



# 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 MRAZÍČÍHO PROCESU U METODY FREEZE-CASTING PRO PŘÍPRAVU KOSTNÍCH NÁHRAD

TAILORING OF COOLING PROCEDURE DURING FREEZE-CASTING FOR BONE REPLACEMENT  
APPLICATIONS.

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tomáš Šantavý

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1408/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Tomáš Šantavý**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. David Salamon, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Optimalizace mrazícího procesu u metody freeze–casting pro přípravu kostních náhrad

### Zadání bakalářské práce:

Experimentálně ověřit vliv mrazícího procesu na vzniklou porozitu během aplikace metody freeze–casting pro přípravu kostních náhrad.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

-----  
Tomáš Šantavý  
student(ka)

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

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Práca sa zameriava na prípravu hydroxyapatitovej keramiky pomocou metódy freeze-casting. Hydroxyapatit je dôležitým keramickým materiálom, vďaka svojej biokompatibilite, biodegradabilite a bioaktivite, má širokú využiteľnosť v medicínskych aplikáciách, najmä pri náhradách kostného materiálu. Zvolená metóda freeze-casting disponuje flexibilitou, šetrnosťou k životnému prostrediu a môžeme ňou dosiahnuť vysokú poréznosť. Metóda zahŕňa procesy mrazenia, lyofilizácie a spekania, čoho výsledkom je porézna štruktúra pripravovaného materiálu.

Cieľom práce bolo zistenie vplyvu mraziaceho procesu na vzniknutú porozitu výsledného materiálu a mechanické vlastnosti. Boli aplikované rýchlosti mrazenia 3, 4, 5, 6, 7 a 26  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

V experimentálnej časti bolo zistené, že rýchlosť mrazenia má výrazný vplyv na vzniknutú vnútornú mikroštruktúru, priamo ovplyvňuje medzilamelárne vzdialenosti a mechanickú vlastnosť, ktorou je pevnosť v tlaku. Mrazením pomocou tekutého dusíku pri rýchlosti mrazenia 26  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  bola dosiahnutá mechanická pevnosť v tlaku 15 MPa a zároveň najmenšie medzilamelárne vzdialenosti 14-22  $\mu\text{m}$ . Pomalším mrazením boli získané medzilamelárne vzdialenosti v priemere 40-150  $\mu\text{m}$  a mechanická pevnosť na úrovni 2-4 MPa pri zrovnateľnej porozite.

## **ABSTRACT**

Bachelor thesis focuses on preparation of hydroxyapatite ceramics by freeze-casting. Hydroxyapatite is an important ceramic material, due to its biocompatibility, biodegradability and bioactivity it has a wide range of use in medicinal applications especially in replacement of bone material. The chosen method, freeze-casting, is flexible, eco-friendly and we are able to achieve a high level of porosity. The method includes freezing, freeze drying and sintering which creates a porous structure of the prepared material.

Objective of this bachelor thesis was to find out the impact on the created porosity and mechanical properties of the final material. Freezing rates were applied 3, 4, 5, 6, 7 and 26  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

During the experimental part it was established that the freezing rate has a significant influence on the newly formed inner microstructure, it directly influences the interlamellar distances and mechanical property which is compressive strength. With liquid nitrogen with a speed of 26  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  the achieved compressive strength was of 15 MPa as well as the shortest interlamellar distances of 14-22  $\mu\text{m}$ . With slower freezing rate the average interlamellar distances were 40-150  $\mu\text{m}$  and compressive strength of 2-4 MPa with comparable porosity.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Kostná náhrada, biokeramika, hydroxyapatit, freeze-casting

## **KEYWORDS**

Bone replacement, bioceramics, hydroxyapatite, freeze-casting

ŠANTAVÝ, Tomáš. *Optimalizace mrazicího procesu u metody freeze-casting pro přípravu kostních náhrad*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. David Salamon, Ph.D..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu na tému “Optimalizace mrazicího procesu u metody freeze-casting pro přípravu kostních náhrad” vypracoval samostatne pod vedením doc. Ing. Davida Salamona, Ph.D. a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne od citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Rád by som sa poďakoval vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Davidovi Salamonovi, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu a trpezlivosť pri spracovaní bakalárskej práce. Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Jakubovi Rolečkovi a Bc. Lucii Pejchalovej za pomoc a cenné rady pri experimentálnej časti práce. V neposlednom rade by som sa chcel poďakovať Ing. Tomášovi Spustovi za kontrolu bakalárskej práce.

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	6
2.	TEORETICKÁ ČASŤ .....	7
2.1.	Ludská kosť .....	7
2.2.	Biomateriály a biokeramika .....	9
2.3.	Mechanické vlastnosti keramiky .....	13
2.4.	Porozita a jej vplyv na scaffold .....	15
2.5.	Metóda freeze-casting .....	16
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	22
3.1.	Použité chemikálie .....	22
3.2.	Použité prístroje .....	22
3.3.	Metódy prípravy .....	22
3.4.	Metóda freeze-casting pomocou chladiacej dosky .....	24
3.5.	Metóda freeze-casting pomocou tekutého dusíku .....	25
3.6.	Lyofilizácia .....	26
3.7.	Spekanie .....	26
3.8.	Meranie hustoty a porozity .....	26
3.9.	Pozorovanie pomocou stereolupy a SEM .....	26
3.10.	Röntgenová prášková difrakčná analýza .....	27
3.11.	Mechanické vlastnosti .....	27
4.	Výsledky .....	28
4.1.	Hustota a porozita .....	28
4.2.	Rýchlosť mrazenia .....	28
4.3.	Štruktúra .....	30
4.4.	Fázové zloženie .....	32
4.5.	Mechanické vlastnosti .....	33
5.	DISKUSIA .....	34
6.	ZÁVER .....	36
7.	LITERATÚRA .....	37
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....	42

# 1. ÚVOD

Zlomenina kosti postihuje ľudí v každom veku a nie každý sa jej za život vyhne. Ľudské kosti majú schopnosť regenerovať zlomenú kosť, avšak poškodenie kostí spôsobené ochorením alebo vážnym zranením, je pre telo náročné zregenerovať. V tomto momente prichádzajú na rad chirurgovia, ktorí nahradia poškodenú kosť pomocou kostných náhrad alebo štepov. Kostné náhrady boli pôvodne vyrábané z kovových materiálov, aby vydržali zaťaženie. Kvôli tuhosti a zlej biokompatibilite sa dostali do popredia náhrady z biokeramiky [1].

Biokeramika zahŕňa biokompatibilné a bioaktívne keramické materiály alebo oxidy kovov, ktoré sú netoxické a nevyvolávajú v tele obrannú imunitnú reakciu. Najrozšírenejšie sú biokeramiky na báze hydroxyapatitu, ktorý tvorí väčšinu anorganickej zložky kostného tkaniva [2].

Hydroxyapatit sa používa v mnohých medicínskych aplikáciách, pri oprave kostných defektov, augmentácie kostí alebo povlakov pre kovové implantáty. V závislosti od spôsobu spracovania hydroxyapatitu sa môže vytvoriť rôznorodá porozita. Veľkosť a pravidelnosť pórov je kritickým faktorom pri navrhovaní keramických implantátov pre medicínske použitie, nielen pre rast kostného tkaniva, ale aj pre pevnosť. Pevnosť implantátov sa znižuje zvýšením celkového objemu pórov. Aby sa umožnila tvorba kostí v biokeramickom implantáte sú potrebné veľké póry, naopak na zachovanie pevnosti v tlaku musia byť póry malé. Medzi týmito dvomi aspektmi musí byť stanovená rovnováha [3].

Jedným z možných prístupov pre prípravu poréznej biokeramiky je metóda freeze-casting. Pomocou metódy freeze-casting je možné vyrobiť biokeramiku s vysokou poréznosťou a pevnosťou v tlaku. Pri tejto príprave sa keramická suspenzia zmrazí, sublimuje a speká, čoho výsledkom je porozita s takmer presnou replikou zmrazených kryštálov rozpúšťadla. Tento spôsob je vysoko modifikovateľný na niekoľkých úrovniach, vďaka čomu je možné upraviť morfológiu pórov, funkcionality, ale aj mechanické vlastnosti. Štruktúra poréznej biokeramiky získanej freeze-castingom je veľmi podobná štruktúre prirodzených biomateriálov, ako je napríklad kosť [4].

## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. Ľudská kosť

Kosti svojím súborom tvoria sústavu kostrovú, skeletnú. Sú to pevné, tvrdé a v istom rozmedzí aj pružné orgány žltobielej farby. Ich súbor kostra, skeleton, spolu s pripojenými chrupkami a s kĺbovými a väzivovými spojmi kostí vytvárajú pasívny pohybový aparát.

Kosť je jednou z najtvrdších tkanív v ľudskom tele a po chrupke je to najodolnejšie tkanivo schopné vzdorovať mechanickému namáhaniu. Slúži tiež ako zásobáreň vápniku, fosfátov a iných iónov, ktoré môžu byť uvoľňované alebo skladované v kontrolovanom režime tak, aby sa nemenilo iónové zloženie telesných tekutín [5, 6].

#### 2.1.1. Zloženie

Kosť je špecializované spojivové tkanivo zložené zo zväpenatelej medzibunkovej hmoty – kostný matrix a troch rôznych typov buniek [6].

##### 2.1.1.1. Kostné bunky

Osteocyty, základné bunky zrelej kosti, sídlia v malých komôrkach zaliatych v matrix. Osteoblasty vytvárajú organickú zložku medzibunkovej hmoty a povrchové kostné lamely. Osteoklasty sú obrovské mnohoadrové elementy, ktoré resorbujú a prestavujú kostné tkanivo. Vzhľadom k tomu, že metabolity nemôžu difundovať zväpenatý kostný matrix, výmena látok medzi osteocytmi a krvnými kapilármi je závislá na prepojení buniek, ktoré je uskutočňované prostredníctvom kanálikov. Kostné kanáliky sú tenké, valcovité priestory prenikajúce matrixom. Pomocou týchto kanálikov osteocyty komunikujú so svojim okolím, s vnútorným a vonkajším povrchom kostí a s krvnými cievami prechádzajúcimi matrixom [5, 6].

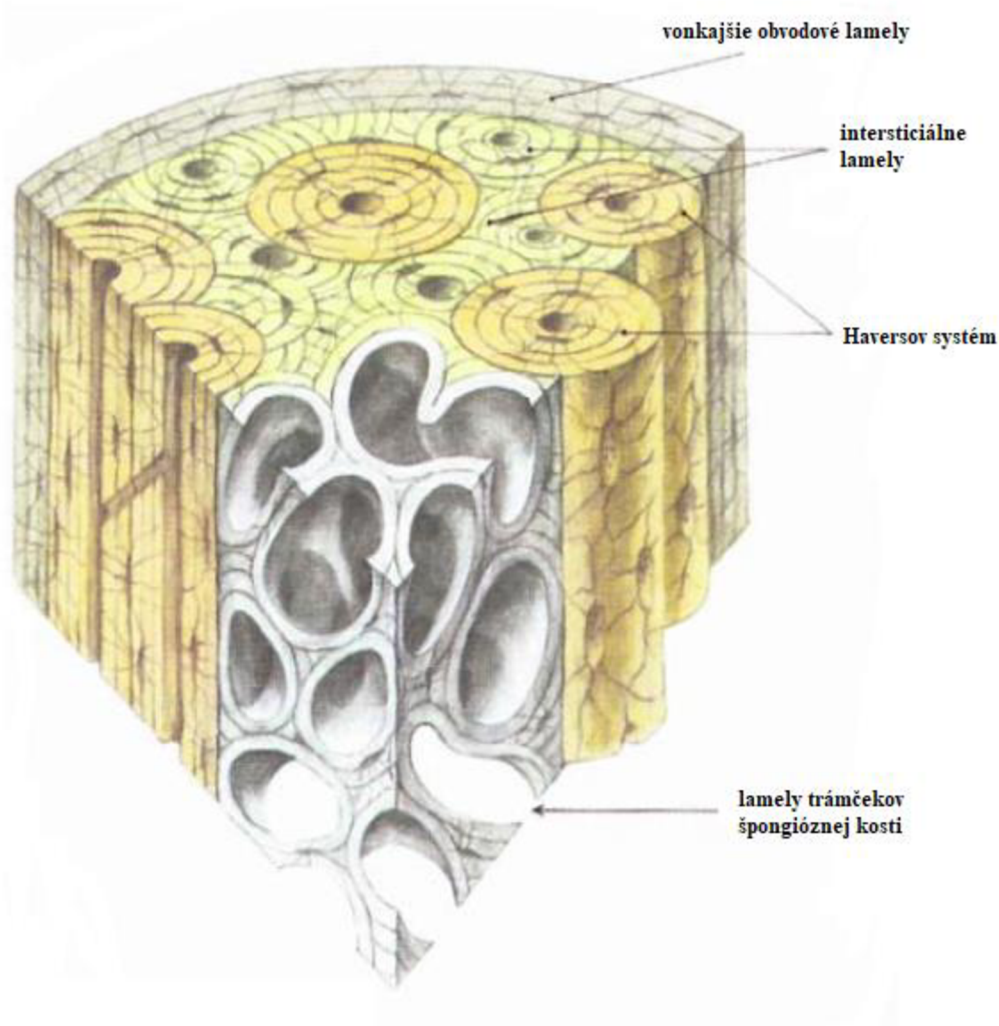
##### 2.1.1.2. Endost a periost

Vnútorný aj vonkajší povrch kostí je lemovaný vrstvou tkaniva, nazývaný endost, resp. periost, ktorý obsahuje osteogenné bunky. Periost pozostáva z vonkajšej vrstvy kolagénnych vlákien a fibroblastov. Zväzky kolagénnych vlákien periostu, ktoré prenikajú matrixom a upevňujú tak periost ku kosti sa nazývajú Sharpeyove vlákna. Endost vystiela vnútorný povrch kostných dutín. Hlavnou funkciou periostu a endostu je výživa kostného tkaniva a nepretržitá dodávka nových osteoblastov určených k obnove a rastu kostí [6, 7].

##### 2.1.1.3. Kostné tkanivá

Existujú dve varianty kostného tkaniva: kortikálna (primárna) kosť a špongiózna (sekundárna) kosť. Primárne kostné tkanivo sa vyskytuje dočasne a v dospelosti je nahradené kosťou sekundárnou s výnimkou niekoľkých málo miest v tele. Má nižší obsah minerálov a vyššie zastúpenie osteocytov ako kosť sekundárna. Sekundárne kostné tkanivo sa nachádza u dospelých a je tvorené kolagénovými vláknami, ktoré sú usporiadané v lamelách a uložené buď paralelne, alebo koncentricky obklopujúce cievny kanál. Celý komplex koncentrických

lamel kostí obklopujúcich kanálik, ktorý obsahuje krvné cievy, nervy a riedke väzivo, nazývame Haversov systém (osteón). V každej lamele sú kolagénové vlákna usporiadané rovnobežne. Haversove systémy sú obklopené cementovou substanciou, ktorú tvorí mineralizovaný matrix s malým počtom kolagénnych vlákien. V kompaktnom kostnom tkanive majú lamely charakteristickú organizáciu tvorenú Haversovým systémom, vonkajšími a vnútornými obvodovými lamelami a lamelami vmedzerenými (intersticiálnymi) [6, 7].



Obrázok 1: Schéma stavby kosti [5]

### 2.1.2. Minerálne látky

Anorganické látky, tvoria okolo 50 % suchej hmotnosti kosti. Prevláda vápnik a fosfor, ale nájdeme aj uhličitan vápenatý, horčík, draslík a sodík. Štúdiá vyhotovené röntgenovou difrakciou ukázali, že vápnik a fosfor tvoria kryštáliky hydroxyapatitu. Ďalej je vo významnom množstve prítomný amorfny fosforečnan vápenatý. Pri pozorovaní vyzerajú kryštáliky kostného hydroxyapatitu ako doštičky o rozmeroch 40 x 25 x 3 nm. Sú uložené pozdĺž kolagénových fibríl a obklopené amorfnou základnou hmotou. Povrchové ióny hydroxyapatitu sú hydratované a okolo kryštálikov je vytvorená vrstva z vody a iónov. Táto hydratačná vrstva uľahčuje iónovú výmenu medzi kryštálom a telesnými tekutinami.



