



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

**STUDIUM INTERAKCE SIMULOVANÉ TĚLNÍ TEKUTINY
NA PRODUKCI APATITŮ**

THE INFLUENCE OF SIMULATED BODY FLUIDS ON THE APATITE PRODUCTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Horváthová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1065/2016
Ústav: Ústav chemie materiálů
Studentka: **Lenka Horváthová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Vedoucí práce: **Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Studium interakce simulované tělní tekutiny na produkci apatitů

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je studium vlivu různých typů tělních tekutin na interakci s bioaktivním materiálem.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Lenka Horváthová
student(ka)

Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá skúmaním interakcie rôznych simulovaných telesných tekutín s keramickými biomateriálmi. Zahŕňa postupy prípravy tekutín, prípravu vzoriek a následnú analýzu ich vzájomnej interakcie. Jednotlivé vzorky biomateriálov boli vystavené pôsobeniu simulovanej telesnej tekutiny určitú časovú dobu. Po uplynutí tejto doby bola stanovená zmena obsahu vápnika a fosforu v roztokoch. Súčasne bola urobená analýza povrchu vzoriek elektrónovým mikroskopom, kde sa preukázala či nepreukázala závislosť zmeny obsahu vápnika a fosforu. Analýza pomocou elektrónového mikroskopu ukázala tvorbu nových fáz na povrchu študovaných materiálov.

Abstract

This bachelor thesis deals with the interaction of various simulated body fluids with ceramic biomaterials. It includes fluid preparation, sample preparation and subsequent analysis of their interaction. Individual samples of biomaterials were exposed to a simulated body fluid for a certain amount of time. After this time, a change in the calcium and phosphorus content of the solutions was determined. At the same time, an electron microscope analysis of sample surface was performed where the dependence of calcium and phosphorus changes was demonstrated. Electron microscopy analysis revealed the formation of new phases on the surface of the studied materials.

Kľúčové slová

Biomateriál, keramika, simulovaná telesná tekutina, apatit, bioaktivita.

Key words

Biomaterial, ceramics, simulated body fluid, apatite, bioactivity.

Citácia

HORVÁTHOVÁ, L. Studium interakce simulované tělní tekutiny na produkci apatitů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Bartoníčková, Ph.D.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Ing. Evy Bartoníčkovej, Ph.D. za použitia odbornej literatúry uvedenej v zozname použitých zdrojov.

.....

Lenka Horváthová

Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať vedúcej bakalárskej práce Ing. Eve Bartoníčkovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné informácie a rady a korektúru tejto práce. Poďakovanie patrí aj ostatným pracovníkom Fakulty chemickej za ich ochotu a pomoc pri práci.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cieľ práce	8
3	Teoretická časť	9
3.1	Základné pojmy	9
3.2	Biomateriály	9
3.2.1	Historický vývoj a využitie	10
3.2.2	Klasifikácia biomateriálov	11
3.3	Biokeramické materiály	13
3.3.1	Biokeramika na báze Al_2O_3 a ZrO_2	13
3.3.2	Bioaktívna keramika na báze apatitov	13
3.3.3	Bioaktívne sklo	14
3.3.4	Bioaktívna sklo-keramika	15
3.4	Metódy prípravy biokeramických materiálov	16
3.4.1	Metódy penenia	16
3.4.2	Príprava penovej štruktúry pomocou konsolidácie škrobu	17
3.4.3	Metóda penenia vypaľovaním organickej fázy	17
3.4.4	Replikačná metóda	17
3.4.5	Výroba pevných voľných foriem (SFF)	18
3.5	In vitro testy	19
3.5.1	Interakcia biomateriálov so simulovanou telesnou tekutinou	19
3.5.2	Teória kryštalizácie	19
3.5.3	Zmena lokálneho presýtenia	20
3.5.4	Zloženie a príprava SBF	20
3.5.5	Testovanie cytotoxicity	22
3.5.6	Testovanie genotoxicity	22
4	Experimentálna časť	23
4.1	Príprava SBF	23
4.2	Príprava vzoriek	25
4.2.1	Oxid hlinitý	25
4.2.2	Hydroxyapatit	26
4.3	Inkubácia vzoriek v SBF tekutinách	27
4.4	Spektrofotometrické stanovenie vápnika	27
4.5	Spektrofotometrické stanovenie fosforu	28
4.6	Analýza povrchu vzoriek	28

4.7	Rentgenová difrakčná analýza (XRD).....	29
5	Výsledky a diskusia.....	30
5.1	Zloženie použitých vzoriek	30
5.2	Syntetická telesná tekutina c-SBF (podľa Kokuba)	31
5.2.1	Stanovenie vápnika	31
5.2.2	Stanovenie fosforu.....	32
5.2.3	Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do c-SBF.....	33
5.3	Hankov komerčný roztok	36
5.3.1	Stanovenie vápnika	36
5.3.2	Stanovenie fosforu.....	37
5.3.3	Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do Hankovho roztoku	38
5.4	Syntetická telesná tekutina c-SBF bez vápnika (blank)	41
5.4.1	Meranie vápnika.....	41
5.4.2	Meranie fosforu	42
5.4.3	Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do c-SBF bez vápnika (blank)	42
5.5	Syntetická telesná tekutina Tas-SBF	44
6	Záver	45
7	Zoznam použitých skratiek	46
8	Literatúra.....	47

1 ÚVOD

Biomateriály majú v dnešnej dobe široké uplatnenie v rôznych oblastiach medicíny. Používajú sa ako náhrady kostí alebo mäkkých tkanív. Súčasné pokroky v oblasti inžinierstva výrazne zvyšujú sofistikovanosť, s ktorou sú navrhnuté a umožnili výrobu materiálov so zložitejšími funkciami. Tieto materiály sú často navrhnuté tak, aby napodobňovali fyzikálno-chemické vlastnosti prírodných materiálov. Čoraz viac príroda inšpiruje nielen samotné materiály, ale aj prostriedky, ktorými sú vyrobené.

Najbežnejšie používaným materiálom je keramika. Využíva sa hlavne pri kostných a zubných implantátoch, ale možné využitie má aj pri výrobe kardiostimulátorov. Medzi často používanú inertnú biokeramiku môžeme zaradiť keramiku na báze oxidu hlinitého a zirkoničitého. Ten disponuje výbornými vlastnosťami ako sú odolnosť voči korózii, dostatočná biokompatibilita či odolnosť voči opotrebovaniu. Hydroxyapatity sa využívajú viac ako 25 rokov v medicíne ako náhrada kostných tkanív. Je to vďaka jeho štruktúre a chemickému zloženiu podobnému minerálnej fáze kostí. Hydroxyapatit je chemicky stabilný vo vnútri tkanív a zaraďuje sa medzi bioaktívny materiál.

V snahe napodobniť vlastnosti tkanív sa často stretávame s problémom biokompatibility implantátov. Nie každý materiál je vhodný ako náhrada tkanív v ľudskom tele. Najčastejšie využívané materiály sú založené na štruktúre plastov, kompozitov, keramiky a skla. Avšak aj tie môžu podliehať povrchovým a štruktúrnym zmenám. Preto sa využívajú testy in vivo a in vitro. Kvôli etike a humanite voči zvieratám sa preferuje metóda in vitro, pri ktorej sa využíva aj simulovaná telesná tekutina. Tá sa snaží svojím zložením, čo najviac napodobniť zloženie krvnej plazmy človeka.

V 80. rokoch predstavil simulovanú telesnú tekutinu (SBF) používanú pre SBF Kokubo, aby vyhodnotil zmeny povrchu bioaktívnej sklo-keramiky. Odvtedy vzniklo veľa ďalších upravených verzií telesnej tekutiny. Po pôsobení simulovanej telesnej tekutiny na biomateriál sa skúma prítomnosť novej biologicky aktívnej vrstvy vo forme apatitov. Práve táto vrstva umožňuje väzbu s hostiteľským tkanivom. SBF sa používa ako in vitro metóda testovania, ktorá predpovedá možnú in vivo kostnú bioaktivitu. Pri vytváraní apatitovej vrstvy sa spotrebávajú vápenaté a fosfátové ióny, ktoré sú prítomné v roztoku. Tento proces vedie k spontánnemu rastu apatitových jadier, ktoré sú podobné povrchu kostí v ľudskom tele.

Napriek tomu, že testovanie pomocou simulovanej telesnej tekutiny preukáže bioaktivitu v podobe tvorby apatitovej vrstvy, testovanie nie je konečné. Roztok SBF neobsahuje niektoré proteíny a hormóny, ktoré sú v ľudskej plazme zastúpené. Preto sa testovanie dopĺňa testami cytotoxicity, hemokompatibility alebo in vivo testami.

2 CIEĽ PRÁCE

Bakalárska práca je zameraná na štúdium interakcie biomateriálov s rôznymi syntetickými telesnými tekutinami za vytvorenia nových apatitových vrstiev.

Cieľom práce je:

- literárne rešerše na tému biokeramické materiály, ich príprava a testovanie
- príprava rôznych simulovaných telesných tekutín a vzoriek biomateriálov
- popis chovania biokeramických materiálov v telesných tekutinách

3 TEORETICKÁ ČASŤ

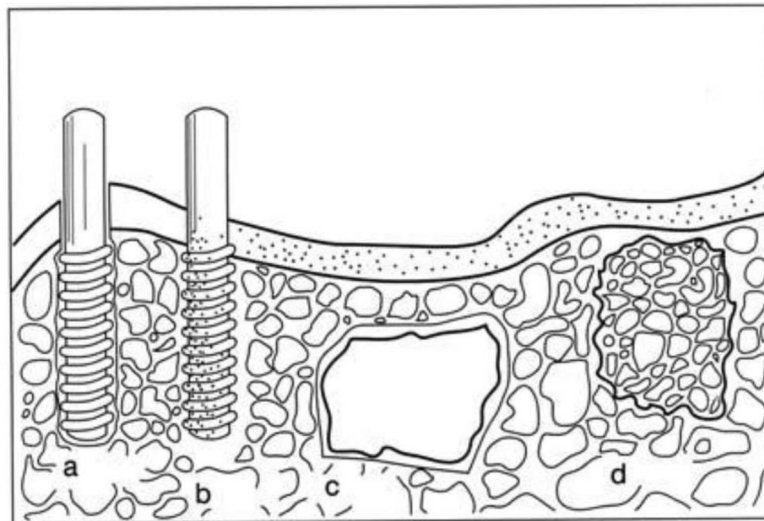
3.1 Základné pojmy

Chemické zloženie povrchu implantátov musí byť také, aby sa čo najviac približovalo zloženiu starších, chorých a poškodených tkanív.[1] Na základe toho, ako pôsobí chemické zloženie materiálu na ľudské tkanivo, rozoznávame niekoľko typov chovania: bioaktivita, biopasivita, biokompatibilita, biodegradabilita.[2]

Bioaktivita je schopnosť interakcie materiálu so živým tkanivom. Stimuluje rýchle uchytenie tkaniva k povrchu implantátu a vytvára stabilné dlhodobé spojenie. Špeciálnym prípadom bioaktivity je biodegradabilita (resorbovateľnosť). V určitom čase je materiál nahradený prirodzeným hostiteľským tkanivom a úplne sa odbúra.

Biokompatibilita je schopnosť podporovať normálnu bunkovú aktivitu bez lokálnych alebo systematických toxických účinkov na hostiteľské tkanivo.[3]

Biopasivita alebo bioinertnosť je schopnosť materiálu v organizme vôbec nereagovať. Táto vlastnosť je len teoretická, pretože žiadny syntetický materiál nie je úplne inertný a vždy bude nejakým spôsobom reagovať.[4]



Obrázok 1: Porovnanie jednotlivých typov chovania biomateriálov a) bioinertný b) bioaktívny c) povrchovo bioaktívny d) biodegradabilný (bioresorbovateľný) [26]

3.2 Biomateriály

Biomateriály sú synteticky pripravené látky, ktoré sa využívajú ako náhrada mäkkých i tvrdých tkanív ľudského tela. Aby sme mohli považovať materiál za biomateriál musí spĺňať niekoľko požiadaviek. Musí byť biokompatibilný, bioaktívny a schopný biodegradácie v určitom časovom úseku. Taktiež by mal mať dostatočnú mechanickú pevnosť.[2]

Voľba vhodného materiálu nie je vždy jednoznačná, preto sa biokompatibilita zisťuje pomocou laboratórnych testov. Predtým, ako si zvolíme vhodnú metódu testovania, je nutné vykonať predbežné skúšky a zhromaždiť si všetky dostupné toxikologické informácie o testovanom materiáli. Existujú dva typy testovania:

In vitro („v skle“) testy sú užitočné na identifikáciu potenciálnych rizík spojených s chemickou zloženinou alebo materiálom. Môže sa použiť tuhý biomateriál aj extrakt. Len obmedzený počet týchto testov bolo oficiálne uznaných, a preto na ďalšie zníženie testovania na zvieratách je potrebné uznať aj iné alternatívne metódy testovania, vrátane in vitro. Obmedzenie in vitro testov spočíva v tom, že nemôžu poskytnúť informácie o presnej dávke, ktorá sa vzťahuje na človeka, a preto nemôžu byť použité ako konečné hodnotenie rizík biomateriálu. Medzi tieto testy patrí napr. testovanie cytotoxicity, genotoxicity, hemokompatibility a testy dráždivosti.

Niektoré z testov in vivo sú potrebné na potvrdenie alebo vyvrátenie výsledkov získaných pri in vitro testoch (napr. reakcia na genotoxicitu), zatiaľ čo iné toxikologické koncové výsledky môžu byť určené iba testovaním in vivo (napr. lokálne tkanivové reakcie, citlivosť). Do tejto kategórie spadá množstvo testov na zvieratách ako napr. testovanie in vivo genotoxicity, MN test, karcinogénne účinky, testovanie hemokompatibility, implantácia, testy dráždivosti a iné.[5]

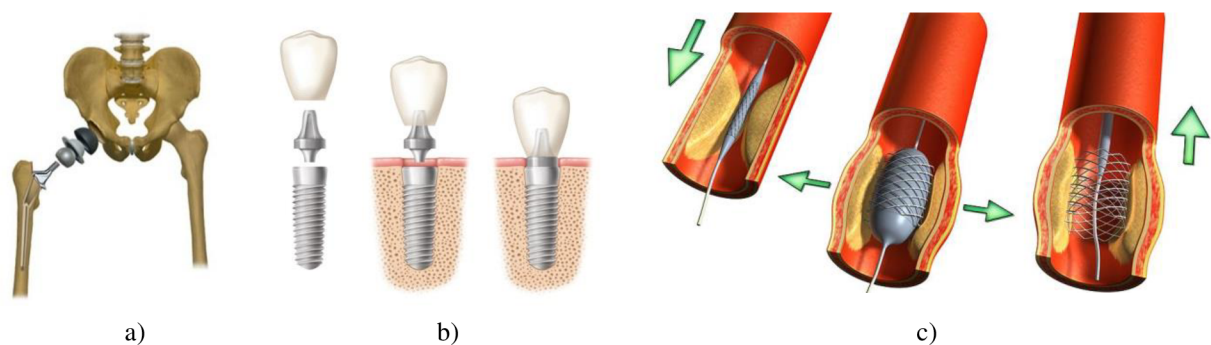
3.2.1 Historický vývoj a využitie

Na začiatku 21. storočia majú biomateriály široké uplatnenie v medicíne, zubnom lekárstve a biotechnológii. V minulosti biomateriály v dnešnom ponímaní neexistovali. Termín „biomateriál“ sa nepoužíval. Neboli žiadni výrobcovia zdravotníckych pomôcok (okrem vonkajšej protetiky ako sú končatiny, zariadenia na fixáciu zlomenín, sklenené oči a dentálne zariadenia). Neexistovali žiadne schválené postupy, nepoznali biokompatibilitu a neboli žiadne štúdiá o biomateriáloch. Napriek tomu boli využívané v priebehu histórie.[6]

S pojmom bioaktívny materiál prišiel prvýkrát Larry Hench koncom 60. rokov, keď zistil, že niektoré sklá majú schopnosť sa viazať na živú kosť. Odvtedy sa preukázalo po celom svete, že sklá obsahujúce SiO_2 , CaO , P_2O_5 , Na_2O a menšie množstvo oxidov majú túto schopnosť.

V Európe boli nájdené pozostatky človeka (200 rokov n.l.) s železnými dentálnymi implantátmi a prvá zmienka o kovových stehoch v tomto období bola nájdená v gréckej literatúre. Neskôr v roku 1816, Philip Physick navrhol používanie stehov z olovených drôtov, pričom si už vtedy uvedomoval malú reakciu tohoto materiálu. V roku 1849 J. Marion Sims z Alabamy, vyrobil stehy zo strieborného drôtu a vykonal s nimi mnoho úspešných operácií.[6]

Aplikácie biomateriálov v medicíne sa viac-menej zameriavali na opravy tvrdých tkanív v zubnej a ortopedickej oblasti. Neskôr boli nahradené implantátmi z biokeramiky a bioskla na bázi hydroxyl karboxyl apatitu (HCA). Vrstva HCA viedla k vytvoreniu silnej väzby medzi implantátom a tkanivom, ktorá napokon držala implantát na mieste. V súčasnosti majú široké uplatnenie v rôznych oblastiach ako sú tkanivové inžinierstvo a regeneračná medicína, ortopédia, obehový systém, génová liečba, plastická chirurgia, podávanie liečiv a v diagnostike aj ako biosenzory.[7]



Obrázok 2: Príklady aplikácie biomateriálov: a) náhoda bedrového kĺbu, b) zubný implantát, c) koronárny stent [8, 9, 10]

Pokrok v oblasti tkaninového inžinierstva viedol k vývoju pórovitých materiálov, ktoré sú navrhnuté a vyrobené tak, aby štruktúrne boli vhodné pre rast nového tkaniva s cieľom obnoviť prirodzený stav a funkciu chorých častí tela. Biokeramické materiály preukázali, že sú veľmi vhodným materiálom pre tkanivové inžinierstvo. Napriek pokrokom, ešte nedosiahli svoj plný potenciál, ale výskum pokračuje.

Okrem tradičného využitia pri kostných náhradách, nedávne štúdiá preukázali, že bioaktívne sklá a sklo-keramika sú vhodné pri hojení rán pri mäkkých tkanivách. Pre tieto aplikácie, kde sú potrebné mäksie a pružnejšie materiály, môžu byť lepším riešením anorganicko-organické hybridy. Tieto materiály majú vzájomne prepojené anorganické a organické siete, ktoré medzi sebou reagujú na molekulárnej úrovni. Výsledný materiál sa správa ako jedná fáza, čím má hlavnú výhodu oproti kompozitným materiálom. Ich mechanické vlastnosti, ako aj bioaktívita, môžu byť prispôsobené zmenou zložiek, parametrov syntézy či spracovania.[3]

3.2.2 Klasifikácia biomateriálov

Profesor Hench rozdelil biomateriály do tzv. generácií. Do prvej generácie patria bioinertné resp. takmer inertné materiály. Ich hlavnou požiadavkou bolo zvoliť vhodnú kombináciu fyzikálnych vlastností tak, aby zodpovedali požiadavkám nahradeného tkaniva s minimálnou toxickou reakciou hostiteľa. Patria sem napr. kovy (zliatiny z nehrdzavejúcej ocele a chróm-kobaltu), keramické materiály na báze Al_2O_3 a ZrO_2 , akrylové živice.

Druhá generácia biomateriálov má schopnosť reagovať s biologickým prostredím. Túto skupinu tvoria aj odbúrateľné biomateriály, ktoré majú schopnosť degradácie, zatiaľ čo nové tkanivo sa regeneruje a lieči. Sem môžeme začleniť napr. biosklo, sklo-keramiku, PGA, PLA .

