	2,8
Oktanol	0,8 (3 kvapky)	1,0
Sacharóza	2,6	-

Na prípravu keramickej suspenzie bol použitý 1% roztok PVA. Bol pripravený vodný kúpeľ, ktorý bol ohriaty na teplotu 97 °C. Do určenej nádoby bolo prevedených 1000 ml demineralizovanej vody a vložené magnetické miešadlo. Na laboratórnych váhach bolo navážených 9,61 g kryštálikov PVA, ktoré boli vysypané do pripravenej nádoby s demineralizovanou vodou. Nádoba bola dobre uzavretá a vložená do kúpeľa. Bolo zapnuté miešadlo na približne 250-255 otáčok. Celkové rozpustenie bolo možné dosiahnuť približne po 45-tich minútach. Až po vychladnutí bolo možné použiť pripravený roztok.

Do pripravenej plastovej nádoby boli vložené miešacie guľičky z materiálu ZrO₂, kvôli tomu, aby sa počas miešania zhomogenizovali veľké aglomeráty keramického prášku. Ako prvé boli navážené mokré časti suspenzie až potom suché. Na začiatok bol navážený pripravený roztok PVA, ktorý poskytuje disperzné prostredie a funguje ako spojivo. Ako aditívum na zníženie povrchového napätia a elimináciu bublín v suspenzii bol pridaný oktanol. Ako disperzant bol použitý Dolapix CE64, ktorý zabraňuje zhukovaniu častíc. Pre keramickú suspenziu poskytuje stabilitu, čo znamená, že suspenzia si zachováva stálosť v čase, t.j. nesedimentuje. Ďalšie aditívum, ktoré bolo pridané je sacharóza. Práškový hydroxyapatit, ktorý zastáva úlohu keramickej zložky ako plnivo. Celá suspenzia bola priebežne premiešaná.

V konečnej fáze bola nádoba uzatvorená a umiestnená na miešacie valce, kde bola ponechaná minimálne 24 hodín.

3.3 Aplikácia metódy freeze-casting

Pred začatím procesu je prvý krok dostatočné odvzdušnenie premiešavanej keramickej suspenzie v exikátore pomocou vývevy. Ďalším krokom bolo zloženie foriem a ich predchladenie. Následne boli umiestnené na chladiacu dosku a vyplnené naliatím suspenzie. Naplnené formy boli umiestnené na hliníkové doštičky, ktoré boli zalievané tekutým dusíkom. V prípade potreby bol dusík prilievajú. Doba mrazenia trvala približne 25 minút.

V nasledujúcom kroku boli formy vložené do mrazničky, odkiaľ boli vyberané a postupne bol rozobraný valček s tyčinkami. Tyčinky boli vytlačené z trubičky a vrátené do mrazničky. Po dokončenom procese rozobratia všetkých valčekov boli tyčinky umiestnené do lyofilizátora, kde prebiehala sublimácia ľadových kryštálikov. Proces lyofilizácie prebiehal približne 16 hodín. Presný čas ukončenia závisel na hodnote tlaku vo vnútri exikátora a teplote vzoriek.

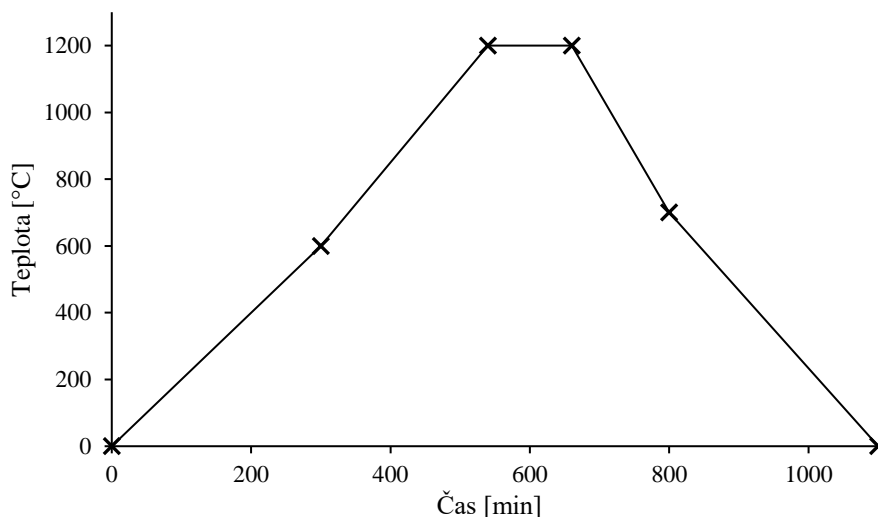
3.3.1 Popísanie foriem

Formy boli vytvorené pomocou programu 3D CAD a vytlačené na 3D tlačiarni, ktorá bola k dispozícii. Pre tlač bol použitý materiál polykyseliny mliečnej (PLA). Výška valcovitej formy bola určená na 45,5 mm s vnútorným priemerom 25,4 mm. Celá forma je zložená zo štyroch častí, a to troch rozoberateľných častí a podstavou. Podstava obsahuje vo vnútri medený valček, ktorý slúži pri mrazení ako vodič medzi chladiacou doskou a keramikou suspenziou.

Vnútro formy bolo vyplnené plastovými trubičkami do celého objemu. Bolo dôležité vyplniť trubičky suspenziou bez bublín, preto boli na plnenie využité injekčné striekačky s ihlou. Po ukončení procesu boli získané biokeramické tyčinky.

3.4 Vhodný proces sintrovania

Záverom celého procesu získania hutného materiálu a tyčiniek, ktoré môžu byť ďalej implementované je sintrovanie. Vzorky boli umiestnené na špeciálnu pripravenú Al_2O_3 doštičku a umiestnené do pece. Bol nastavený program sintrovania a pec bola spustená. Po ukončení procesu boli vzorky ponechané v peci do doby jej vychladnutia a následne boli vybraté. Počas sintrovania dochádza k určitým teplotným zmenám v čase. Proces sintrovania je graficky znázornený na Obrázku 4.



Obrázok 4: Grafické znázornenie tepelných zmien počas procesu sintrovania.

3.5 Lisovanie

Ďalším skúmaným materiálom sú tabletky vytvorené z prášku dvojfázovej zmesi 60 % hmot. β -TCP a 40 % hmot. hydroxyapatitu. Kde je prášok prvotne predlisovaný pomocou formy v uniaxiálom lise a následne vytvorené tabletky sú izostaticky vylisované do konečného stavu.

Uniaxiálne lisovanie

Forma je kovového materiálu zložená z malého piestu, valcovitej formy o požadovanom priemere a veľkého piestu. Na laboratórnych váhach bolo navážených približne 0,5 g HAP prášku. Do valcovitej formy o veľkosti 16 mm, bol zo spodnej časti vložený malý piest. Následne bol do formy vsypaný navážený prášok a zatlačený veľkým piestom. Pre tlak 10 MPa bola nastavená sila 2 kN. Po odobratí piestu bola z formy vybratá tabletká.

Izostatické lisovanie za studena (CIP)

Dopredu predlisované tabletky boli zabalené do špeciálnych prezervatívov, ako ochrana proti kontaminácii pred vysokotlakovým olejom. Pomocou vývevy bol z prezervatívu vytiahnutý vzduch a ten bol dobre uzavretý. Takto pripravené tabletky boli umiestnené do sieťky a vložené do komory prístroja. V ďalšom kroku bol vybraný program lisovania, kde boli nastavené parametre programu tlak 250 MPa, lisovacia sila 707 kN a výdrž v tlaku 5 minút. Po skončení programu boli vrstvy prezervatívov pozorne odobrané. Nasledoval proces sintrovania za takých istých podmienok ako bolo spomínané vyššie (Obrázok 4).

3.6 Meranie hustoty pripravených scaffoldov

Meranie hustoty bolo vykonané pomocou Archimedovej metódy (ČSN EN 623-2) [45]. Aby mohli byť vzorky zvážené na analytických váhach, boli pred vážením 24 hodín sušené pod infralampou. Bola zapísaná hodnota suchej hmotnosti m_s v gramoch s čo najväčšou presnosťou a aj hodnota teploty vody vo váhach. V ďalšom kroku boli vzorky umiestnené do špeciálneho exikátora. Pomocou vývevy boli odvzdušnené po dobu 30 minút. Následne bola na vzorky pustená destilovaná voda so zmáčadlom. Vývevou bol priestor odvzdušnený ďalších

30 minút. Po uplynutí tohto času boli vzorky vybraté z exikátora a nechané voľne ďalších 30 minút. Následne boli vzorky odvážené v kvapaline váh tak, že boli vložené do košíčku a ponorené. Bola zapísaná hmotnosť m_A . Na záver boli vzorky osušené a zvážené, čím bola získaná hmotnosť m_P . Ako posledný krok boli scaffolds umiestnené pod infralampu na vysušenie. Výpočet relatívnej hustoty pre tyčinky pripravené metódou freeze-casting bol prevedený podľa vzorca:

$$\rho_{rel} = \frac{m_S \cdot \rho_{H_2O}}{(m_P - m_A) \cdot \rho_{teor}} \cdot 100 \quad (1)$$

kde m_S je hmotnosť suchého vzorku, m_P je hmotnosť vzorku meraného v kvapaline, m_A je hmotnosť nasiaknutej vzorky. Hustota H_2O je daná podľa teploty vody vo váhach. Teoretická hustota je dopočítaná vzťahom:

$$\rho_{teor} = (x_{\beta-TCP} \cdot \rho_{\beta-TCP}) + (x_{HAP} \cdot \rho_{HAP}) \quad (2)$$

kde v tomto prípade hustota β -TCP je $3,14 \text{ kg/dm}^3$ a hustota HAP je $3,18 \text{ kg/dm}^3$. Po dosadení do vzorca hodnota teoretickej hustoty je $3,1428 \text{ kg/dm}^3$. Pre prehľadnosť budú výsledky relatívnej hustoty počítané s hodnotou hustoty β -TCP pre oba typy vzoriek, pretože rozdiely s prepočtom sú zanedbateľné.

3.7 Príprava simulovanej telesnej tekutiny (SBF)

V tejto časti práce je popísané zloženie použitej simulovanej telesnej tekutiny, jej zloženie a celý testovací cyklus.