Organickú hmotu tvorí kolagén typu I a amorfná základná hmota, ktorá obsahuje glykosaminoglykány spoločne s proteínmi. Kostný sialoproteín a osteokalcín viažu vápnik a sú dôležitým faktorom kalcifikácie kostného matrixu. Vzhľadom k vysokému obsahu kolagénu viaže odvápnenny kostný matrix intenzívne farbivá na kolagénne fibrily. Spojenie hydroxyapatitu s kolagénymi fibrilami zabezpečuje kosti charakteristickú tvrdosť a pružnosť [6, 8].

### **2.1.3. Ochorenia kostí**

Ochorenia kostí postihujú ľudí v každom veku. Príčiny ochorení môžu byť vrodené poruchy, degeneratívne zmeny, úrazy, ale aj nádorové ochorenia.

Osteoporóza patrí medzi systémové ochorenia skeletu, ktoré je charakterizované nerovnováhou kostnej prestavby, kedy nastáva prevaha osteoresorpcie nad novotvorbou kosti. Dôsledkom je úbytok kostnej hmoty a strata pevnosti kosti, čo zvyšuje riziko zlomeniny. Jej priebeh je spočiatku asymptomatický, ale postupom času sa mení na závažné ochorenie s množstvom nepriaznivých dôsledkov vrátane smrti [9].

Rakovina kostí patrí medzi závažné ochorenia kostí. Kosť je bežným miestom tvorby metastáz, rakovinové bunky sa obyčajne vytvárajú v kostiach a šíria sa do iných orgánových systémov cez krvný obeh. Z klinického hľadiska majú kostné metastázy negatívny dopad na kvalitu života pacienta a sú hlavnou príčinou úmrtia pacientov [10].

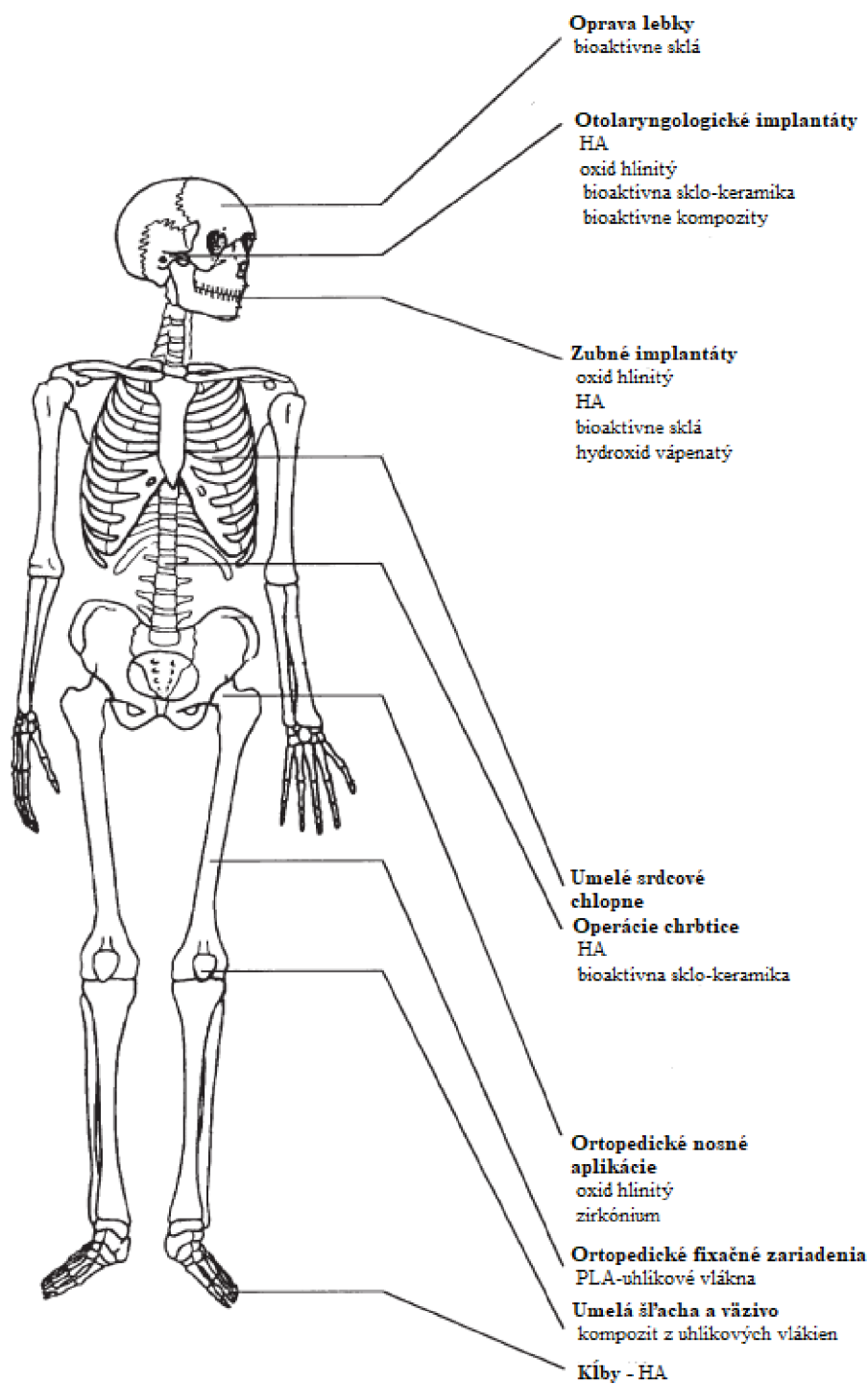
## **2.2. Biomateriály a biokeramika**

Biomateriály sú syntetické materiály určené pre náhradu prírodných biomateriálov v ľudskom tele. Aby plnili funkciu náhrady, musia byť biokompatibilné, tzn. netoxické a nevyvolávať v tele obrannú imunitnú reakciu. Podľa stupňa interakcie so živým tkanivom môžu byť biokompatibilné materiály bioinertné alebo bioaktívne [2].

Bioinertné materiály sú prvou generáciou biomateriálov, ktoré neovplyvňujú biologický systém a vykazujú minimálnu alebo žiadnu interakciu s hostiteľským tkanivom. Rozhranie medzi materiálom a hostiteľským tkanivom tvorí tenká acelulárna kapsula s minimálnou adhéziou a materiál je v nej zapuzdrený. Typicky sa jedná o kovové implantáty [11].

Druhá generácia biomateriálov sú bioaktívne materiály, ktoré vyvolávajú kontrolovanú biologickú aktivitu na rozhraní s hostiteľským tkanivom. Hlavným zástupcom je bioaktívne sklo. Bioaktívne sklá nie sú schopné len vytvoriť povrchovú štruktúru podobnú hydroxyapatitu po kontakte s biologickými tekutinami, čím podporujú stabilnú väzbu k živej kosti, ale majú aj schopnosť stimulovať kostné bunky k regenerácii, čím sa urýchľuje rýchlosť hojenia tkanív. Bioaktívne sklá sú široko využívané na reparáciu mäkkých tkanív, defektov kostí a zubov, ale aj ako nosiče liekov [11, 12].

Tretia generácia biomateriálov sú vstrebávatel'né materiály, ktoré slúžia ako dočasná náhrada kostného tkaniva. Pri obnovovaní kostného tkaniva sa implantovaný materiál postupne vstrebáva bez vzniku metabolických škodlivín. Biomateriál poskytuje hmotu, ktorá je vyžadovaná pri obnovovaní pôvodného kostného tkaniva [13].



Obrázok 2: Klinické využitie biokeramiky [14]

### 2.2.1. Biokeramika

Biokeramika je špeciálne navrhnutá a vyrobená keramika na opravu a rekonštrukciu chorých, poškodených alebo opotrebovaných častí tela. Väčšina klinických aplikácií biokeramiky sa týka opravy kostrového systému, zloženého z kostí, kĺbov a zubov (tvrdé aj mäkké tkanivá) ale aj na nahradenie častí kardiovaskulárneho systému, najmä srdcových chlopní. V mnohých aplikáciách sa keramika používa vo forme objemných materiálov

špecifického tvaru, nazývaných implantáty, protézy alebo protetické pomôcky. Biokeramika sa tiež používa na vyplnenie priestoru, zatiaľ čo prírodné opravné procesy obnovujú funkciu. V iných situáciách sa keramika používa ako povlak na substráte alebo ako druhá fáza v kompozite, ktorá kombinuje vlastnosti oboch, na nový materiál s vylepšenými mechanickými a biochemickými vlastnosťami [14, 15].

Tabuľka 1: Charakteristické vlastnosti biokeramických materiálov [15]

<b>Materiál</b>	<b>Youngov modul [GPa]</b>	<b>Pevnosť v tlaku [MPa]</b>	<b>Pevnosť väzby [GPa]</b>	<b>Tvrdosť [Hv]</b>	<b>Hustota [g/cm<sup>3</sup>]</b>
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	380	4000	300-400	2000-3000	>3,9
ZrO <sub>2</sub>	150-200	2000	200-500	1000-3000	6,0
HA	73-117	600	120	350	3,1
Biosklo	75	1000	50	-	2,5
Keramická kosť	3-30	130-180	60-160	-	-

### 2.2.1.1. Fosforečnany vápenaté

Biokeramické materiály na báze fosforečnanu vápenatého sú široko využívané v oblasti regenerácie kostí, a to ako v ortopédii, tak aj v zubnom lekárstve kvôli ich dobrej biokompatibilite, kostným štepom a kostným náhradám. Biokompatibilita je spôsobená ich hojnosťou v tele v rozpustenom alebo pevnom stave.

Kritický problém, ktorý obmedzuje širšiu klinickú aplikáciu sú mechanické vlastnosti. Fosforečnany sú krehké a majú nízku odolnosť voči nárazu a pomerne nízku pevnosť v ťahu. Hlavným dôvodom je ich porozita, ktorá slúži ako iniciačné miesto pre šírenie trhlín. Napriek tomu ich pevnosť v tlaku je pomerne dobrá, je nižšia ako normálna kosť, preto sa používajú ako implantáty bez zaťaženia, ako je operácia stredného ucha, kostná výplň v ústnej dutine alebo ako povlak na zubné a ortopedické kovové implantáty. Medzi zástupcov patrí monohydrát dihydrogénfosforečnanu vápenatého, dihydrát hydrogénfosforečnanu vápenatého, hydrogénfosforečnan vápenatý, hydroxyapatit a mnoho ďalších [16].

### 2.2.1.2. Hydroxyapatit

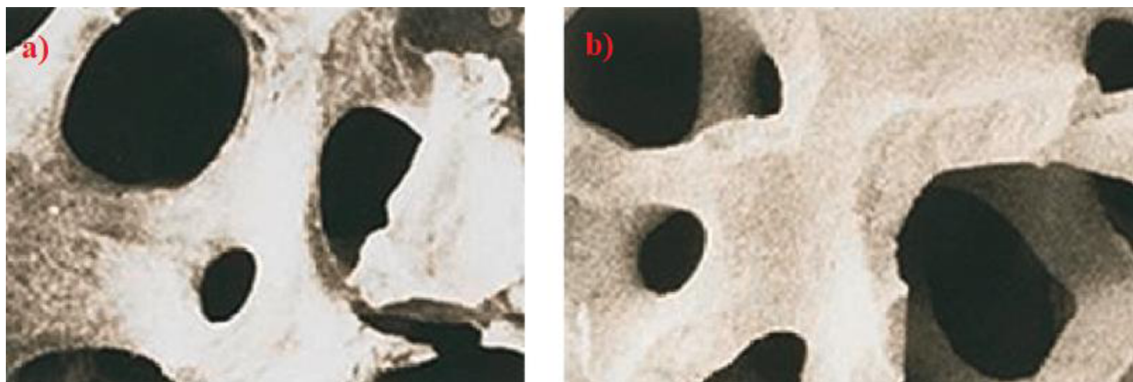
Hydroxyapatit (HA) je členom apatitovej skupiny keramiky. Bol veľakrát testovaný ako umelá kosť, pretože je podobný prirodzenej kosti, aj keď neobsahuje organické zložky ako kolagén a polysacharidy. HA sa syntetizuje a používa na výrobu rôznych foriem implantátov (pevných a poréznych) a ako povlak na iných implantátoch.

HA sa vyrába rôznymi metódami ako je hydrotermálna syntéza, mikrovlnná syntéza, precipitačná metóda. Hydroxyapatitová keramika sa zvyčajne pripravuje z apatitu získaného zrážaním alebo hydrolýzou a následne spekaných pri teplotách medzi 950 °C a 1300 °C.

Hlavným problémom, ktorý sa vyskytuje pri aplikácii HA, je jeho pomerne slabá mechanická odolnosť. Z toho dôvodu sa využíva aj ako povlak na kovové implantáty, ktorý je nanášaný plazmovým nástrekom a zabezpečuje im primárnu stabilitu. Veľké úsilie bolo vynaložené na zlepšenie mechanických vlastností HA keramiky na použitie v implantátoch.

Mechanické vlastnosti môžu byť zlepšené kalcináciou práškov alebo modifikáciou spekania vytvorených vzoriek. Kalcinované prášky majú tendenciu agregovať a tiež majú určitú heterogenitu vo svojom zložení. Okrem toho, vysoká kalcinačná teplota, ktorá sa vyžaduje, môže spôsobiť zväčšenie veľkosti zrna, preto je potrebná oveľa nižšia teplota.

Hydroxyapatit je klasifikovaný ako biokatívny, čo znamená, že podporuje vrastanie kostí a priame spojenie medzi kosťou a povrchom implantátu. Hydroxyapatit je rozpustný v kyslom prostredí roztoku, pričom je nerozpustný v alkalickom a mierne rozpustný v destilovanej vode. Rozpustnosť v destilovanej vode sa zvyšuje pridaním elektrolytov. Okrem toho sa mení rozpustnosť HA v prítomnosti aminokyselín, proteínov, enzýmov a ďalších organických zlúčenín. Tieto rozpustné vlastnosti sú úzko spojené s biokompatibilitou HA s tkanivami a jeho chemickými reakciami s inými zlúčeninami. Avšak, rýchlosť rozpustnosti závisí od rozdielov v tvare, porozite, veľkosti kryštálov, kryštalinity, a veľkosti kryštálov. Hydroxyapatit reaguje aktívne s proteínmi, lipidmi a inými anorganickými a organickými látkami[15, 17].



Obrázok 3: Mikroštruktúrna podobnosť ľudskej kosti a) a hydroxyapatitu b) [18]

### 2.2.1.3. Oxid hlinitý

Čistý oxid hlinitý (> 99,5%) sa používa od začiatku sedemdesiatych rokov ako implantátový materiál, obzvlášť pre umelé kĺbové protézy (väčšinou bedier) a zuby, pretože má vynikajúcu kompatibilitu s tkanivami a dobré mechanické vlastnosti (najmä trenie a opotrebovanie). Má však oveľa nižšiu pevnosť v ťahu než pevnosť v tlaku v dôsledku jeho krehkosti (to znamená, že nemôže prechádzať plastickou deformáciou ako kovy a plasty). Tieto charakteristiky obmedzujú jeho použitie na tlakové aplikácie.

Väčšina oxidu hlinitého použitého na výrobu implantátov je buď polykryštalická pevná látka s vysokou hustotou a čistotou, alebo umelo pestovaný bezfarebný monokryštál. Rovnako ako u všetkých ostatných krehkých materiálov, mechanické vlastnosti polykryštalického oxidu hlinitého závisia vo veľkej miere od veľkosti zrna, distribúcie zrna a porozity.