Tretia generácia biomateriálov využíva bioaktívne a biologicky resorbujeme materiály ako dočasné trojrozmerné porézne štruktúry, ktoré sú schopné aktivovať gény, ktoré stimulujú regeneráciu živého tkaniva. Pre tieto biomateriály je kombinácia bioaktivity a biologickej odbúrateľnosti najcharakteristickejšou vlastnosťou. Na vývoj poréznych štruktúr sa využívajú kovy ako titán a jeho zliatiny.[27]

Podľa kategórie materiálu sa biomateriály delia na:

- Kovy
- Keramika a sklá
- Polyméry
- Kompozitné materiály

Nie všetky kovy majú bioaktívne vlastnosti. Napriek tomu sa využívajú vďaka vysokej mechanickej odolnosti voči opotrebovaniu a nárazom, vysokej pevnosti a húževnatosti. Ich nevýhodou je schopnosť korodovať pri styku s fyziologickým prostredím. V medicíne sa najviac využívajú kovy Au, Ag, Ti a jeho zliatiny, nerez a zliatiny Co a Cr. Využitie majú ako zubné a kĺbové náhrady a taktiež ako koronárny stent (viď Obr. 2 c). Stent sa vyrába z ocele alebo chróm-kobaltovej zliatiny.[2],[11]

Keramika sa v súčasnosti využíva v rôznych medicínskych aplikáciách v ľudskom tele. Podľa typu rozlišujeme bioinertnú a bioaktívnu keramiku. Bioaktívna keramika ďalej môže byť resorbujeme alebo neabsorbujeme. Tvoria ju polykrystalické látky, ktoré sa môžu vyrábať v poréznom alebo hustom stave vo forme granúl alebo povlakov. Sú to väčšinou tvrdé a krehké materiály s porovnateľným modulom pružnosti ako má ľudská kosť. Medzi hlavných zástupcov patria hydridy, sulfidy, selenidy, karbidy a oxidy kovov. Najčastejšie využívané materiály sú založené na obsahu Al_2O_3 a ZrO_2 .

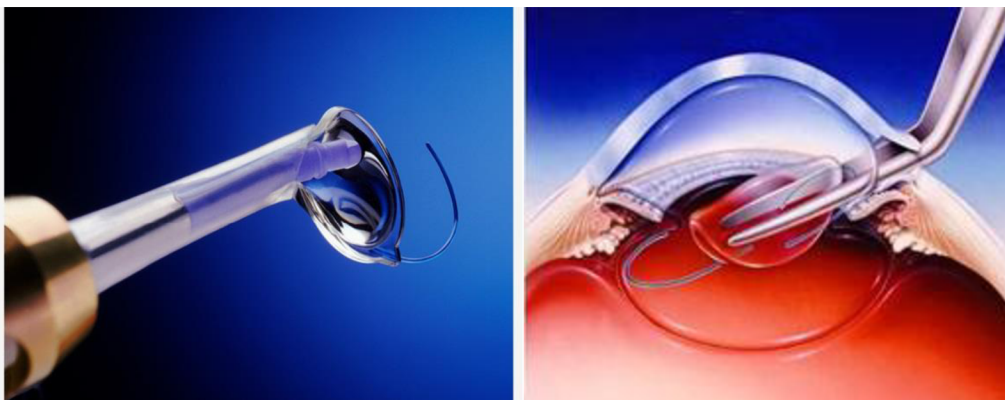
Medzi biokeramiku patria aj bioaktívne sklá a materiály na báze kalcium fosfátu. Sú to amorfné pevné látky s trojrozmernou sieťou oxidu kremičitého a ďalších oxidov. Bolo dokázané, že vytvárajú

silnú väzbu na živé tkanivo a spúšťajú biologické procesy ako je napr. regenerácia tkanív. Na povrchu bioskla vzniká biologicky aktívna vrstva hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), ktorá poskytuje väzbu s hostiteľským tkanivom, zatiaľ čo produkty rozpúšťania (Si, Na, Ca, atď.) stimulujú bunky na produkciu nových tkanív. Bioaktívne sklá sa predovšetkým zameriavajú ako tkaninové nosiče v povrchových vrstvách a degradujúce komponenty pri reparácii tkanív.

Kalcium fosfátové cementy sú biodegradujúce materiály patriace do skupiny apatitov. Ich mólový pomer vápniku a fosforu je blízky k zloženiu kosti. Najčastejšie využitie majú pri rekonštrukciách tváre a čeľusti, v chirurgii chrbtice a v zubných implantátoch.[2], [3], [12]

Polyméry sú v tejto oblasti obzvlášť užitočné hlavne kvôli ich flexibilitě, vďaka ktorej majú výborné fyzikálne a mechanické vlastnosti. Delíme ich na prírodné a syntetické. Ich veľkou výhodou a zároveň nevýhodou je ľahká spracovateľnosť. Zo syntetických polymérov sú najviac využívané polyetylén, ktorý má dva rôzne druhy HDPE (high density polyethene) a LDPE (low density polythene), polypropylén, polymetylmakrylát (PMMA) alebo polyamidy. PMMA výborne prepúšťa svetlo a využíva sa pri výrobe intraokulárnych šošoviek, ale aj pri voperovaní kĺbových implantátov ako kostný cement, ktorý z jednej strany adheruje k implantátu a zo strany druhej na kostné tkanivo.

Z biodegradovateľných polymérov treba spomenúť PLGA, čo je kopolymér tvorený kyselinou mliečnou a kyselinou glykolovou. PLGA je veľmi pevný polymér a zároveň je netoxický, takže produkty jeho degradácie môže telo bez problémov spracovať a vylúčiť.[13]



Obrázok 3: Intraokulárna šošovka a jej aplikácia [14], [15]

Kompozitné materiály kombinujú najvhodnejšie vlastnosti kovových, keramických, polymérnych a prírodných materiálov, dosahujú požadovanú biokompatibilitu, vysokú pevnosť a odolnosť voči korózii.

Biologické materiály v ľudskom tele sú prírodné kompozity, ktoré slúžili ako šablóny pre vývoj látok nahradzujúcich tkanivá. Využitie bioaktivity biokeramických častíc v kompozitoch viedlo k výskumu výroby nových materiálov, ako sú bioaktívne kostné cementy a bioaktívne zubné materiály. V priebehu posledných desaťročí boli tiež skúmané štruktúrne bioinertné kompozitné materiály, ako napríklad polyéterketón zosilnený uhlíkovými vláknami a kompozit na báze zirkónu a oxidu hlinitého na ortopedické alebo zubné aplikácie.

Najnovšie štúdiá preukázali taktiež využitie grafénu pre jeho jedinečnú 2-D štruktúru a výnimočné fyziologické a chemické vlastnosti. Súčasné pokroky v jeho aplikáciách v biomedicíne sa zameriavajú na dodávku liekov a liečbu rakoviny.[16]

Táto práca sa ďalej viac sústreďuje na biomateriály na báze keramiky a skla.

3.3 Biokeramické materiály

Biokeramika zahŕňa keramiku, sklo a sklo-keramiku, ktorá má široké uplatnenie v medicíne ako náhrada predovšetkým tvrdých tkanív. Na základe ich reakcie na živé tkanivo ju delíme na takmer inertnú (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý), bioaktívnu (bioaktívne sklo) a resorbovateľnú (materiály na báze apatitov).[3]

3.3.1 Biokeramika na báze Al_2O_3 a ZrO_2

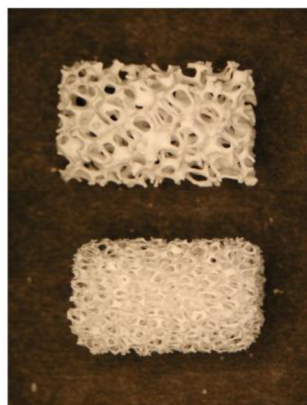
Oxid hlinitý (Al_2O_3) a oxid zirkoničitý (ZrO_2) sú široko využívané inertné keramiky v biomedicínskych aplikáciách. Prvým klinicky použitým biokeramickým materiálom bol $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ s vysokou hustotou a čistotou (> 99,5%). Bol použitý ako nosná konštrukcia bedrového kĺbu a v zubných implantátoch. Má výborné vlastnosti ako sú odolnosť voči korózii, biokompatibilitu, odolnosť voči opotrebovaniu, nízky koeficient trenia a vysokú pevnosť. Avšak líši sa výrazne hodnotou modulu pružnosti (380 GPa) od hodnoty modulu pružnosti ľudskej kosti (72,5 GPa). Ďalšie využitie majú ako kolenné protézy, kostené skrutky, náhrady pri rekonštrukcii čeľuste, náhrady kostí v strednom uchu a iné. Al_2O_3 sa používa aj ako prísada do HAp na zlepšenie mechanických vlastností.[17]

ZrO_2 vyniká vysokou lomovou húževnatosťou a biokompatibilitou. Hlavy stehennej kosti na báze ZrO_2 boli zavedené asi pred dvomi desaťročiami vo Francúzsku, USA a Austrálii. Pri atmosférickom tlaku môže vytvoriť rôzne polymorfie v závislosti od teploty. Čistý ZrO_2 má tendenciu lámať sa dokonca už pri izbovej teplote. Tento dej je známy aj ako degradácia alebo starnutie pri nízkej teplote, ktorý zhoršuje mechanické vlastnosti. Preto sa na čiastočnú stabilizáciu využíva horčík (Mg-PSZ). Od konca 80. rokov ZrO_2 obsahuje približne 3 mol. % Y_2O_3 , ktorý plní funkciu stabilizátora (3Y-TZP). Svoje uplatnenie má v zubnom lekárstve, kde sa používa na výrobu zubných koruniek a protéz. Ďalším vhodným využitím ZrO_2 je kombinácia s matricou Al_2O_3 za vzniku ZTA (oxid hlinitý vystužený zirkónom).[36]

Medzi inertnú kryštalickú biokeramiku môžeme ďalej zaradiť aj TiO_2 , SiO_2 , $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ a $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Na}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$. [17]

3.3.2 Bioaktívna keramika na báze apatitov

Hydroxyapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) patrí medzi keramiku na báze fosforečnanu vápenatého, ktorá je využívaná viac ako 25 rokov v medicíne ako náhrada kostných tkanív. Je to vďaka jeho štruktúre a chemickému zloženiu podobnému minerálnej fáze kostí. HAp je chemicky stabilný vo vnútri tkanív a bioaktívny materiál. Syntetický HAp má stechiometrický pomer vápniku k fosforečnanu 1:67 a z kryštalografického hľadiska je fázou fosforečnanu vápenatého, ktorá je najviac podobná prírodnému kostnému apatitu.



Obrázok 4: Hydroxyapatitové nosiče s rôznou pórovitosťou [3]

Pre svoju vynikajúcu biologickú kompatibilitu a osteokonduktivitu sa HAp úspešne používa ako plnivo v kostiach vo forme cementu alebo granúl a vo forme povlakov na kovové kĺbové protézy. Jeho použitie ako nosného materiálu je obmedzené z dôvodu jeho nízkych mechanických vlastností a extrémne pomalej rýchlosti resorpcie. Bežná nevýhoda všetkých biokeramik fosforečnanu vápenatého vyrobenej v poréznej forme sú krehkosť a nízka únosnosť.[3], [17]

Kvôli týmto nevýhodám sú aplikácie HAp obmedzené. Mnoho materiálov ako ZrO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 sa všeobecne použili na prekonanie týchto nevýhod. Taktiež sa vynaložilo značné úsilie na zlepšenie mechanických vlastností HAp kombináciou vlastností. Výhodná kombinácia je s Al_2O_3 , čím sa zlepšia mechanické vlastnosti a zároveň sa nezhorší biokompatibilita. Resorbovateľné vlastnosti môže dosiahnuť v kombinácii s polymérmi napr. PLA, PCL. Je známa aj kompozícia HAp v polyetyléne HDPE/HA (HAPEX™). Ďalšie možné kombinácie sú s kolagénom (Col-HA), chitozánom a i.[30]

Zloženie väčšiny resorbovateľných keramik je založená na obsahu trikalciium fosfátov (TCP) a kalcium sulfátov, ktoré vykazujú pozitívnu reakciu so živým tkanivom. Síran vápenatý bol jeden z prvých materiálov, ktorý bol označený za resorbovateľnú náhradu kostnej hmoty. Jeho použitie bolo obmedzené kvôli nižšej pevnosti a nepredvídateľnej resorbovateľnosti. β -TCP je vysoko biologicky odbúrateľný materiál. Pri implantácii TCP reaguje s telesnými tekutinami za vzniku HAp.

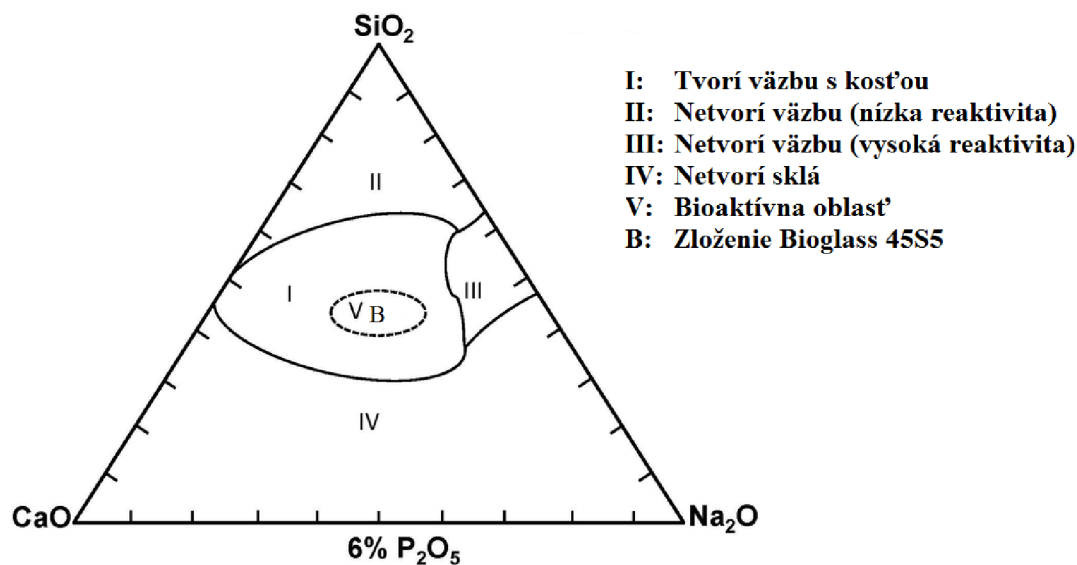
Rozpustnosť povrchu TCP sa blíži k rozpustnosti HAp a pH roztoku sa ďalej znižuje, čo zvyšuje rozpustnosť TCP a zvyšuje resorpciu. Rozpustnosť fosforečnanov vápenatých je funkciou Ca/P pomeru. Veľmi jemná pórovitosť v spekannej forme môže zvýšiť rozpustnosť týchto fáz. Nižšia mechanická účinnosť a metabolické problémy, ktoré vznikajú pri uvoľňovaní veľkých zrn, sú hlavnými obmedzeniami. Svoje uplatnenie má pri kostných defektoch, ošetruje citlivosť v sklovinových alebo dentínových oblastiach, tým že uvoľňuje fluoridové, vápnikové a fosfátové ióny, prirodzene sa vyskytujúce v slinách.[17]

3.3.3 Bioaktívne sklo

Bioaktívne sklo je amorfný materiál, ktorý má schopnosť reagovať s ľudským tkanivom za tvorby biologicky aktívnej vrstvy karbonátovaného hydroxyapatitu (HCA). Molekulu skla tvorí sieť náhodne usporiadaných atómov, ktorých usporiadanie nie je periodické. Sú to krehké a priehľadné materiály.[2]

Väčšina bioaktívnych skiel obsahuje SiO_2 , Na_2O , CaO a P_2O_5 . Na základe týchto zložiek profesor Larry Hench použil fázový diagram o zložkách Na_2O - CaO - SiO_2 (viď Obr. 4). Prvé a najznámejšie zloženie má Bioglass®, ktoré sa označuje aj ako 45S5. Obsahuje 45 % SiO_2 , 24,5 % Na_2O , 24,4 % CaO a 6 % P_2O_5 , všetko v hmotnostných percentách. Nízky obsah SiO_2 , vysoký obsah Na_2O a CaO a vysoký pomer CaO/P_2O_5 sú kľúčovými vlastnosťami, pre ktoré je Bioglass® vysoko reaktívny materiál k vodným médiám a je charakterizovaný ako bioaktívny. Na to aby bolo sklo bioaktívne, je potrebné vytvoriť minimálne množstvo apatitu k živému tkanivu. Rýchla tvorba HCA na povrchu skla indikuje in vitro bioaktivitu, ktorú možno skúmať ponorením bioskla do simulovanej telesnej tekutiny (SBF).

Keď je bioaktívne sklo ponorené do fyziologického prostredia, nastáva iónová výmena kationov (väčšinou Na^+) v skle s kationom H_3O^+ vo vonkajšom roztoku. Nasleduje hydrolyza povrchu skla, v ktorej zaniknú Si-O-Si mostíky, vytvoria sa Si-OH silanolové skupiny a sklenená sieť sa naruší. Následne sa silanoly zmenia kondenzačnou reakciou na gélovú povrchovú vrstvu, ktorá je ochudobnená o ióny sodíka a vápnika. Ďalšia fáza prebieha v prostredí okolo implantátu, kde amorfná vrstva fosforečnanu vápenatého remineralizuje na kryštalický hydroxyapatit napodobňujúci minerál, ktorý je prirodzene obsiahnutý v kostiach stavovcov.[4]



Obrázok 5: Fázový diagram o zložkách $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$, upr. podľa [18]

Kremičité biosklá obsahujú okrem SiO_2 , Na_2O , CaO a P_2O_5 aj iné oxidy, ktoré sú potrebné na vyvolanie určitých vlastností. Medzi tieto oxidy patria napr. MgO , K_2O a B_2O_3 . Nedávno bolo preukázané, že borité sklá sú tiež bioaktívne. Z dôvodu nižšej chemickej odolnosti niektoré borité bioaktívne sklá sa rýchlejšie rozkladajú a menia sa na materiál podobný HAp, v porovnaní s 45S5 sklom. Ich premena na HAp je podobná ako pri 45S5, ale bez vytvorenia bohatej vrstvy SiO_2 . Slúžia aj ako substrát na uvoľňovanie liečiva pri liečbe kostnej infekcie. Nedávne štúdiá ukázali schopnosť kontrolovať rýchlosť degradácie bioaktívneho skla manipuláciou jeho zloženia, napr. čiastočnou výmenou SiO_2 v kremičitanoch 45S5, 13-93 s B_2O_3 alebo úplnou výmenou SiO_2 s B_2O_3 . Ďalšou možnosťou je využiť flexibilitu zloženia skla, aby mohlo slúžiť aj ako zdroj mnohých prvkov, o ktorých je známe, že podporujú rast kostí, ako napríklad Zn, Cu, F, Mn, Sr a B. Keď sklo degraduje in vivo, tieto prvky sa uvoľňujú pri biologicky prijateľnej rýchlosti.[19]

Bioaktívne sklá s obsahom Na_2O nižším ako 10 mol.% a malým alebo žiadnym obsahom K_2O a Al_2O_3 na báze systému $\text{SiO}_2-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{P}_2\text{O}_5$ poskytujú vhodnú rýchlosť ukladania apatitu pre potenciálnu bioaktivitu a rýchlu rekonštrukciu poškodenej kosti. Horčík ovplyvňuje kryštalinitu a rozpustnosť apatitu a pomáha regulovať jeho rozpúšťanie.[4]

3.3.4 Bioaktívna sklo-keramika

Sklo sa môže previesť zahriatím na čiastočne kryštalický materiál, obsahujúci rôzne druhy kryštalických fáz. Vo všeobecnosti výsledný sklo-keramický materiál vykazuje vynikajúce mechanické vlastnosti ako napr. vyšší modul pružnosti, tvrdosť, pevnosť pri porušení a odolnosť voči opotrebovaniu. Veľa bioaktívnych skiel, vrátane 45S5 Bioglass® kryštalizujú hneď nad teplotou skleneného prechodu, preto sú sintované bioaktívne sklenené nosiče často sklo-keramické.[3]

Jedným z najdôležitejších modifikácií bioaktívnych skiel bol vývoj A/W (apatit/wollastonit) bioaktívnej sklo-keramiky od profesorov Yamamuro a Kokubo. Jedinečné spracovanie spôsobuje veľmi jemnú zrnitú sklenenú keramiku zloženú z veľmi malých kryštálov apatitu (A) a wollastonitu ($\text{W}=\text{CaSiO}_3$). Mechanická pevnosť, húževnatosť a stabilita sklenenej keramiky A/W vo fyziologickom prostredí je vynikajúca. A/W môže byť vyrobená v $\text{SiO}_2-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{F}$ sústave. Chemické zloženie v hmotnostných percentách obsahuje 34,0 SiO_2 , 44,7 CaO , 4,6 MgO , 16,2 P_2O_5 a 0,5 CaF_2 .