3.7.1 Zloženie SBF

Chemikálie, ktoré boli použité na výrobu simulovanej telesnej tekutiny, boli vybrané kvôli najlepšiemu napodobneniu iónov v krvnej plazme.

Presné zloženie simulovanej telesnej tekutiny je popísané v Tabuľke 3.

Tabuľka 3: Zloženie pripravovanej c-SBF podľa Kokuba.

Chemikálie	NaCl	NaHCO ₃	KCl	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1M HCl	CaCl ₂	Na ₂ SO ₄	TRIS
Hmotnosť [g]	8,035	0,355	0,2525	0,231	0,311	39 ml	0,292	0,072	6,118

Na magnetickú miešačku s teplotou bola umiestnená sklenená nádoba s deionizovanou vodou. Do nej bola vložená plastová kadička so 700 ml deionizovanej vody a magnetickým miešadlom. Ďalej bolo do kadičky vložené čidlo na meranie teploty a elektróda pH metra. Voda bola zohrievaná na teplotu $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$ za stáleho miešania vo vodnom kúpeli pri 120 otáčkach za minútu.

Postupne ako sú zoradené chemikálie v Tabuľke 3 boli navážené na analytických váhach a pridávané do deionizovanej vody. Každá ďalšia zložka bola pridaná až po úplnom rozpustení predchádzajúcej látky. Do tekutiny boli látky pridávané po častiach a medzitým dostatočne

premiešané. Priebežne bolo kontrolované pH. Pri pomalom pridávaní TRISu je sledovaná teplota a veľký dôraz na pH. Ideálne pH konečnej tekutiny je 7,42. V prípade ak je pH zvýšené je možné ho korigovať pridávaním kvapiek 1M HCl.

V poslednom kroku je tekutina voľne chladená. Na záver je preliata do 1000 ml plastovej odmernej banky a doliata deionizovanou vodou po rysku.

3.7.2 Testovací cyklus

Boli pripravené uzatváracie nádoby o objeme 30 ml a na spodok boli vložené vzorky. Automatickou pipetou bolo naliatych 20 ml SBF do každého kelímku na vzorku. Kelímky boli uzatvorené a víčko bolo zatiahnuté parafilmom, aby sa predišlo prípadnému odparovaniu. Takto pripravené kelímky, boli vložené do termostatu na proces inkubácie. Teplota bola nastavená na 36,5 °C pri pretrepávaní 50 otáčok za minútu.

Vzorky boli z termostatu vyberané počas testovacieho cyklu v časových intervaloch 0, 3, 7, 14 a 21 dní. Vzorky boli vytiahnuté z tekutiny na silika gel k usušeniu a odoberaná SBF bola ďalej analyzovaná.

3.8 Analýza vápenatých iónov

Pre stanovenie zmeny koncentrácie vápenatých iónov na rozhraní systému biomateriál a SBF bola použitá kolorimetrická metóda pomocou spektrofotometrického stanovenia koncentrácie.

3.8.1 Kalibračné rady

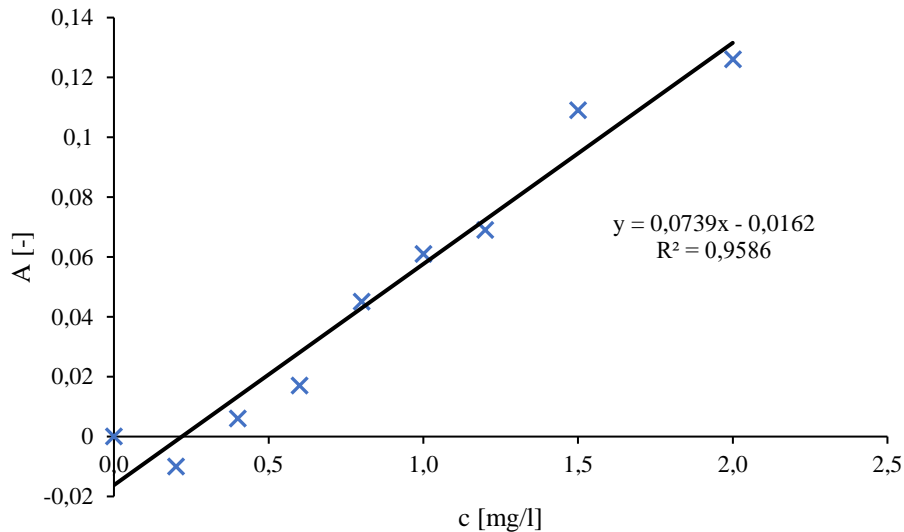
Základom vytvorenia kalibračnej rady je príprava štandardného roztoku. Pri experimente bol vybraný štandardný roztok CaCl_2 . Do 250 ml odmernej banky bolo kvantitatívne prevedených 0,6923 g CaCl_2 . Následne bola odmerná banka doplnená deionizovanou vodou po rysku, uzatvorená a dobre premiešaná. Pre získanie koncentrácie 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,5 a 2 mg Ca^{2+} na liter bolo potrebné prepočítať nariadenie štandardného roztoku. V Tabuľke 4 je znázornené ako boli pripravené koncentrácie štandardu.

Tabuľka 4: Zloženie nariadeného štandardného roztoku.

Roztok	1	2	3	4	5	6	7	8	9
c Ca^{2+} [mg/l]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,5	2
V_{CaCl_2} [μl]	0	10	10	10	10	10	10	10	10
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml]	5	49,89	24,94	16,62	12,47	9,97	8,32	6,65	4,98

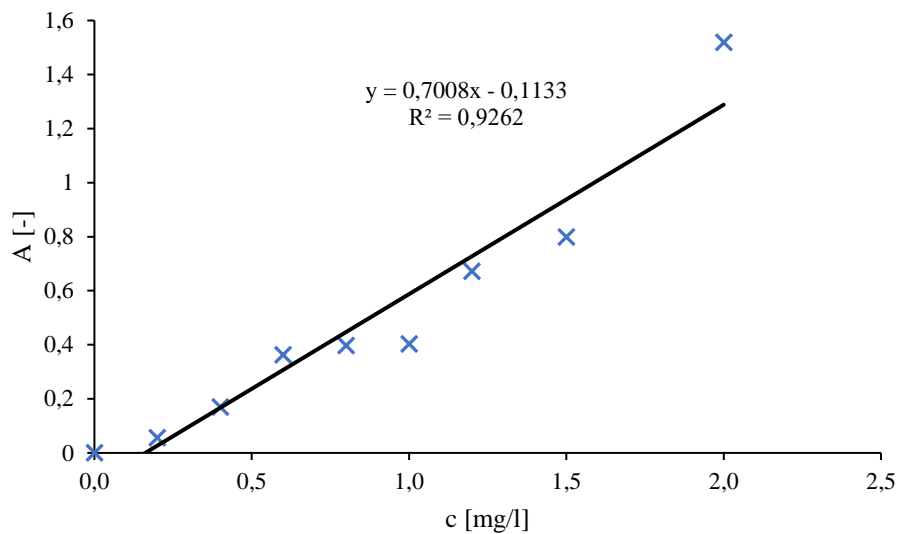
Pre vytvorenie kalibračnej rady spolu s činidlom murexid musel byť najprv rozpustený. Do 50 ml odmernej banky bolo kvantitatívne prevedených 0,08 g práškového murexidu. Pridaných 35 ml ethanolu a doplnené deionizovanou vodou po rysku. Banka bola uzatvorená zátkou a dobre premiešaná. Do kadičky bolo odobraných vždy 5 ml nariadeného štandardného roztoku, kvôli stabilite pH murexidu bolo automatickou pipetou napipetovaných vždy 1 ml NaOH o koncentracii 0,001 M. K tomu bolo jednorázovou plastovou pipetou pridaných 8 kvapiek roztoku murexidu. Takýmto spôsobom bola vytvorená kalibračná rada pre roztok

murexidu. V ďalšom kroku bolo potrebné vytvoriť kalibračnú krivku závislosti absorbie na koncentrácii pomocou spektrofotometra. Ako blank bol použitý roztok 1, kde bola iba čistá voda ozásadená NaOH a zafarbená murexidom a zároveň bol použitý ako roztok 1 v kalibračnej rade. Vlnová dĺžka bola nastavená na $\lambda = 506$ nm. Postupne boli do prístroja vkladané roztoky od 1 po 9 (Tabuľka 4), kde bola zadaná ich koncentrácia a zaznamenaná ich absorbanca. Na záver bola kalibračná krivka uložená v prístroji, ako na Obrázku 5.



Obrázok 5: Zostavená kalibračná krivka s činidlom murexid.

Ako druhá bola vytvorená kalibračná rada pre KIT „Spectroquant Calcium Test“ Sulpeco. Do kadičiek bolo odobraných vždy 5 ml nariedeného štandardného roztoku podľa Tabuľky 4. KIT obsahoval dve reagenty. Prvých bolo napipetovaných automatickou pipetou 0,5 ml reagentu Ca-1. Potom 0,5 ml reagentu Ca-2. Zmes bola dobre premiešaná a nechaná voľne stáť 5 minút. Kalibračná rada bola pripravená, avšak v prípade, ak by došlo k zakaleniu roztoku je potrebné roztok prefiltrovať. Následne bola pomocou spektrofotometra vytvorená kalibračná krivka ako bolo písané vyššie. Ako blank bol použitý roztok 1, kde bola čistá destilovaná voda spolu s reagentom Ca-1 a Ca-2. Vlnová dĺžka pre KIT bola určená na $\lambda = 565$ nm. Na Obrázku 6 je možné vidieť zostavenú kalibračnú krivku.



Obrázok 6: Zostavená kalibračná krivka s testom KIT.

3.8.2 UV/VIS Spektrofotometria

Po odobratí vzorky z SBF bolo odpipetovaných 5 ml tekutiny do kadičky. K nej bol pridaný 1 ml roztoku NaOH a jednorázovou pipetou napipetovaných 8 kvapiek roztoku murexidu. Obsah bol premiešaný. Kyveta bola pred použitím prepláchnutá deionizovanou vodou a vysušená. Do pripravenej kyvety bol naliaty farebný roztok takmer po okraj. Pokiaľ bol prístroj pripravený a nastavená požadovaná vlnová dĺžka $\lambda = 506$ nm a kalibračná krivka pre roztok murexidu, kyveta bola vložená do prístroja. Následne bol vykonaný test a zaznamenaná hodnota absorbancie a vypočítanej koncentrácie vápnika podľa rovnice kalibračnej krivky. Nakoniec bola vzorka odobratá z prístroja, kyveta opláchnutá a vysušená.