V biomedicínskych aplikáciách má oxid hlinitý značné výhody oproti iným materiálom kvôli jeho inertnosti, ktorá ponúka vynikajúcu biologickú kompatibilitu a nesenzibilizáciu tkanív. Navyše jeho vynikajúce opotrebovanie a trecie vlastnosti in vivo ho robia vhodným pre umelé povrchy kĺbov. Jeho pevnosť v tlaku, ktorá je vyššia ako jeho pevnosť v ťahu, spôsobuje, že je vhodnejší na kompresné zaťaženie, ako u umelých kĺbov a zubov. Jedným z nedostatkov oxidu hlinitého je vznik a rast mikrotrhliniek, čo vedie k rýchlemu opotrebovaniu.

Nedostatkom sú aj nečistoty, ktoré možno prekonať starostlivou kontrolou kvality počas výroby [15, 19].

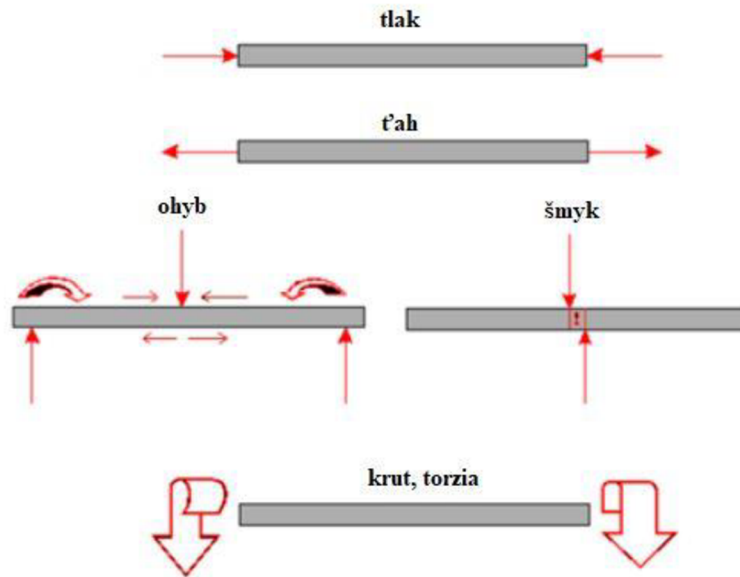
#### **2.2.1.4. Oxidy zirkónia**

Zirkónium je lesklý šedo-biely kov, ktorý môže mať modročiernu farbu v práškovej forme. Zirkónium sa vyznačuje svojou chemickou stálosťou, je odolné voči vode aj väčšine minerálnych kyselín a alkalických hydroxidov. V prírode sa nenachádza ako čistý oxid. Hlavné zdroje zirkónia sú zirkón ( $ZrSiO_4$ ) a baddeleyit ( $ZrO_2$ ), väčšina použitého materiálu sa chemicky extrahuje z týchto dvoch minerálov. Oxidy zirkónia sa používajú na výrobu implantátov a kĺbových náhrad. Niektoré z jeho mechanických vlastností sú rovnako dobré alebo lepšie, ako vlastnosti keramiky z oxidu hlinitého. Zirkónium bolo použité na nahradenie oxidu hlinitého, pretože vyrobené implantáty môžu byť tvrdšie a silnejšie ako z oxidu hlinitého. Sú vysoko biologicky kompatibilné, podobne ako iné keramické materiály a môžu byť vyrobené do takých veľkých implantátov, ako je femorálna hlava a náhrada bedrového kĺbu. Niektoré z ich nevýhod zahŕňajú skutočnosť, že vykazujú vysokú hustotu, nízku tvrdosť a fázové transformácie pri strese vo vodných podmienkach, čím sa zhoršujú ich mechanické vlastnosti. Oxid zirkoničitý má vynikajúce mechanické vlastnosti (pevnosť, tvrdosť) porovnateľné s tvrdosťami na báze kovu, čo je možné využiť na prípravu keramických korúnok, mostíkov a ostatných implantátov v stomatológii [15, 20].

### **2.3. Mechanické vlastnosti keramiky**

#### **2.3.1. Pevnosť**

Keramika má tendenciu byť slabá v pevnosti v ťahu, ale silná v pevnosti v tlaku. Kovy majú pevnosť v tlaku blízku pevnosti v ťahu, ale keramika môže mať pevnosť v tlaku niekoľkonásobne vyššiu ako v ťahu. Rozdiel medzi pevnosťou v ťahu a tlaku je čiastočne spôsobený krehkým charakterom keramiky. Pri vystavení zaťaženiu ťahom nie je keramika schopná uvoľniť napätie. Pevnosť keramických materiálov môže byť ovplyvnená prítomnosťou fyzickej chyby v materiáli, ako sú trhliny, ktoré sa môžu šíriť v ťahu a nie v kompresii, vnútorné cudzorodé látky a kryštály s abnormálnym rastom zrn. Zvýšenie priemernej veľkosti zrna oslabuje keramiku, pretože väčšie zrná prinášajú väčšie chyby. Väčšie keramické komponenty, kvôli svojmu objemu, majú vyššiu pravdepodobnosť vnútorných chýb v porovnaní s menšími. Pevnosť keramiky je významne ovplyvnená zmenami behom výroby a výrobných procesov. Znižovanie pevnosti je ovplyvnené zvyšovaním defektu v materiáli. Pevnosť je rozdelená na pevnosť v tlaku, ohybe, ťahu, šmyku a krute (torzii). Pevnosť v ťahu sa u keramických materiálov nestanovuje z dôvodov nemožnosti technicky realizovať trhaciu skúšku reprodukovateľným spôsobom. Mechanická pevnosť keramiky v oblasti krehkého chovania je predovšetkým závislá na hodnote Youngovho modulu pružnosti. Youngov modul pružnosti je jednou zo základných materiálových charakteristík [21].



Obrázok 4: Pôsobenie síl pri stanovení pevnosti [21]

### 2.3.2. Pružnosť

Pokročilé keramické materiály majú vysokú tuhosť, ktorá je definovaná pružnosťou vzorku po jeho zaťažení. Materiály, ktoré vykazujú menšiu pružnú deformáciu pri zaťažení, majú vyššiu tuhosť. Až do kritického namáhania ťahovou alebo tlakovou silou je deformácia priamoúmerná napätiu [21].

### 2.3.3. Tvrdosť

Tvrdosť je jednou z najčastejšie meraných vlastností keramiky. Jej hodnota pomáha charakterizovať odolnosť voči deformáciám, zhutneniu a lomu. Tvrdosť je rozhodujúca pre rezné nástroje, diely odolné voči opotrebeniu a oteru, protetické kĺbové náhrady a mnoho ďalších. Skúšky tvrdosti sa delia na vtláčané, vrypové a odrazové. Tvrdosť keramiky je zvyčajne meraná na konvenčných mikrotvrdomeroch s diamantovým indentorom podľa Vickersa alebo Knoopu.

Pri Vickersovej metóde merania mikrotvrdosti je vtláčaný diamantový ihlan (indentor) s malým zaťažením, čo vytvára menšie, hlbšie odtlaky, ktoré s väčšou pravdepodobnosťou prasknú ako u Knoopu. Pri Knoopovej metóde sa využíva predĺžený indentor na prekonanie trhlín pozorovaných v krehkých materiáloch. Tvrdosť podľa Knoopu je často vyššia pri nízkych zaťaženiach, ale potom klesá na plošnú záťaž, ktorá je o niečo menšia ako tvrdosť podľa Vickersa pri vysokých zaťaženiach [22].

## 2.4. Porozita a jej vplyv na scaffold

Porozita je definovaná ako pomer objemu pórov k celkovému objemu porézneho telesa, ktorá sa všeobecne vyjadruje v percentách. Zavedenie porozity v keramike umožňuje rozšíriť počet možných aplikácií v oblasti biomedicíny. Porézne materiály sú klasifikované podľa veľkosti pórov. IUPAC klasifikuje porézne materiály na:

- mikroporézne materiály majú priemer pórov menší ako 2 nm,
- mesoporézne materiály majú priemer pórov medzi 2 nm a 50 nm,
- makroporézne materiály majú priemer pórov väčší ako 50 nm [23].

Porozita umožňuje chemické spojenie medzi biokeramikou a kosťami. Otvorená porozita je priamo spojená s tvorbou kostí a poskytuje povrch a priestor pre pripojenie buniek a rast kostí. V tkanivovom inžinierstve nachádzajú uplatnenie najmä porézne biokeramické scaffoldy, čo sú trojrozmerné porézne skelety s vyššou poréznosťou a homogénnou prepojenou sieťou pórov, ktoré slúžia sa kontrolu bunkových funkcií a usmerňujú tvorbu nových tkanív a orgánov. Scaffold musí mať vzájomne prepojenú štruktúru s veľkým pomerom povrchu k objemu a veľkosťou pórov najmenej 100  $\mu\text{m}$  v dôsledku veľkosti buniek (ideálne na opravu kostí) aby sa umožnila proliferácia buniek, rast tkaniva, uľahčila vaskularizácia konštruktu a transport živín. Odporúčajú sa však veľkosti pórov viac ako 300  $\mu\text{m}$  v dôsledku zvýšenej tvorby novej kosti a tvorby krvných kapilár. Rozhodujúcim aspektom pre úspešný výsledok scaffoldov pre nosné aplikácie je potreba vyrovnať porozitu skeletu s jeho mechanickými vlastnosťami. Vysoko prepojená porézna štruktúra (typicky obsah pórov nad 50 obj. %) je nevyhnutná na umožnenie úplnej integrácie scaffoldu po jeho implantácii. Avšak porozita ovplyvňuje mechanickú spôsobilosť zložky, pretože pevnosť a tuhosť sa postupne znižujú so zvyšujúcou porozitou a veľkosťou prepojenia. Zvýšenie veľkosti prepojenia má za následok zníženie pevnosti v tlaku, pretože zvýšenie prepojenia s konštantnou veľkosťou pórov vedie k zvýšeniu porozity [24, 44].

Veľkosť pórov ovplyvňuje aj proliferáciu buniek. Väčšia veľkosť pórov je prospešná pre bunkový rast, pretože vo väčšom priestore sa môže získať väčšia výmena média. V tkanivovom inžinierstve pre najlepšie pripojenie buniek v scaffoldoch je ideálna veľkosť prepojenia pórov 120  $\mu\text{m}$  a veľkosť pórov 300 – 400  $\mu\text{m}$ . Póry väčšie ako 400  $\mu\text{m}$  neumožňujú zachytenie niektorých buniek v scaffoldoch pri očkovaní a väčšie prepojenia v okolí 150  $\mu\text{m}$  znižujú počet naočkovaných buniek v scaffoldoch [25].

Pri vaskularizácii, ktorá je rozhodujúca pre regeneráciu kostí, vedie zväčšenie veľkosti pórov k zväčšeniu veľkosti krvných ciev rastúcich do makroporéznych biokeramických scaffoldov. Zväčšením veľkosti prepojenia sa zväčšuje veľkosť a počet krvných ciev vytvorených v makropórových bunkách. Makropóry poskytujú hlavne priestor pre rast krvných ciev a prepojenia fungujú ako dvere pre rast krvných ciev [25].

Optimálne parametre pórov sa môžu líšiť pre rôzne aplikácie tkanivového inžinierstva, ktoré je potrebné vziať do úvahy pri konštrukcii scaffoldov [25].

## **2.5. Metóda freeze-casting**

Freeze-casting je metóda tuhnutia suspenzie pri výrobe poréznych materiálov. Skladá sa z prípravy suspenzie, spodného mrazenia suspenzie, lyofilizácie a spekania. Výhoda freeze-castingu je jeho flexibilita. Objemová frakcia, veľkosť, tvar a orientácia porozity môžu byť ladené zmenou charakteristiky suspenzie ako aj podmienok tuhnutia. Základná keramická suspenzia pre freeze-casting pozostáva z najmenej troch základných zložiek a jej jemné ladenie umožňuje prispôbiť veľkosť pórov, tvar a celkovú porozitu [26, 27].

### **2.5.1. Príprava suspenzie**

Pri príprave suspenzie musí byť keramický prášok správne dispergovaný v rozpúšťadle, takže sa často používa disperzant. Teplota suspenzie je závislá na rozsahu, v akom je rozpúšťadlo kvapalné, laboratórna teplota v prípade vody, ale pre suspenzie na báze kamfénu a terc-butylalkoholu je potrebná odlišná teplota. Stabilita suspenzie sa musí kontrolovať, aby sa zabránilo segregáčnemu javu pri procese mrazenia. Keramická suspenzia sa skladá z troch základných zložiek, ktorými sú keramický prášok, rozpúšťadlo a aditíva [28].

#### **2.5.1.1. Keramický prášok**

Prvou zložkou suspenzie je keramický prášok. Jeho zastúpenie býva v rozmedzí 10-50 objemových % celkovej suspenzie v závislosti od požadovaného množstva celkovej porozity. Nižšia hodnota ako 10 obj. % by bola problematická pre mechanickú integritu konečnej konštrukcie s veľmi tenkými keramickými stenami, zatiaľ čo vyššia hodnota ako 50 obj. % by nebola vhodná pre rast rozpúšťadlových kryštálov a následnú tvorbu porozity, kvôli nízkemu obsahu rozpúšťadla v suspenziách. Fyzikálno-chemické vlastnosti prášku ako je veľkosť zrna, hodnota pH alebo špecifický povrch majú vplyv na stabilitu suspenzie. Vhodnými keramickými práškami je napr. hydroxyapatit, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, oxid titaničitý, ale aj kompozitné materiály [26].

#### **2.5.1.2. Rozpúšťadlo**

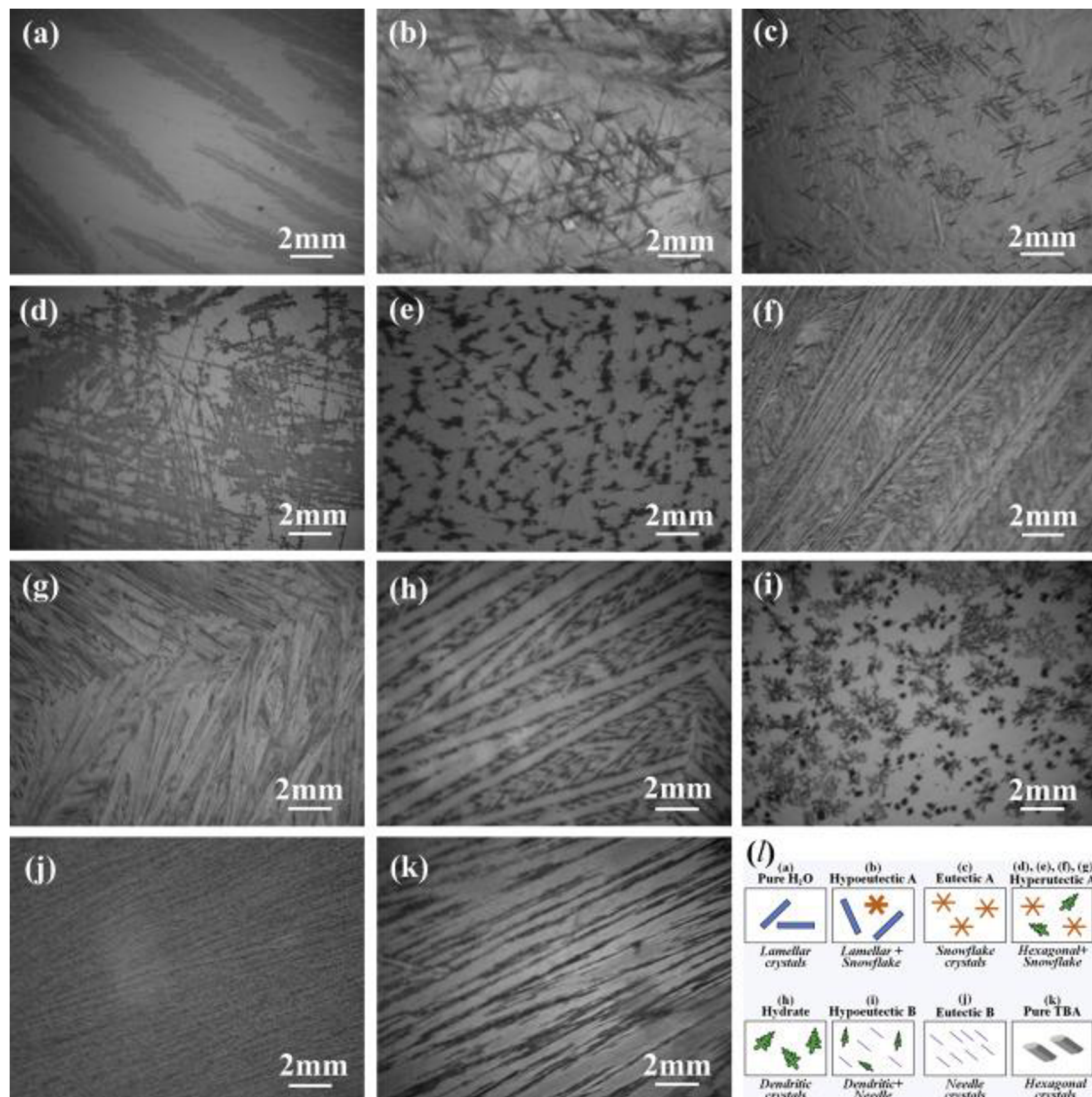
Druhou zložkou suspenzie je rozpúšťadlo. Tri hlavné rozpúšťadlá sú voda, kamfén a terc-butylalkohol, pričom každé z nich vedie k inému tvaru porozity. Najčastejšie sa využíva voda v dôsledku absencie chemickej toxicity počas celého procesu. Výsledná porozita spojená s použitím vody ako rozpúšťadla predstavuje lamelárny tvar v dôsledku väčšej vertikálnej rýchlosti rastu kryštálov ľadu oproti horizontálnemu rastu. Keď podmienky rastu kryštálov vedú k veľmi malému lamelovému rozstupu, napríklad vďaka vysokej rýchlosti mrazenia, môže byť rýchlosť rastu kryštálov dostatočne veľká na vytvorenie mostíkov medzi lamelami [26, 29].