Je možné dosiahnuť jemnú kryštalickú mikroštruktúru sklo-keramiky, čo sa odrazí v pevnosti v ohybe približne 215 MPa, pevnosti v tlaku 1,080 MPa a lomovej húževnatosti 2,0 $\text{MPa m}^{0.5}$. Vďaka

týmto dobrým mechanickým vlastnostiam je táto sklo-keramická forma potenciálne vhodná pre nosné aplikácie. Sklenená keramika A/W je tiež obrábatelná strojom, ale jej hlavnou nevýhodou je relatívne nízka lomová húževnatosť v porovnaní s inou keramikou oxidu hlinitého. Cerabone™ je komerčne dostupná verzia vysoko pevnej bioaktívnej sklo-keramiky zloženej z A/W.[4]

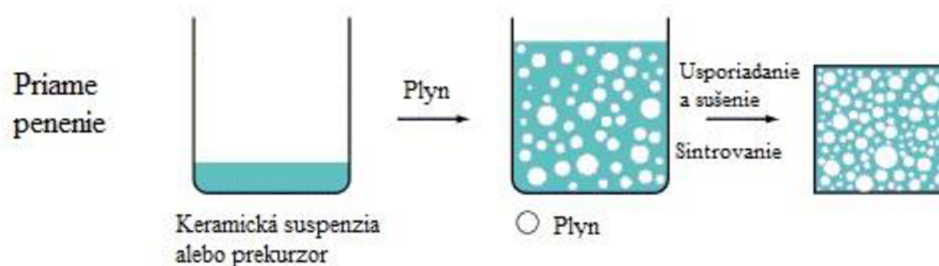
3.4 Metódy prípravy biokeramických materiálov

Existuje široká škála spôsobov prípravy biokeramických nosičov (angl. scaffolds) v tkanivovom inžinierstve. Každá metóda poskytuje špecifický rozsah veľkosti pórov a distribúciu. Preto najviac vhodná technika musí byť presne vybraná tak, aby vyhovovala požiadavkám daného typu tkaniva. Okrem toho, každá výrobná metóda má iné náklady na výrobu, preto pre niektoré je vhodnejšia veľkoobjemová výroba, zatiaľ čo iné sú vhodné na výrobu produktov s pridanou hodnotou.

3.4.1 Metódy penenia

Vysoko poréznu keramiku (póry v rozmedzí 20 μm –2 mm) možno vyrobiť rozptýlením plynu vo forme bublín do keramickej suspenzie alebo koloidných roztokov a následným tuhnutím. Poznáme niekoľko techník penenia: mechanickým spenením vplyvom externe pridávaným plynom, cieľovým vstrekaním prúdu plynu či vývojom plynu in situ.

Rozhodujúcim krokom pri metóde priameho napenenia je stabilizácia a nastavenie vlhkých pien. Je potrebné ich nastaviť tak, aby sa zachovala ich porézna morfológia pred ohrevom pri vysokej teplote na spekanie. Okrem toho môže nastať niekoľko premien v štruktúre v čase medzi tvorbou a tuhnutím peny. Aby sa zachovala porézna morfológia a zabránilo sa narušeniu penovej štruktúry, využívame povrchovo aktívne látky. Ich hlavnou úlohou je stabilizácia bublín vytvorených v kvapalnej fáze, pretože znižujú povrchové napätie na rozhraní plyn-kvapalina. Tieto látky stabilizujú systém len po obmedzenú dobu, preto je potrebný ďalší mechanizmus, ktorý poskytne trvalejšiu formu stabilizácie.



Obrázok 6: Schéma postupu prípravy biokeramického materiálu metódou priameho napenenia, upr. podľa [20]

Zabudovanie bublín môže byť zapríčinené rôznymi spôsobmi spracovania. H_2O_2 penenie zahŕňa miešanie keramickeho prášku s vodným roztokom H_2O_2 ako penotvorným činidlom. Potom sa výsledná zmes odlieva do foriem a ukladá sa do pece pri 60 °C. Teplotou sa uvoľňuje kyslík, tvoria sa bublinky v suspenzii a nastáva proces penenia. Vzorka je potom spekaná, aby sa získala kryštalická keramika alebo bioaktívne sklo.[3]

Alternatívou H_2O_2 penenia je polymerizácia organického monoméru. Pripraví sa vodná keramická suspenzia s vysokým obsahom tuhých látok, ktorá tiež obsahuje organický monómér, ktorý musí byť rozpustný vo vode (napr. akryláty) spoločne s iniciátormi a katalyzátorom, aby nastala polymerizácia. Po pridaní penotvornej látky (povrchovo aktívnej látky) sa suspenzia mechanicky mieša, aby sa získala vlhká keramická pena. Pena sa odlieva do vhodnej formy a po ukončení polymerizácie je nevyhnutne keramika dostatočne pevná na to, aby ju bolo možné z formy odstrániť a preniesť do pece na vysušenie a vypálenie.

Ďalšou možnosťou je metóda sol-gel penenia. Tento proces zahŕňa nasledujúce kroky:

1. Príprava sólu zo zmesi destilovanej vody, vhodných prekursorov (alkoxydy kovov), solí (CaNO_3) a katalyzátoru hydrolyzy (zriedená kyselina).
2. Pridanie želatínového činidla, povrchovo aktívneho činidla a destilovanej vody.
3. Odlievanie penovej zmesi do foriem.
4. Starnutie na dosiahnutie zgelovania sólu.
5. Odstránenie rozpúšťadla sušením na nízkej teplote.
6. Spekanie.

Na tento spôsob je možné úspešne získať vysoko bioaktívne 3-D štruktúry. Obmedzením je vnútorná krehkosť pórovitého produktu vďaka nanoporéznej štruktúre, čo predstavuje kritické problémy z hľadiska bezpečnej implantácie (príliš nízke mechanické vlastnosti).[3]

3.4.2 Príprava penovej štruktúry pomocou konsolidácie škrobu

Táto metóda používa škrobové granuly na báze kukurice, ryže alebo zemiakov ako činidlo tvoriace póry aj ako spojivo na výrobu poréznej keramiky. Hlavnými výhodami tejto techniky spracovania sú jej nízke náklady a ekologický charakter. Tento spôsob zahŕňa miešanie škrobových granúl, keramického prášku a destilovanej vody, aby sa získala suspenzia, ktorá je kontinuálne miešaná a udržiavaná pri 60 až 80 °C. V tomto teplotnom rozsahu škrob narastá kvôli absorpcii vody, čo vedie k vzniku gélovitému materiálu, ktorý sa po konsolidácii tepelne spracuje vypaľovaním organickej fázy a spekaním keramickej matrice. Historicky bola táto metóda jednou z prvých používaných na spracovanie bioaktívnych skiel v poréznej forme. Mechanické vlastnosti výsledných sklokeramických nosičov (pevnosť v tlaku približne 6 MPa) boli porovnateľné s mechanickými vlastnosťami pórovitých kostí (2–12 MPa), pórovitosť bola príliš nízka (40 obj. %) a slabo prepojená na to aby boli vhodne aplikované.[3]

3.4.3 Metóda penenia vypaľovaním organickej fázy

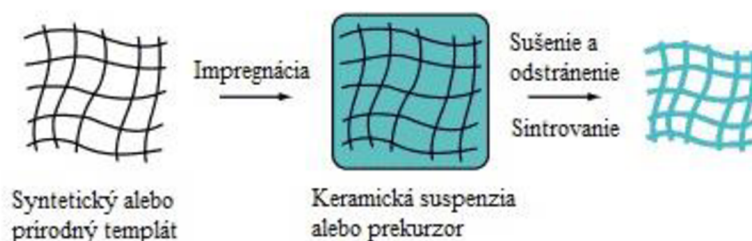
Pri tejto metóde sa keramické prášky zmiešajú spolu s tuhým polymérom syntetickou fázou (napr. PMMA). Potom sa zmes lisuje a následne je tepelne spracovaná pri vysokej teplote. Pri zahrievaní sa polyméromé častice rozkladajú, zatiaľ čo anorganické častice sa spekajú. Pretože spekanie vyžaduje vyššie teploty ako pyrolýza, musí byť keramická matrica čiastočne upevnená pred odstránením, takže porézna štruktúra sa počas kroku odstraňovania polyméru nezrúti. Preto sa v zmesi obvykle pridávajú spojivá. Na dosiahnutie vysoko poréznej štruktúry je potrebná veľká časť polyméromé fázy vo východiskovej zmesi. To spôsobuje vývoj veľkého množstva plynu počas ohrevu, ktorý môže spôsobiť tvorbu trhlín v keramickom systéme. Preto musí byť proces kontrolovaný, aby sa zabránilo vzniku defektov v konečnej zložke.[3]

3.4.4 Replikačná metóda

Táto metóda bola patentovaná v roku 1963 a odvtedy sa stala najpopulárnejšou a najpoužívanejšou metódou výroby penových keramických nosičov pre tkanivové inžinierstvo. Tento úspech je pripísaný jednoduchosťou a flexibilitou tejto metódy, pretože je použiteľná na akýkoľvek keramický materiál, ktorý môže byť rozptýlený do suspenzie. Bolo pozorované, že sieťovaná štruktúra tejto metódy, pozostávajúca zo vzájomne prepojených dutín obklopených keramickou oporou je najvhodnejšia pre nosiče kostného tkaniva. Ďalšou výhodou je, že počiatočný špongiový materiál sa dá ľahko vystrihnúť a prispôbiť veľkosti a tvaru defektu tkaniva podľa potrieb pacienta.

Tento proces zahŕňa impregnáciu pórovitej formy (napr. polyuretánovej špongie) alebo prírodného materiálu (napr. morskej špongie) s kašou z jemného keramického prášku a spojiva (napr.

polyvinylalkoholom, koloidným oxidom kremičitým). Špongiový materiál je potom stlačený, aby sa odstránila prebytočná kaša a umožnilo sa potiahnutie špongiových vzpier s tenkou vrstvou suspenzie. Po vysušení sa potiahnutý templát (šablóna) pyrolyzuje, zatiaľ čo zostávajúci keramický povlak sa sintruje pri vyšších teplotách, aby sa získala porézna keramika. Výsledný materiál vyrobený touto metódou možno vidieť na Obr. 4.



Obrázok 7: Schéma postupu prípravy biokeramického materiálu replikačnou metódou, upr. podľa [20]

Najdôležitejším krokom procesu je výroba rovnomerného povlaku na polymérnej štruktúre. Suspenzia by mala byť dostatočne tekutá, aby umožnila prenikanie do buniek špongie po stlačení a roztiahnutí, ale dostatočne viskózna, aby sa zabránilo vysušaniu (odvodneniu) zostávajúceho povlaku. Je tiež potrebné spomenúť, že neúplné odstránenie prebytočnej kaše vedie k štruktúre s určitým stupňom uzavretej pórovitosti. Táto replikačná metóda sa nedávno použila v kombinácii s metódou EISA na výrobu hierarchických pórovitých bioaktívnych sklenených nosičov. Tieto nosiče sú vysoko bioaktívne, ale vykazujú krehkosť kvôli prítomnosti mezoporéznej štruktúry.[3]

Tabuľka 1: Prehľad výhod a nevýhod metód spomenutých v texte [3]

Metóda	Výhody	Nevýhody
H ₂ O ₂ penenie	Jednoduchosť	Štruktúra s nízkou poréznosťou a nízkym 3D prepojením
Sol-gel penenie	Je možné získať hierarchickú štruktúru	Vysoká potreba kontroly peny
Vypaľovanie organickej fázy	Vysoká mechanická pevnosť	Je ťažké dosiahnuť homogénnu distribúciu pórov; zlé prepojenie
Konsolidácia škrobu	Šetrné k životnému prostrediu, nízka cena	Póry môžu byť slabo prepojené
Replikačná metóda	Uplatniteľné na akýkoľvek keramický materiál, ktorý môže byť dispergovaný do suspenzie; nie sú potrebné žiadne toxické chemikálie	Mechanické vlastnosti môžu byť slabé

3.4.5 Výroba pevných voľných foriem (SFF)

Výroba pevných voľných foriem, nazývaná aj rýchle prototypovanie, označuje súbor technológií tvarovania, ktoré používajú vrstvom výrobné stratégie na vytvorenie nosičov. Tie sú prispôbené vonkajším tvarom a vopred navrhnutou vnútornou štruktúrou priamo počítačom vyvíjaného 3-D modelu. Tento model predstavuje 3-D rekonštrukciu pacientovho špecifického defektu tkaniva, ktorý

sa dá získať z údajov počítačovej tomografie pacienta alebo z magnetickej rezonancie. Ďalšie podrobnosti týkajúce sa mikro-prostredia môžu byť vyvinuté pomocou počítačom podporovaného dizajnu (CAD). Jednou z hlavných výhod technológie SFF je schopnosť vyrábať komponenty s vysoko reprodukovateľnou stavbou.

Stereolitografia (SLA) je metóda, ktorá používa zmes keramických práškov a fotolabilného monoméru. UV laserový lúč, ktorý vytvrdzuje monomér, je selektívne naskenovaný na povrch zmesi. Ďalšie vrstvy sú vytvorené priamo na vrchu predtým vytvrdených vrstiev. Po tomto kroku sa materiál, ktorý nie je vytvrdený laserom, môže odčerpať a spekať tak, aby sa vytvoril konečný produkt.

Selektívne laserové spekanie (SLS) je technika, ktorá využíva CO₂ laserový lúč na spekanie tenkých vrstiev práškových keramických materiálov na vytvorenie 3-D objektov. Laserový lúč sa naskenuje nad práškovú vrstvu na základe údajov CAD. Tým sa zvýši teplota práškov vo vybraných oblastiach. Týmto spôsobom sa častice spájajú dohromady a následné vrstvy sa môžu vytvoriť priamo na vrchu predtým spekaného materiálu.

Metódy označované ako robocasting spadajú do širokej triedy 3DP techník. Touto metódou boli navrhnuté bioaktívne sklené nosiče s pravidelným usporiadaním pórov s mimoriadne vysokými mechanickými vlastnosťami pri kompresii a ohybe. Minimálny obsah rozpúšťadla zaručuje malé zmrštenie. Je možno vyrábať bežné porézne štruktúry, 3D siete aj štruktúry s vysoko orientovanou pórovitosťou.[3]

Väčšina prírodných materiálov (napr. drevo alebo niektoré časti živočíchov) sú kompozity, ktoré sa vyznačujú komplikovanou hierarchickou štruktúrou. S cieľom kopírovať tento biologický dizajn sa inšpirovalo biomimetické inžinierstvo. Medzi metódy biomimetického inžinierstva patrí aj „biotemplating“, kde sú štruktúry biologického pôvodu priamo používané pre materiály s požadovanou mikroštruktúrou. Niektoré keramické materiály so štruktúrou dreva môžu byť vyrábané pyrolýzou dreva v redukčnej atmosfére a infiltrovaním vysoko poréznej zostatkovej karbónovej siete keramickým prekurzorom alebo sólom. Takto pripravená keramika vykazuje po výpale štruktúru šablóny (dreva). Na podobnom princípe sa táto metóda dá využiť pri použití pórotvorných činidiel biologického pôvodu (napr. škrob).[25]

3.5 In vitro testy

Ako už bolo už spomenuté, in vitro testovanie je mimotelové a má isté obmedzenia, ktoré sa často dopĺňajú in vivo testami. Mnohé zo skúšobných metód sú úpravy existujúcich testovacích metód, ktoré sa historicky používali na testovanie chemických látok a liečiv. Úpravy súvisia s prípravou testovacej vzorky. Väčšina zdravotníckych pomôcok je v podstate nerozpustná a pevná, iné zas môžu byť rozpustné tuhé látky a kvapaliny. Pri nerozpustných pevných biomateriáloch sa testované vzorky pripravujú vytvorením extraktu v rôznych rozpúšťadlách. Tieto rozpúšťadlá sú určené na extrakciu chemikálií, ktoré by sa dali očakávať, že sa budú vylučovať z biomateriálu počas klinického používania.[5]

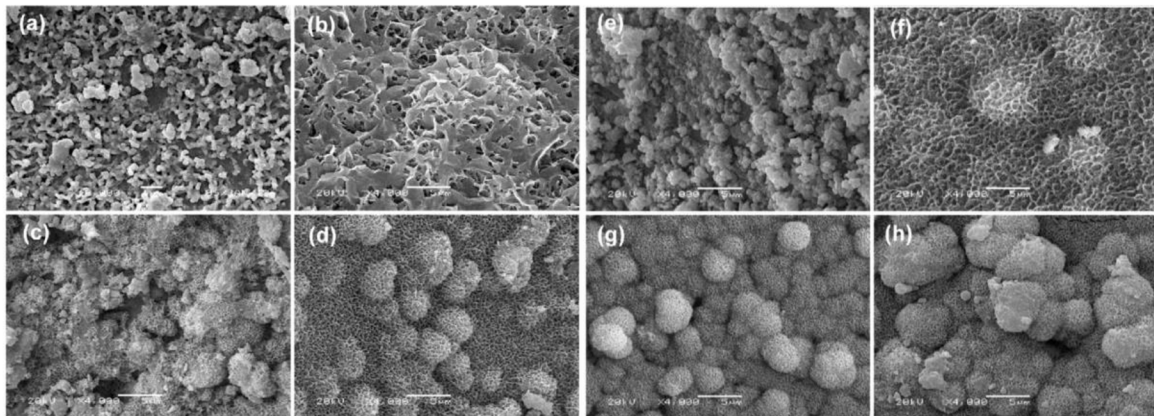
3.5.1 Interakcia biomateriálov so simulovanou telesnou tekutinou

Schopnosť materiálu viazať sa na kosť sa často hodnotí skúmaním schopnosti tvorby apatitu na svojom povrchu v simulovanej telesnej tekutine (SBF). Koncentrácie iónov v SBF sú takmer rovné koncentráciám ľudskej krvnej plazmy. Dospelo sa k záveru, že skúmanie tvorby apatitu na materiáli v SBF je užitočné na predpovedanie in vivo kostnej bioaktivity materiálu a vďaka tejto metóde sa výrazne môže znížiť testovanie na zvieratách.[21]

3.5.2 Teória kryštalizácie

Teória kryštalizácie poukazuje na to, že schopnosť väzby na kosť (alebo bioaktivity) a tvorba apatitu v roztoku SBF sú dva odlišné javy. Aby bolo možné vysvetliť toto tvrdenie, je potrebné preskúmať

základné princípy teórie kryštalizácie a tieto princípy spájať s testom bioaktivity na báze SBF. Termochemické výpočty ukazujú, že sérum a SBF sú presýtené na apatitové kryštály, čiže systém je metastabilný a nakoniec sa stane termodynamicky stabilným vytvorením kryštálov apatitu. Táto doba, nazývaná aj ako doba indukcie alebo nukleácie, závisí od rýchlosti vytvárania krištálových jadier dostatočne veľkých na to, aby boli termodynamicky stabilné a teda dostatočne veľké na rast (veľkosť, nad ktorou sú kryštály stabilné sa všeobecne označuje ako kritická veľkosť). Keď sa apatitové kryštály tvoria alebo precipitujú na kúske materiálu ponoreného do séra alebo SBF, môžeme povedať že doba namáčania bola dlhšia ako doba indukcie. Preto je nevyhnutné pochopiť faktory ovplyvňujúce tvorbu nukleácie, aby sme pochopili výsledky experimentov bioaktivity uskutočnených v SBF.[22]



Obrázok 8: Vrstvy apatitu vytvorené na povrchu vzoriek vystavených SBF (a,b) β -TCP; (c,d) β -TCP/SiO₂; (e,f) β -TCP/MgO (g,h); β -TCP/SiO₂/MgO [23]

3.5.3 Zmena lokálneho presýtenia

Pridaním tuhej látky do SBF môžeme meniť zloženie roztoku a preto poskytnuté presýtenie je aspoň čiastočne rozpustné v SBF. Lokálna zmena presýtenia môže byť buď pozitívna, čím napomáha tvorbe apatitu, alebo negatívna a tým bráni tvorbe apatitu. V prípade bioskla je tento materiál zásaditý, a preto vyvoláva lokálne zvýšenie pH SBF. Toto zvýšenie vedie k 10 až 100-násobnému zníženiu rozpustnosti HAP a teda k veľmi veľkému zrýchleniu apatitovej nukleácie. Tento dej je posilnený uvoľňovaním vápnikových iónov z bioskiel.