Do ďalšej kadičky bolo odobratých automatickou pipetou 5 ml SBF. K nej bolo pridaných 0,5 ml reagentu Ca-1 a 0,5 ml reagentu Ca-2. Roztok bol premiešaný a voľne stál 5 minút. Pri vzniku zrazeniny bolo potrebné roztok prefiltrovať roztok cez filtračný papier. Postup bol opakovaný ako pri roztoku murexidu, avšak vlnová dĺžka odpovedala $\lambda = 565$ nm.

Týmto procesom bolo vykonané meranie pre každú vzorku SBF s roztokom murexidu aj s reagentmi KITu.

3.9 Analýza mikroštruktúry

Na potvrdenie výsledkov zmeny koncentrácie vápenatých iónov, či bola vytvorená apatitová vrstva na povrchu skúmaného materiálu bola použitá analýza skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM).

Pred použitím tejto analýzy boli vybrané vzorky povlakované uhlíkom. Po vložení vzoriek do prístroja, bolo nastavené rozlíšenie skenovacieho elektrónového mikroskopu FEI Verios 460L (VERIOS) a zobrazovací mód.

3.10 Analýza zloženia

Pre zistenie fázového zloženia vzoriek bola použitá analýza röntgenovej difraktometrie (XRD).

Technika je využívaná na určenie kryštalografickej štruktúry materiálu. Pokiaľ materiál dovoľoval rozdrvenie na prášok, meranie bolo vykonané z neho. Avšak, ak materiál bol v tuhom stave, meranie je možné vykonať z jeho povrchu. Vzorka bola umiestnená do röntgenového difraktometra Rigaku SmartLab 3 kW (RIGAKU), kde bolo uskutočnené meranie povrchu pri napätí 40kV a prúde 30 mA. Zdrojom röntgenového žiarenia bola použitá Cu anoda. Materiál bol ožiarený dopadajúcimi röntgenovými lúčmi. Následne bola zaznamenaná intenzita a uhol rozptylu röntgenových lúčov, ktoré boli od materiálu odrazené.

4 VÝSLEDKY

V tejto kapitole je prehľad získaných výsledkov počas experimentálnej činnosti. Sú popísané jednotlivé merania a výsledky sú doložené grafickým znázornením. Pomocou výsledkov je možné zistiť či materiál vykazoval alebo nevykazoval interakciu s SBF. Ďalej sa preukáže či je UV/VIS spektrofotometer schopný zachytiť zmenu koncentrácie vápenatých iónov a či je na to táto metóda vhodná.

4.1 Popis pripravených vzoriek

Pre získanie komplexnejších výsledkov bol pripravený materiál, vyrobený dvomi odlišnými metódami.

Pomocou metódy freeze-casting s mrazením tekutým dusíkom boli pripravené tyčinky s priemerom 2,1 mm. Po sintrovaní boli narezané na rovnaké časti o dĺžke 11 mm.

Uniaxiálnym lisovaním boli pripravené čisto biele vzorky diskového tvaru o priemere 16 mm. Následným izostatickým lisovaním za studena sa ich priemer zmenšil a čiastočne zmenili farbu. Na záver boli sintované rovnakým spôsobom ako prechádzajúce vzorky. V závere mali tabletky priemer 11,2 mm a hrúbku 1,6 mm.

4.2 Relatívna hustota

Každá vzorka bola po procese sintrovania odvážená Archimedovou metódou, popísanou v kapitole 3.6. Podľa rovnice (1) bola vypočítaná relatívna hustota materiálov.

Tabuľka 5: Namerané a vypočítané hodnoty FC vzoriek.

Vzorka	m_S [g]	m_A [g]	m_P [g]	ρ_{teor}	ρ_{rel}
(1) FC	0,0369	0,0238	0,0622	3,14	30,52
(2) FC	0,0394	0,0261	0,0672	3,14	30,45
(3) FC	0,0408	0,0238	0,0683	3,14	29,12
(4) FC	0,0422	0,0275	0,0730	3,14	29,46
(5) FC	0,0384	0,0185	0,0632	3,14	27,28
(6) FC	0,0437	0,0290	0,0737	3,14	31,05
(7) FC	0,0547	0,0368	0,0928	3,14	31,02
(8) FC	0,0375	0,0262	0,0682	3,14	28,36
(9) FC	0,0628	0,0405	0,1122	3,14	27,82
(10) FC	0,0384	0,0144	0,0578	3,14	28,10
Priemerná hustota					29,32
Smerodajná odchýlka					1,40
Min. hustota					27,28
Max. hustota					31,05

Výsledky merania, vypočítaná relatívna hustota a ich priemerná hodnota s relatívnou odchýlkou boli zapísané do Tabuľky 5 a 6. Teplota vody pri vzorkách pripravených metódou freeze-casting (FC) bola 21,0 °C a hustota vody pre danú teplotu bola 0,9981 kg/dm³.

Tabuľka 6: Namerané a vypočítané hodnoty CIP vzoriek.

Vzorka	m_s [g]	m_A [g]	m_P [g]	ρ_{teor}	ρ_{rel}
(1) CIP	0,4783	0,3216	0,4783	3,14	96,90
(2) CIP	0,4850	0,3260	0,4844	3,14	97,20
(3) CIP	0,5026	0,3382	0,5022	3,14	97,29
(4) CIP	0,4999	0,3364	0,4988	3,14	97,72
(5) CIP	0,4828	0,3241	0,4816	3,14	97,32
(6) CIP	0,4655	0,3127	0,4649	3,14	97,10
(7) CIP	0,4805	0,3231	0,4794	3,14	97,60
(8) CIP	0,5217	0,3511	0,5212	3,14	97,37
(9) CIP	0,4991	0,3350	0,4975	3,14	97,51
(10) CIP	0,4875	0,3280	0,4861	3,14	97,89
Priemerná hustota					97,39
Smerodajná odchýlka					0,30
Min. hustota					96,90
Max. hustota					97,89

Pri meraní vzoriek pripravených metódou izostatického lisovania za studena (CIP) bola teplota vody 22,4 °C. Hustota vody pre túto teplotu bola 0,9977 kg/dm³.

4.3 Zmena hmotnosti

Vzorky boli na začiatku testovacieho cyklu odvážené na analytických váhach s presnosťou na štyri desatinné miesta. Vždy po vybratí z SBF boli vzorky odložené na silika gel, kde boli samovoľne sušené. Tento proces naznačuje Tabuľka 7 a 8. Pre lepšiu orientáciu je v tabuľkách zahrnutý aj percentuálny nárast alebo úbytok z hmotnosti vzoriek.

Tabuľka 7: Zmena hmotnosti vzoriek FC v čase.

Vzorka	m_0 [g]	m_3 [g]	m_7 [g]	m_{14} [g]	m_{21} [g]	Δm [-]	%
(1) FC	0,0622	-	-	-	-	-	-
(2) FC	0,0672	-	-	-	-	-	-
(3) FC	0,0683	0,0419	-	-	-	-0,0264	-38,653
(4) FC	0,0730	0,0430	-	-	-	-0,0300	-41,096
(5) FC	0,0632	-	0,0399	-	-	-0,0233	-36,867
(6) FC	0,0737	-	0,0456	-	-	-0,0281	-38,128
(7) FC	0,0928	-	-	0,0577	-	-0,0351	-37,823
(8) FC	0,0682	-	-	0,0411	-	-0,0271	-39,736
(9) FC	0,1122	-	-	-	0,0673	-0,0449	-40,018
(10) FC	0,0578	-	-	-	0,0424	-0,0154	-26,644

Z tabuľky je viditeľné, že hmotnosť každej vzorky počas testovacieho procesu klesá, čím konštatujeme úbytok na hmotnosti. V priemere došlo k úbytku 37 % z pôvodnej hmotnosti nezávisle od počtu dní v SBF. Naopak z Tabuľky 8 je zrejmé, že došlo k nárastu hmotnosti.

V priemere je nárast z pôvodnej hmotnosti veľmi zanedbateľný, približne 0,35%. Avšak, závisí na počte dní ponorenia, čo dokazujú napríklad vzorky (4) CIP a (9) CIP.

Tabuľka 8: Zmena hmotnosti vzoriek CIP v čase.

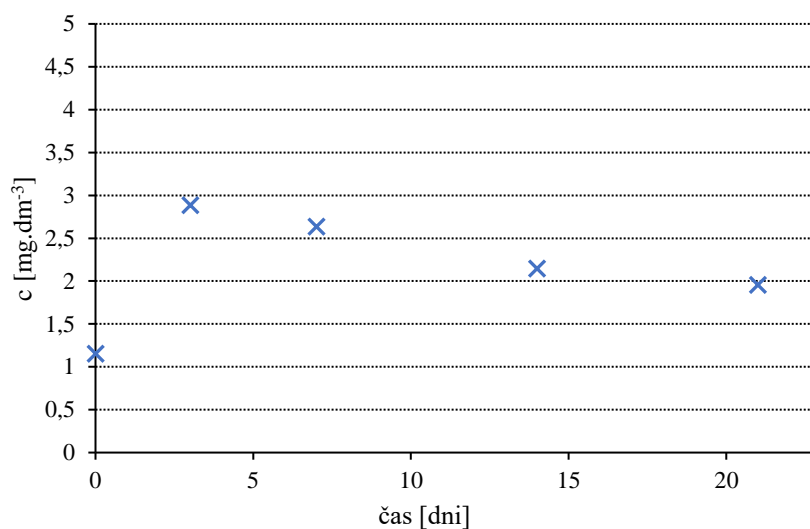
Vzorka	m ₀ [g]	m ₃ [g]	m ₇ [g]	m ₁₄ [g]	m ₂₁ [g]	Δm [-]	%
(1) CIP	0,4783	-	-	-	-	-	-
(2) CIP	0,4844	-	-	-	-	-	-
(3) CIP	0,5022	0,5030	-	-	-	0,0008	0,159
(4) CIP	0,4988	0,5000	-	-	-	0,0012	0,241
(5) CIP	0,4816	-	0,4833	-	-	0,0017	0,353
(6) CIP	0,4649	-	0,4657	-	-	0,0008	0,172
(7) CIP	0,4794	-	-	0,4816	-	0,0022	0,459
(8) CIP	0,5212	-	-	0,5229	-	0,0017	0,326
(9) CIP	0,4975	-	-	-	0,5003	0,0028	0,563
(10) CIP	0,4861	-	-	-	0,4888	0,0027	0,555