Kanfén, organické rozpúšťadlo, tvorí dendritickú porozitu. Kamfén môže byť zmrazený a ľahko sublimovaný v blízkosti izbovej teploty, čo je jeho značnou výhodou. Freeze-casting na báze kamfénu sa môže použiť na zmrazenie veľmi zriedených keramických suspenzií, čo umožňuje výrobu keramiky s ultra vysokou poréznosťou a úplne prepojenými kanálmi pórov.



Kamfénové kryštály majú izotropnú štruktúru, zatiaľ čo voda tuhne do anizotropných šesťuholníkových řadových kryštálov [26, 29, 30, 31].

Terc-butylalkohol dáva porozitu s prizmatickým tvarom. Terc-butylalkohol sa často mieša s vodou, ktorá sa používa ako rozpúšťadlo pri lyofilizácii, pretože TBA môže rozpúšťať organickú látku. TBA a voda v kvapaline sú nekonečne rozpustné, ale po tuhnutí nepredstavujú jediný tvar. Tvar kryštálu sa mení v pomere TBA a vody. Kanáliky s hexagonálnymi pórnami sa dajú získať pri keramickej suspenzii so 100 hmotnostnými % TBA [26, 32].



Obrázok 5: Typická stuhnúť mikroštruktúra rôznych kryštálov z terc-butylalkoholu (TBA): (a) 100% vody; (b) 10% TBA; (c) 20% TBA; (d) 30% TBA; (e) 40% TBA; (f) 50% TBA; (g) 60% TBA; (h) 70% TBA; (i) 80% TBA; (j) 90% TBA; (k) 100% TBA; (l) schéma vplyvu zloženia na mikroštruktúru [32]

### 2.5.1.3. Aditíva

Poslednou zložkou keramickej suspenzie sú aditíva. Aditíva sa využívajú na zaistenie stability a viskozity suspenzie, aby sa zabránilo sedimentácii počas kroku mrazenia, a na

zabezpečenie dostatočnej mechanickej pevnosti pre štruktúru green body počas kroku lyofilizácie a tým zabránili jej poškodeniu. Green body je keramické teleso (prášok) pred procesom spekania. Aditíva môžu byť tiež prítomné v suspenzii ako štruktúrne činidlo, ktoré pri freeze-castingu môže upravovať štruktúru lamiel. Ďalej umožňujú regulovať povrchovú štruktúru a drsnosť lamiel vytvorených počas procesu mrazenia [26, 29].

V niektorých prípadoch sa využívajú funkčné aditíva zahŕňajúce napríklad enzýmy a antibiotiká na kontrolované uvoľňovanie liečiva. Môžu byť pridané od začiatku procesu, vzhľadom na biologickú funkčnosť, keď sa nevyžadujú žiadne vysokoteplotné kroky spracovania, čo je pri použití polymérov alebo zmesi keramiky a polyméru. Pridanie na začiatku zabezpečuje ich dobré priestorové rozdelenie vo finálnych materiáloch, čo môže byť nevyhnutné na zabezpečenie postupného uvoľňovania do tela v prípade antibiotík [4].

Prídavok PVA do suspenzie má vplyv na rast ľadových kryštálov a vedie k rozdielnym morfológiám a veľkostiam pórov v keramike. PVA má za následok, že pórov je viac a sú menšie. Väčšina z nich je otvorená a viac pórov vytvára prepojenia. Hydroxyapatitová keramika s malými pórmí vyrobenými prídavkom PVA môže byť použitá ako nosič liekov [33].

Prídavok polystyrénu ako organického spojiva do suspenzie tvorenej oxidom hlinitým a kamfénom na výrobu keramiky s vyrovnanými kanálkami pórov, má za následok tvorbu poréznej keramiky s ultra vysokou poréznosťou viac ako 88% [34].

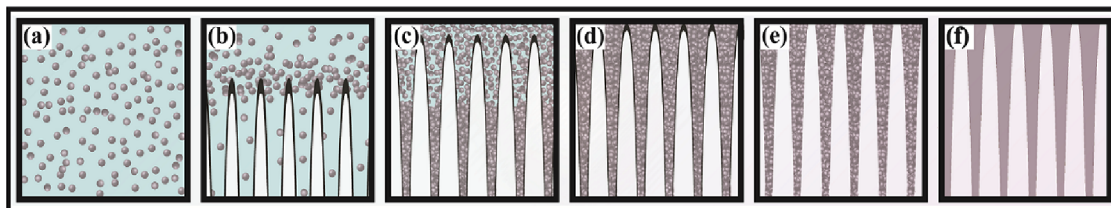
Kryoprotektanty, tiež známe ako nemrznúce činidlá, vykazujú značný pokles bodov mrazu a niektoré aj modifikujú poréznu štruktúru. Jedným z kryoprotektantov je glycerol, ktorý má za následok rovnomeré kanálky pórov. Hlavnou vlastnosťou glycerolu je znižovanie šírky pórov bez ohľadu na to, či viskozita suspenzie sa zvýšila alebo znížila po jeho pridaní. Ďalšími kryoprotektantami sú etanol alebo 1-propanol, silné interakcie vodíkových väzieb medzi alkoholmi a molekulami vody môžu narušiť kryštalizáciu ľadu, čo spôsobuje dobrú spojitosť medzi lamelami a výsledkom je vyššia pevnosť v tlaku [35].

Prídavok želatíny mení lamelárne póry na malé a prepojené bunkové póry, čiže mení dvojrozmernú lamelárnu štruktúru na trojrozmerný sieťovaný pór. Želatína má vplyv nielen na veľkosť a morfológiu pórov, ale aj na viskozitu suspenzie a porozitu [36].

Ďalšími aditívami je napríklad sacharóza, trehalóza, chlorid sodný a mnoho ďalších, ktoré tiež upravujú štruktúru keramiky [37].

### **2.5.2. Proces mrazenia**

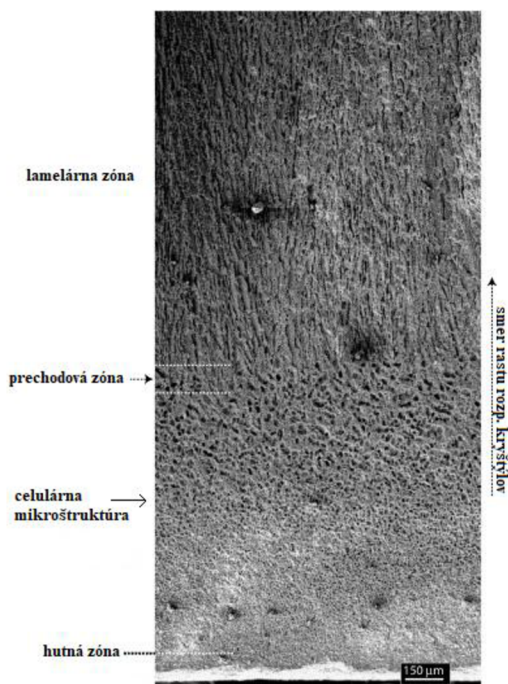
Proces mrazenia je kritická fáza, v ktorej sa vytvára štruktúra a určujú sa vlastnosti budúcej porozity. Zmrazenie suspenzie indukuje opakovane vzrast vertikálnych rozpúšťadlových kryštálov pozdĺž smeru mrznutia a súvisiace odsúvanie keramických častíc medzi týmito kryštálmi. Podmienky mrazenia sú určené počiatočnou voľbou rozpúšťadla. Nízke teploty (<0 °C) sú potrebné pri použití vody, zatiaľ čo pri použití kamfénu je dostatočná laboratórna teplota, pričom bod tuhnutia je okolo 44-48 °C. Podmienky mrazenia budú do značnej miery určovať charakteristiku rastúcich kryštálov rozpúšťadla a tým aj konečnú charakteristiku porozity [4, 26, 27].



Obrázok 6: Spracovanie krokov freeze-castingu [38]

Na Obrázku 6 môžeme vidieť znázornenie priebehu procesu freeze-casting. Suspenzia s keramickými časticami (a) sa umiestni na chladiace médium; kryštály ľadu rozpúšťadla sa šíria v smere teplotného gradientu a súčasne odtláčajú keramické častice z pohybujúcej sa mrznúcej prednej časti (b). Oblasť nahromadených častíc sa uhýba medzi ľadové kryštály (c). Po úplnom stuhnutí (d) sa ľadové kryštály odstránia lyofilizáciou (e). Nakoniec sa častice tepelne spracujú spekaním na zahustenie stien (f).

Výsledná mikroštruktúra môže byť rozdelená do troch charakteristických zón (Obrázok 7), z ktorých sa každá vyznačuje odlišným tvarom a rozmermi pórov. V hutnej zóne, ktorá sa nachádza najbližšie k chladiacemu médiu, nie je pozorovaná žiadna porozita. Je to spôsobené teplotnou zmenou a rýchlym rastom rozpúšťadlových kryštálov, ktoré zachycujú častice suspenzie. Po hutnej zóne nasleduje prechodová zóna, ktorá je charakteristická celulárnou mikroštruktúrou a začínajú vznikajú lamely. Prechodová zóna je závislá od rýchlosti mrazenia, koncentrácie suspenzie a veľkosti keramických častíc. Na začiatku prechodovej zóny je priemerná veľkosť pórov malá a vrchná časť vykazuje lamelárnu štruktúru. Konečná lamelárna zóna obsahuje lamelárnu mikroštruktúru s vyrovnanými pórmí v smere rastu kryštálov a prepojenou porozitou [39].



Obrázok 7: Charakteristická mikroštruktúra vytvorená pomocou metódy freeze-casting [39]

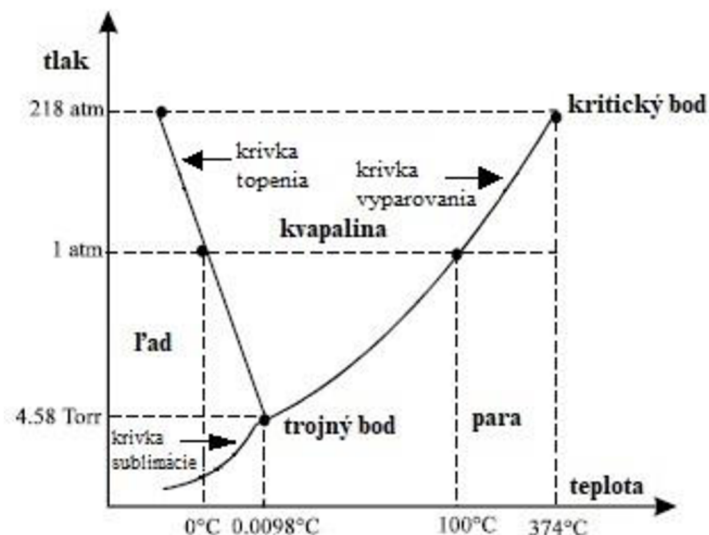
### **2.5.2.1. Vplyv rýchlosti mrazenia na mikroštruktúru**

Najdôležitejšími parametrami pri procese freeze-casting sú teplota mrazenia, obsah tuhých látok, rýchlosť a spôsob ochladzovania. Teplota mrazenia sa pohybuje od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až po teplotu kvapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Obsah tuhých látok určuje objem porozity a veľkosť pórov. Je potrebný optimálny rozsah koncentrácií suspenzie, aby sa zabránilo kolapsu mikroštruktúry. Parameter, ktorý dominantne ovplyvňuje orientáciu porozity je chladiaci proces. Ak chceme získať mikroštruktúru so smerovo orientovanými pórmami musí byť v kontakte s chladiacim zariadením iba spodná časť suspenzie. Proces chladenia sa môže uskutočňovať pri konštantnej teplote alebo pri konštantnej rýchlosti mrazenia. Keď je teplota udržiavaná konštantná, mikroštruktúra ukazuje tvorbu rôznych orientovaných kolónií s vyrovnanými pórmami, zatiaľ čo v prípade, že sa zmrazovanie uskutočňuje konštantnou rýchlosťou, získa sa porézna štruktúra s jednosmernými kanálkami. Kinetika tuhnutia má vplyv na veľkosť porozity a štruktúry zmrazenej keramiky. Veľkosť pórov sa môže meniť väčšinou zvýšením alebo znížením rýchlosti mrazenia. Keďže sú kanály pórov vysoko anizotropné, sú charakterizované dlhou a krátkou osou. Pri nízkej rýchlosti chladenia ( $<1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), bude konečná mikroštruktúra charakterizovaná veľkou hrúbkou lamiel ( $>50\text{ }\mu\text{m}$ ) a šírkou pórov ( $>500\text{ }\mu\text{m}$  v dlhej ose a  $40\text{ }\mu\text{m}$  v krátkej ose). Naopak pre rýchlu chladiacu rýchlosť ( $>5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) sú charakteristické jemnejšie lamely a póry [39, 40].

### **2.5.3. Lyofilizácia**

Lyofilizácia alebo tiež mrazové sušenie, je metóda na odstránenie vody sublimáciou ľadových kryštálov zo zmrazeneho materiálu. Prebieha pod trojným bodom vody (rozpúšťadla), ľad v produkte je priamo premenený na vodnú paru, ak je parciálny tlak vodnej pary nižší ako parciálny tlak ľadu pri jeho príslušnej teplote [41].

Prvá fáza lyofilizácie je primárne sušenie, kedy sa materiál zbavuje vlhkosti. Počas primárneho sušenia sa znižuje tlak a do materiálu sa privádza teplo, aby sa voda sublimovala. Vzniknutá vodná para desublimuje na kondenzátore, ktorý je oveľa chladnejší ako materiál ( $-50$  až  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  oproti  $-10$  až  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tlak pár v kondenzátore je oveľa nižší ako pri produkte. Teplota produktu nesmie nikdy prekročiť jeho teplotu eutektického alebo skleneného prechodu. Ak dôjde k prekročeniu tejto teploty, ľad sa začne skvapalňovať, čím by narušil produkt. Na konci primárneho sušenia väčšina produktov stratí 95 % svojej vlhkosti. Zostávajúca vlhkosť 5 % je často dostatočná na to, aby ešte podporovala biologickú alebo chemickú aktivitu, ktorá spôsobí degradáciu. Odstránenie zvyšnej adsorbovanej alebo viazanej vody prebieha desorpciou, sekundárnym sušením. Desorpcia zahŕňa odstránenie molekúl vody, ktoré priliehajú k povrchu produktu pomocou Van der Waalsových síl. Tento proces je oveľa energeticky náročnejší ako sublimácia. Teplota sa v komore zvýši o  $20 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  nad konečnú teplotu primárneho sušenia [41, 42].