Ďalšou zmenou lokálneho zloženia roztoku je použitie materiálu rozpustného v SBF, ktorý môže uvoľňovať veľké množstvá vápnikových a/alebo fosfátových iónov. Platí to pre CSH (hydrát síranu vápenatého), CSD (dihydrát síranu vápenatého), DCPD (dihydrát dikalcium fosfátu). Napriek tomu, výsledky in vivo ukázali, že tieto látky sú resorbované príliš rýchlo na vytvorenie priamej väzby s kosťou.

V predchádzajúcom odseku bolo opísané, ako zmena lokálnej zložky SBF vyvolala spomalenie alebo zrýchlenie zrážania apatitu. Aj lokálna dynamika môže mať vplyv na reakčnú kinetiku. Preukázalo sa, že použitie skôr dynamickej ako statickej inkubačnej metódy oddialilo tvorbu apatitu. Takisto zvýšenie plochy povrchu materiálu (napríklad použitím granúl namiesto hustých foriem) vedie k rýchlejšej zmene lokálneho zloženia SBF a tým k rýchlejšej tvorbe apatitu.[22]

3.5.4 Zloženie a príprava SBF

Odkedy sa zverejnilo prvé zloženie SBF, tak sa časom navrhlo niekoľko nových zložiek. Napriek tomu, ani jedno zloženie týchto roztokov nezodpovedá zloženiu krvnej plazmy. Hlavným rozdielom je absencia proteínov, ktoré zohrávajú významnú úlohu pri kontrole apatitovej nukleácie. Ďalšími rozdielmi je pridávanie TRIS do tlmivých roztokov SBF a chýba kontrola obsahu uhličitanov. Preto súčasné zloženia SBF sa líšia od krvnej plazmy, ktoré by malo simulovať. Asi jedinou požiadavkou,

vd'aka ktorej sa používa SBF na testovanie bioaktivity je, že môže zrážať hydroxyapatit pri telesnej teplote 37 °C.

Metóda, ktorú navrhli Kokubo a Takadama na prípravu roztoku SBF, je zložitá, čo zvyšuje riziko získania nereprodukovateľných výsledkov. Postup prípravy SBF je uskutočňovaný za miešania pri 37 °C, čím sa zvyšuje riziko predčasného vápnikového a fosfátového zrážania. Roztoky nie sú v žiadnom bode filtrované, hoci prítomnosť nerozpustných látok môže mať významný vplyv na zrážanie. Obsah uhličitanov v roztokoch nie je kontrolovaný. Ale ich obsah môže ovplyvniť pH roztoku (prostredníctvom výmeny s atmosférou) a zmeniť hladinu nasýtenia fosforečnanov a uhličitanov vápenatých. Ideálne by mala byť príprava roztokov SBF jednoduchá a reprodukovateľná.

Na to, aby sa splnila táto podmienka, východiskové materiály by sa mohli rozdeliť do dvoch termodynamicky stabilných zásobných roztokov. Tie by sa mali dať pripraviť a uchovávať v primeranom čase pred použitím na testovanie bioaktivity. Zásobné roztoky by mali byť pripravené v atmosfére s obsahom 5% oxidu uhličitého a ďalej by mali byť ultrafiltrované a skladované v tesných fľašiach v tme až do použitia. Stačilo by ich premiešať tesne pred použitím. V roku 2008 bolo navrhnuté alternatívne zjednodušenie prípravy SBF.

Za predpokladu, že bioaktivita môže byť skutočne testovaná in vitro, je navrhnutý nasledujúci postup:

1. Vyberie sa najjednoduchšia SBF, ktorá sa približuje zloženiu krvnej plazmy, pH=7,4 pri 37 °C, pod $p(\text{CO}_2)=0,05 \text{ atm}$, v rovnováhe s DCPD.

2. Referenčné materiály sa ponoria (β -TCP, HAp, Ti, biosklo atď.) do SBF a koreluje sa ich správanie in vitro s ich in vivo správaním. Povrch testovaných materiálov by mali byť vopred dobre charakterizovaný a identický v oboch prípadoch.

3. Ak sa nezistí významná korelácia medzi testom bioaktivity a výsledkami in vivo, môžu sa sledovať účinky rôznych aditív (napr. Mg, K, sulfátov, proteínov atď.), dokým sa nedosiahnu zhodné výsledky.[22]

Tabuľka 2: Iónové koncentrácie (mM) krvnej plazmy a rôznych typov SBF [21], [24]

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

3.5.5 Testovanie cytotoxicity

Pojem cytotoxicita zahŕňa toxické účinky na bunkovej úrovni. Testy cytotoxicity sú primárne testy na biokompatibilitu pre širokú škálu elastomérnych, polymérnych a iných materiálov používaných v zdravotníckych pomôckach. Sú známe tri rôzne prístupy hodnotenia cytotoxicity: test extrakcie, test priameho kontaktu a test nepriameho kontaktu.

Súčasná štúdiá naznačujú, že materiál, ktorý sa považuje za netoxický in vitro, bude netoxický v in vivo teste. Avšak to neznamena, že ak materiál bude toxický in vitro, nebude sa môcť použiť v danej klinickej aplikácii. In vitro testy môžu hodnotiť iba vrodenu toxicitu chemickej látky a netestovať metabolické produkty, ktoré môžu mať väčší alebo menší potenciál toxicity.

Cytotoxicita môže byť vyhodnotená morfológiou buniek, poškodením buniek, rastom buniek alebo meraním bunkovej aktivity. V každom nezávislom cytotoxickom teste by mali byť zahrnuté nasledujúce kontroly: pozitívna kontrola, negatívna kontrola a kontrola slepeho pokusu. Pozitívne a negatívne kontroly by mali byť založené na biomateriáloch, o ktorých je známe, že vyvolávajú cytotoxickú alebo necytotoxickú reakciu. Pre extrakty je kontrola slepeho pokusu dôležitá, pretože ide o extrakčné médium na prípravu testovaných vzoriek.[5],[6]

3.5.6 Testovanie genotoxicity

Testovanie genotoxicity sa využíva tam, kde úprava zloženia materiálov odhalí možnú prítomnosť zlúčenín, ktoré by mohli interagovať s genetickým materiálom, alebo ak je chemické zloženie zdravotníckej pomôcky/biomateriálu neznáme. Test in vitro by mal zahŕňať tri kritické koncové body genotoxicity, tzn. génové mutácie, štruktúrne a numerické chromozómové odchýlky.

Génové mutácie môžu byť stanovené v bakteriálnom teste reverzných mutácií (Amesov test). Tento test využíva aminokyseliny vyžadujúcu kmene Salmonella typhimurium a Escherichia coli. Princíp tohto testu spočíva v tom, že detekuje mutácie, ktoré navrátia mutácie prítomné v testovaných kmeňoch. Tieto indukované mutácie obnovujú funkčnú schopnosť baktérií syntetizovať esenciálnu aminokyselinu. Čo napokon vedie k rastu na vybraných médiách, kým nemutované materské baktérie nebudú na týchto médiách rásť.

Medzi testy genotoxicity patrí aj MN test, ktorý zisťuje aktivitu klastogénnych a aneugénnych chemikálií v bunkách, ktoré boli podrobené bunkovému rozdeleniu počas expozície alebo po expozícii testovanej látke.

Keď sú všetky testy in vitro na mutagenitu alebo poškodenie DNA negatívne, ďalšie testovanie in vivo nie je potrebné. Ak výsledkom je pozitívny test, vyžaduje sa ďalšie testovanie in vivo alebo sa predpokladá, že materiál je mutagénny.[5]

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Praktická časť tejto práce sa zaoberá skúmaním interakcie biomateriálov s rôznymi typmi SBF. Zahŕňa vytvorenie a naloženie vzoriek, prípravu konkrétnych SBF, popis metód na meranie množstva vápnika a fosforu a analýzu povrchu vzoriek pomocou elektrónového mikroskopu.

Zoznam použitých chemikálií:

- NaCl, KCl, NaHCO₃, K₂HPO₄ · 3H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂, Na₂SO₄ (všetko v p.a., Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o),
- Na₂HPO₄ · 2H₂O (LACHEMA n.p. Brno),
- (NH₄)₂MoO₄, KH₂PO₄, hydrochinón, Na₂SO₃, HCl, H₂SO₄ (všetko v p.a., Lach-Ner s.r.o),
- Tris (tris (hydroxymetyl) aminometán, arzenázo III, hydroxyapatit (všetko p.a., Sigma-Aldrich),
- Al₂O₃ (NABALOX, p.a.)

Zoznam použitých prístrojov:

- analytické váhy (METTLER TOLEDO),
- VIS fotospektrometer (Haach Lange 2880DR),
- pH meter (METTLER TOLEDO),
- skenovací elektrónový mikroskop (EVO LS10 od firmy ZEISS),
- rentgenový difraktogram (Empyrean od firmy Panalytical),
hydraulický lis (LIS BSL 2, BRIO Hranice s.r.o).

4.1 Príprava SBF

Na experiment sa pripravili tri rôzne fyziologické roztoky (c-SBF, c-SBF bez vápnika, Tas-SBF) a použil sa jeden komerčný roztok (Hankov roztok).

Podľa Tab. 3 bola pripravená SBF podľa Kokuba (c-SBF). Do umelohmotnej nádoby s hladkým povrchom za stáleho miešania pri teplote $36,5 \pm 1,5$ °C sa nalialo 700 ml deionizovanej vody. Následne sa podľa poradia (viď Tab. 3) pridávali jednotlivé látky. Každá nasledujúca látka sa pridala až po úplnom rozpustení látky pridanej predtým. Hygroskopické látky ako KCl, K₂HPO₄ · 3H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂ a Na₂SO₄ sa pridali v čo najkratšom čase. CaCl₂ bolo treba pridávať po malých množstvách, aby sa predišlo nožnej precipitácii.

Po pridaní Na₂SO₄ sa objem nádoby doplnil deionizovanou vodou na 900 ml. Teplota roztoku sa udržiavala v teplotnom rozmedzí $36,5 \pm 0,5$ °C. Po týchto krokoch sa začal pridávať tris po veľmi malých množstvách. pH metrom sa kontrolovalo pH roztoku tak, aby konečná hodnota bola 7,40 pH. Pokiaľ množstvo trisu nestačilo na to, aby sa zvýšilo pH na hodnotu 7,40, tak sa pridalo ešte malé množstvo. Ak by pH stúplo na $7,45 \pm 0,01$, tak pridaním 1M HCl sa môže upraviť. V našom prípade to nebolo treba. Takto pripravený roztok môže byť použitý maximálne mesiac. SBF musí byť číry roztok bez zrazenín, inak nie je možný použitia.[21]

Rovnakým spôsobom bol pripravený aj roztok c-SBF bez vápnika (roztok bez CaCl₂).

Tabuľka 3: Poradie a množstvá potrebných látok na prípravu SBF podľa Kokuba [21]

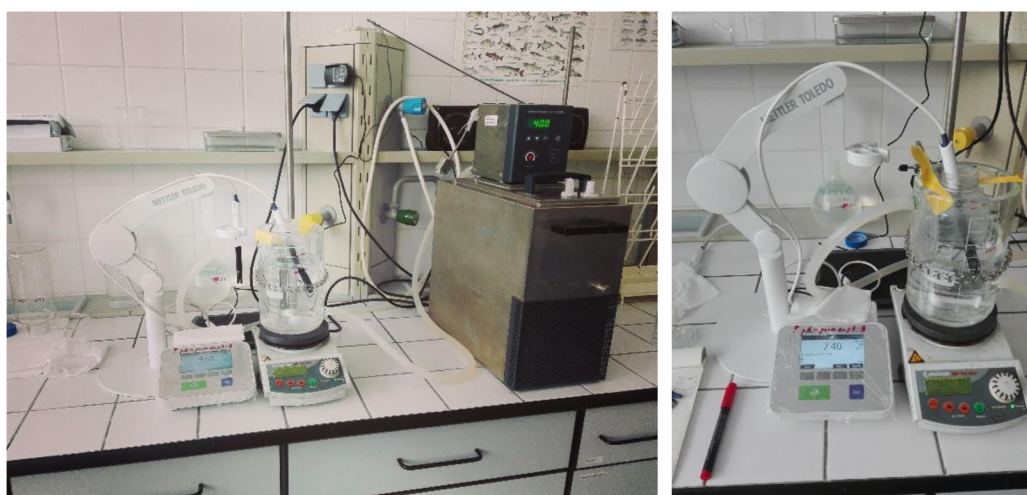
Poradie	Reagent	Množstvo
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,311 g
6	1.0 M HCl	39 ml
7	CaCl ₂	0,292 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	Tris	6,118 g

Tas-SBF bola pripravená podobným spôsobom ako c-SBF. Do umelohmotnej nádoby s hladkým povrchom za stáleho miešania pri laboratórnej teplote sa nalialo 700 ml deionizovanej vody. Postupne sa pridávali látky podľa poradia (viď. Tab. 4). Každá nasledujúca látka sa pridala až po úplnom rozpustení látky pridanej predtým. Pred pridaním CaCl₂ · 2H₂O, sa do roztoku prilialo 15 ml HCl. Celkový objem potrebný na prípravu bol 40 ml HCl.

Potom, čo sa tris pridávaný po malých množstvách úplne rozpustil, bolo treba roztok zohriať na 37 °C. Nakoniec sa po malých dávkach pridával striedavo zvyšok HCl a voda tak, aby sa doplnil objem na 1 l a dosiahlo sa pH 7,4 pri teplote 37 °C. Počas celého postupu bola kontrolovaná teplota a pH.[24]

Tabuľka 4: Poradie a množstvá látok potrebných na prípravu Tas-SBF [24]

Poradie	Reagent	Množstvo
1	NaCl	6,547 g
2	NaHCO ₃	2,268 g
3	KCl	0,373 g
4	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,178 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,305 g
6	1.0 M HCl	15 ml (40 ml)
7	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,368 g
8	Na ₂ SO ₄	0,071 g
9	Tris	6,057 g

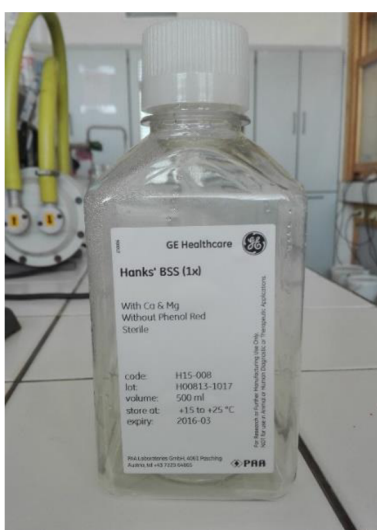


Obrázok 9: Fotky aparatury na prípravu c-SBF, c-SBF bez vápnika a Tas-SBF

Tretím fyziologickým roztokom bol komerčný Hankov roztok od firmy GE Healthcare. Zloženie uvedené výrobcom je v Tab. 5.

Tabuľka 5: Poradie a množstvá látok v 1 l v Hankovom roztoku

Poradie	Reagent	Množstvo
1	NaCl	8,000 g
2	KCl	0,400 g
3	KH ₂ PO ₄	0,060 g
4	Glukóza	1,000 g
5	Na ₂ HPO ₄	0,048 g
6	MgSO ₄	0,098 g
7	CaCl ₂	0,140 g
8	Na ₂ CO ₃	0,350 g



Obrázok 10: Fotka Hankovho komerčného roztoku

4.2 Príprava vzoriek

Boli použité tri typy vzoriek biomateriálov: Al₂O₃ vo forme tabliet a peny, hydroxyapatit (HAp) vo forme tabliet.

4.2.1 Oxid hlinitý

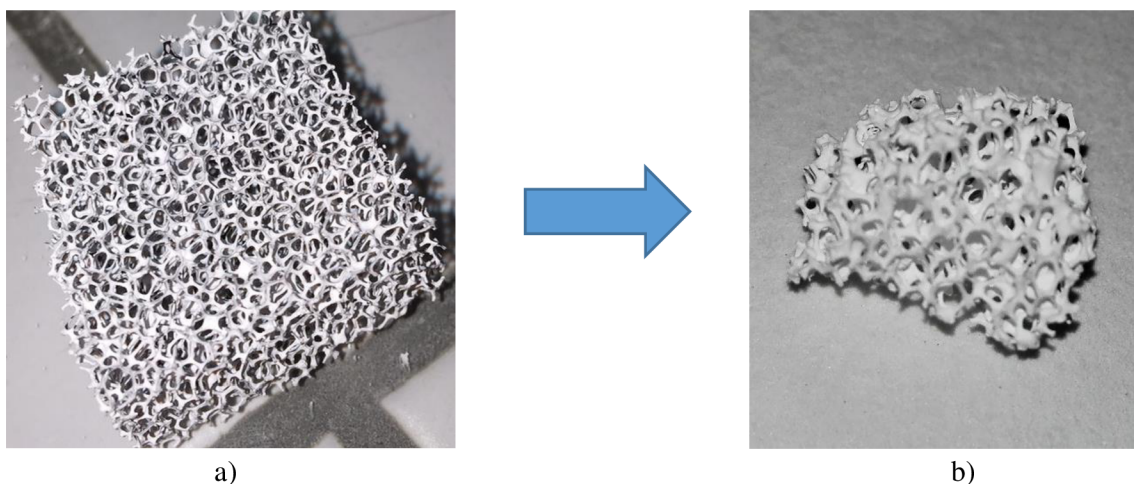
Chemické zloženie Al₂O₃ udávané výrobcom: 99,8 % Al₂O₃, 0,3 % Na₂O, 0,03 % SiO₂, 0,03% Fe₂O₃.

Tablety Al₂O₃ sa pripravili z komerčného prášku 625-10 (Nabaltec AG) pomocou laboratórneho uniaxiálneho hydraulického lisu. Do prášku sa pridala kyselina olejová ako spojivo (2 hm. %). Následne sa tablety kalcinovali pri 900°C pre odstránenie organickej zložky a ďalej sa slinuli pri 1500 °C po dobu 3 h. Brúsnym papierom sa vyleštila úplne na hladko jedna strana (SiC papier, zrnitosť 1000 µm).



Obrázok 11: Pripravená a vypálená Al₂O₃ tableta

Vzorky Al₂O₃ vo forme peny boli už predpripravené v minulosti laboratórne replikačnou metódou a boli využité pre túto prácu.



Obrázok 12: Laboratórna príprava Al₂O₃ peny a) po nanosení suspenzie na PUR penu o PPI 30 a vysušení b) po výpale

4.2.2 Hydroxyapatit

Vzorky HAp boli lisované za rovnakých podmienok ako Al₂O₃ tablety, t.j. uniaxiálne za použitia spojiva 2 hm.% kyseliny olejovej. Tablety HAp sa vypálili pri teplote 1100 °C po dobu 5 h. Brúsnym papierom sa vyleštila úplne na hladko jedna strana (SiC papier, zrnitosť 100 μm).