4.4 Zmena koncentrácie vápnika

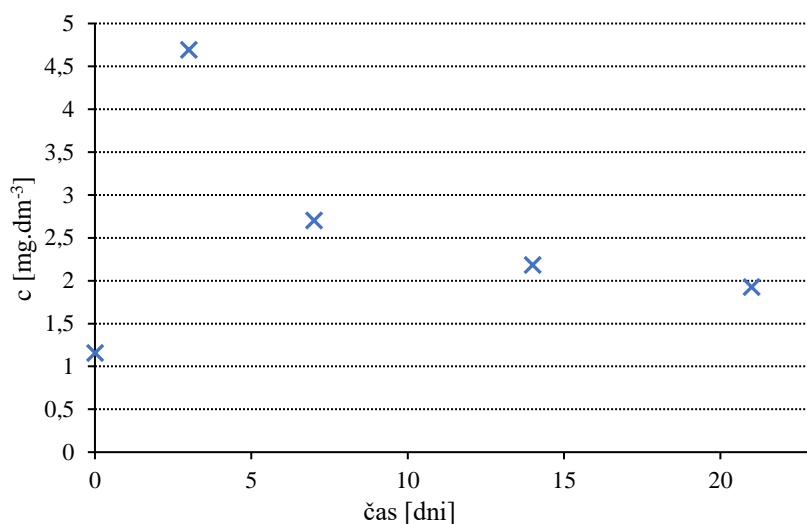
Pomocou metódy UV/VIS spektrofotometrie bolo uskutočnené meranie koncentrácie vápenatých iónov v SBF podľa intervalu inkubácie. Zmeny koncentrácie Ca²⁺ sú znázornené v Tabuľke 9. Vývoj zmeny koncentrácie na čase oboch vzoriek je popísaný na Obrázku 7 a 8.

Tabuľka 9: Znázornenie zmeny koncentrácie Ca²⁺ s činidlom murexid.

počet dní	vzorka	A [-]	priemer A [-]	c [mg.dm ⁻³]	priemer c [mg.dm ⁻³]
0	SBF	0,069	0,0690	1,153	1,153
3	(3) FC	0,205	0,1970	2,993	2,885
	(4) FC	0,189		2,777	
7	(5) FC	0,184	0,1785	2,709	2,635
	(6) FC	0,173		2,560	
14	(7) FC	0,159	0,1425	2,371	2,147
	(8) FC	0,126		1,924	
21	(9) FC	0,126	0,1285	1,924	1,958
	(10) FC	0,131		1,992	
0	SBF	0,069	0,0690	1,153	1,153
3	(3) CIP	0,188	0,3305	2,763	4,691
	(4) CIP	0,473		6,620	
7	(5) CIP	0,182	0,1835	2,682	2,702
	(6) CIP	0,185		2,723	
14	(7) CIP	0,147	0,1450	2,208	2,181
	(8) CIP	0,143		2,154	
21	(9) CIP	0,128	0,1260	1,951	1,924
	(10) CIP	0,124		1,897	



Obrázok 7: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} FC vzoriek s murexidom.

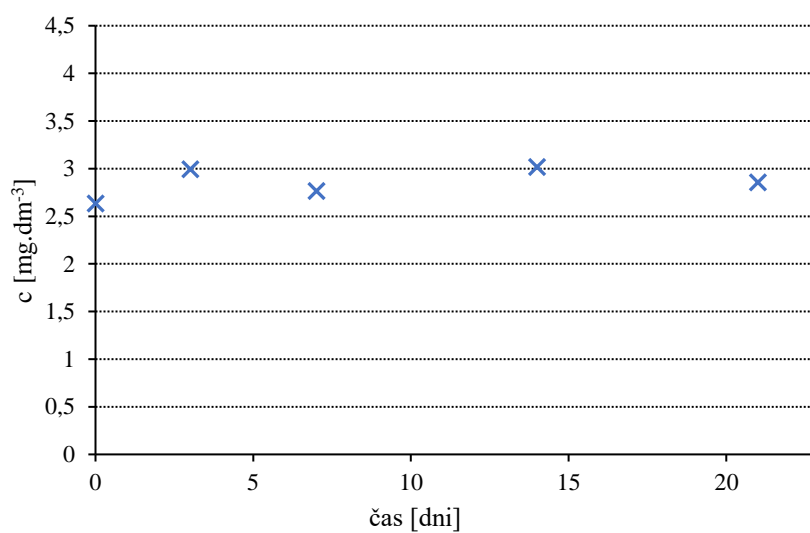


Obrázok 8: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} CIP vzoriek s murexidom.

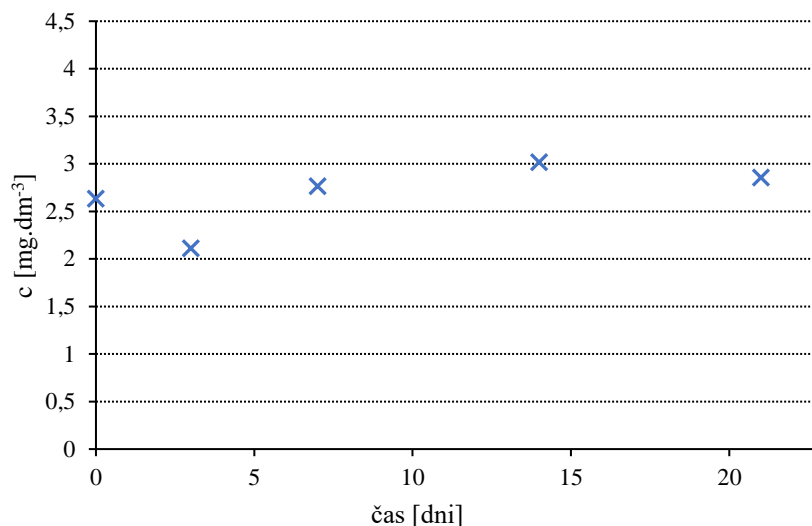
Meranie bolo prevedené na porovnanie aj s využitím reagensí KITu. Bolo predpokladané, že budú dosiahnuté presnejšie výsledky. Zaznamenané výsledky v Tabuľke 10. Znázornenie vývoja zmeny koncentrácie na čase je na Obrázku 9 a 10.

Tabuľka 10: Znážornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} s testom KIT.

počet dní	vzorka	A [-]	priemer A [-]	c [$mg \cdot dm^{-3}$]	priemer c [$mg \cdot dm^{-3}$]
0	SBF	1,732	1,732	2,633	2,633
3	(3) FC	2,088	1,983	3,141	2,991
	(4) FC	1,878		2,841	
7	(5) FC	1,845	1,824	2,794	2,764
	(6) FC	1,803		2,734	
14	(7) FC	1,996	2,0005	3,010	3,016
	(8) FC	2,005		3,023	
21	(9) FC	1,869	1,887	2,829	2,854
	(10) FC	1,905		2,880	



Obrázok 9: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} FC vzoriek s testom KIT

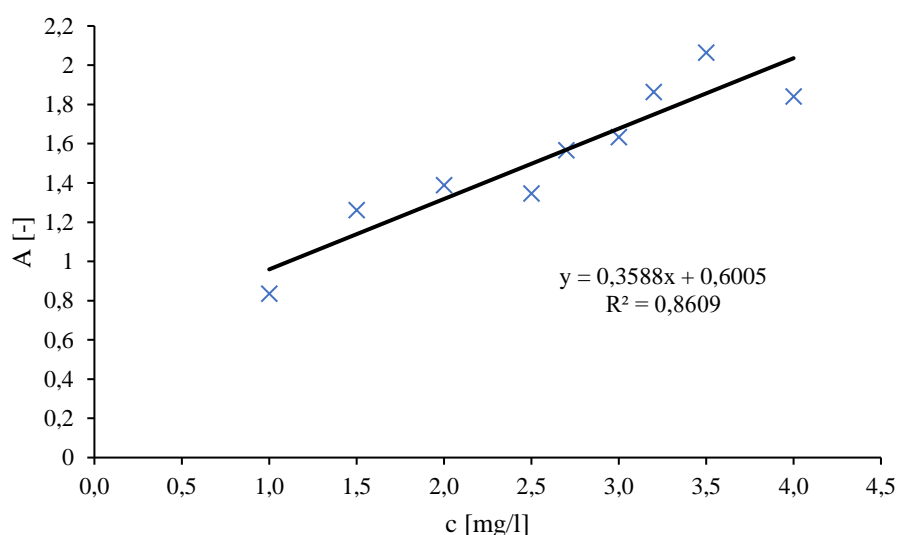


Obrázok 10: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} CIP vzoriek s testom KIT.

Keďže hodnoty absorbancie boli mimo kalibračnú krivku bola vytvorená nová kalibračná rada (Tabuľka 11), aby boli dosiahnuté presnejšie výsledky. Bolo postupované ako v podkapitole 3.8.1.

Tabuľka 11: Zloženie nariadeného štandardného roztoku.

Roztok	1	2	3	4	5	6	7	8	9
c Ca^{2+} [mg/l]	1	1,5	2	2,5	2,7	3	3,2	3,5	4
V_{CaCl_2} [μl]	0	10	10	20	20	20	20	20	20
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml]	9,97	6,64	4,98	7,96	7,38	6,64	6,22	5,68	4,98

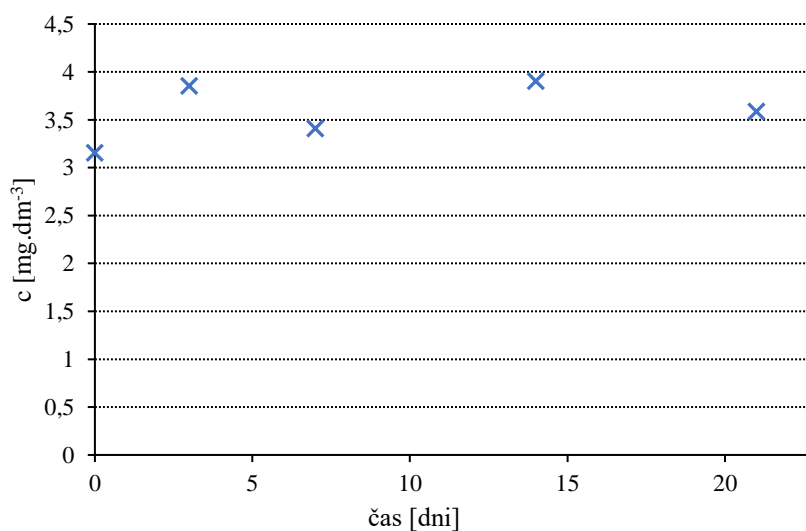


Obrázok 11: Zostavená kalibračná krivka 2 s testom KIT.