Obrázok 8: Fázový diagram trojného bodu vody [43]

#### 2.5.4. Spekanie

Po úplnom odstránení rozpúšťadla, získané green body môže byť spekané bežnou technikou spekania, pri ktorej dôjde k spojeniu keramických častíc. Spekanie pozostáva z vysokotepeľného spracovania green body, ale pri teplote nižšej ako je teplota topenia. Pri vysokej teplote môže nastať zhrubnutie mikroštruktúry, kedy dochádza k rastu veľkosti zrna a pórov. Podmienky spekania, ako je teplota a čas, závisia od použitej keramiky a môžu byť optimalizované na dosiahnutie požadovanej veľkosti zrna a hustoty. Počas fázy spekania sa z keramických stien môže odstrániť mikroporéznosť, ale makroporéznosť vytvorená kryštálmi rozpúšťadla sa zachová. Pri spekaní môže byť okrem vysokej teploty využitý aj tlak, ale nízka pevnosť green body pri metóde freeze-casting zabraňuje akémukoľvek použitiu spekania pod tlakom [4].

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1. Použité chemikálie

- Hydroxyapatit: 502,31 g/mol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Polyvinylalkohol: 61,00 g/mol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dolapix CE64: 660 g/mol (Zschimmer & Schwarz, Nemecko)
- 2-oktanol: 130,23g/mol (Fluka AG, Švajčiarsko)
- Sacharóza: 342,30 g/mol (Cukrovar Vrbátky, Česká republika)

#### 3.2. Použité prístroje

- Presné váhy (Mettler Toledo)
- IR teplomer (Votcraft IR 2200-50D)
- Chladiaca doska (Medit)
- Lyofilizátor (vlastný prototyp)
- Vysokoteplotná pec (Clasic HT1200M)
- Stereolupa (Zeiss Stemi 508)
- Elektronový mikroskop (FIB/SEM Tescan Lyra3)

#### 3.3. Metódy prípravy

##### 3.3.1. Zloženie a príprava keramickej suspenzie

Základnou zložkou keramickej suspenzie bol hydroxyapatit, ktorý slúži ako plnivo. Ako rozpúšťadlo bol použitý vodný roztok polyvinylalkoholu. Voda ovplyvňuje výsledné póry, ktoré majú lamelárny tvar vďaka väčšej vertikálnej rýchlosti rastu kryštálov oproti horizontálnemu rastu. Prídavok polyvinylakoholu slúži ako spojivo, pretože nereaguje s prísadami, ovplyvňuje morfológiu a veľkosť pórov [33]. Dolapix CE64 slúži ako disperzant a stabilizuje suspenziu. Ďalšie aditívum je 2-oktanol, ktorý odvzdušňuje suspenziu pri miešaní pred vákuovým odvzdušením pomocou exsikátoru. Sacharóza pomáha kontrolovať a spevňovať štruktúru rastúcich kryštálov.

Použitá keramická suspenzia obsahovala 15 obj. % hydroxyapatitu, ďalej označenie ako 15S.

Hydroxyapatit bol upravený pred použitím kalcináciou, kedy sa redukujú uhličitany z východiskového prášku. Kalcinácia bola uskutočnená vo vysokoteplotnej peci pri teplote 800 °C počas 2 hodín. Pri teplote nad 800 °C sa hydroxyapatit mení na fosforečnan vápenatý.

Do suspenzie sa používal približne 1% roztok polyvinylalkoholu, ktorý sa pripravuje stanoveným postupom. Bolo navážené 9,61 g PVA, ktorý bol prevedený do plastovej fľaše s 1000 ml deionizovanej vody. Fľaša bola umiestnená do vodného kúpeľa o teplote 97 °C, aby sa rozpustil PVA.

Do plastovej fľaše na prípravu suspenzie boli vložené guľôčky oxidu zirkoničitého, aby pokryli dno, kvôli dôkladnému premiešaniu suspenzie. Do vážiacej misky bolo navážené stanovené množstvo sacharózy, ktorá bola prevedená do plastovej fľaše spolu s pripraveným a naváženým roztokom polyvinylakoholu. Roztok bol premiešavaný až do rozpustenia

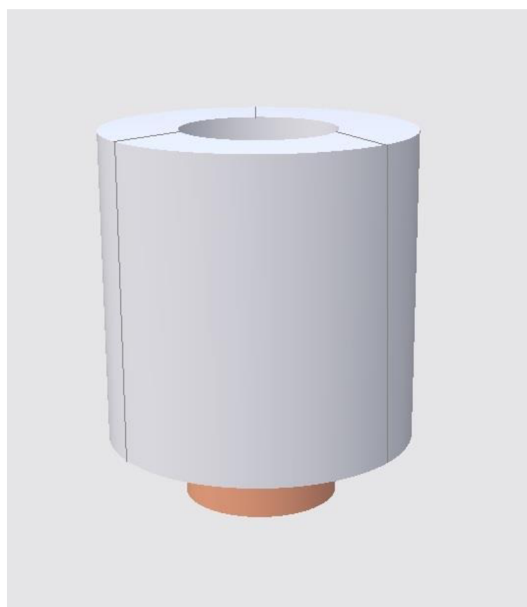
sacharózy. Do roztoku bolo napipetované stanovené množstvo Dolapixu CE64 a oktanolu. Po premiešaní roztoku bolo postupne pridávané 30 g kalcinovaného hydroxyapatitu. Na záver bola fľaša uzavretá a umiestnená na miešacie valce, kde pobudla približne 24 hodín. Konečné zloženie suspenzie s 15 obj. % hydroxyapatitu je uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Zloženie suspenzie s 15 obj.% hydroxyapatitu

<b>Chemikália</b>	<b>Hmotnosť [g]</b>	<b>Obj. zastúpenie [% obj.]</b>	<b>Hmot. zastúpenie [% hmot.]</b>
Hydroxyapatit	30,0	15,1	34,08
Polyvinylakohol	1,1	1,1	1,25
Voda	51,5	80,7	58,50
Dolapix CE64	2,0	2,8	2,22
2-oktanol	0,83	1,0	0,94
Sacharóza	2,6	-	3,00

### 3.3.2. Forma

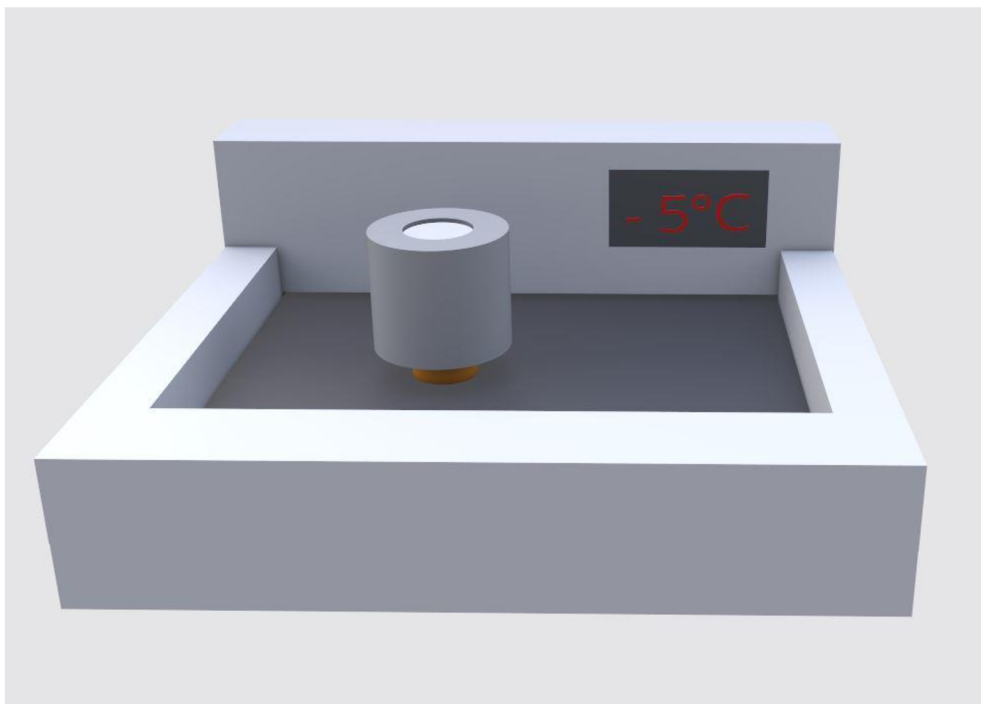
Forma sa skladá z podstavy, troch stien a medeného valčeku. Výška stien je 45,4 mm a hrúbka je 11,9 mm. Medený valček má výšku 13,9 mm a priemer 25,4 mm. Steny a podstava boli vytlačené pomocou 3D tlačiarne z kyseliny polymliečnej. Materiál vyrobený z kyseliny polymliečnej má dobrú tuhosť, tvrdosť, pevnosť, ale aj trvanlivú štruktúru. Steny formy sú duté, čo slúži ako izolant a dochádza tam k menšiemu prestupu tepla. Naopak medený valček, ktorý je v kontakte s chladiacou podložkou má vysoký koeficient tepelnej vodivosti, čo zabezpečuje dobrý prenos tepelnej energie. Steny spolu s podstavou sú spojené pomocou vazelíny, ktorá zabezpečuje nepretečenie suspenzie a jednoduchú rozložiteľnosť formy.



Obrázok 9: Model formy využívanej pri freeze-castingu

### 3.4. Metóda freeze-casting pomocou chladiacej dosky

Suspensia bola odobratá z miešacích valcov a vložená do exsikátoru, kde bola ďalej odvdzdušená po dobu 5 minút. Zložené formy boli položené na chladiacu dosku aby sa nachladili, čo bolo pozorované infračerveným teplomerom. Po nachladení foriem bola do nich vliata odplynená suspenzia a zaznamenaná jej teplota. V rovnakých časových intervaloch (od 10 po 50 minút) bola teplota znižovaná o 5 °C až do -35 °C. Pri každom znižovaní teploty chladiacej dosky bola zmeraná a zaznamenaná teplota hladiny suspenzie. Teplota bola zaznamenávaná až do úplného zmrazenia suspenzie. Úplne zmrazenie suspenzie bolo pozorované voľným okom, kedy sa na vrchnej strane vzorky objavilo lamelárne štruktúrovanie a overené pomocou IR teplomeru, kedy hodnota teploty prekročila hranicu -5 °C.



Obrázok 10: Model sústavy pri metóde freeze-casting pomocou chladiacej dosky

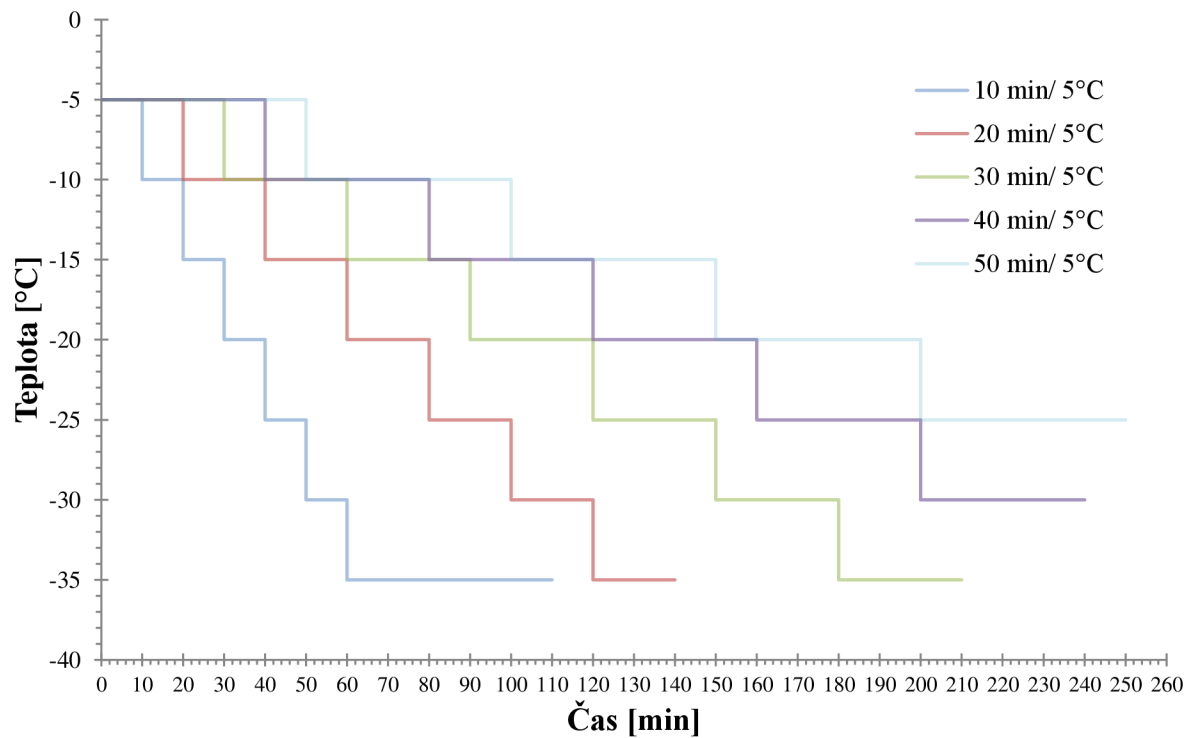
#### 3.4.1. Typy rýchlosti mrazenia

Pomocou freeze – castingu s chladiacou doskou prebiehalo znižovanie teploty pomocou 5 časových intervalov (10, 20, 30, 40, 50 minút) pri teplotnom gradiente od -5 °C po -35 °C s krokom -5 °C. Z toho vyplýva, že po uplynutí určitého časového intervalu sa zníži teplota o 5 °C až do -35 °C, čo bolo dosiahnuteľné maximum na chladiacej doske.

Suspensia bola vlietaná do foriem až po okraj, preto výška zmrazeného vzorku činila 45,5 mm. Na základe výšky zmrazeného vzorku ( $h_v$ ) a zaznamenaného času zmrazenia vzorky ( $t_z$ ) bola vypočítaná priemerná rýchlosť mrazenia podľa vzťahu (1).

$$v = \frac{h_v}{t_z} \quad (1)$$

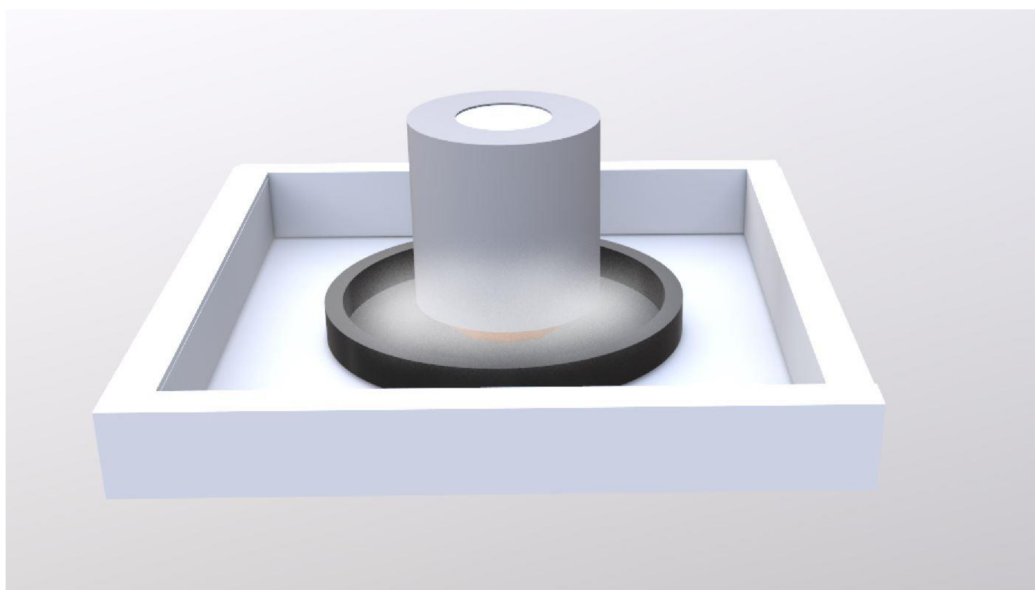




Obrázok 11: Graf teplotného gradientu mrazenia pomocou chladiacej dosky

### 3.5. Metóda freeze-casting pomocou tekutého dusíku

Odvzdušnenie suspenzie a nachladenie foriem prebiehalo rovnako ako pri chladení pomocou chladiacej dosky. Suspenzia bola vliata do nachladenej formy a forma bola vložená do plastovej misky s tekutým dusíkom. Plastová miska bola umiestnená na veľkú polystyrénovú podložku, aby sa čo najviac zabránilo prestupu tepla do okolia. Zaznamenávala sa teplota hladiny suspenzie v rovnakých časových intervaloch až do úplného zmrznutia. Tekutý dusík bol prilievajú počas celého merania.