Obrázok 13: Pripravená a vypálená HAp tableta

4.3 Inkubácia vzoriek v SBF tekutinách

Po prípravení konkrétnych SBF a tabliet resp. pien nasledovalo inkubácia týchto vzoriek. Z rozmerov vzorky bolo treba vypočítať ich povrch a následne objem SBF potrebný na ich zmáčanie (viď príklad nižšie). Pri poréznych materiáloch by mal byť objem SBF väčší ako vypočítaný objem.[21]

$$S_a = 360,81 \text{ mm}^2$$

$$V_s = S_a/10$$

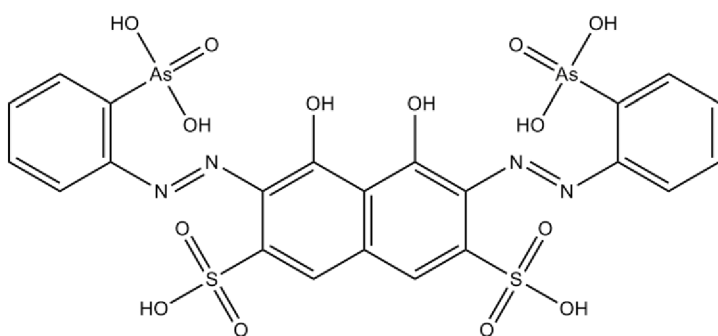
$$V_s \cong 36 \text{ ml}$$

Po vypočítaní objemu SBF sa tablety a peny vložili do plastovej nádoby (jedna vzorka na jednu nádobu). Tablety sa vložili tak aby vyleštená strana bola smerom hore. Následne sa priliať potrebný vypočítaný objem SBF. Nádoba sa uzatvorila a dala sa inkubovať pri teplote $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri manipulácii bolo treba dávať pozor, aby sa vzorky neotáčali v roztoku. Pre každú SBF sa použila každá vzorky materiálu a nechala sa inkubovať po dobu 1, 3, 7, 14 a 28 dní. Po uplynutí doby inkubácie sa tablety resp. peny vybrali z nádoby, jemne sa očistili destilovanou vodou a nechali sa vysušiť v exsíkátore tak, aby vyleštená strana tablety bola smerom nahor. Roztoky v nádobách sa uskladnili v chladničke na neskoršiu analýzu.

4.4 Spektrofotometrické stanovenie vápnika

Spektrofotometria je analytická metóda pre meranie vlastností vzorky (napr. koncentrácie látky v roztoku) na základe pohlcovania svetla rôznych vlnových dĺžok spektra. Patrí do skupiny spektrálnych optických metód založených na meraní a vyhodnocovaní absorpčných spektier. Roztok v kyvete je ožarovaný monochromatickým svetlom (vybraná oblasť elektromagnetického spektra) a svetelné žiarenie je absorbované molekulou analytu. Detektor žiarenia meria intenzitu dopadajúceho svetla (žiarivý tok) neabsorbovaného roztokom.[38]

Po vybratí vzoriek z SBF sa spektrofotometricky stanovoval vápnik. Využilo sa pri tom činidlo Arzenázo III, ktoré predstavuje metalochromné farbivo s citlivosťou na Ca^{2+} . Pripravilo sa 200 ml roztoku s koncentráciou $200 \text{ } \mu\text{mol/l}$.



Obrázok 14: Štruktúra a fotka pripraveného Arzenáza III

Koncentrácia vápnikových iónov v SBF roztokoch bola stanovená metódou kalibračnej krivky. Do kyvety sa najprv pridalo automatickou pipetou $10 \text{ } \mu\text{l}$ vzorky SBF a $1000 \text{ } \mu\text{l}$ Arzenáza III. Merala sa absorbancia na VIS fotospektrometri proti slepému pokusu pri vlnovej dĺžke 650 nm . Meranie bolo urobené 6x a pre vyhodnotenie bola z výberu odstránená najmenšia a najväčšia hodnota, zvyšné hodnoty boli spriemerované. Chyba merania je vo forme smerodajnej odchýlky.

Bola zhotovená kalibračná krivka. Pripravil sa zásobný roztok s koncentráciou 10 mmol/l. Riedením sa pripravili roztoky s koncentráciou 0,5; 1, 2, 3, 4, 5 mmol/l. Takto pripravené roztoky sa merali ako je uvedené v postupe vyššie oproti slepému pokusu.

4.5 Spektrofotometrické stanovenie fosforu

Fosforečnanové ióny boli stanovené pomocou molybdénanu amónneho, vďaka ktorému vznikli fosfomolybdénany, ktoré sa redukujú roztokom hydrochinónu a siričitanu sodného na molybdénovú modrú. Výsledná koncentrácia vo vzorkách bola opäť stanovená pomocou metódy kalibračnej krivky. Meranie bolo urobené 6x a rovnakým spôsobom ako pri stanovení vápnika, chyba merania bola vyjadrená vo forme smerodajnej odchýlky. Princíp spektrofotometrickej metódy je už popísaný v kap. 4.4.

Kalibračná krivka sa zhotovila pomocou štandardného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného s koncentráciou 25 μg fosforu v 1 ml roztoku. Z neho sa odpipetovalo do po 0,0; 0,1; 0,2 až 0,7 ml. Pridalo sa po 1 ml roztoku molybdénanu amónneho (0,13 mol/l), hydrochinónu (0,045 mol/l) a siričitanu sodného (0,16 mol/l). Následne sa roztok doplnil destilovanou vodou na objem 10 ml. Po 30 min. sa merala absorbancia pri vlnovej dĺžke 610 nm proti slepému pokusu .

Z pripravených vzoriek SBF sa odpipetovalo 0,1 ml. Pridalo sa po 1 ml roztoku molybdénanu amónneho, hydrochinónu a siričitanu sodného. Následne sa roztok doplnil vodou na objem 10 ml. Po 30 min. sa merala absorbancia pri vlnovej dĺžke 610 nm proti slepému pokusu.



Obrázok 15: Fotka pripravených roztokov kalibračného radu stanovenia fosforu po 30 min

4.6 Analýza povrchu vzoriek

Na analýzu povrchu vzoriek sa použila metóda elektrónovej mikroskopie. V 70. rokoch minulého storočia sa stala táto metóda jednou z najrozvíjajších metód pozorovania vzoriek. V súčasnosti najlepšie elektrónové mikroskopy sú schopné dosiahnuť rozlíšenie až 0,4 nm a zväčšenie 1 000 000x.

Pri tejto metóde sa využíva zväzok elektrónov s krátkou vlnovou dĺžkou, ktorý je urýchljený elektrónovým polom. Zdrojom elektrónov je elektrónová tryska, najčastejšie volfrámové vlákno. Princípom pozorovania v SEM je interakcia primárnych elektrónov s povrchom vzorky za uvoľnenia sekundárnych elektrónov, ktoré sú snímané detektorom. Detekcia sekundárnych elektrónov prináša informáciu o reliéfe vzorky s veľkým rozlíšením a so značne veľkou hĺbkou ostrosti nedosiahnuteľnú optickými mikroskopy. Keďže elektróny medzi anódou a katódou sú vodivé musia byť aj vzorky vodivé. Preto sa používa povlak vo forme uhlíka alebo zlata. Vďaka výbornej rozlišovacej schopnosti dostaneme informácie o štruktúre skúmaného materiálu.[32],[33]

Na analýzu bolo vybratých všetkých deväť vzoriek po 28 dňoch. Pred analýzou sa vzorky pozlátili, kvôli zlepšeniu vodivosti. Pracovná vzdialenosť bola nastavená na 12 mm a použilo sa 5000x, 10 000x a 20 000x zväčšenie.



Obrázok 16: Elektrónový mikroskop Zeiss EVO LS10

4.7 Rentgenová difrakčná analýza (XRD)

Princípom tejto metódy je prechod valenčných elektrónov, kedy dochádza vyrazeniu elektrónu z atómového obalu rýchlym elektrónom. Vytvorí sa diera, ktorá sa ihneď zaplní elektrónom z vyšších energetických hladín. Prebytočná energia sa uvoľní vo forme fotónu röntgenového žiarenia. Vzniknutý rozdiel energií sa zobrazí vo forme čiarového spektra.[35]

Rentgenová difrakčná analýza (XRD) je základnou metódou určovania štruktúry pevných látok, kde každá kryštalická látka má jedinečný difraktogram. Táto metóda je založená na interakcii rentgenového žiarenia s elektrónmi atómu. Vďaka pravidelnému periodickému usporiadaniu atómov v kryštalickej fáze dochádza k rozptýleniu a následnej interferencii rentgenového žiarenia. Vznikajú tak difrakčné maximá, ktorých poloha, intenzita a tvar závisí od druhu atómov a ich usporiadania v 3D priestore. Vďaka difrakčnému obrazu vieme spätne študovať kryštalické zloženie vzorky a jeho mikroštruktúru.[34]

Pomocou XRD boli analyzované pripravené vzorky na prístroji Empyrean (firma Panalytical). Bola použitá medená anóda bez monochromátoru. Na ose x sa nastavilo rozmedzie 5–90 s krokom 0,013, kde každý krok bol meraní po dobu 96 sekúnd. Zloženie bolo vyhodnotené semikvantitatívne pomocou programu Highscore, kde sa výsledky porovnali s databázami (ICOS, ICCD PDF 2).



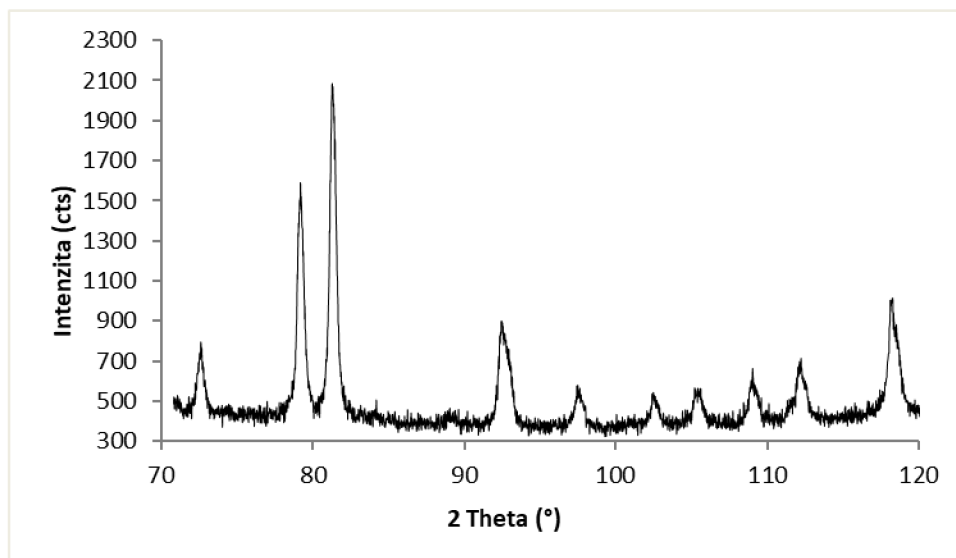
Obrázok 17: Rentgenový difraktogram Empyrean od firmy Panalytical [34]

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto kapitole sú popísané výsledky merania vápnika a fosforu v jednotlivých SBF a ich grafické znázornenie. Podľa výsledkov predbežne vieme, či biomateriál vykazuje interakciu resp. nevykazuje. Na overenie sú priložené snímky povrchu všetkých vzoriek po 28 dňoch.

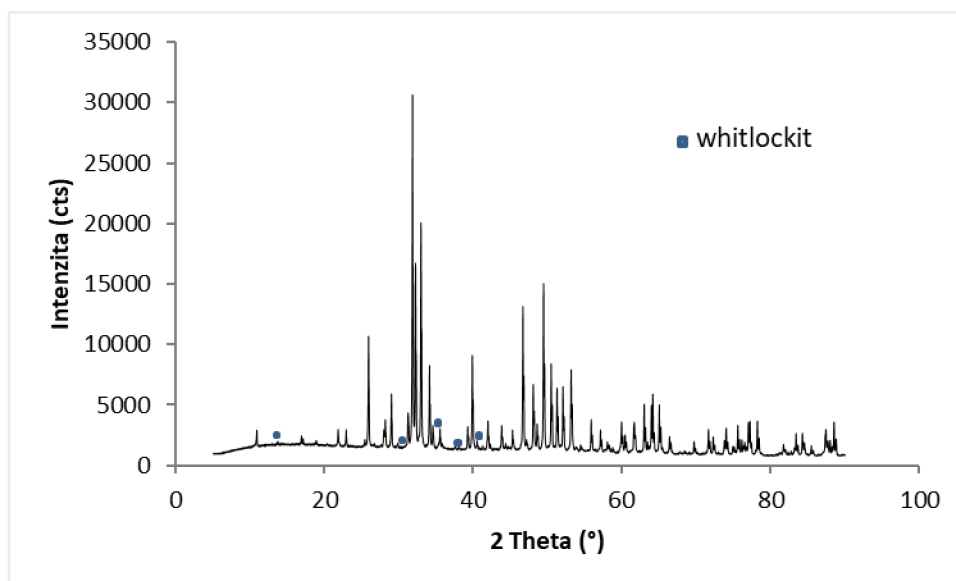
5.1 Zloženie použitých vzoriek

Pre kontrolu chemického a fázového zloženia vzoriek bola použitá metóda rentgenovej difrakcie. Na Obr. 18 je uvedená analýza tablety, peny Al_2O_3 . Analýza peny a tablety bola totožná – oxid hlinitý.



Obrázok 18: Difraktogram zloženia tablety a peny Al_2O_3

Na Obr. 19 je uvedený difraktogram tablety HAp, kde sa vytvorila nová fáza – whitlockit. Fázové zloženie je uvedené v Tab. 6.

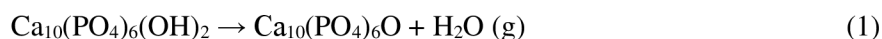


Obrázok 19: Difraktogram zloženia tablety HAp

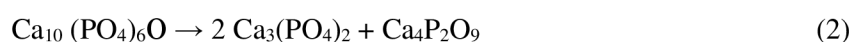
Tabuľka 6: Výsledky semikvantitatívnej analýzy HAp

Fáza	hm. %
Hydroxyapatit – (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂)	92
Whitlockit – Ca ₉ (PO ₄) ₆	8

Semikvantitatívna analýza preukázala prítomnosť whitlockitovej fázy (Tab. 6). Pravdepodobne vznikla dehydroxyláciou hydroxyapatitu na oxoapatit medzi teplotami 900 °C až 1200 °C podľa rovnice:



Následným zahriatím nad 1450 °C dochádza k tepelnému rozkladu oxoapatitu na trikalciom fosfáty (TCP) podľa rovnice:



K pravdepodobnému rozkladu oxoapatitu na TCP prišlo už pri nižšej teplote, vzhľadom na teplotu výpalu vzorky pri 1100 °C, čo bolo sprevádzané vytvorením whitlockitovej fázy.[37]

5.2 Syntetická telesná tekutina c-SBF (podľa Kokuba)

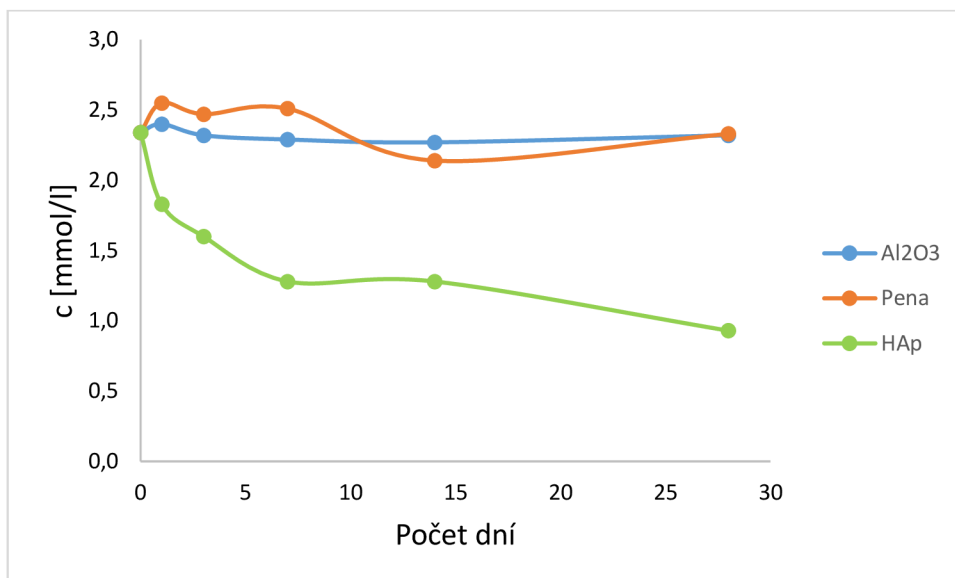
Do pripravenej SBF sa vložili vzorky, Al₂O₃ vo forme tabliet a peny a HAp vo forme tabliet. Predpokladaná pozitívna interakcia je najmä s HAp, ktorý je čiastočne bioaktívny materiál narozdiel od Al₂O₃, ktorý vykazuje bioinertné vlastnosti. Avšak nukleácia môže nastať aj pri bioinertných materiáloch.[22]

5.2.1 Stanovenie vápnika

Teoretická hodnota koncentrácie Ca²⁺ je 2,5 mmol/l. Experimentálne nameraná hodnota pripravenej SBF bola 2,34 mmol/l. Zmeny koncentrácie Ca²⁺ s rastúcim časom inkubácie sú znázornené v Tab. 7 a na Obr. 20.

Tabuľka 7: Namerané hodnoty koncentrácií vápnika pre c-SBF so smerodajnou odchýlkou ± 0,01 mmol/l

Počet dní	Al ₂ O ₃	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	2,34	2,34	2,34
1	2,40	2,55	1,83
3	2,32	2,47	1,60
7	2,29	2,51	1,28
14	2,27	2,14	1,28
28	2,32	2,33	0,93



Obrázok 20: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie vápnika počas doby inkubácie

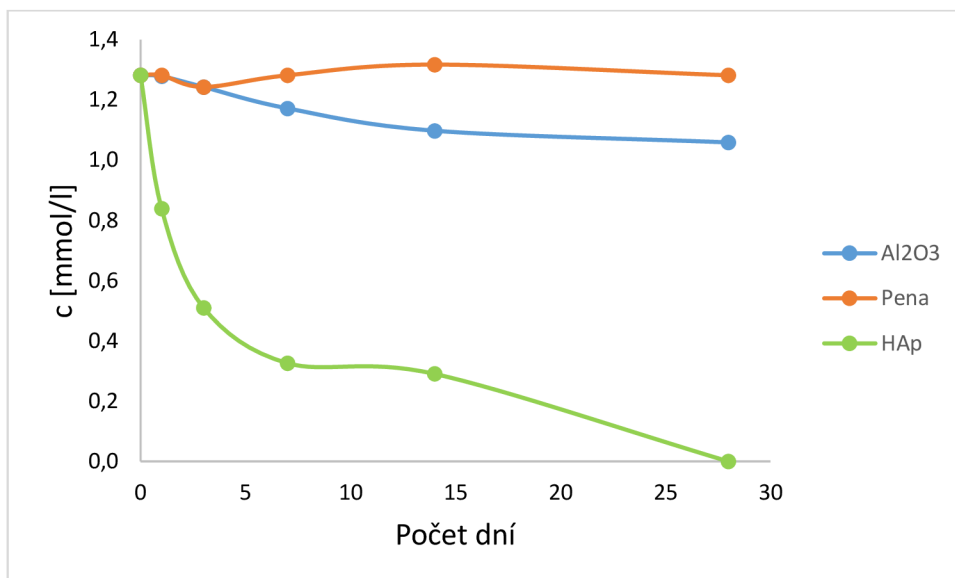
Podľa nameraných výsledkov a grafického znázornenia sa predpoklad potvrdil. Pre vzorky HAp je výrazný úbytok Ca^{2+} hneď v prvých dňoch a postupne klesá. Čím sa potvrdzuje interakcia s SBF a vytvorenie apatitovej vrstvy na povrchu tablety, ktorá bude dokázaná snímkou povrchu. Pre Al_2O_3 je zmena minimálna. Vzhľadom na chybu merania môžeme povedať, že takmer žiadna zmena nenastala. Pri pene bola zaznamenaná malá výchylka po 14 dňoch, avšak po 28 dňoch je koncentrácia takmer rovnaká ako koncentrácia Ca^{2+} čistej SBF.

5.2.2 Stanovenie fosforu

V pripravenom SBF roztoku sa namerala koncentrácia PO_4^{3-} s hodnotou 1,28 mmol/l. Hodnota je o trochu vyššia ako u teoretickej hodnoty (1,0 mmol/l). Zmeny koncentrácie sú znázornené v Tab. 8 a na Obr. 21.