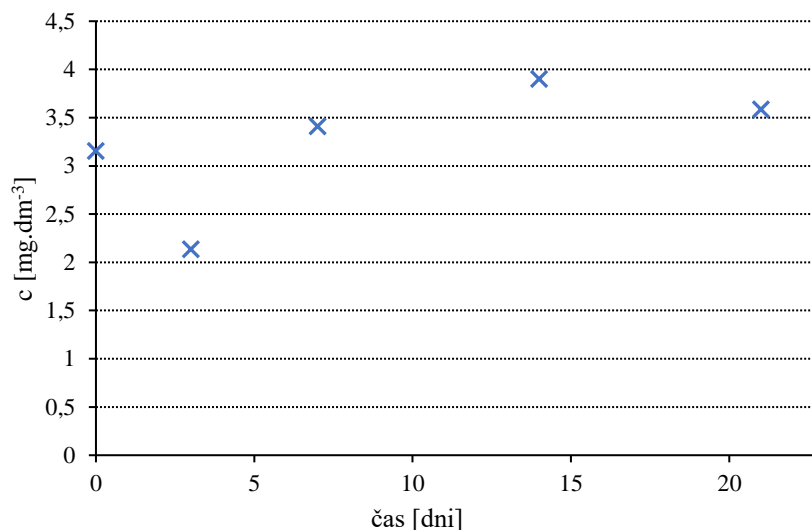
Podľa rovnice kalibračnej krivky 2 (Obrázok 11) boli dopočítané hodnoty koncentrácie vápenatých iónov, čo znázorňuje Tabuľka 12. Grafické znázornenie je pozorované na Obrázku 12 a 13.

Tabuľka 12: Znážornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} s testom KIT (kalibračná krivka 2).

počet dní	vzorka	A [-]	priemer A [-]	c [mg.dm ⁻³]	priemer c [mg.dm ⁻³]
0	SBF	1,732	1,732	3,154	3,154
3	(3) FC	2,088	1,983	4,146	3,853
	(4) FC	1,878		3,560	
7	(5) FC	1,845	1,824	3,469	3,410
	(6) FC	1,803		3,351	
14	(7) FC	1,996	2,0005	3,889	3,902
	(8) FC	2,005		3,914	
21	(9) FC	1,869	1,887	3,535	3,586
	(10) FC	1,905		3,636	
0	SBF	1,732	1,732	3,154	3,154
3	(3) CIP	2,009	1,3665	3,926	2,135
	(4) CIP	0,724		0,344	
7	(5) CIP	1,845	1,824	3,469	3,410
	(6) CIP	1,803		3,351	
14	(7) CIP	1,996	2,0005	3,889	3,902
	(8) CIP	2,005		3,914	
21	(9) CIP	1,869	1,887	3,535	3,586
	(10) CIP	1,905		3,636	



Obrázok 12: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} FC vzoriek s testom KIT (kalibračná krivka 2).

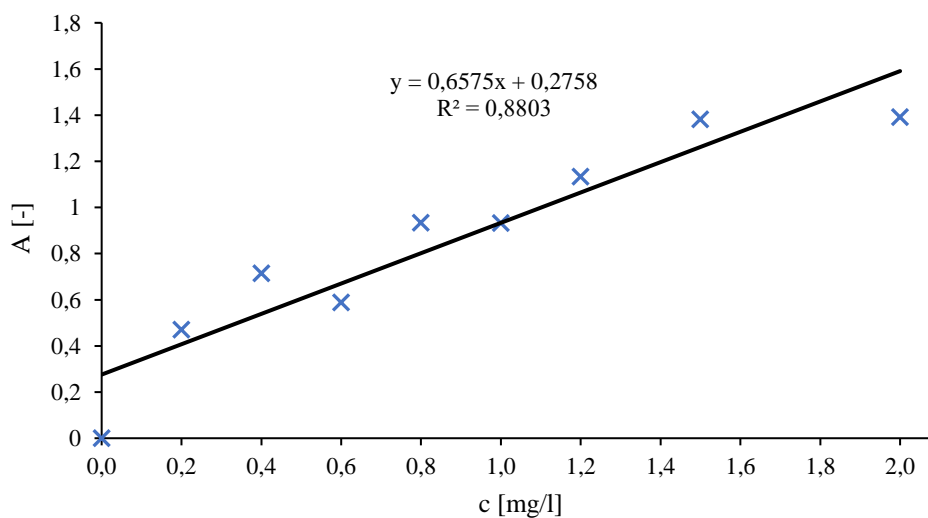


Obrázok 13: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} CIP vzoriek s testom KIT (kalibračná krivka 2).

Dosiahnuté hodnoty stále neboli dostatočne presné a také ako bolo predpokladané. Preto bola ešte vytvorená kalibračná rada so štandardným roztokom z SBF (Tabuľka 13), ktorá bola pridávaná k vzorkám na testovací cyklus.

Tabuľka 13: Zloženie nariadeného štandardného roztoku z SBF.

Roztok	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$c \text{ Ca}^{2+}$ [mg/l]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,5	2
V_{SBF} [μl]	0	10	20	30	40	50	60	80	100
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml]	5	5,260	5,250	5,240	5,230	5,220	5,210	5,541	5,170

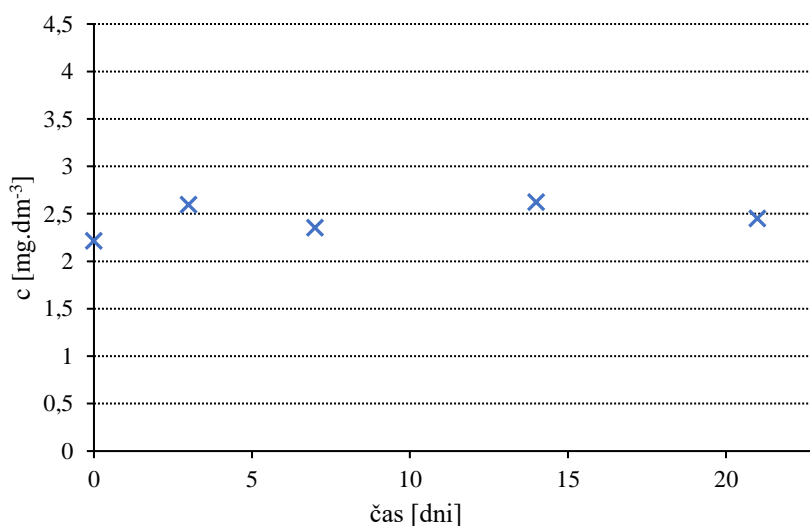


Obrázok 14: Zostavená kalibračná krivka 3 s testom KIT.

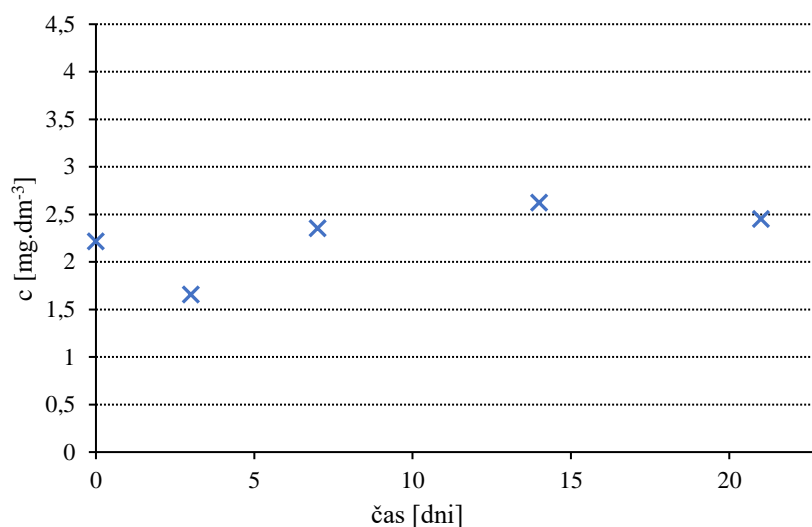
Podľa rovnice kalibračnej krivky 3 (Obrázok 14) boli dopočítané hodnoty koncentrácie vápenatých iónov, čo znázorňuje Tabuľka 14. Grafy zmeny koncentrácie na čase sú znázornené na Obrázku 15 a 16.