Obrázok 12: Model sústavy pri metóde freeze-castingu s tekutým dusíkom

### 3.6. Lyofilizácia

Po zmrazení suspenzie boli formy rozobraté a zmrazené vzorky boli umiestnené na nachladenú kovovú podložku v mrazničke, kvôli dokonalejšiemu celkovému premrznutiu. Po premrznutí boli vzorky vložené do lyofilizátoru. Lyofilizácia prebiehala pri tlaku 10 Pa po dobu 24 hodín. Teplota počas procesu bola postupne zvyšovaná na 30 °C, aby sa zabránilo poškodeniu lamelárnej štruktúry keramického vzorku a dosiahnutiu teploty skleného prechodu sacharózy. Lyofilizácia musela byť vykonávaná pod teplotou skleného prechodu, kvôli prídavku sacharózy do suspenzie. Ak by teplota prekročila túto hranicu, došlo by k poškodeniu poréznej štruktúry. Počas lyofilizácie boli odstránené ľadové kryštáliky sublimáciou a desorpciou zvyšné molekuly vody priľnuté k stenám, čoho výsledkom bolo vytvorenie vertikálnej lamelárnej štruktúry vzorku.

### 3.7. Spekanie

Po lyofilizácii boli vzorky umiestnené na misku z oxidu hlinitého a vložené do vysokoteplotnej pece. Na peci bol nastavený program, pričom spekanie bolo uskutočnené pri 1200 °C s výdržou 2 hodiny. Rýchlosť zahrievania bola nastavená na 5 °C/min až do 600 °C, kvôli vypáleniu všetkých aditív a 10 °C/min až do teploty spekania. Rýchlosť ochladzovania z teploty spekania bola nastavená na 10 °C/min, aby sa zabránilo teplotnému šoku, ktorý by spôsobil prasknutie vzorky.

### 3.8. Meranie hustoty a porozity

Vzorky boli po spekaní zvážené pomocou presných váh. Digitálnym posuvným meradlom bola zmeraná výška a šírka vzoriek. Vzorky mali tvar valcov, preto bol ich objem vypočítaný zo vzťahu pre objem valca. Na základe ich hodnôt výšky ( $h$ ), polomeru ( $r$ ) a hmotnosti ( $m$ ) bola spočítaná teoretická hustota  $\rho$  zo vzťahu (2):

$$\rho = \frac{m}{\pi \cdot r^2 \cdot h} \quad (2)$$

Celková porozita  $\Pi$  pripravených vzoriek bola stanovená pomocou gravimetrickej metódy s použitím hustoty vzoriek ( $\rho$ ) a hustoty hydroxyapatitu ( $\rho_{HA}$ ), podľa vzťahu (3):

$$\Pi = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_{HA}}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Vypočítaná celková porozita je hrubý odhad skutočnej porozity.

### 3.9. Pozorovanie pomocou stereolupy a SEM

Spekané vzorky boli pred pozorovaním stereolupou, vložené do silikónovej formy a zaliaté epoxidom. Forma bola vložená do exsikátoru a vakuovaná 15 minút, aby epoxid vnikol do všetkých voľných priestorov vzorky. Po vakuovaní bola forma so zaliatymi vzorkami ponechaná pri laboratórnej teplote 24 hodín, aby epoxid stvrdol. Po stvrdnutí epoxidu boli

vzorky vybraté z formy a narezané diamantovou pilou v smere kolmom na smer tuhnutia v dvoch miestach o veľkosti 15 a 30 mm od spodnej časti vzorku.

Mikroštruktúra bola pozorovaná pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu FIB/SEM Tescan Lyra3. Vzorky boli odobraté zo strednej a vrchnej časti spekaných valčekov, aby mohla byť porovnaná zmena medzilamelárnych vzdialeností a medzizrnovej porozity.

### **3.10. Röntgenová prášková difrakčná analýza**

Fázové zloženie bolo merané pomocou röntgenového difraktometra Rigaku. Analýza bola vyhotovená pri napätí 40 kV a prúde 30 mA. Zdrojom röntgenových lúčov bola Cu anóda. Vzorky pre analýzu boli odobrané z prášku, ktorý bol získaný z drvenia spekaných vzoriek. Použité spekané vzorky boli z freeze-castingu pomocou tekutého dusíka a chladiacej platne s intervalom znižovania teploty 50 minút, aby bolo porovnané fázové zloženie.

### **3.11. Mechanické vlastnosti**

Pevnosť v tlaku je dôležitou mechanickou vlastnosťou keramickej kostnej náhrady, aby mohla odolávať zaťažovaniu. Z mechanických vlastností pripravených vzoriek bola zmeraná pevnosť v tlaku, pomocou kompresných testov. Kompresné testy boli vykonané Ing. Jakubom Rolečkom v Španielsku pomocou AG Shimadzu (Japonsko).

Pre kompresné testy boli vybraté vzorky freeze-castingu pomocou chladiacej dosky s časovými intervalmi zmeny teplotného gradientu 20 a 50 minút a freeze-castingu pomocou tekutého dusíku. Vzorky boli pri kompresných testoch vložené do lisu, kde pôsobilo jednoosové napätie až do porušenia vzorku. Pre vybrané typy programov bolo testovaných najmenej 10 spekaných vzoriek, aby sa získali štatisticky relevantné výsledky. Pre štatisticky relevantné výsledky bolo potrebné upraviť vzorky na rovnakú výšku, ktorá činila  $20,68 \pm 0,08$  mm, z pôvodných  $34,3 \pm 1,2$  mm. Výsledné hodnoty kompresných testov boli vyjadrené ako sila ( $C$ ) v N, ktorá bola prepočítaná na tlakovú jednotku Pa, podľa vzťahu (4).

$$\sigma = \frac{C}{\pi \cdot r^2} \quad (4)$$

## 4. Výsledky

### 4.1. Hustota a porozita

Hustota a porozita sú dôležitým aspektom pre zistenie kvality kostnej náhrady. Hustota zohráva hlavnú úlohu pre zistenie celkovej porozity. Použiteľná kostná náhrada musí mať vysokú porozitu, aby bola zvýšená pravdepodobnosť prerastania kostných buniek, vaskularizácií a v neposlednom rade k transportu živín kostným tkanivom.

Z vypočítaných hodnôt teoretickej hustoty bola stanovená celková porozita. Priemerné hodnoty teoretickej hustoty a celkovej porozity pre jednotlivé programy mrazenia sú uvedené v Tabuľke 3. Pre výpočet porozít bola použitá teoretická hodnota hustoty HA pri laboratórnych podmienkach, ktorá je  $\rho = 3,08 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Priemerné hodnoty pre všetky merania boli stanovované z 23 vzoriek pre mrazenie dusíkom, 6 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ min}$ , 18 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ , 3 vzorky pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ , 3 vzorky pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/40 \text{ min}$  a 22 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/50 \text{ min}$ .

Tabuľka 3: Vypočítané hodnoty hustôt a porozít

Typ mrazenia	$\rho \text{ [g}\cdot\text{cm}^{-3}]$	$\Pi \text{ [%]}$
dusík	$1,06 \pm 0,08$	$65,8 \pm 2,7$
10 minút	$1,05 \pm 0,12$	$65,8 \pm 3,9$
20 minút	$1,13 \pm 0,04$	$63,3 \pm 1,4$
30 minút	$0,90 \pm 0,02$	$70,7 \pm 0,5$
40 minút	$0,97 \pm 0,01$	$68,7 \pm 0,3$
50 minút	$1,07 \pm 0,12$	$65,4 \pm 3,8$

### 4.2. Rýchlosť mrazenia

Zmena rýchlosti mrazenia je jednou z techník na úpravu veľkosti pórov. Teplota hladiny suspenzie bola zaznamenávaná pri každom znížení teploty mrazenia. Pri mrazení dusíkom bol zvolený časový interval zaznamenávania 5 minút. Čas zmrznutia vzorku je závislý na zvolenej teplote mrazenia, čím je znižovanie teploty rýchlejšie dôjde aj k rýchlejšiemu zmrazeniu vzorku. Teplota chladiacej dosky neudáva teplotu suspenzie, preto teplotný gradient nie je totožný s nameranými hodnotami. Rýchlosť mrazenia bola spočítaná z priemerných teplôt suspenzie. Priemerné hodnoty pre teplotu suspenzie a čas, za ktorý bola vzorka zmrznutá, boli stanovované z 23 vzoriek pre mrazenie dusíkom, 10 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ min}$ , 14 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ , 3 vzorky pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ , 3 vzorky pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/40 \text{ min}$  a 22 vzoriek pre interval  $-5 \text{ }^\circ\text{C}/50 \text{ min}$ . Výsledné priemerné hodnoty pre všetky časové intervaly merania sú uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4: Priemerné hodnoty času a teploty pri mrazení

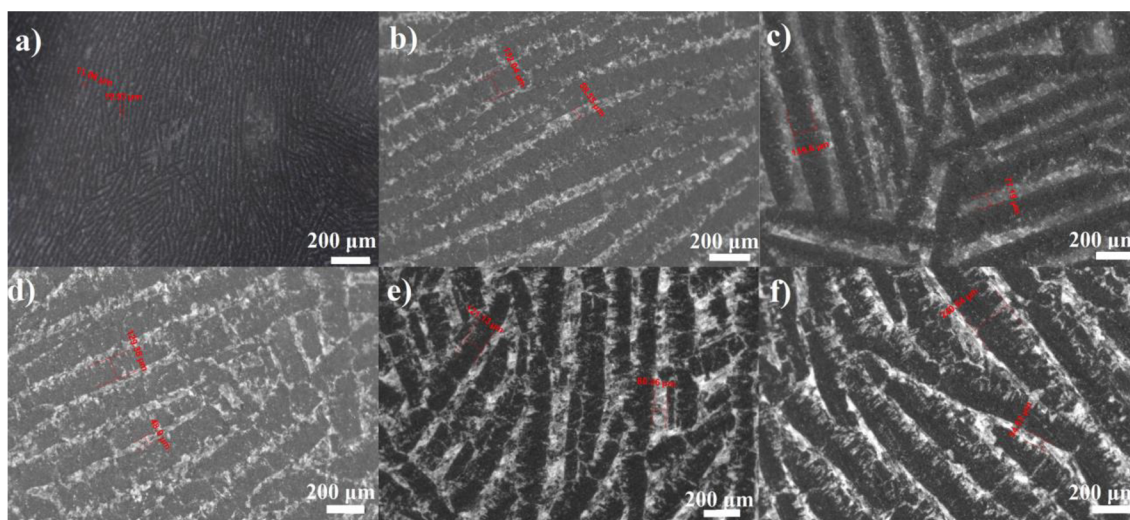
Typ mrazenia	Čas [min]	Teplotný režim [°C]	Teplota suspenzie [°C]	Priemerná rýchlosť mrazenia [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
dusík	0	—	16,8 ± 3,7	26,1 ± 3,4
zmrznutie	5		13,9 ± 1,0	
	10		12,7 ± 1,2	
	15		9,1 ± 1,9	
	20		3,9 ± 2,8	
	29,0 ± 3,8		-9,6 ± 2,9	
10 minút	0	0	19,1 ± 0,5	6,9 ± 0,3
zmrznutie	10	-5	14,4 ± 1,6	
	20	-10	11,2 ± 0,6	
	30	-15	6,5 ± 0,7	
	40	-20	3,8 ± 0,3	
	50	-25	1,5 ± 0,4	
	60	-30	-0,1 ± 0,5	
	70	-35	-1,3 ± 1,4	
	80	-35	-2,3 ± 1,2	
	90	-35	-3,6 ± 0,8	
100	-35	-5,2 ± 2,5		
108,8 ± 4,7	-35	-5,5 ± 1,6		
20 minút	0	0	16,3 ± 4,5	5,5 ± 0,2
zmrznutie	20	-5	10,5 ± 1,4	
	40	-10	4,3 ± 0,8	
	60	-15	1,3 ± 0,6	
	80	-20	-1,0 ± 0,8	
	100	-25	-2,6 ± 0,6	
	120	-30	-4,1 ± 0,2	
137,0 ± 4,2	-35	-7,6 ± 2,6		
30 minút	0	0	17,5 ± 0,2	4,7 ± 0,1
zmrznutie	30	-5	8,8 ± 0,3	
	60	-10	6,9 ± 0,3	
	90	-15	-0,4 ± 0,2	
	120	-20	-2,9 ± 0,1	
	150	-25	-4,1 ± 0,1	
161,7 ± 4,7	-30	-6,3 ± 1,1		
40 minút	0	0	17,0 ± 0,1	4,0 ± 0,2
zmrznutie	40	-5	8,1 ± 0,2	
	80	-10	0,1 ± 0,2	
	120	-15	-2,5 ± 0,2	
	160	-20	-2,5 ± 0,5	
189,7 ± 7,5	-25	-7,0 ± 0,6		
50 minút	0	0	17,4 ± 4,6	3,4 ± 0,3
zmrznutie	50	-5	6,7 ± 2,9	
	100	-10	2,3 ± 2,3	
	150	-15	-0,1 ± 2,8	
	200	-20	-3,8 ± 1,7	
221,3 ± 21,4	-25	-5,6 ± 0,7		

## 4.3. Štruktúra

### 4.3.1. Medzilamelárne vzdialenosti

Lamelárna štruktúra vzniká po odstránení ľadových kryštálov lyofilizáciou, ktoré boli vytvorené pri mrazení keramickej suspenzie. Medzilamelárny priestor je dôležitý pre proliferáciu buniek, pričom je dôležité aby medzilamelárny priestor mal väčšie rozmery ako je kostná bunka, kvôli správne mu rastu.

Zmeny medzilamelárnych vzdialeností boli pozorované pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie a stereolupy. Na Obrázku 13 môžeme vidieť porovnanie medzilamelárnych vzdialeností a hrúbky lamiel, pri ktorom mrazenie pomocou tekutého dusíka vykazuje najmenšie rozmery a naopak 50 minútový interval najväčšie.