Tabuľka 8: Namerané hodnoty koncentrácií fosforu pre c-SBF so smerodajnou odchýlkou $\pm 0,01$

Počet dní	Al ₂ O ₃	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	1,28	1,28	1,28
1	1,28	1,28	0,84
3	1,24	1,24	0,51
7	1,17	1,28	0,33
14	1,10	1,32	0,29
28	1,06	1,28	0,00

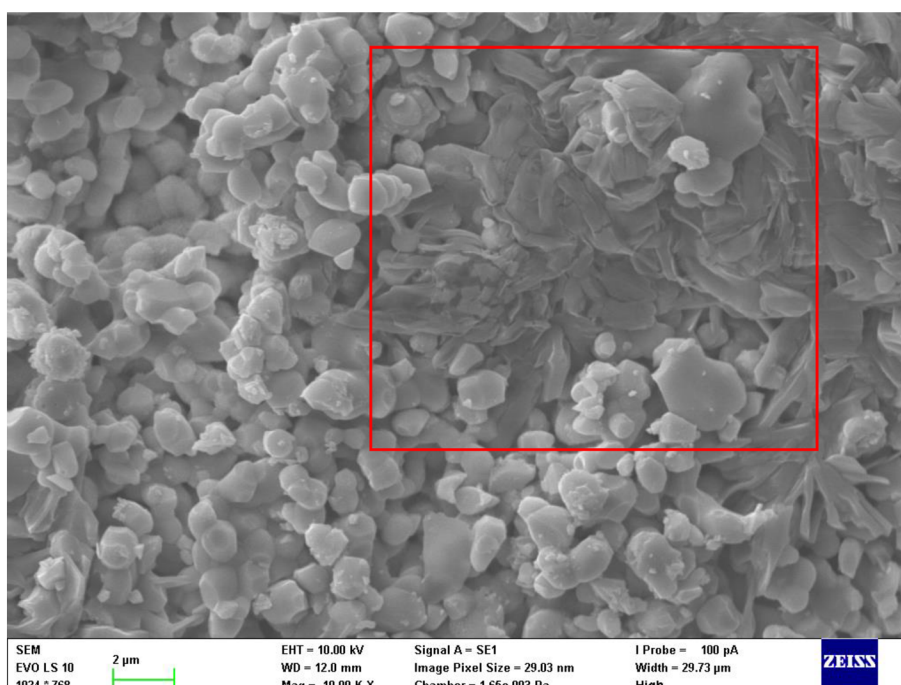


Obrázok 21: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie fosforu počas doby inkubácie

Graf (Obr. 21) vykazuje podobný priebeh hodnôt ako pri vápniku. Pri HAp je značný pokles koncentrácie už po prvých dňoch a po 28 dňoch klesá na nulovú hodnotu. Hodnoty Al₂O₃ ukazujú mierny pokles. Pri pene možno pozorovať výchylku po troch dňoch, ale po 28 dňoch je koncentrácia PO₄³⁻ rovnaká. Z nameraných hodnôt sa dá predpokladať, tak ako pri hodnotách Ca²⁺, že iba HAp reagoval s c-SBF za vytvorenia apatitovej vrstvy.

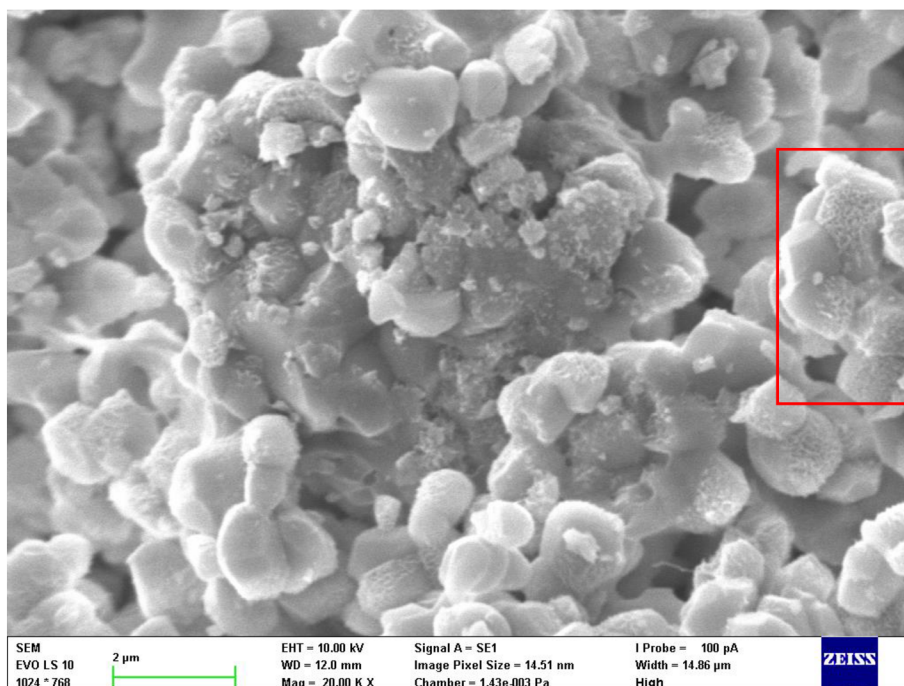
5.2.3 Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do c-SBF

Pomocou SEM sa vytvorili snímky na pozorovanie zmien povrchu tabliet a peny.



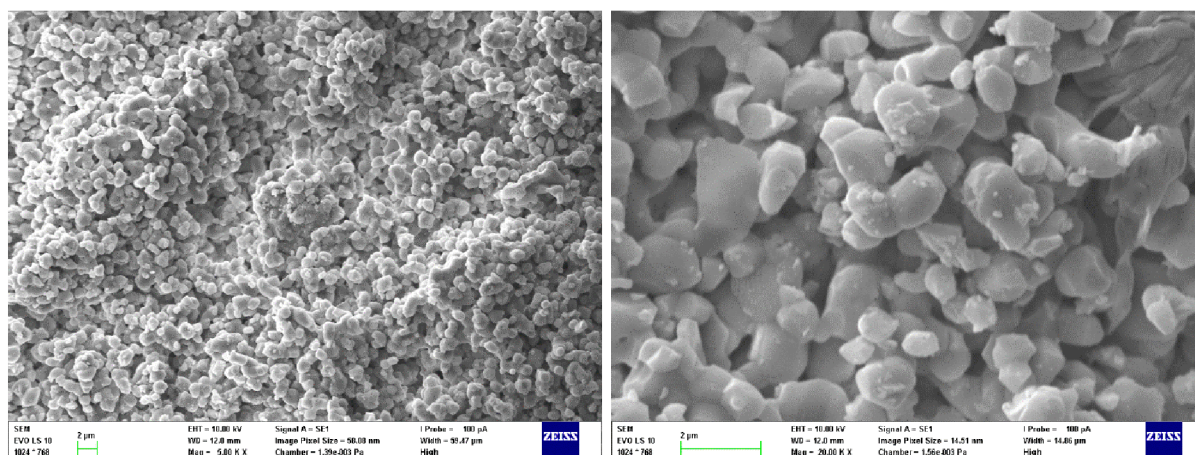
Obrázok 22: Snímka HAp zo SEM popisujúca vznik whitlockitovej fáze pri 10 000x zväčšení

Obr. 22 dokazuje vytvorenie whitlockitovej fáze, ktorej prítomnosť bola potvrdená aj v semikvantitatívnej analýze v Tab. 6.



Obrázok 23: Snímka povrchu HAp zo SEM pri 20 000x zväčšení

Vznik lamelovitých útvarov možno pozorovať na Obr. 23, ktoré sú typické pri vytvorení apatitových vrstiev (viď Obr. 8).

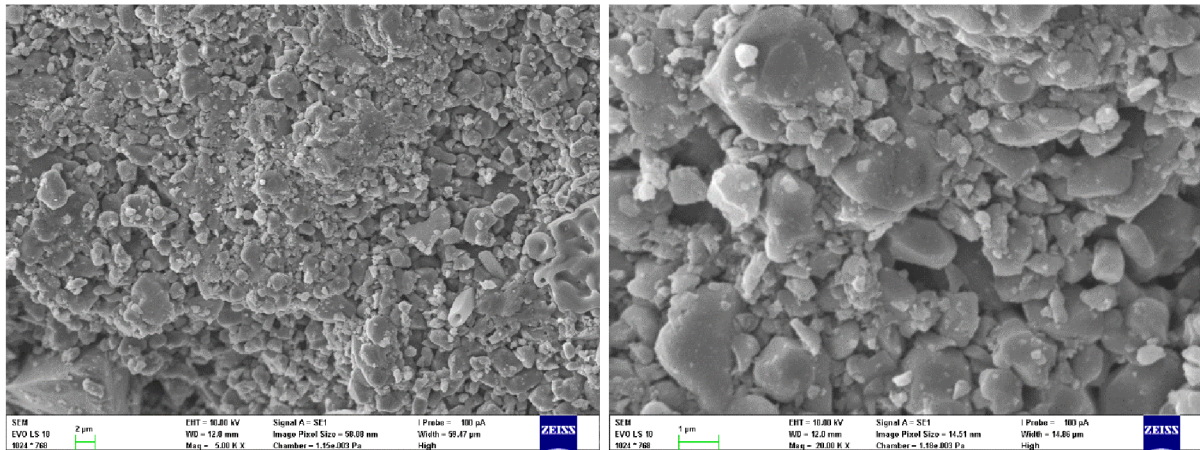


a)

b)

Obrázok 24: Snímky HAp zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x

Na Obr. 24 možno vidieť vytvorenie apatitovej vrstvy na povrchu tablety, čo zodpovedá výsledkom nameraných hodnôt vápnika a fosforu (Tab. 8)

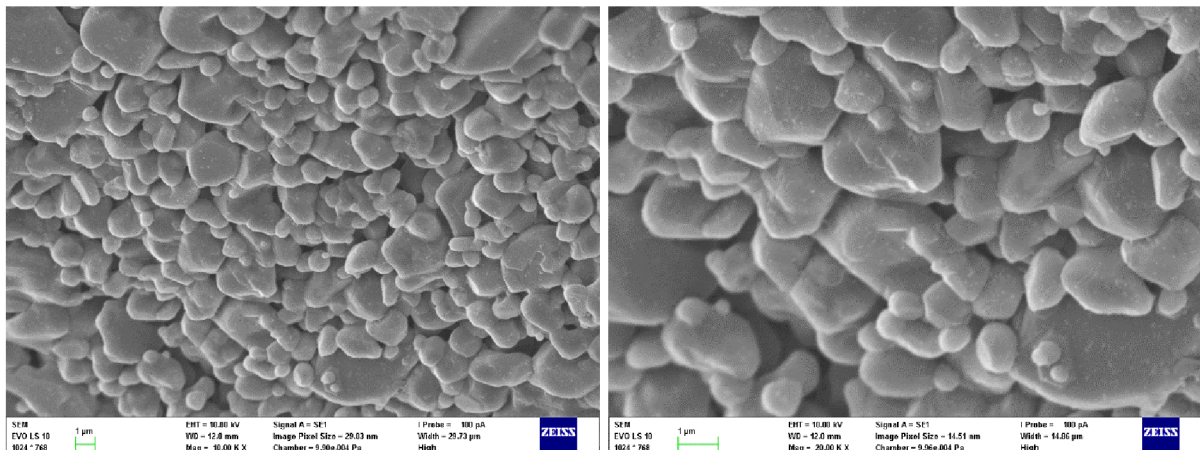


a)

b)

Obrázok 25: Snímky povrchu Al_2O_3 tablety zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x

Z nameraných hodnôt vápnika a fosforu (Tab. 8 a Obr. 21.), bolo možno predpokladať, že k vytvoreniu apatitovej vrstvy u Al_2O_3 nedošlo, čo dokazujú aj snímky na Obr. 25, kde nie je vidieť vznik žiadnych iných útvarov.

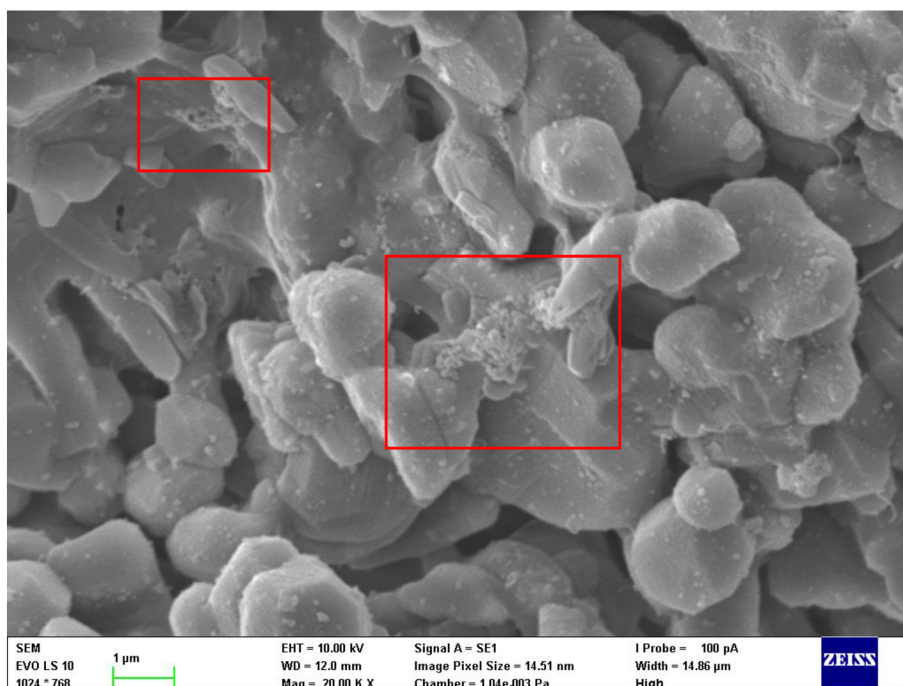


a)

b)

Obrázok 26: Snímky povrchu peny zo SEM pri zväčšení a) 10 000x b) 20 000x

Na Obr. 26 nie je vidieť u Al_2O_3 peny vytvorenie žiadnych nových útvarov, či vytvorenia apatitovej vrstvy. Pri bližšom pozorovaní lomovej plochy (Obr. 27) boli nájdené nové útvary.



Obrázok 27: Snímka lomovej plochy peny zo SEM pri 20 000x zväčšení

Pri nasnímaní lomovej plochy peny, možno pozorovať na Obr. 27 vznik nových útvarov vo veľmi malom množstve. K výraznejším zmenám neprišlo, čo potvrdzujú aj výsledky stanovenia fosforu a vápniku (Tab. 21 a Obr. 8.).

5.3 Hankov komerčný roztok

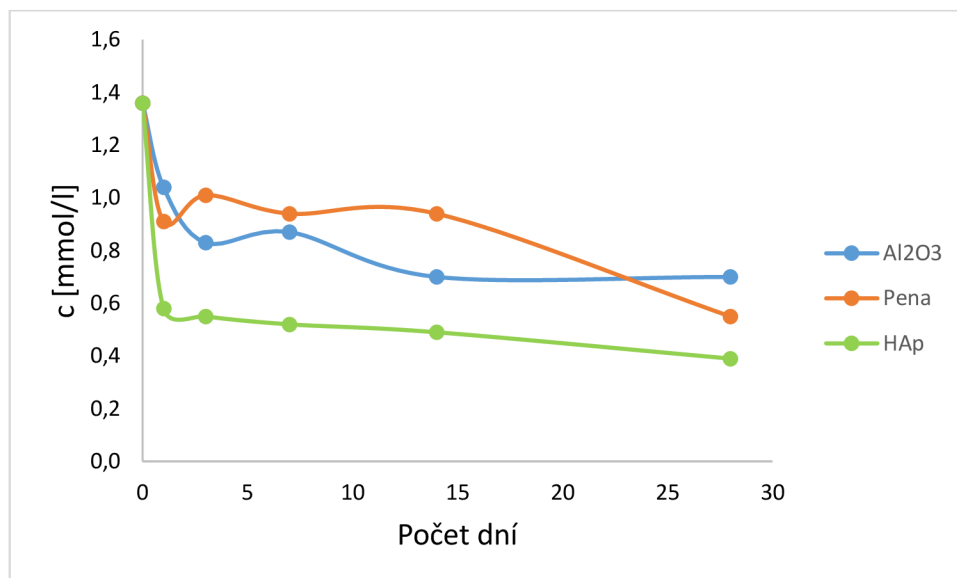
Tak isto ako pri c-SBF sa do roztoku vložili vzorky Al_2O_3 vo forme peny a tabliet a HAp ve formě tablety. Predpokladaná interakcia je podobná ako pri c-SBF. Očakávaná interakcia je s HAp, u Al_2O_3 vo forme tabliet i peny sa nepredpokladá vytvorenie apatitovej vrstvy, alebo minimálnej tak ako bolo pri roztoku c-SBF.

5.3.1 Stanovenie vápnika

Pri roztoku bola nameraná koncentrácia Ca^{2+} s hodnotou 1,36 mmol/l. Hodnotu, ktorú uvádza výrobca je 1,3 mmol/l. Zmeny, ktoré nastali počas 28 dní je vidieť v Tab. 9 a na Obr. 28.

Tabuľka 9: Namerané hodnoty koncentrácií vápnika pre Hankov komerčný roztok so smerodajnou odchýlkou $\pm 0,01$

Počet dní	Al_2O_3	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	1,36	1,36	1,36
1	1,04	0,91	0,58
3	0,83	1,01	0,55
7	0,87	0,94	0,52
14	0,70	0,94	0,49
28	0,70	0,55	0,39



Obrázok 28: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie vápnika počas doby inkubácie

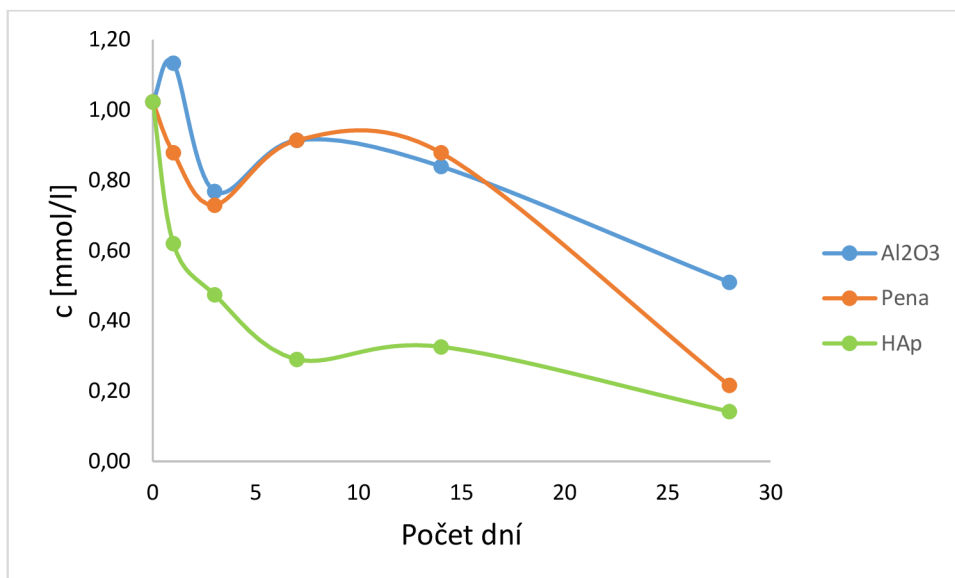
Pri všetkých vzorkách je zaznamenaný pokles vápnika od prvého dňa. Pri Al₂O₃ vo forme tabliet aj peny má kolísavý priebeh, zatiaľ čo pri HAp po prvom dni vápnik prudko klesol a ďalšie dni postupne, takmer lineárne klesal. Hodnoty po 28 dňoch u všetkých vzoriek sa výrazne líšia od hodnoty čistého roztoku, preto sa na nich predpokladá vytvorenie apatitovej vrstvy. Najvýraznejšia by mala byť podľa Obr. 28 pri HAp.

5.3.2 Stanovenie fosforu

Koncentrácia PO₄³⁻ v čistom roztoku bola 1,02 mmol/l, pričom hodnota daná výrobcom je 0,74 mmol/l.