Tabuľka 14: Znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} s testom KIT (kalibračná krivka 3).

počet dní	vzorka	A [-]	priemer A [-]	c [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	priemer c [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]
0	SBF	1,732	1,732	2,215	2,215
3	(3) FC	2,088	1,983	2,756	2,597
	(4) FC	1,878		2,437	
7	(5) FC	1,845	1,824	2,387	2,355
	(6) FC	1,803		2,323	
14	(7) FC	1,996	2,0005	2,616	2,623
	(8) FC	2,005		2,630	
21	(9) FC	1,869	1,887	2,423	2,450
	(10) FC	1,905		2,478	
0	SBF	1,732	1,732	2,215	2,215
3	(3) CIP	2,009	1,3665	2,636	1,659
	(4) CIP	0,724		0,682	
7	(5) CIP	1,845	1,824	2,387	2,355
	(6) CIP	1,803		2,323	
14	(7) CIP	1,996	2,0005	2,616	2,623
	(8) CIP	2,005		2,630	
21	(9) CIP	1,869	1,887	2,423	2,450
	(10) CIP	1,905		2,478	



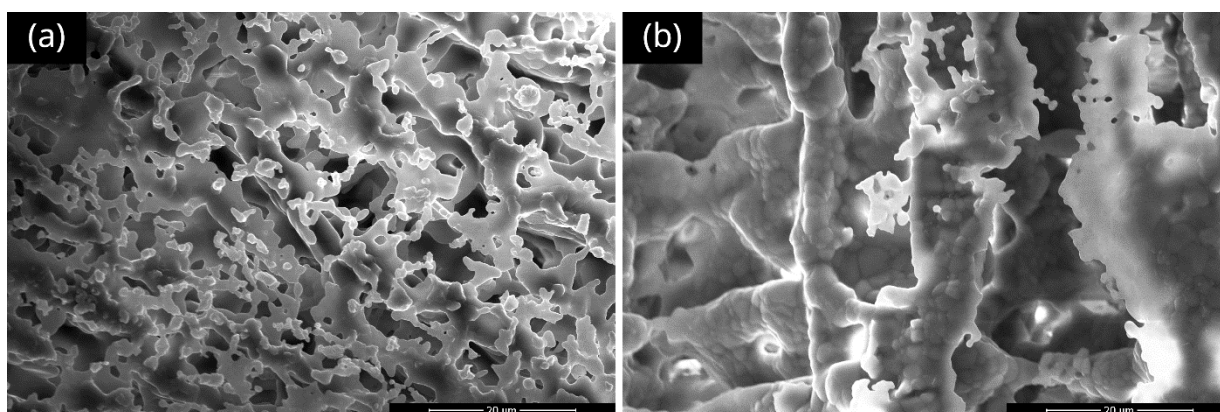
Obrázok 15: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} FC vzoriek s testom KIT (kalibračná krivka 3).



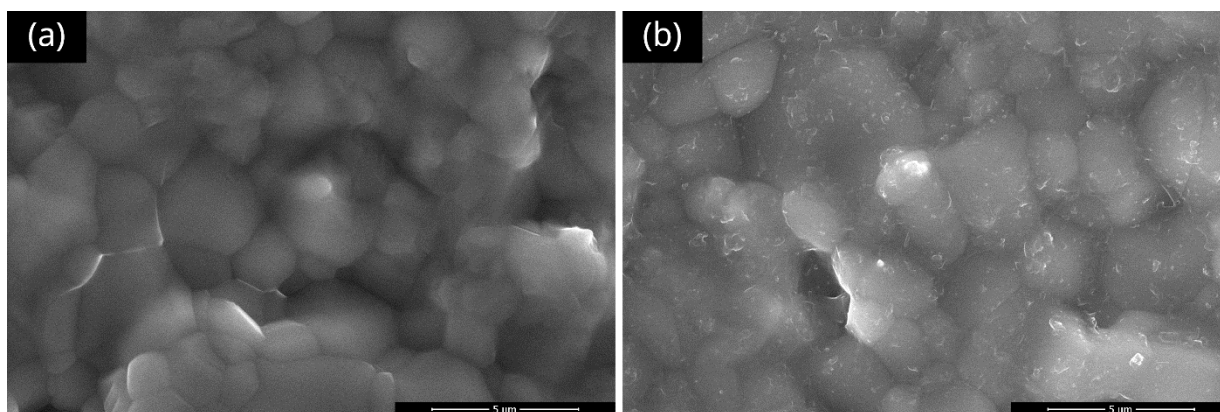
Obrázok 16: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie Ca^{2+} CIP vzoriek s testom KIT (kalibračná krivka 3).

4.5 Analýza mikroštruktúry

Obrazová analýza bola prevedená pomocou rastrového skenovania elektrónovou mikroskopiou (SEM). Podľa najväčších zmien v koncentrácií vápenatých iónov boli zvolené tri dni z testovacieho cyklu (0, 3 a 21 deň). Následne sa z dvoch vzoriek daného dňa vybrala jedna tyčinka a tabletky. Pomocou mikroskopickéj analýzy bol pozorovaný povrch vzoriek. Metóda slúžila na overenie vzniku predpokladanej apatitovej vrstvy. Na Obrázku 17 a Obrázku 18 je možné pozorovať snímky zo SEM.



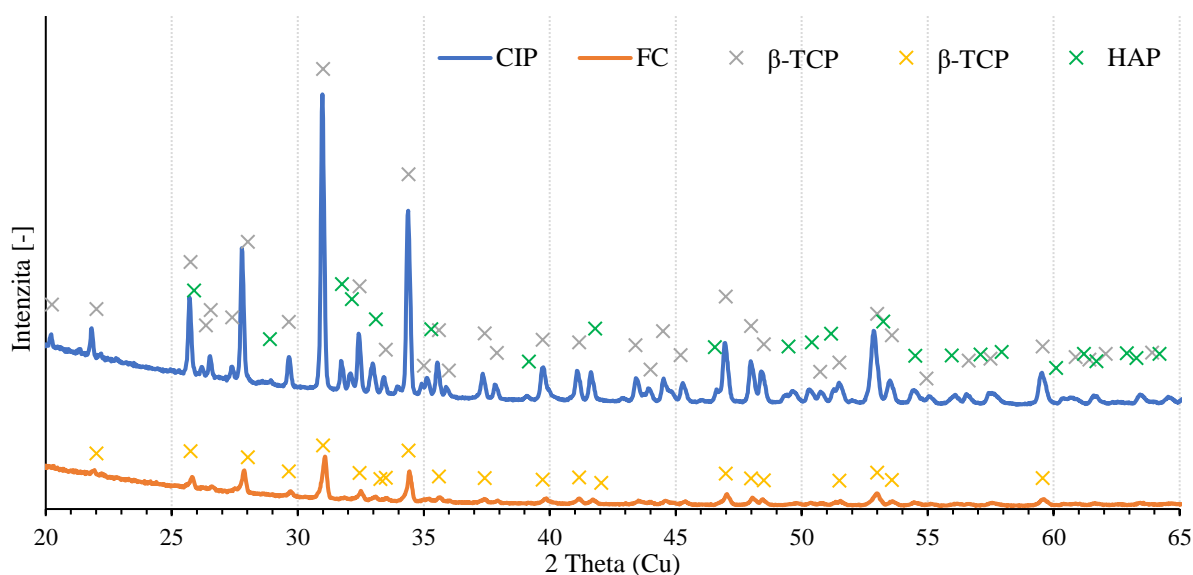
Obrázok 17: Snímky vzoriek pri zväčšení 20 μm , na ľavo (1) FC v deň 0 a na pravo (9) FC v 21. deň.



Obrázok 18: Snímky vzoriek pri zväčšení 5 μ m, na ľavo (1) CIP v deň 0 a na pravo (9) CIP v 21. deň.

4.6 Fázová analýza

Fázové zloženie vzoriek pred namáčaním do SBF bolo analyzované pomocou röntgenovej difraktometrie (XRD). Na Obrázku 19 je znázornené difrakčné spektrum dvoch typov pozorovaných materiálov pripravených metódou freeze-casting (FC) a izostatickým lisovaním za studena (CIP). Krivky boli vyhodnotené a pomocou programu Profex bolo zistené, že FC vzorka obsahovala 98,6 % β -TCP a 1,4 % HAP. Avšak tieto výsledky vykazovali vyššiu odchýlku merania, čo mohlo byť spôsobené získaním slabšej intenzity, tým pádom vyhodnotenie programu nemuselo byť správne. Fázová analýza vzorky CIP identifikovala dve fázy, a to 93,8 % β -TCP a 6,2 % HAP.



Obrázok 19: Grafické znázornenie XRD analýzy FC a CIP vzoriek .

5 DISKUSIA

Ako príprava vzoriek ovplyvnila hustotu, rozpustnosť, zmenu hmotnosti, fázové zloženie a mikroštruktúru, bolo ukryté vo vnútri materiálu. Vzorky pripravené metódou freeze-casting (FC) sú vysoko porézne. Čo spôsobuje nízke hodnoty relatívnej hustoty v priemere $29,32 \pm 1,4$. Naopak hodnoty relatívnej hustoty sú pre vzorky pripravené izostatickým lisovaním za studena (CIP) vysoké, v priemere $97,39 \pm 0,3$. Výsledky sú zhodné s literatúrou, kde potvrdili, že metóda prípravy má vplyv zmenu pórovitosti a veľkosti medzilamelárnych priestorov [44].

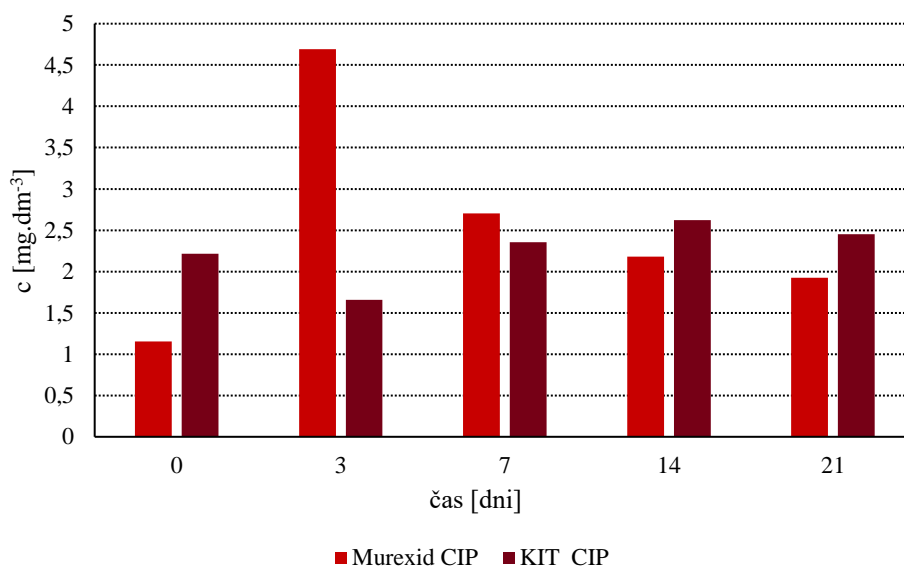
Prípravou materiálu je možné ovplyvniť veľkosť vzniku pórov, zrnitosť alebo hutnosť materiálu. Vďaka rýchlejšej biodegradácii a dobrej rozpustnosti je β -TCP určený na regeneráciu kostí [43]. V našom prípade by malo tým pádom dôjsť k úplnému rozkladu hydroxyapatitu pri sintrovaní na $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri fázovej analýze bolo zistené, že vzorka FC pred namáčaním preukázala iba fázu β -TCP, pri zanedbaní veľmi malého množstva stôp hydroxyapatitu. Avšak počas merania bola zaznamenaná slabá intenzita, čo mohlo spôsobiť nepresné vyhodnotenie. Vzorka CIP obsahovala dve fázy 93,8 % a β -TCP 6,2 % hydroxyapatitu. Zostatok HAP bolo pravdepodobne spôsobené aplikáciou vysokého tlaku pri tvarovaní vzorky. Podobný experiment vykonaný s CIP vzorkami bol potvrdený vo výskume analýzou XRD, kde došlo k úplnej premene HAP so zanedbateľným zostatkom [44].