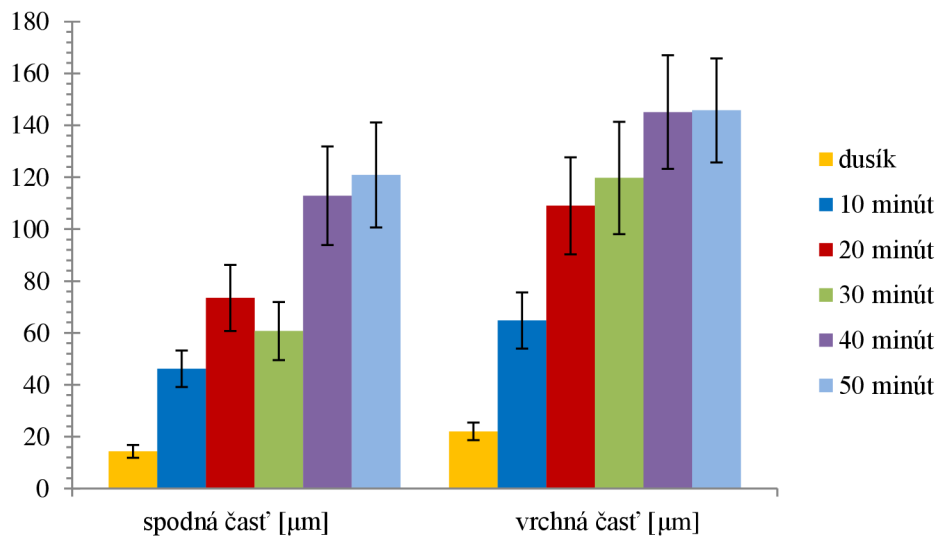
Obrázok 13: Porovnanie medzilamelárnych vzdialeností a hrúbky lamiel pomocou stereolupy všetkými typmi mrazenia: (a) dusík, (b) 10 minút, (c) 20 minút, (d) 30 minút, (e) 40 minút, (f) 50 minút

Pri použití stereolupy boli zmerané medzilamelárne vzdialenosti a hrúbky lamiel počítačovým softvérom AxioVision. Meranie bolo vykonané v 15 a 30 mm mieste od spodnej časti vzorku, pri troch zväčšeniach. Pri každom zväčšení bolo vykonaných 10 meraní pre medzilamelárne vzdialenosti a 5 pre hrúbku lamiel. Výsledné priemerné hodnoty pre medzilamelárne vzdialenosti a hrúbky lamiel v oboch častiach sú uvedené v Tabuľke 5.

Tabuľka 5: Priemerné hodnoty medzilamelárnych vzdialeností a hrúbky lamiel všetkých typov mrazení

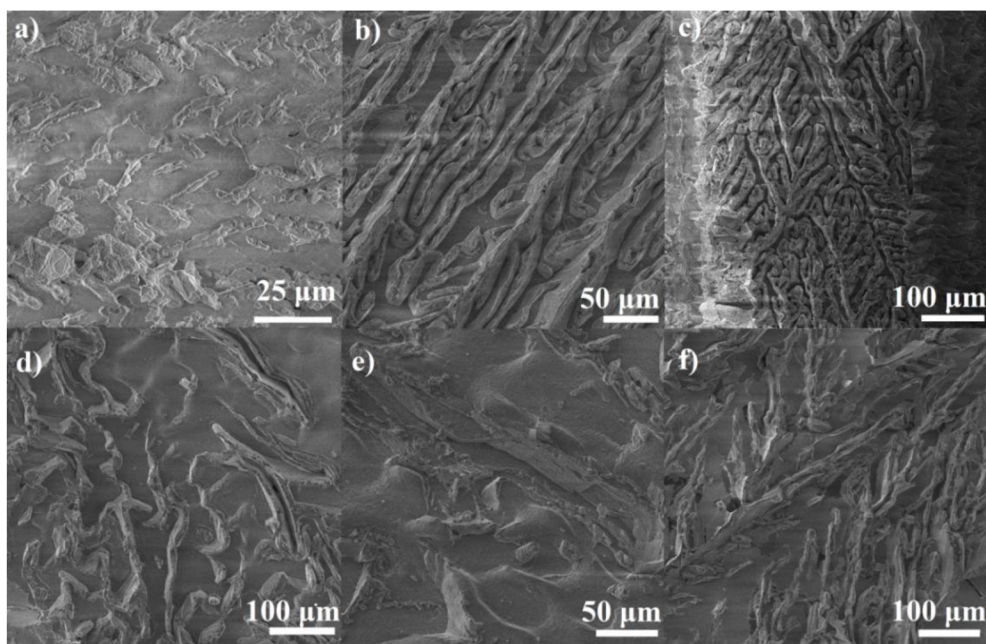
	medzilamelárne vzdialenosti		hrúbka lamiel	
	spodná časť [µm]	vrchná časť [µm]	spodná časť [µm]	vrchná časť [µm]
<b>dusík</b>	14,3 ± 2,5	22,0 ± 3,4	13,0 ± 2,2	20,5 ± 4,0
<b>10 minút</b>	46,2 ± 7,0	64,8 ± 10,9	71,5 ± 20,9	94,2 ± 34,6
<b>20 minút</b>	73,5 ± 12,7	109,0 ± 18,7	60,2 ± 12,7	91,4 ± 13,6
<b>30 minút</b>	60,7 ± 11,3	119,7 ± 21,6	91,9 ± 29,7	83,2 ± 14,1
<b>40 minút</b>	112,9 ± 19,0	145,1 ± 21,8	79,4 ± 18,6	90,1 ± 16,8
<b>50 minút</b>	120,9 ± 20,2	145,8 ± 20,1	71,9 ± 15,8	76,7 ± 17,2

Porovnanie rozdielov medzilamelárných vzdialeností v spodnej a vrchnej časti vzorku je graficky znázornené na Obrázku 14.



Obrázok 14: Grafické znázornenie priemerných medzilamelárných vzdialeností pre všetky typy mrazenia

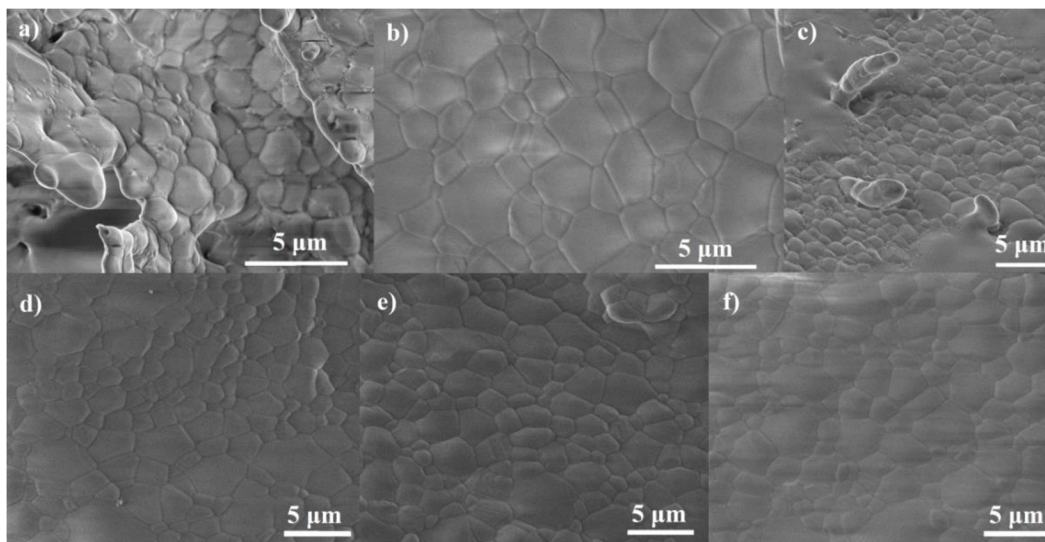
Hrúbka lamiel má vplyv na celkovú stabilitu pripravenej kostnej náhrady. Menšie hrúbky lamiel umožňujú väčší rast medzilamelárných mostíkov. Medzilamelárne mostíky vznikajú v dôsledku odtlačania ale zhlukovania častíc pri mraziacom procese a zvyšujú mechanické vlastnosti. Mostíky môžu byť modifikované aditívami (sacharóza), ktoré ovplyvňujú interakcie medzi časticami. Medzilamelárne mostíky boli pozorované pomocou SEM, vid' Obrázku 15.



Obrázok 15: Porovnanie medzilamelárných mostíkov pomocou SEM všetkými typmi mrazenia: (a) dusík, (b) 10 minút, (c) 20 minút, (d) 30 minút, (e) 40 minút, (f) 50 minút

### 4.3.2. Medzizrnová porozita

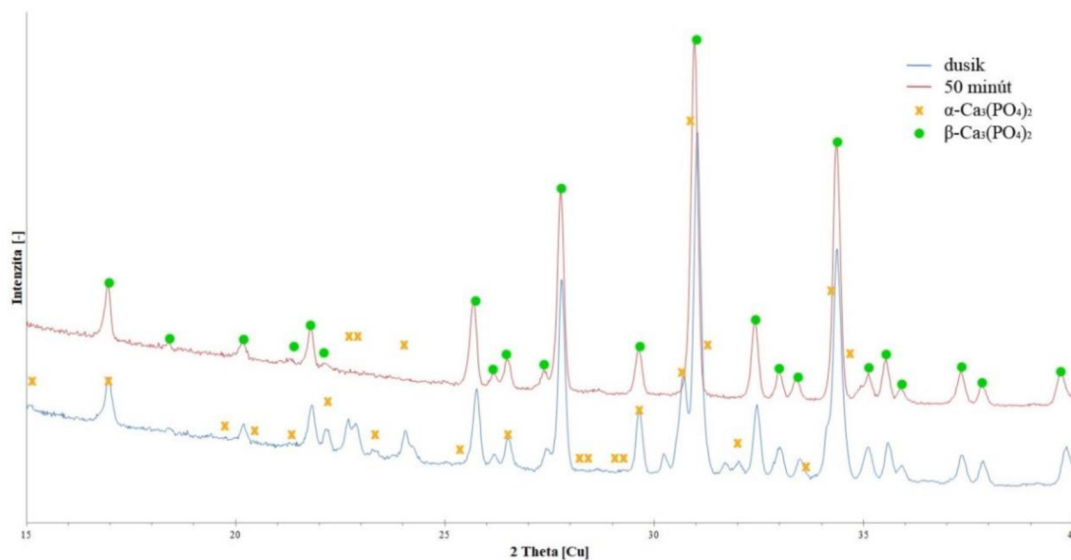
Pri pozorovaní medzizrnovej porozity pomocou SEM sa vo vzorke mrazenej tekutým dusíkom vyskytovali aj menšie zrná ako v ostatných vzorkách, vid' Obrázok 16. Pozorované menšie zrná na Obrázku 16a patrili pravdepodobne  $\alpha$ -fosforečnanu vápenatému, ktorý bol potvrdený analýzou fázového zloženia.



Obrázok 16: Porovnanie medzizrnovej porozity pomocou SEM všetkými typmi mrazenia: (a) dusík, (b) 10 minút, (c) 20 minút, (d) 30 minút, (e) 40 minút, (f) 50 minút

### 4.4. Fázové zloženie

Pomocou röntgenového difraktometru sme získali difrakčné spektrá pre mrazenie dusíkom a chladiacou platňou s intervalom 50 minút. Difrakčné spektrá boli porovnávané s  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosforečnanom vápenatým. Jednotlivé peaky fosforečnanov boli zaznamenané do difrakčných spektier analyzovaných vzorkou, ktoré sú zobrazené na Obrázku 17.



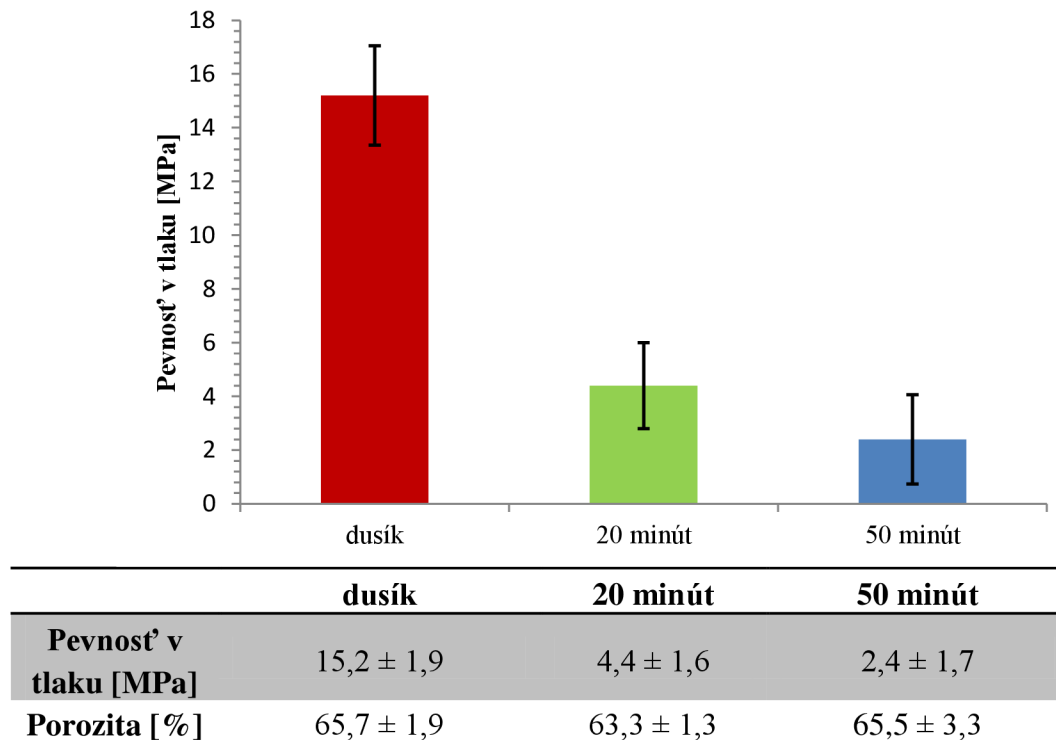
Obrázok 17: Difrakčné spektrum pripravených vzoriek



#### 4.5. Mechanické vlastnosti

Vzorky boli pred kompresnými testami zmerané a zvážené, aby mohla byť stanovená porozita. Pre výpočet priemerných hodnôt pevnosti v tlaku a porozity bolo použitých 10 ekvivalentných hodnôt z merania pre každý vybraný typ mrazenia.

Pevnosť v tlaku každej vzorky bola hodnotená ako maximálne napätie aplikované v priebehu testu. Výsledky získané z meraní pevnosti v tlaku spolu s výsledkami priemernej porézności použitých vzoriek sú zhrnuté na Obrázku 18.



Obrázok 18: Porovnanie mechanických vlastností a porozity pripravených vzorkou

## 5. DISKUSIA

Najvyššiu priemernú celkovú porozitu vykazoval freeze-casting pomocou chladiacej platne so znižovaním teploty po 30 minútach ( $70,7 \pm 0,5 \%$ ), naopak najnižšia bola zistená pri znižovaní teploty po 20 minútach ( $63,3 \pm 1,4 \%$ ). Rozdiel medzi najvyššou a najnižšou priemernou celkovou porozitou činil  $7,4 \%$ . Celková porozita vyššia ako  $60 \%$  umožňuje rýchlejšie vrastanie kostných buniek [44]. Počas lyofilizácie biologických vzoriek môže dôjsť k vytvoreniu bubliny vo vzorke, ktorá pri spekaní naruší štruktúru vzorky alebo ovplyvní výslednú porozitu a hustotu. To vysvetľuje rozdiely v porozite.

Póry v kostných náhradách sú potrebné na tvorbu kostného tkaniva, pretože umožňujú proliferáciu kostných buniek a vaskularizáciu. Minimálna odporúčaná veľkosť pórov pre kostnú náhradu je  $100 \mu\text{m}$ . Podľa štúdie Karageorgiou a spol. bolo zistené, že najideálnejšie podmienky pre tvorbu kostí poskytujú póry väčšie ako  $300 \mu\text{m}$  [45]. Veľkosť pórov bola stanovovaná ako veľkosť medzilamelárnych vzdialeností. Najväčšie priemerné medzilamelárne vzdialenosti boli vytvorené pomocou freeze-castingu s 50 minútovými intervalmi, ktoré dosahovali vo vrchnej časti veľkosť  $145,8 \pm 20,1 \mu\text{m}$ . Spodná časť mala pri všetkých typoch mrazenia menšie medzilamelárne vzdialenosti, kvôli rýchlej tvorbe ľadových kryštálov, ako je to aj pozorovateľné na Obrázku 7. K rýchlej tvorbe ľadových kryštálov dochádza hlavne pri mrazení tekutým dusíkom, z toho dôvodu vykazoval najmenšie medzilamelárne vzdialenosti aj vo vrchnej časti s veľkosťou  $22,0 \pm 3,4 \mu\text{m}$ . Rozdiely medzi spodnou a vrchnou časťou sa pohybovali v rozmedzí  $7,7\text{-}59,0 \mu\text{m}$ .