Tabuľka 10: Namerané hodnoty koncentrácií fosforu pre Hankov komerčný roztok so smerodajnou odchýlkou ± 0,01

Počet dní	Al ₂ O ₃	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	1,02	1,02	1,02
1	1,13	0,88	0,62
3	0,77	0,73	0,47
7	0,91	0,91	0,29
14	0,84	0,88	0,33
28	0,51	0,22	0,14

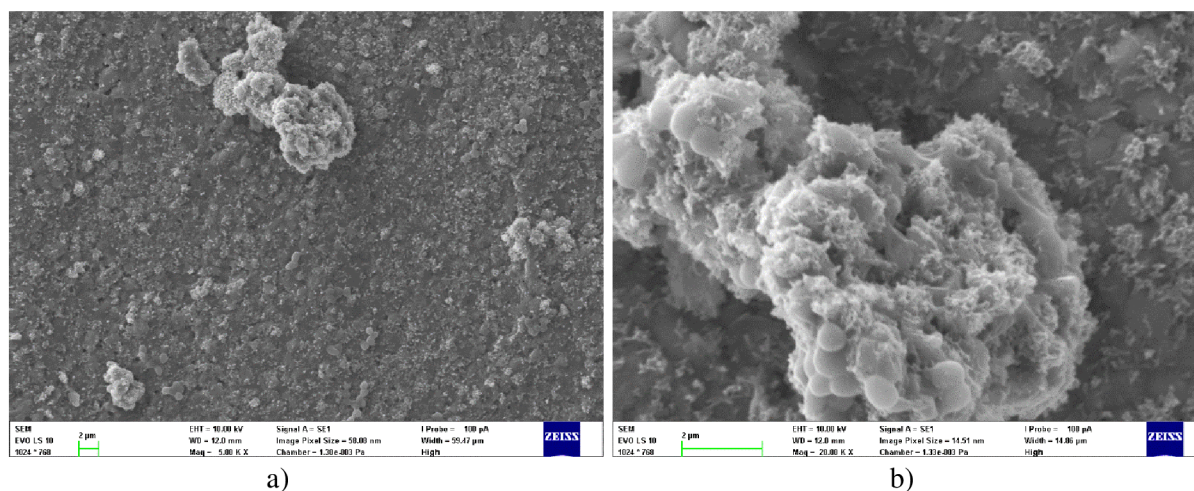


Obrázok 29: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie fosforu počas doby inkubácie

Z grafu na Obr. 29 je vidieť kolísavý priebeh u všetkých vzoriek. Tak isto ako pri vápniku, najvýraznejší je pri Al₂O₃ vo forme tabliet aj peny. Koncentrácia fosforu u Al₂O₃ vo forme tabliet po prvom dni zaznamenala nárast oproti ostatným vzorkám. Pri HAp je pokles od prvého do siedmeho dňa najvýraznejší, pričom pri ostatných vzorkách je pokles najvýraznejší po 14 dňoch. Po 28 dňoch sú výsledky totožné s výsledkami zmeny vápniku, kedy najväčší pokles zaznamenal HAp a následne pena a Al₂O₃ vo forme tabliet.

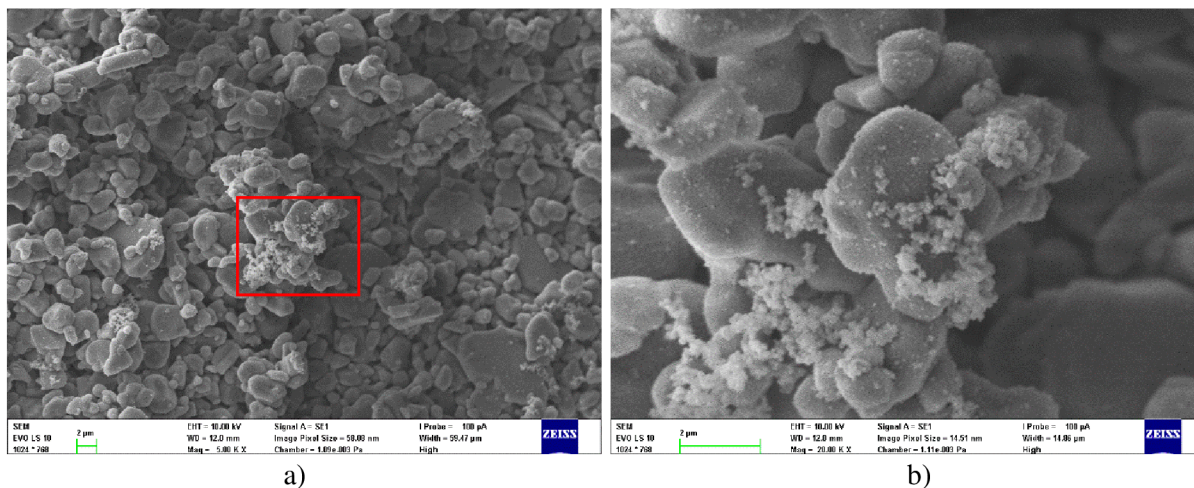
5.3.3 Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do Hankovho roztoku

Pomocou SEM analýzy sa študoval povrch tabliet a peny, kde možno pozorovať vznik nových útvarov. Z hľadiska výsledkov (Tab. 9 a Obr. 29) možno usúdiť, že prišlo k tvorbe apatitov.



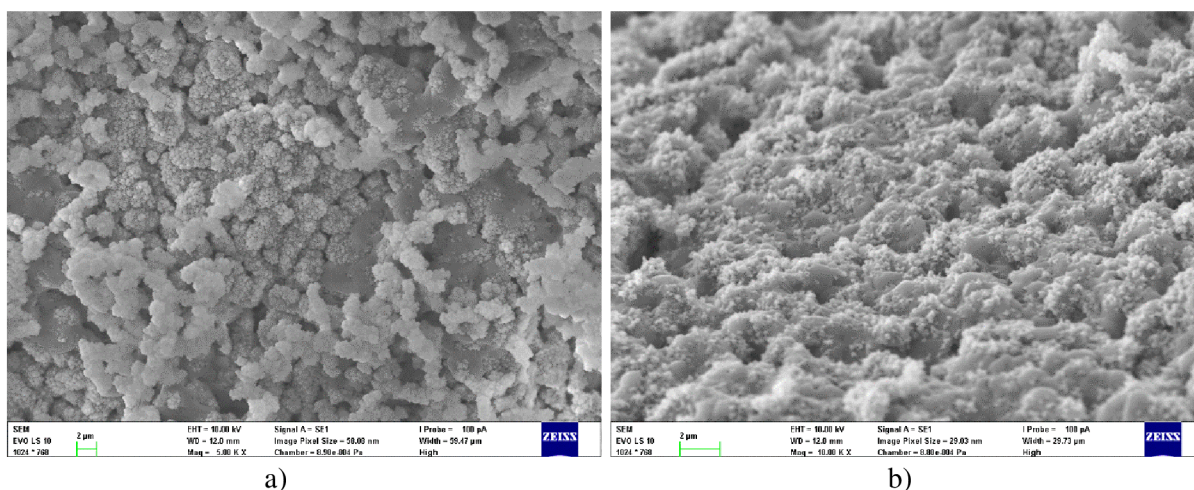
Obrázok 30: Snímky povrchu HAp zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x

Ako naznačovali výsledky poklesu vápnika a fosforu (Tab. 10 a Obr. 29), tak na Obr. 30 možno vidieť vznik nových útvarov a jemnej vrstvičky apatitu po celej ploche.



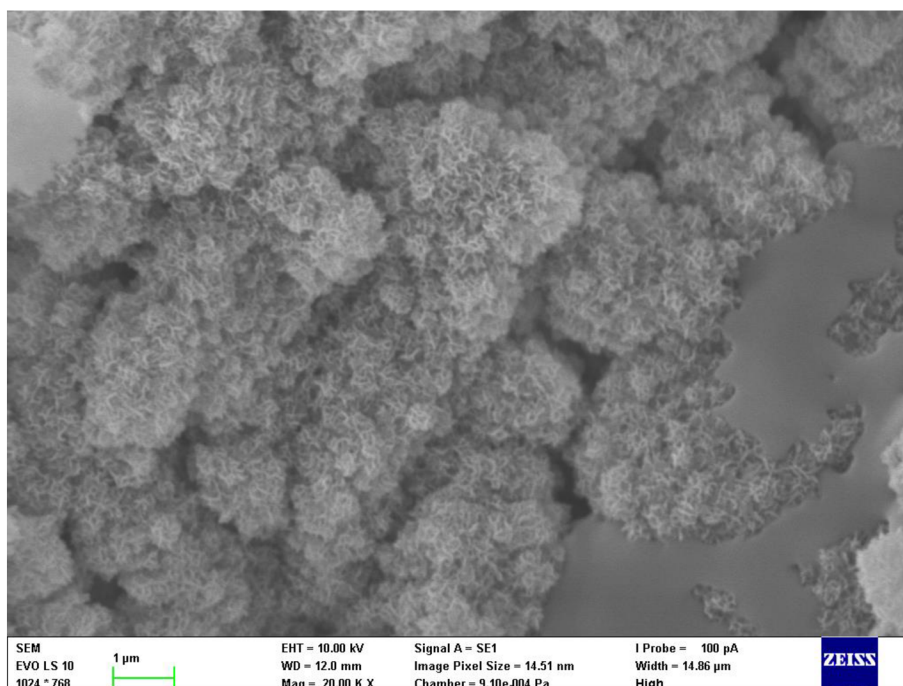
Obrázok 31: Snímky povrchu Al_2O_3 tablety zo SEM pri zväčšení: a) 5000x b) 20 000x

Zo snímok na Obr. 31 tiež možno zaznamenať vytvorenie jemnej vrstvičky na povrchu tablety Al_2O_3 . Avšak aj napriek výraznejšiemu poklesu vápnika a fosforu narozdiel od poklesu pri c-SBF, k vytvoreniu súvislej apatitovej vrstvy neprišlo.



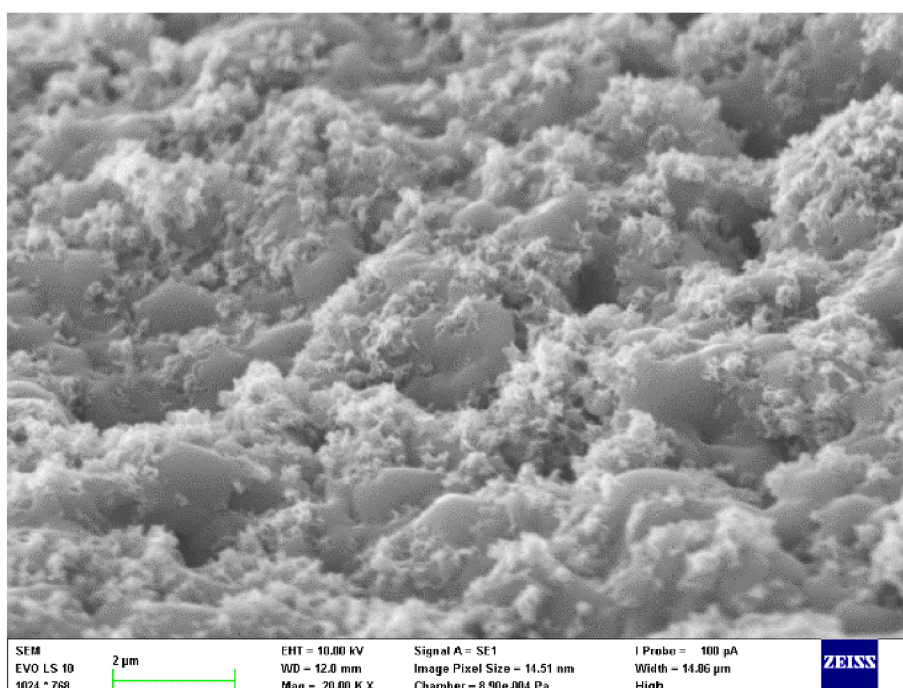
Obrázok 32: Snímky povrchu peny zo SEM pri zväčšení: a) 5 000x b) 20 000x

Snímky na Obr. 32 (Al_2O_3 peny) potvrdili predpoklad z poklesu vápnika a fosforu z výsledkov Tab. 10 a Obr. 29, že bude vytvorená najvýraznejšia vrstva apatitov. Vrstva sa vytvorila po celom povrchu peny. Možno vidieť rôzne útvary a podoby apatitov.



Obrázok 33: Snímka povrchu peny zo SEM popisujúca vznik apatitov pri 20 000x zväčšení

Na Obr. 33 je vidieť detailne vzniknutú vrstvu apatitov lamelovitého tvaru, ktoré sme videli aj v menšom množstve pri HAp v c-SBF, čo zodpovedá literatúre (vid'. Obr. 8). Povrch peny je prerastený tak, že nie je vidieť jej pôvodný povrch.



Obrázok 34: Snímka povrchu peny zo SEM popisujúca vznik vrstvičky pri 20 000x zväčšení

Na Obr. 34 možno detailne vidieť vznik iných ako lamelových štruktúr apatitu. Vznikla jemná vrstvička, ktorá kryje časť povrchu peny.

5.4 Syntetická telesná tekutina c-SBF bez vápnika (blank)

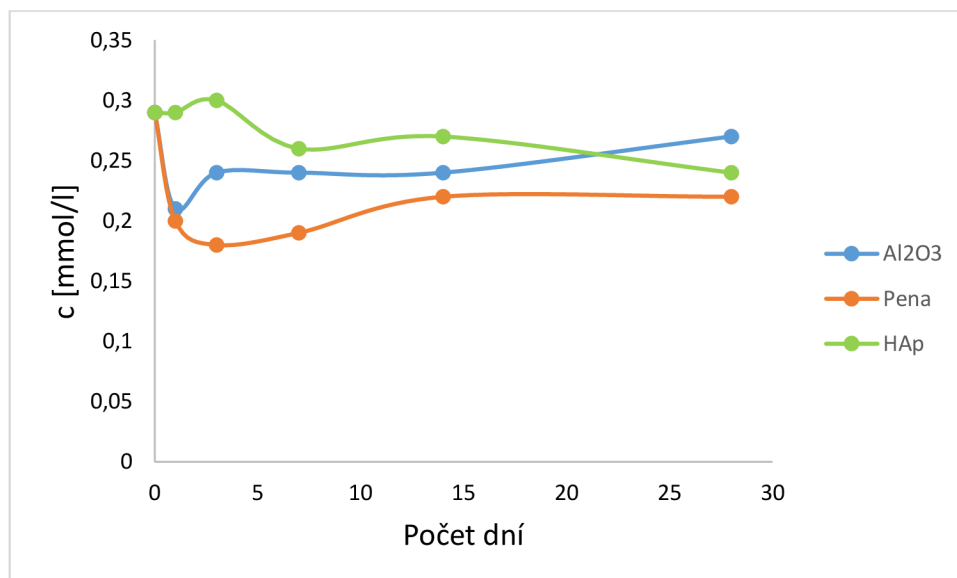
Pre porovnanie boli vzorky inkubované v tekutine bez vápenatých iónov, kde sa nepredpokladá interakcia a vznik vápenatých apatitov na povrchu vzoriek materiálov.

5.4.1 Meranie vápnika

Aj napriek tomu, že neboli do roztoku pridávané vápenaté látky, namerali sme koncentráciu Ca^{2+} s hodnotou 0,29 mmol/l, čo mohlo byť spôsobené nižšou čistotou chemikálií alebo kontamináciou pri príprave.

Tabuľka 11: Namerané hodnoty koncentrácií vápnika pre c-SBF bez vápnika so smerodajnou odchýlkou $\pm 0,01$

Počet dní	Al ₂ O ₃	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	0,29	0,29	0,29
1	0,21	0,20	0,29
3	0,24	0,18	0,30
7	0,24	0,19	0,26
14	0,24	0,22	0,27
28	0,27	0,22	0,24



Obrázok 35: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie vápnika počas doby inkubácie

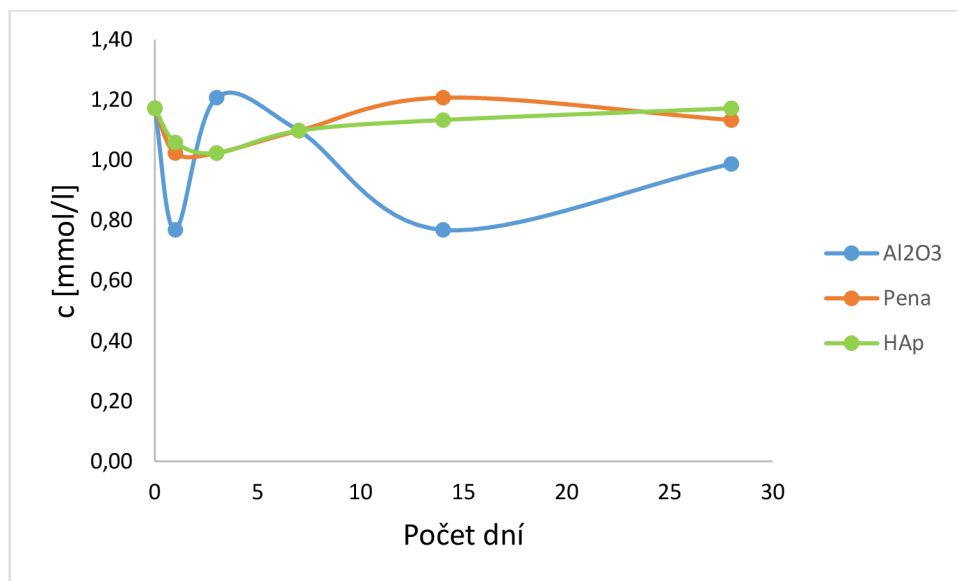
Po prvých troch dňoch môžeme pozorovať na grafe (Obr. 35) náhly pokles pri pene, pričom pri ostatných vzorkách je mierny nárast. Všetky vzorky majú mierne kolísavú tendenciu, avšak k výrazným zmenám po 28 dňoch neprišlo.

5.4.2 Meranie fosforu

Pripravená čistá SBF obsahovala 1,17 mmol/l PO_4^{3-} , pričom tabuľková hodnota je 1,0 mmol/l.

Tabuľka 12: Namerané hodnoty koncentrácií fosforu pre c-SBF bez vápnika so smerodajnou odchýlkou $\pm 0,01$

Počet dní	Al ₂ O ₃	Pena	HAp
	c (mmol/l)		
0	1,17	1,17	1,17
1	0,77	1,02	1,06
3	1,21	1,02	1,02
7	1,10	1,10	1,10
14	0,77	1,21	1,13
28	0,99	1,13	1,17

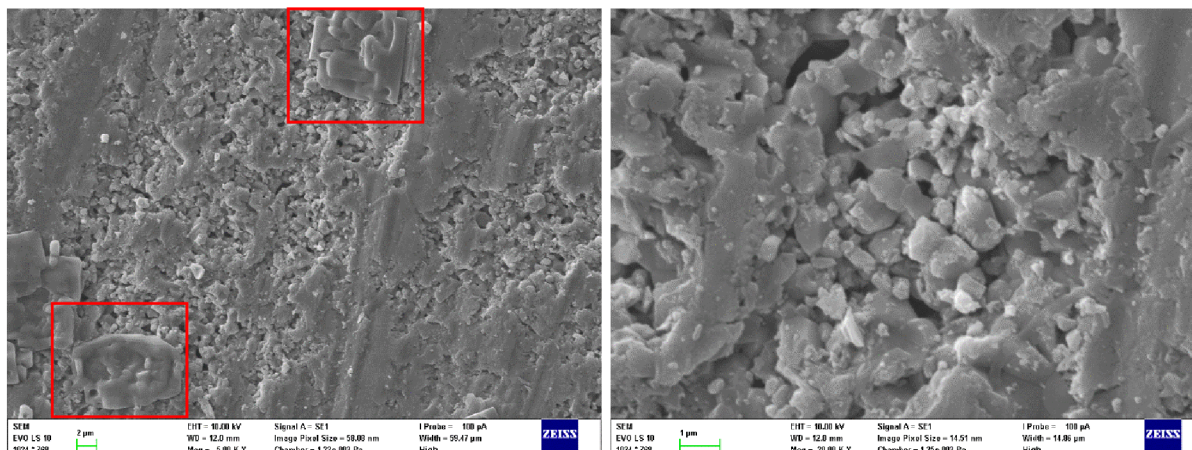


Obrázok 36: Grafické znázornenie zmeny koncentrácie fosforu počas doby inkubácie

Z grafu na Obr. 36 je vidieť kolísavý priebeh u Al₂O₃. Po 28 dňoch koncentrácia mierne klesla. U peny a HAp prvé dni je možno zaznamenať minimálny pokles, avšak po 28 dňoch je koncentrácia takmer nezmenená.