Kinetiku rozpustnosti vzoriek v SBF a následnú zmenu hmotnosti po vybratí mohol ovplyvniť povrch materiálu, kde FC vzorky majú zväčšený povrch vďaka pórom, a tým pádom tekutina zateká aj do vnútra vzorky. Naopak vzorky CIP sú stlačené tak, že jediná možnosť reakcie na ich povrchu. Ovplyvniť ju môže aj kryštalinita materiálu. Podľa týchto kritérií, by mali väčšiu rozpustnosť preukazovať FC vzorky. Čo dokazuje aj zmena hmotnosti po namáčaní do SBF, kde v priemere vzorky mali úbytok na hmotnosti 37% oproti vzorkám CIP kde došlo k zvýšenou hmotnosti v priemere o 0,354%. Rozpustnosť vápenatých iónov pri namáčaní materiálu závisí aj od vlastností tekutiny ako rýchlosti difúzie častíc, teploty a pH. V spomínaných štúdiách dokázali, že pre rozpustnosť a vznik apatitovej vrstvy je dôležitá povrchová reakcia, t.j. povrch materiálu musí byť záporne nabitý, priťahoval Ca^{2+} ióny z SBF. Čo súvisí aj s fázovým zložením, pokiaľ je namočený materiál z TCP prítomnosť vrstvy je pozorovaná rýchlejšie ako z hydroxyapatitu [39,40]. Vznik apatitovej vrstvy nie je možný dokázať, pretože pri SEM sa nabíjali, čo znemožnilo dosiahnuť kvalitné snímky. Na Obrázku 17 a 18 je však vidieť vznik amorfnej vrstvy fosforečnanu vápenatého. Pokiaľ by bolo možné nahliadnuť do vnútornej štruktúry FC vzoriek, je možnosť, že by bola pozorovaná väčšia koncentrácia apatitu.

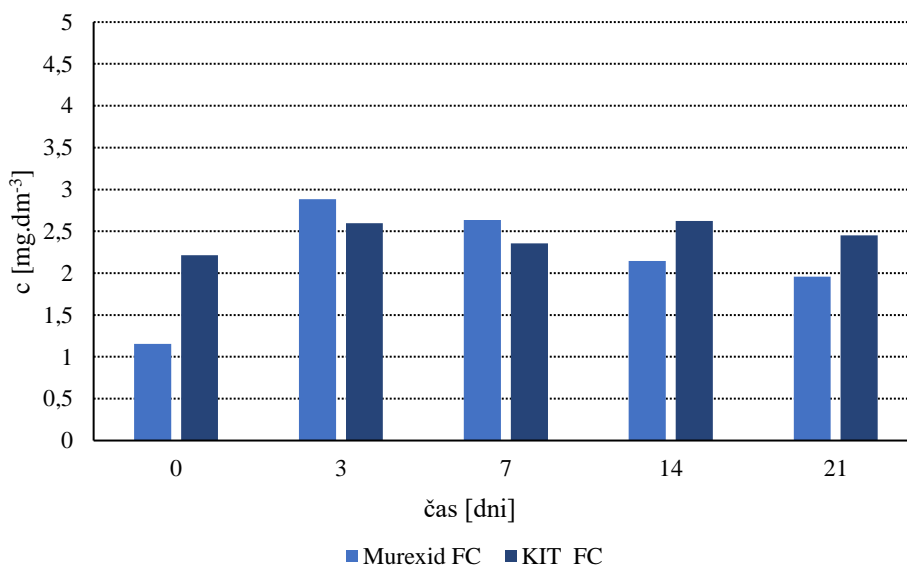
Analýza SBF po namáčaní vzoriek bola vykonaná molekulovou spektrofotometriou UV/VIS. Počas experimentálnej analýzy bolo využívané nepriame kolorimetrické stanovenie pomocou reagentov roztoku Murexidu a zakúpeného KITu Sulpeco, ktorý obsahoval dve reagenty. Meranie ukázalo, že presnejšie výsledky poskytuje Murexid. Výsledky KITu mohli byť nepresné, pretože namerané hodnoty boli čiastočne mimo kalibračnú radu. Preto bola vytvorená kalibračná rada o iných koncentráciách Ca^{2+} . Napriek tomu výsledky boli nedostačujúce. Ďalšou možnosťou bolo vytvorenie kalibračnej rady nariadením SBF, do ktorej boli materiály namáčané. Aby sa pracovalo s tým istým roztokom a bola znížená šanca vyžrážania neočakávaných iónov po pridaní reagentu. Avšak, aj tieto výsledky boli neuspokojivé. Jedným z dôvodov je, že KIT je učený na testovanie vápenatých iónov z podzemných alebo minerálnych

vôd. Ďalším faktorom mohlo byť filtrovanie cez filtračný papier zrazenej SBF po pridaní reagensii. Využitie roztoku Murexidu je overené viacerými štúdiami. Pri jeho príprave bolo postupované podľa pôvodnej metódy z roku 1953 [42].

Vývoj koncentrácie v čase závisí od rozpustnosti CaP pri namáčaní do SBF, od fázového obehu a všetkých ostatných faktorov, ktoré boli spomínané vyššie [36]. Koncentrácia vápenatých iónov v SBF pri oboch keramických materiáloch bola zmenená počas testovacieho cyklu 0, 3, 7, 14 a 21 dní. Jej vývoj pre dva druhy vzoriek je graficky znázornený na Obrázku 20 a 21.



Obrázok 21: Grafické znázornenie koncentrácie Ca^{2+} v čase vzorky CIP



Obrázok 20: Grafické znázornenie koncentrácie Ca^{2+} v čase vzorky FC

Pri použití reagentu Murexidu u vzoriek CIP bol pozorovaný rapidný nárast koncentrácie vápenatých iónov v SBF v 3. deň cyklu. V ďalších dňoch nastalo zníženie a pomalé ustálenie koncentrácie v 21. deň. Priebeh pri vzorkách pripravených metódou freeze-casing (FC) bol

plynulejší. Nárast bol pozorovaný taktiež v tretí deň a napriek rozdielnemu priebehu oba typy vzoriek sa v závere dostávajú na približne rovnakú finálnu koncentráciu $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Napriek tomu, že KIT preukazuje nepresnejšie výsledky, vždy je konečná koncentrácia približne rovnaká. Najväčší nárast koncentrácie Ca^{2+} v tretí deň by mohol byť spôsobený fázovým zložením a kinetikou rozpúšťania vápenatých fosforečnanov. Materiál sa od namočenia po tretí deň najviac rozpúšťal do tekutiny, následne sa koncentrácia ustáľuje, pretože tekutina začína byť presýtená, nemá ako vzniknúť ďalšia reakcia a na materiáli sa začína vytvárať apatitová vrstva.

6 ZÁVER

Cieľom práce bolo získanie vedomostí o testovaní biokeramických materiálov pomocou telesnej tekutiny so zameraním na vápenaté fosforečnany. Experimentálne pripraviť biokeramické substráty a vhodnú simulovanú telesnú tekutinu (SBF). Nasledne analyzovať prenos vápenatých iónov medzi biokeramikou a SBF.

Podľa použitej literatúry bola určená vhodná simulovaná telesná tekutina o najbližšom iónovom zložení krvnej plazmy. Hodnotenie bioaktivity keramických materiálov bolo prevedené pomocou *in vitro* testu acelulárnou SBF. Na zistenie zmeny koncentrácie vápenatých iónov bola určená analýza UV/VIS spektrofotometrom. Pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) bol analyzovaný povrch materiálov a zistený vznik apatitových štruktúr. Fázové zloženie bolo skúmané metódou röntgenovej difraktometrie (XRD).

Vzorky biokeramických materiálov boli pripravené dvomi rôznymi metódami. Metódou freeze-casing mrazením tekutým dusíkom vznikli tyčinky. Predlisovaním a následným izostatickým lisovaním za studena vznikli tabletky. Vzniknuté tyčinky mali dobrú porozitu a nízku hustotu oproti tabletkám, ktoré mali výrazne vyššiu hustotu. Rôznou tvarovacou metódou bolo ovplyvnené aj fázové zloženie materiálov, čo pôsobilo na kinetiku v systéme biokeramika – SBF.

Testovanie v SBF bolo skúmané s dvomi reagentmi, roztokom Murexidu a použitím KITu. Experimentálne bolo dokázané, že roztok Murexidu poskytuje presnejšie výsledky. Bola detekovaná zmena koncentrácie vápenatých iónov v SBF. Pri vzorkách CIP bol zaznamenaný nárast koncentrácie do vyšších hodnôt oproti vzorkám FC, kde bola zmena v počas testovacieho cyklu stabilnejšia. Avšak v posledný deň merania bola na rovankej hodnote koncentrácie vápenatých iónov pri oboch typoch vzoriek.