Na charakterizáciu mechanických vlastností kostných náhrad sa využíva ich pevnosť v tlaku. Pevnosť v tlaku ľudskej kortikálnej kosti sa pohybuje od  $90$  do  $230 \text{MPa}$ , zatiaľ čo pevnosť v tlaku špongióznej kosti je  $2$  až  $45 \text{MPa}$  [46]. V našom prípade rýchlosť mrazenia ovplyvnila významne aj pevnosť v tlaku. Proces mrazenia pomocou tekutého dusíku dosahoval najvyššiu pevnosť v tlaku v priemere  $15,2 \pm 1,9 \text{MPa}$ , naopak najnižšiu pevnosť v tlaku v priemere  $2,4 \pm 1,7 \text{MPa}$  vykazovalo mrazenie pomocou chladiacej dosky so znižovaním teploty po 50 minútach. Takmer rovnaké, nízke rozmery medzilamelárnych vzdialeností a hrúbky lamiel mrazením tekutým dusíkom viedli k mechanickej stabilite vzorky, čo zapríčinilo vysokú pevnosť v tlaku.

Pri röntgenovej difrakčnej analýze bola zistená fázová premena hydroxyapatitu na  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosforečnan vápenatý u vzorky mrazenej tekutým dusíkom. Pri mrazení s intervalom znižovania teploty každých 50 minút vzorka nevykazovala prítomnosť  $\alpha$ -fosforečnanu vápenatého. Nevýhodou  $\alpha$ -fosforečnanu vápenatého je jeho rýchlejšia resorpcia ako tvorba novej kosti, preto jeho prítomnosť môže obmedziť použitie v medicínskych aplikáciách [16].

Novým poznatkom je rozdielnosť fázového zloženia v závislosti na rýchlosti mraziaceho procesu pri metóde freeze-casting. Prítomnosť  $\alpha$ -fosforečnanu vápenatého bola pozorovaná aj pomocou SEM, kedy vzorky mrazené dusíkom obsahovali menšie zrná. Na Obrázku 16 a sú vidieť u dusíku menšie zrná v porovnaní s ostatnými typmi mrazenia, ktoré tieto menšie zrná neobsahovali. Výskyt  $\alpha$ -fosforečnanu vápenatého a vplyv fázového zloženia na výsledné mechanické vlastnosti nie je celkom jasný, preto sú potrebné ďalšie výskumy v tejto oblasti.

Rýchlosť mrazenia výrazne ovplyvňovala mikroštruktúru, mechanické vlastnosti aj fázové zloženie, čo je v zhode s literatúrou [39, 40]. Mrazenie pomocou chladiacej platne malo najnižší časový interval znižovania teploty 5 °C/10 min. Pri nižšom časovom intervale by sa chladiaca platňa nestihla dostatočne nachladiť. Nižšie intervaly by mohli ovplyvniť mechanické vlastnosti, možno aj fázové zloženie. Ak by bola sústava dostatočne izolovaná, bolo by možné znižovať teplotu po 1-2 °C, čo by ovplyvňovalo výslednú mikroštruktúru.

## 6. ZÁVER

Experimentálne bol overený vplyv mraziaceho procesu na vzniknutú porozitu behom aplikácie metódy freeze-casting pre prípravu kostných náhrad. Po aplikácií rôznych rýchlostí mrazenia v rozsahu od 3 do 26  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  sme dosiahli teoretickú porozitu od 63 % do 71 %.

Mikroštruktúrna analýza pomocou stereolupy ukázala veľkosť medzilamelárnych vzdialeností v rozmedzí 22-150  $\mu\text{m}$ , pričom spodná časť vzorku bola menšia o 8-60  $\mu\text{m}$ . Rozdiely medzi spodnou a vrchnou časťou vzorky boli spôsobené rastom ľadových kryštálov, ktorý bol závislý na použitom type rýchlosti mrazenia.

Fázová analýza ukázala prekvapivý rozdiel pri mrazení pomocou dusíka a chladiacej platne s rýchlosťou mrazenia 3  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ , kedy sa pri dusíku vyskytoval  $\alpha$ -fosforečnan vápenatý.

Rýchlosť mrazenia a jej vplyv na mikroštruktúru mala dramatický dopad na mechanické vlastnosti. Pri rýchlosti mrazenia dusíkom boli dosiahnuté výnimočné hodnoty pevnosti v tlaku 15 MPa pri vysokej porozite 66 %.

## 7. LITERATÚRA

- [1] ROBERTS, Timothy T. a Andrew J. ROSENBAUM. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis* [online]. 2014, **8**(4), 114-124 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.4161/org.23306. ISSN 1547-6278. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/org.23306>
- [2] *Biokeramika a biomimetické procesy* [online]. 2007, [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: [http://old.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic\\_Technology/SM-Lect-13-C.pdf](http://old.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic_Technology/SM-Lect-13-C.pdf)
- [3] UCHIDA, A, SM NADE, ER MCCARTNEY a W CHING. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* [online]. 1984, **66-B**(2), 269-275 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1302/0301-620X.66B2.6323483. ISSN 0301-620X. Dostupné z: <http://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.66B2.6323483>
- [4] DEVILLE, Sylvain. Freeze-Casting of Porous Biomaterials: Structure, Properties and Opportunities. *Materials* [online]. 2010, **3**(3), 1913-1927 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.3390/ma3031913. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1913>
- [5] ČIHÁK, Radomír, 2001. *Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada. ISBN 80-716-9970-5.
- [6] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY, 1997. *Základy histologie*. Jinočany: H & H. ISBN 8085787377.
- [7] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie. 2. vyd.* Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
- [8] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ, 2011. *Přehled obecné histologie. 2., přeprac. vyd.* Brno: Masarykova univerzita. ISBN 9788021055438.
- [9] MASARYKOVÁ, Lucia, Magdaléna FULMEKOVÁ, Ľubica LEHOCKÁ a Tomáš ĎURDÍK, 2014. Osteoporóza a kvalita života: Osteoporosis and quality of life. *Praktické lekárnictvo*. Bratislava: SOLEN, **4**(4), 98-102. ISSN 1338-3132.
- [10] *Bone Cancer* [online]. Elsevier, 2010 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374895-9.X0001-1. ISBN 9780123748959.
- [11] *Chemické listy: CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ MODIFIKACE BIOMATERIÁLŮ NA BÁZI CELULOSY*, 2017. **111**(10). ISSN 0009-2770.
- [12] BAINO, Francesco, Sepideh HAMZEHLOU a Saeid KARGOZAR. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?. *Journal of Functional Biomaterials*[online]. 2018, **9**(1) [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.3390/jfb9010025. ISSN 2079-4983. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/25>

- [13] MAJLING, Ján a Gustav PLESCH. *Technológia špeciálnych anorganických materiálov*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2002. Edícia skript. ISBN 80-227-1734-7.
- [14] HENCH, Larry L. *An Introduction to bioceramics*. Second edition. London: Imperial College Press, 2013. ISBN 9781908977151.
- [15] PARK, Joon Bu. *Bioceramics: properties, characterizations, and applications*. New York: Springer, c2008. ISBN 978-0-387-09544-8.
- [16] ELIAZ, Noam a Noah METOKI. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials* [online]. 2017, **10**(4) [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.3390/ma10040334. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/10/4/334>
- [17] MUCALO, Michael. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. Boston: Elsevier/Woodhead Publishing, Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2015. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 95. ISBN 978-1-78242-033-0.
- [18] SARKAR, Ritwik, 2011. Hydroxyapatite based synthetic orbital implant. *InterCeram: International Ceramic Review* [online]. **60**(3), 239-241 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/272792616\\_Hydroxyapatite\\_based\\_synthetic\\_orbital\\_implant](https://www.researchgate.net/publication/272792616_Hydroxyapatite_based_synthetic_orbital_implant)
- [19] TIWARI, Ashutosh, Mohammad Rabia ALENEZI a Seong Chan JUN, ed. *Advanced Composite Materials* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2016 [cit. 2018-05-11]. ISBN 9781119242666.
- [20] Ji, Yang & Zhang, Xiaodong & Wang, Xiaochen & Che, Zhaochang & Yu, Xiaoming & Yang, Huazhe. (2013). Zirconia Bioceramics as All-Ceramic Crowns Materials: a Review. *Reviews on advanced materials science*. 34. 72-78.
- [21] OVČÁČIKOVÁ, H. a J. VLČEK. *Speciální keramické materiály*. 1. vyd. Ostrava, 2013. ISBN ISBN 978-80-248-3365-1.
- [22] QUINN, George, 1998. Hardness Testing of Ceramics. *Advanced Materials and Processes* [online]. **154**(2), 23-27 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/285641328\\_Hardness\\_testing\\_of\\_ceramics](https://www.researchgate.net/publication/285641328_Hardness_testing_of_ceramics)
- [23] SOLANO-UMAÑA, Victor a José Roberto VEGA-BAUDRIT. Micro, Meso and Macro Porous Materials on Medicine. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*[online]. 2015, **06**(04), 247-256 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.4236/jbmb.2015.6423. ISSN 2158-7027. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbmb.2015.6423>

- [24] BAINO, Francesco, Giorgia NOVAJRA a Chiara VITALE-BROVARONE. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2015, **3** [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00202. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00202/abstract>
- [25] ZHEN, Wang, Chang JIANG, Bai FENG, Sun XIAOJIANG, Lu JIANXI, Lin LI, Lei CHEN a Dai RONG, Role of the porous structure of the bioceramic scaffolds in bone tissue engineering. *Nature Precedings* [online]. 14 January 2010, 3-5 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1038/npre.2010.4148.1. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10101/npre.2010.4148.1>
- [26] GAUDILLERE, Cyril a José Manuel SERRA. Freeze-casting: Fabrication of highly porous and hierarchical ceramic supports for energy applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* [online]. 2016, **55**(2), 45-54 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.bsecv.2016.02.002. ISSN 03663175. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0366317516000212>
- [27] SCOTTI, Kristen L. a David C. DUNAND. Freeze casting – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, FreezeCasting.net. *Progress in Materials Science* [online]. 2018, **94**, 243-305 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2018.01.001. ISSN 00796425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007964251830001X>
- [28] DEVILLE, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2008, **10**(3), 155-169 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1002/adem.200700270. ISSN 14381656. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adem.200700270>
- [29] WEGST, U. G. K., M. SCHECTER, A. E. DONIUS a P. M. HUNGER. Biomaterials by freeze casting. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2010, **368**(1917), 2099-2121 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1098/rsta.2010.0014. ISSN 1364-503X. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2010.0014>
- [30] HONG, Changqing, Xinghong ZHANG, Jiecai HAN, Jiancong DU a Wei ZHANG. Camphene-based freeze-cast ZrO<sub>2</sub> foam with high compressive strength. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2010, **119**(3), 359-362 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2009.10.031. ISSN 02540584. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058409006567>
- [31] HAN, Jiecai, Changqing HONG, Xinghong ZHANG, Jiancong DU a Wei ZHANG. Highly porous ZrO<sub>2</sub> ceramics fabricated by a camphene-based freeze-casting route: Microstructure and properties. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2010, **30**(1), 53-60 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2009.08.018. ISSN 09552219. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095522190900428>

- [32] TANG, Yufei, Sha QIU, Cong WU, Qian MIAO a Kang ZHAO. Freeze cast fabrication of porous ceramics using tert -butyl alcohol–water crystals as template. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2016, **36**(6), 1513-1518 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2015.12.047. ISSN 09552219. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095522191530306X>
- [33] ZUO, Kai Hui, Yu-Ping ZENG a Dongliang JIANG. Effect of polyvinyl alcohol additive on the pore structure and morphology of the freeze-cast hydroxyapatite ceramics. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2010, **30**(2), 283-287 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.msec.2009.11.003. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493109002835>
- [34] KOH, Young-Hag, Eun-Jung LEE, Byung-Ho YOON, Ju-Ha SONG, Hyoun-Ee KIM a Hae-Won KIM. Effect of Polystyrene Addition on Freeze Casting of Ceramic/Camphene Slurry for Ultra-High Porosity Ceramics with Aligned Pore Channels. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. 2006, **89**(12), 3646-3653 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01311.x. ISSN 0002-7820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01311.x>
- [35] ZENG, Jing, Yan ZHANG, Ke-chao ZHOU a Dou ZHANG. Effects of alcohol additives on pore structure and morphology of freeze-cast ceramics. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* [online]. 2014, **24**(3), 718-722 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/S1003-6326(14)63116-2. ISSN 10036326. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1003632614631162>
- [36] ZHANG, Yuan, Kaihui ZUO a Yu-Ping ZENG. Effects of gelatin addition on the microstructure of freeze-cast porous hydroxyapatite ceramics. *Ceramics International* [online]. 2009, **35**(6), 2151-2154 [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1016/j.ceramint.2008.11.022. ISSN 02728842. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884209000066>
- [37] MUNCH, Etienne, Eduardo SAIZ, Antoni P. TOMSIA a Sylvain DEVILLE. Architectural Control of Freeze-Cast Ceramics Through Additives and Templating. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. 2009, **92**(7), 1534-1539 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.03087.x. ISSN 00027820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2009.03087.x>
- [38] *Freeze-casting: The Open Data Repository* [online], [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://freezecasting.net/freezecast.html>
- [39] DEVILLE, Sylvain, Eduardo SAIZ a Antoni P. TOMSIA. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(32), 5480-5489 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.028. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206005801>



- [40] RODRÍGUEZ-PARRA, Jesús, Rodrigo MORENO a Isabel NIETO. Effect of cooling rate on the microstructure and porosity of alumina produced by freeze casting. *Journal of the Serbian Chemical Society* [online]. 2012, **77**(12), 1775-1785 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.2298/JSC121018132R. ISSN 0352-5139. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391200132R>
- [41] FREEZE DRYING PROCESS: A REVIEW, 2011. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. **2**(12), 3061-3068 [cit. 2019-03-01]. ISSN 23205148. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/292047227\\_LYOPHILIZATION\\_FREEZE\\_DRYING\\_-\\_A\\_REVIEW](https://www.researchgate.net/publication/292047227_LYOPHILIZATION_FREEZE_DRYING_-_A_REVIEW)
- [42] REY, Louis a Joan C. MAY. *Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 3rd ed. London: Informa Healthcare, 2011. Drugs and the pharmaceutical sciences, v. 206. ISBN 9781439825754.
- [43] YU, Kuang-Cheng, Chien-Cheng CHEN a Pei-Cheng WU. Research on Application and Rehydration Rate of Vacuum Freeze Drying of Rice. *Journal of Applied Sciences* [online]. 2011, **11**(3), 535-541 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.3923/jas.2011.535.541. ISSN 18125654. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2011.535.541>
- [44] HING, Karin A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology* [online]. 2005, **2**(3), 184-199 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x. ISSN 1546-542X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x>
- [45] KARAGEORGIU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(27), 5474-5491 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205001511>
- [46] HANNINK, Gerjon a J.J. Chris ARTS. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?. *Injury* [online]. 2011, **42**, S22-S25 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.008. ISSN 00201383. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020138311002452>

## 8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

HAP	hydroxyapatit (hydroxyapatite)
IR	infračervený (infrared)
IUPAC	Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu (International Union of Pure and Applied Chemistry)
PLA	kyselina polymliečna (polylactic acid)
PVA	polyvinylalkohol (polyvinyl alcohol)
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia (scanning electron microscope)
TBA	terc-butylalkohol (tert-butyl alcohol)