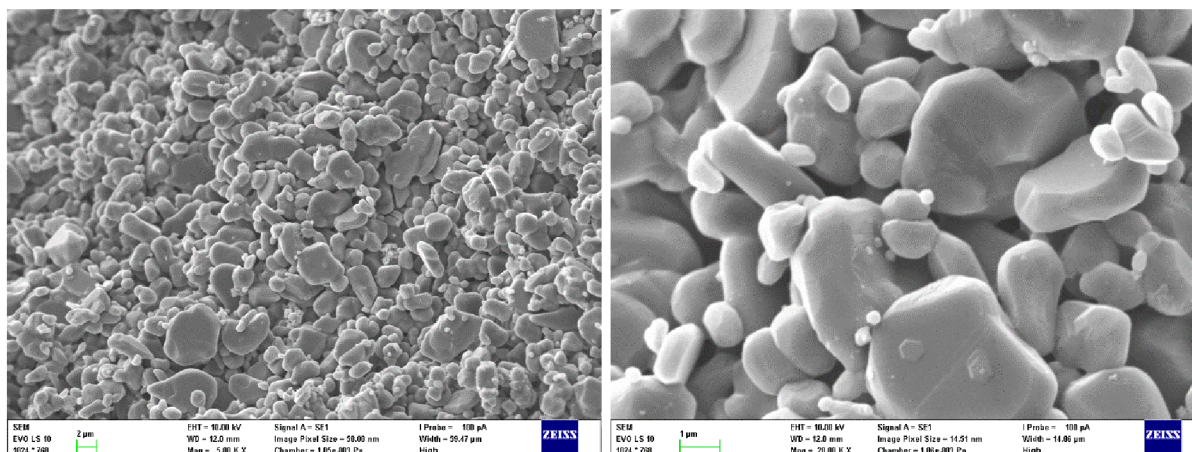
5.4.3 Pozorovanie zmien povrchu vzoriek ponorených do c-SBF bez vápnika (blank)

Pomocou SEM analýzy sa vytvorili snímky na pozorovanie zmien povrchu tabliet a peny. Podľa výsledkov stanovenia vápnika a fosforu sa neočakáva tvorba apatitov, alebo len vo veľmi malom množstve tak ako bolo spomenuté kap. 5.4.



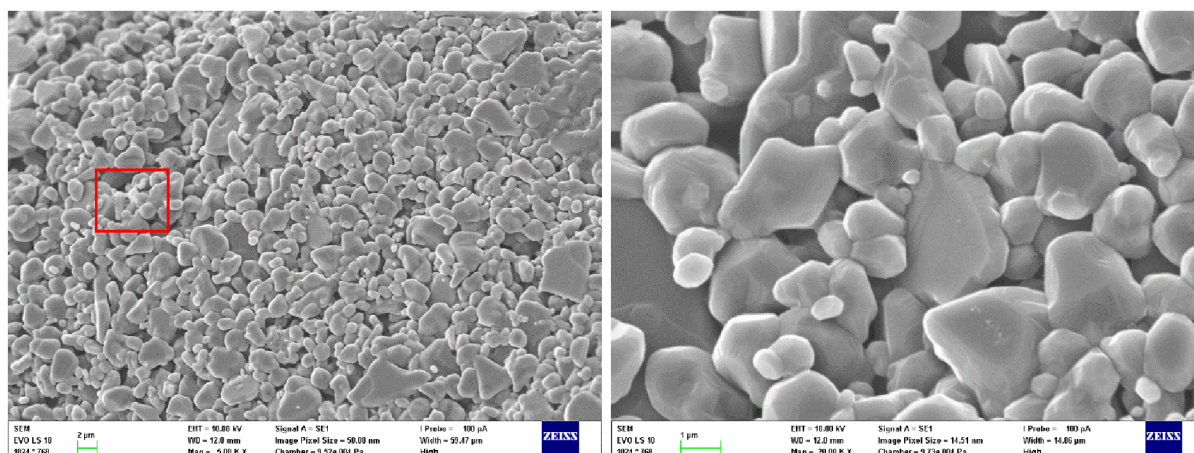
a) b)
Obrázok 37: Snímky HAp zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x

Na povrchu HAp podľa Obr. 37 nevznikli žiadne apatitové vrstvy a novovytvorené útvary, čo potvrdzuje aj meranie vápnika a fosforu. Útvary, ktoré sú vidieť na povrchu na Obr. 37 a je vykryštalizovaná soľ, ktorá vznikla pravdepodobne zlým opláchnutím vzorky.

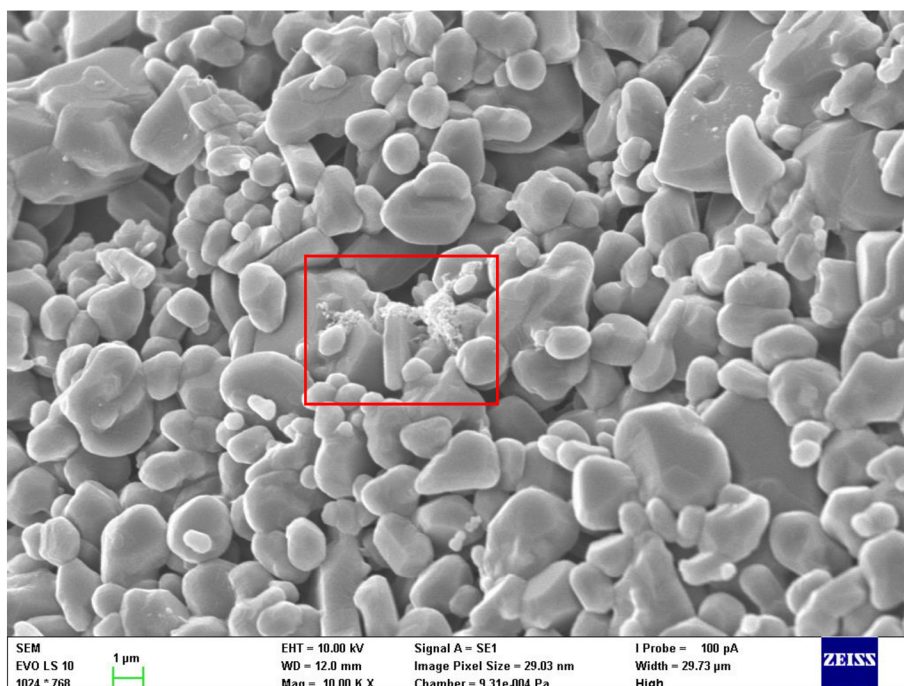


a) b)
Obrázok 38: Snímky Al₂O₃ tablety vytvorené zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x

Tak ako pri HAp, tak ani na snímkach povrchu Al₂O₃ vzorky na Obr. 38 nie je vidieť vznik nových štruktúr a potvrdzuje výsledky stanovenia vápnika a fosforu (Tab.12 a Obr. 36)



a) b)
Obrázok 39: Snímky peny vytvorené zo SEM pri zväčšení a) 5000x b) 20 000x



Obrázok 40: Snímka peny zo SEM pri 10 000x zväčšení

Na Obr. 39 je vidieť, že povrch peny zostal nezmení. Je tam naznačená malá novovzniknutá vrstva, ktorá na iných miestach nebola. Dá sa preto konštatovať, že k tvorbe apatitovej vrstvy neprišlo a k vytvoreniu inej štruktúry (Obr. 40) bolo ojedinelé.

5.5 Syntetická telesná tekutina Tas-SBF

Tento roztok sa nepodarilo pripraviť, preto sa na experiment nakoniec nepoužil. Po pridaní tris, sa roztok zakalil, čo je nežiadúce. Pri stálom miešaní a po pridaní malého množstva vody a HCl sa neskôr vyčírnil. Avšak po vychladnutí nastala precipitácia a na dne nádoby bolo vidieť kal. Po tejto skúsenosti bol upravený postup. Od začiatku sa roztok zohrial a temperoval pri teplote $36,5 \pm 1,5$ °C. Namiesto 15 ml HCl sa pridalo 35 ml. Tým sa výrazne znížila hodnota pH z 6,10 na 2,21. Napriek tomu po vychladnutí nastala precipitácia.

6 ZÁVER

Cieľom práce bolo štúdium interakcie pripravených simulovaných telesných tekutín s biokeramickými materiálmi. Pozoroval sa vznik novej apatitovej vrstvy na povrchu vzoriek a koncentrácie vybraných iónov v syntetických telesných tekutinách. Práca zahŕňovala prípravu viacerých typov SBF a vzoriek biomateriálov.

Na experiment boli použité tri vzorky biomateriálov. Pripravil sa bioinertný oxid hlinitý vo forme peny a tabliet a bioaktívny hydroxyapatit vo forme tabliet. XRD analýza HAp tabliet po slinutí preukázala prítomnosť fázy whitlockitu, ktorú bolo možné vidieť aj na snímke zo SEM analýzy.

Boli synteticky pripravené dva roztoky c-SBF, c-SBF bez vápnika a použil sa komerčný Hankov roztok. Pripravený bol aj Tas-SBF roztok, ktorý precipitoval a aj po úprave postupu nebol použiteľný na experiment. Upravené vzorky biomateriálov sa vložili do pripravených roztokov SBF a nechali sa vyvíjať po dobu 1, 3, 7, 14 a 28 dní v inkubátore pri približne 37 °C. Po uplynutí inkubačnej doby sa spektrofotometricky stanovoval vápnik a fosfor v roztokoch. Pozoroval sa ich úbytok, prípadne nárast. Hodnoty vápnika a fosforu u čistých synteticky pripravených roztokoch sa s malou odchýlkou rovnali tabuľkovým hodnotám.

Z nameraných hodnôt sa dalo predpokladať, či na vzorke vznikla alebo nevznikla nová vrstva apatitu. Na overenie sa použila SEM analýza vzoriek po 28 dňoch, kde na vytvorených snímkach bolo jasne vidieť vznik nových vrstiev a štruktúr.

Pri c-SBF bol predpoklad interakcie a vzniku apatitov iba pri HAp, ktorý vykazuje bioaktívne vlastnosti. Z nameraných hodnôt vápnika a fosforu a snímkov sa tento predpoklad potvrdil, aj keď pri pene bolo miestami vidieť vznik nových štruktúr, ale súvislá vrstva sa nevytvorila. Na snímkach HAp sa vytvorila pravdepodobne hustá vrstva apatitov.

Podobný priebeh sa predpokladal aj pri Hankovom roztoku, kde najväčší pokles vápnika a fosforu mala vzorka HAp. Napriek tomu najvýraznejšia vrstva apatitov sa vytvorila na pene, kde bolo vidieť husté lamelovité útvary či jemná vrstvička. Na povrchu HAp tablety vznikli len malé útvary apatitu a jemná vrstva. Podobná vrstva apatitu sa nachádzala aj na vzorke tablety Al₂O₃, ale výraznejšie povrch nezaberala.

Na porovnanie bol pripravený roztok c-SBF bez vápnika, pri ktorom vzhľadom na absenciu vápnika sa nepredpokladal výskyt apatitov ani u jednej vzorky. Pri meraní vápnika čistého roztoku sa však prítomnosť vápenatých iónov potvrdila, ale len vo veľmi malom množstve. Výsledky stanovenia vápnika a fosforu naznačovali možný výskyt apatitov, najmä u Al₂O₃ tablety, kde priebeh bol výrazne kolísavý. Avšak pri pozorovaní povrchu u žiadnej vzorky biomateriálu sa nezaznamenal vznik novej vrstvy a štruktúr.

Týmto experimentom bola preukázaná interakcia biomateriálov so simulovanými telesnými tekutinami vytvorením novej vrstvy vo forme apatitov. Potvrdilo sa, že aj tzv. bioinertné materiály istým spôsobom reagujú. Oxid hlinitý vo forme poréznej peny preukázal vyššiu reaktivitu so simulovanými telesnými tekutinami ako vo forme neporéznej tablety.

Na to aby materiál bol vhodný pre tkanivové inžinierstvo, musí prejsť viacerými testami, keďže v SBF zložení chýbajú určité látky obsiahnuté v ľudskom tele (napr. hormóny). Preto testovanie in vitro pomocou simulovaných telesných tekutín nie je konečné.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CAD – počítačová podpora návrhu

CSD – dihydrát síranu vápenatého

CSH – hydrát síranu vápenatého

DCPD – dihydrát dikalcium fosfátu

HA/HAp – hydroxyapatit

HCA – karbonátovaná forma hydroxyapatitu

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínetsulfónová

PCL – polykaprolaktón

PGA – kyselina polyglykolová

PLA – kyselina polymliečna

PLGA – kopolymér kyseliny polymliečnej

PMMA – polymetylmetakrylát

SBF – simulovaná telesná tekutina

SEM – skenovací (rastrovací) elektrónový mikroskop

TCP – trikalcium fosfát

TRIS – tris (hydroxymetyl) aminometán

XRD – rentgenová difrakčná analýza

8 LITERATÚRA

- [1] CAO, Wanpeng a Larry L. HENCH. Bioactive materials. *Ceramics International* [online]. Elsevier, 1996, **22**(6), [cit. 2017-10-17]. DOI: 10.1016/0272-8842(95)00126-3. ISSN 0272-8842.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/027288429501263>
- [2] KAUR, Gurbinder. *Bioactive Glasses: Potential Biomaterials for Future Therapy*. Springer, 2017. ISBN 9783319457161.
- [3] BAINO, Francesco, Giorgia NOVAJRA a Chiara VITALE-BROVARONE. *Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015, 3, -. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00202. ISSN 2296-4185. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00202/abstract>
- [4] EL-MELIEGY, Emad. a Richard van. NOORT. *Glasses and glass ceramics for medical applications*. New York: Springer, 2012. ISBN 978-1-4614-1227-4.
- [5] BOUTRAND, Jean-Pierre. *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*. Elsevier Science, 2012. DOI: 10.1533/9780857096456. ISBN 0857090704.
- [6] BUDDY D. RATNER. [et al.]. *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 978-008-0470-368.
- [7] ZHAO, X., COURTNEY, J.M. a QIAN, H. *Bioactive materials in medicine design and applications*. Oxford: Woodhead Pub, 2011. ISBN 978-085-7092-939.
- [8] The Risk: Metal-on-Metal Hip Implants [online]. In: . [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <https://i.pinimg.com/736x/11/f4/ed/11f4ed5d716f6d788c63e2c1cd7e6e9a--hip-implants-joint-replacement.jpg>
- [9] What are dental implants? [online]. In: . [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: http://www.aaid-implant.org/assets/1/7/MainFCKEditorDimension/AAID_Fig1_color.jpg
- [10] Infarkt myokardu a jeho liečba [online]. In: . [cit. 2017-10-31]. Dostupné z: <http://sk.medixa.org/media/image/2-infarkt-myokardu-lecba.jpg>
- [11] Implantácia koronárneho stentu [online]. [cit. 2017-10-31]. Dostupné z: <http://www.cardio.sk/moznosti-terapie/srdce/implantacia-koronarneho-stentu>
- [12] BEST, S.M., PORTER A.E., THIAN E.S a HUANG J. *Bioceramics: Past, present and for the future*. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008, 28(7), 1319-1327. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001. ISSN 09552219. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221907005961>
- [13] KOUTSKÝ, Jaroslav. *Biomateriály*. Plzeň: Západočeská univerzita, 1997. ISBN 80-708-2370-4.
- [14] CE MARKING OF INTRAOCULAR LENS [online]. In: . [cit. 2017-11-04]. Dostupné z: <https://maleshblog.files.wordpress.com/2013/07/iol.jpg?w=650>
- [15] Intra-Ocular Lens Implatation. In: Mahadev eyecare [online]. [cit. 2017-11-04]. Dostupné z: <http://www.mahadeveyecare.in/images/machine/11.jpg>

- [16] WANG, Min. Guest Editorial: Composites in medicine (Special Issue for the Symposium on Composites in Medicine at ACCM-5). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. London: Springer Science, 2008, 19(7), 2533-4 [cit. 2017-11-03]. DOI: 10.1007/s10856-008-3447-9. ISSN 09574530.
- [17] EDITED BY SOORAJ H. NANDYALA. *Current Trends on Glass and Ceramic Materials*. Online-Ausg. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2013. ISBN 16-080-5452-7.
- [18] Compositional dependence of bone and soft tissue bonding to bioactive glasses. Dr. Wilson continued investigation of the interfacial interaction of soft tissues established, in key papers with David Nolleti, the compositional dependence of the bonding of bioactive glasses to soft tissues. [online]. In: . [cit. 2017-11-11]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/279273002/figure/fig1/AS:398356112265217@1471986906556/Figure-1-Compositional-dependence-of-bone-and-soft-tissue-bonding-to-bioactive-glasses.jpg>
- [19] RAHAMAN, Mohamed N., Delbert E. DAY, B. SONNY BAL, Qiang FU, Steven B. JUNG, Lynda F. BONEWALD a Antoni P. TOMSIA. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(6), 2355-2373. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.016. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001280>
- [20] STUDART, André R., Urs T. GONZENBACH, Elena TERVOORT a Ludwig J. GAUCKLER. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. Malden, USA: Blackwell Publishing, 0606, 89(6), 1771-1789 [cit. 2017-11-26]. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x. ISSN 0002-7820.
- [21] KOKUBO, Tadashi, Hiroaki TAKADAMA a Takao YAMAMURO. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006, 27(15), 2907-2915. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206000457>
- [22] BOHNER, Marc a Jacques LEMAITRE. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2009, 30(12), 2175-2179 [cit. 2017-11-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.008. ISSN 0142-9612.
- [23] 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. DOI: 10.3390/ijms16046818. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/4/6818>
- [24] CÜNEYT TAS, A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*. 2000, 21(14), 1429-1438. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00019-3. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961200000193>
- [25] Biomimetické procesy v keramice [online]. In: . [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic_Technology/SM-Lect-13-C.pdf
- [26] Biomaterials - Classifications and Behaviour of Different Types of Biomaterials. In: *AZO Materials* [online]. [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <https://www.azom.com/work/Biomaterials%20->

%20Classifications%20and%20Behaviour%20of%20Different%20Types%20of%20Biomaterials_files/image004.jpg

- [27] Biomaterials generations [online]. [cit. 2018-01-22]. Dostupné z: http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/publication_12_1581_1707.pdf
- [28] SHEN, He, Liming ZHANG, Min LIU a Zhijun ZHANG. Biomedical Applications of Graphene. *Theranostics*. 2012, 2(3), 283-294. DOI: 10.7150/thno.3642. ISSN 1838-7640. Dostupné také z: <http://www.thno.org/v02p0283.htm>
- [29] *Future Dental Journal*. 2016, 2(2). ISSN 23147180. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314718016300398>
- [30] A Review of Synthesis and Properties of Hydroxyapatite/Alumina Nano Composite Powder. 2015, 5(2). ISSN 2049-954X.
- [31] OYANE, Ayako, Kazuo ONUMA, Atsuo ITO, Hyun-Min KIM, Tadashi KOKUBO a Takashi NAKAMURA. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, 64A(2), 339-348. DOI: 10.1002/jbm.a.10426. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10426>
- [32] Vidět znamená vědět – elektronová mikroskopie [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/videt-znamenava-vedet>
- [33] SUZUKI, E. High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2002.01082.x. ISBN 10.1046/j.1365-2818.2002.01082.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2818.2002.01082.x>
- [34] Rentgenová difrakční analýza na práškových vzorcích [online]. [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/rentgenova-difrakcni-analyza-na-praskovych-vzorcich>
- [35] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [36] ABD EL-GHANY, Ossama Saleh a Ashraf Husein SHERIEF. Zirconia based ceramics, some clinical and biological aspects: Review. *Future Dental Journal*. 2016, 2(2), 55-64. DOI: 10.1016/j.fdj.2016.10.002. ISSN 23147180. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314718016300398>
- [37] PTÁČEK, Petr. Introduction to Apatites. *Apatites and their Synthetic Analogues - Synthesis, Structure, Properties and Applications*. InTech, 2016, 2016-04-13, , 32-33. DOI: 10.5772/62208. ISBN 978-953-51-2265-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/apatites-and-their-synthetic-analogues-synthesis-structure-properties-and-applications/introduction-to-apatites>
- [38] Fotometrické metody [online]. [cit. 2018-05-18]. Dostupné z: <https://anl.zshk.cz/vyuka/fotometricke-metody.aspx>