Testovanie bioaktivity biokeramických materiálov má významný vplyv na ďalšie využitie pri rozvoji implantátov a ich jednoduchšiu aplikáciu. Zdokonalenie vytvorenia materiálu tak, aby bol poskytol čo najvhodnejšie podmienky pre vytvorenie apatitovej vrstvy na prijatie v ľudskom organizme.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] CARTER, C. Barry a M. Grant NORTON. Ceramic materials: science and engineering. New York: Springer, 2007. ISBN 03-874-6270-8.
- [2] RAVAGLIOLI, A. a A. KRAJEWSKI. Bioceramics: Materials · Properties · Applications. UK: Springer Science Business Media, B.V., 1992. ISBN 978-94-010-5032-6.
- [3] MIOLA, Marta, Yousef PAKZAD, Sara BANIJAMALI, et al. Glass-ceramics for cancer treatment: So close, or yet so far? *Acta Biomaterialia*. 2019, 83, 55-70. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2018.11.013
- [4] DANEWALIA, S.S. a K. SINGH. Bioactive glasses and glass–ceramics for hyperthermia treatment of cancer: state-of-art, challenges, and future perspectives. *Materials Today Bio*. 2021, 10. ISSN 25900064. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtbio.2021.100100
- [5] KOKUBO, Tadashi a Hiroaki TAKADAMA. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*. 2006, 27(15), 2907-2915. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- [6] KRATOCHVÍL, Bohumil, Václav ŠVORČÍK a Dalibor VOJTĚCH. Úvod do studia materiálů. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0568-4.
- [7] JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, 9 (1), 4457-4486 [cit. 2019-09-17]. DOI: 0.1016/j.actbio.2012.08.023. ISSN 17427061
- [8] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000, 21(24), 2529-2543. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6
- [9] LI, W L, K LU a J Y WALZ. Freeze casting of porous materials: review of critical factors in microstructure evolution. *International Materials Reviews*. 2013, 57(1), 37-60. ISSN 0950-6608. Dostupné z: doi:10.1179/1743280411Y.0000000011
- [10] COPPOLA, Bartolomeo, Julien SCHMITT, Tanguy LACONDEMINE, Caroline TARDIVAT, Laura MONTANARO a Paola PALMERO. Digital light processing stereolithography of zirconia ceramics: Slurry elaboration and orientation-reliant mechanical properties. *Journal of the European Ceramic Society*. 2022, 42(6), 2974-2982. ISSN 09552219. Dostupné z: doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2022.01.024
- [11] HOU, Nicholas, Hiran PERINPANAYAGAM, Mohammad MOZUMDER a Jesse ZHU. Novel Development of Biocompatible Coatings for Bone Implants. *Coatings*. 2015, 5(4), 737-757. ISSN 2079-6412. Dostupné z: doi:10.3390/coatings5040737
- [12] USTUN, Seda a Elif Aydogan AYZ. Effect of different cement systems and aging on the bond strength of chairside CAD-CAM ceramics. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2021, 125(2), 334-339. ISSN 00223913. Dostupné z: doi:10.1016/j.prosdent.2019.11.025
- [13] URBAN, Zdeněk a Zdeněk STRNAD. Bioaktivní sklokeramika nahrazující kost: Neživé náhrady srůstající s živou tkání [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z:

<https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2000/cislo-3/bioaktivni-sklokeramika-nahrazujici-kost.html>

- [14] Biokeramika [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z:
http://old.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic_Technology/SM-Lect-13-C.pdf
- [15] MÜLLER, Werner E.G., Xiaohong WANG, Bärbel DIEHL-SEIFERT, et al. Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca² level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(6), 2661-2671. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2011.03.007
- [16] MAJLING, Ján a Gustav PLESCH. *Technológia špeciálnych anorganických materiálov*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2002. Edícia skript. ISBN 80-227-1734-7.
- [17] JORDAN, David R., Steven GILBERG a Ahmed BAWAZEER. Coralline Hydroxyapatite Orbital Implant (Bio-Eye): Experience with 158 Patients. 2004, 20(1), 69-74. ISSN 0740-9303. Dostupné z: doi:10.1097/01.IOP.0000105566.71251.D9
- [18] Bioceramics in ophthalmology [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z:
<https://core.ac.uk/download/pdf/11427042.pdf>
- [19] CARRODEGUAS, R.G. a S. DE AZA. A-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(10), 3536-3546. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2011.06.019
- [20] BOHNER, Marc, Bastien Le Gars SANTONI a Nicola DÖBELIN. B-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomaterialia*. 2020, 113, 23-41. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.06.022
- [21] TRUNEC, Martin. *Termoplastické tvarování pokročilé keramiky: Thermoplastic shaping of advanced ceramics*. Brno: VUTIUM, 2006, 16 s. ISBN 80-214-3184-9.
- [22] PTÁČEK, Luděk. *Nauka o materiálu*. 2. opr. a rozš. vyd. Brno: CERM, 2002, 392 s. ISBN 80-7204-248-32.
- [23] RAHAMAN, M. *Ceramic processing*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2007, 473 p. ISBN 9780849372858.
- [24] DEVILLE, Sylvain, Sylvain MEILLE a Jordi SEUBA. A meta-analysis of the mechanical properties of ice-templated ceramics and metals. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2016, 16(4). ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/16/4/043501
- [25] Freeze-Casting [online]. [cit. 2022-04-21]. Dostupné z:
<http://www.freezecasting.net/freezecast.html>
- [26] DEVILLE, Sylvain, Eric MAIRE, Audrey LASALLE, Agnès BOGNER, Catherine GAUTHIER, Jérôme LELOUP a Christian GUIZARD. In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particle Suspensions- Part I: Initial Instants. *Journal of the American Ceramic Society*. 2009, 92(11), 2489-2496. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x

- [27] DEVILLE, Sylvain, Eric MAIRE, Audrey LASALLE, Agnès BOGNER, Catherine GAUTHIER, Jérôme LELOUP a Christian GUIZARD. In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particles Suspensions. Part II: Steady State. *Journal of the American Ceramic Society*. 2009, 92(11), 2497-2503. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2009.03264.x
- [28] PEPPIN, Stephen S.L, M. Grae WORSTER a J.S WETTLAUFER. Morphological instability in freezing colloidal suspensions. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2007, 463(2079), 723-733. ISSN 1364-5021. Dostupné z: doi:10.1098/rspa.2006.1790
- [29] BAREGGI, Andrea, Eric MAIRE, Audrey LASALLE a Sylvain DEVILLE. Dynamics of the Freezing Front During the Solidification of a Colloidal Alumina Aqueous Suspension: In Situ X-Ray Radiography, Tomography, and Modeling. *Journal of the American Ceramic Society*. 2011, 94(10), 3570-3578. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2011.04572.x
- [30] DEVILLE, Sylvain, Eduardo SAIZ, Ravi K. NALLA a Antoni P. TOMSIA. Freezing as a Path to Build Complex Composites. *Science*. 2006, 311(5760), 515-518. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1120937
- [31] DEVILLE, Sylvain, Eduardo SAIZ a Antoni P. TOMSIA. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, 27(32), 5480-5489. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.028
- [32] DEVILLE, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Advanced Engineering Materials*. 2008, 10(3), 155-169. ISSN 14381656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200700270
- [33] OHTSUKI, Chikara, Tadashi KOKUBO a Takao YAMAMURO. Mechanism of apatite formation on CaOSiO₂P₂O₅ glasses in a simulated body fluid. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1992, 143, 84-92. ISSN 00223093. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3093(05)80556-3
- [34] OYANE, Ayako, Hyun-Min KIM, Takuo FURUYA, Tadashi KOKUBO, Toshiki MIYAZAKI a Takashi NAKAMURA. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, 65A(2), 188-195. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.10482
- [35] JALOTA, S., S. B. BHADURI a A. C. TAS. Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006, 17(8), 697-707. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-006-9680-1
- [36] GAO, Chengde, Pingpin WEI, Pei FENG, Tao XIAO, Cijun SHUAI a Shuping PENG. Nano SiO₂ and MgO Improve the Properties of Porous β -TCP Scaffolds via Advanced Manufacturing Technology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(12), 6818-6830. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms16046818

- [37] SURMENEV, Roman A., Maria A. SURMENEVA a Anna A. IVANOVA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. *Acta Biomaterialia*. 2014, 10(2), 557-579. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2013.10.036
- [38] GALLO, Marta, Solène TADIER, Sylvain MEILLE a Jérôme CHEVALIER. Resorption of calcium phosphate materials: Considerations on the in vitro evaluation. *Journal of the European Ceramic Society*. 2018, 38(3), 899-914. ISSN 09552219. Dostupné z: doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2017.07.004
- [39] JUHASZ, Judith A., Serena M. BEST, Antony D. AUFFRET a William BONFIELD. Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, 19(4), 1823-1829. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-007-3344-7
- [40] CHAVAN, Pradnya N., Manjushri M. BAHIR, Ravindra U. MENE, Megha P. MAHABOLE a Rajendra S. KHAIRNAR. Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite. *Materials Science and Engineering: B*. 2010, 168(1-3), 224-230. ISSN 09215107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mseb.2009.11.012
- [41] DOS SANTOS, Euler A., Simona MOLDOVAN, Mihaela MATEESCU, Jacques FAERBER, Manuel ACOSTA, Hervé PELLETIER, Karine ANSELME a Jacques WERCKMANN. Physical–chemical and biological behavior of an amorphous calcium phosphate thin film produced by RF-magnetron sputtering. *Materials Science and Engineering: C*. 2012, 32(7), 2086-2095. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2012.05.041
- [42] WILLIAMS, M. B. a J. H. MOSER. Colorimetric Determination of Calcium with Ammonium Purpurate. *Analytical Chemistry*. 1953, 25(9), 1414-1417. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60081a036
- [43] JEONG, Jiwoon, Jung Hun KIM, Jung Hee SHIM, Nathaniel S. HWANG a Chan Yeong HEO. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*. 2019, 23(1). ISSN 2055-7124. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-018-0149-3
- [44] PEJCHALOVÁ, L., J. ROLEČEK a D. SALAMON. Why freeze-casting brings different phase composition of calcium phosphates?. *Open Ceramics*. 2021, 7. ISSN 26665395. Dostupné z: doi:10.1016/j.oceram.2021.100161
- [45] ČSN EN 623-2 (727512). Speciální technická keramika monolitická keramika. Všeobecné a strukturální vlastnosti. Část 2: Stanovení hustoty a pórovitosti. Praha: Český normalizační institut, 1995.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CaP	Kalcium fosfát
CIP	Izostatické lisovanie za studena
HAP	Hydroxyapatit
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-1-yl]ethan-1-sulfonová kyselina
PLA	Kyselina polymliečna
PVA	Polyvinylalkohol
SBF	Simulovaná telesná tekutina
SEM	Skenovacia elektrónová mikroskopia
TBA	Terc-butylalkohol
TCP	Trikalciumfosfát
TEM	Transmisná elektrónová mikroskopia
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
XRD	Röntgenová difraktometria
α -TCP	α -trikalciumfosfát
β -TCP	β -trikalciumfosfát