



Individuální náhrady vyrobené technologií Selective Laser Melting

Diplomová práce

Studijní program: N3963 – Biomedicínské inženýrství
Studijní obor: 3901T009 – Biomedicínské inženýrství

Autor práce: **Bc. Lucie Matoušková**
Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D.





Individual medical implants produced by Selective Laser Melting technology

Master thesis

Study programme: N3963 – Biomedical engineering
Study branch: 3901T009 – Biomedical Engineering
Author: **Bc. Lucie Matoušková**
Supervisor: doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Matoušková**
Osobní číslo: **D15000030**
Studijní program: **N3963 Biomedicínské inženýrství**
Studijní obor: **Biomedicínské inženýrství**
Název tématu: **Individuální náhrady vyrobené technologií Selective Laser Melting**
Zadávací katedra: **Fakulta zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

- 1) Literární rešerše
- 2) Zhotovení laboratorních vzorků metodou SLM
- 3) Testování biokompatibility
- 4) Ověření geometrické přesnosti technologie SLM
- 5) Závěr a diskuze

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Technologií SLM se zhotoví laboratorní vzorky, které se budou v laboratoři dále testovat a vyhodnocovat. Součástí práce bude testování biokompatibility a ověření geometrické přesnosti technologie SLM. Ve světové literatuře je publikováno, že implantáty vyrobené z titanové slitiny technologií SLM jsou vhodné i pro medicínské využití. Cílem práce bude ověření, zda nemají takto vyrobené implantáty pozměněné chemické složení a zda jsou biokompatibilní.

Výzkumné předpoklady:

Hlavní výzkumnou otázkou práce je zaměření se na testování chemického složení a biokompatibility, tedy vlivu na buněčné populace. Dosažené výsledky budou porovnány s literaturou (dle odborné literatury viz níže a dalších vhodných literárních zdrojů).

Metoda:

Kvantitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Součástí experimentu s titanovými vzorky bude zjišťování chemického složení a testování cytotoxicity. Ta bude vyhodnocována především po stránce porovnávání (buňky vystavené/nevystavené působení titanového vzorku). Dále bude ověřována geometrická přesnost technologie SLM a nakonec se provede statistické vyhodnocení experimentů.

Místo a čas realizace výzkumu:

Práce bude probíhat v Laboratoři prototypových technologií a procesů a dále pak v Laboratoři tkáňového inženýrství, a to v měsících červen 2016 až březen 2017.

Vzorek:

Hodnoceny budou vzorky titanové slitiny vyrobené technologií SLM.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **70-90**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury: **viz příloha**

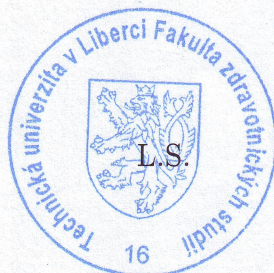
Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D.

Katedra mechaniky, pružnosti a pevnosti

Datum zadání diplomové práce: **1. srpna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2017**



Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením fakulty

V Liberci dne 30. listopadu 2016

Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné literatury:

1. RATNER, B. D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS (eds.). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Third edition. Amsterdam: Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
2. BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMIL a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, 29(6), 739-767 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004. ISSN 0734-9750. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000802>
3. FRÖMEL, Jiří. *Optimalizace parametrů výrobního procesu pro 3D tisk z kovového prášku* [online]. Liberec, 2015 [cit. 2016-11-17]. Dostupné z: http://knihovna-opac.tul.cz/externalResources/theses/31750_type=0.
Diplomová práce.
Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Jiří Šafka.
4. TUHÁČEK, Daniel. *Optimalizace podpůrných struktur ve výrobním procesu pro 3D tisk z kovového prášku* [online]. Liberec, 2016 [cit. 2016-11-17]. Dostupné z: http://knihovna-opac.tul.cz/externalResources/theses/31760_type=0.
Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Jiří Šafka.
5. GU, Dongdong. *Laser additive manufacturing of high-performance materials*. Berlin: Springer, 2015. ISBN 978-3-662-46088-7.
6. PRUITT, Lisa A. a Ayyana M. CHAKRAVARTULA. *Mechanics of biomaterials: fundamental principles for implant design*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-0-521-76221-2.
7. BANDYOPADHYAY, Amit a Susmita BOSE (eds.). *Characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415800-9.
8. BLACK, Jonathan. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. 4th ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-3959-6.
9. PULEO, David A. a Rena BIZIOS (eds.). *Biological interactions on materials surfaces: understanding and controlling protein, cell, and tissue responses*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-98160-4.
10. BAGHERI, Zahra S., David MELANCON, Lu LIU, R. Burnett JOHNSTON a Damiano PASINI. Compensation strategy to reduce geometry and mechanics mismatches in porous biomaterials built with Selective Laser Melting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2016, [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.04.041. ISSN 1751-6161. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175161611630114X>
11. XIAO, Dong-ming, Yong-qiang YANG, Xu-bin SU, Di WANG a Zi-yi LUO. Topology optimization of microstructure and selective laser melting fabrication for metallic biomaterial scaffolds. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* [online]. 2012, 22(10), 2554-2561 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/S1003-6326(11)61500-8. ISSN 1003-6326. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1003632611615008>
12. ARABNEJAD, Sajad, R. BURNETT JOHNSTON, Jenny Ann PURA, Baljinder SINGH, Michael TANZER a Damiano PASINI. High-strength porous

biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints. *Acta Biomaterialia* [online]. 2016, 30, 345-356 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.10.048. ISSN 1742-7061. Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270611530177X>

13. VAITHILINGAM, Jayasheelan, Elisabetta PRINA, Ruth D. GOODRIDGE, Richard J.M. HAGUE, Steve EDMONDSON, Felicity R.A.J. ROSE a Steven D.R. CHRISTIE. Surface chemistry of Ti6Al4V components fabricated using selective laser melting for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, 67, 294-303 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.054. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116304738>

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

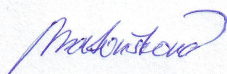
Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 29.4.2017

Podpis: 

Poděkování:

Děkuji doc. Ing. Lukáši Čapkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, cenné rady a věcné připomínky. Mé poděkování patří také RNDr. Janě Horákové, Ph.D. a Ing. Tereze Švarcové za pomoc při testování cytotoxicity. Dále děkuji Ing. Michalu Ackermannovi, Ph.D. za zhotovení laboratorních vzorků a pomoc s jejich zpracováním a testováním. Také bych na tomto místě ráda poděkovala Ing. Radomíru Mendřickému, Ph.D. za pomoc s ověřením geometrické přesnosti, Ing. Lukáši Voleskému za pomoc s měřením drsnosti povrchu a doc. Ing. Pavlu Solfronkovi, Ph.D. za provedení tahových zkoušek. Děkuji také MUDr. Pavlu Buchvaldovi, Ph.D. a celému oddělení Neurochirurgie v Krajské nemocnici Liberec za možnost nahlédnout do klinické praxe. Mé poděkování patří rovněž Ing. Jaroslavu Fenclovi a společnosti BEZNOSKA, s.r.o. za cennou spolupráci. V neposlední řadě děkuji také Bc. Jaroslavu Horákovi a celé své rodině za morální podporu.

Anotace

Jméno a příjmení autora: Bc. Lucie Matoušková

Instituce: Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií

Název práce: Individuální náhrady vyrobené technologií Selective Laser Melting

Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D.

Počet stran: 91

Počet příloh: 5

Rok obhajoby: 2017

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá individuálními implantáty vyrobenými technologií Selective Laser Melting (SLM). Testovaným materiálem je biokompatibilní titanová slitina Ti-6Al-4V, ze které byly technologií SLM zhotoveny laboratorní vzorky. V rámci práce byly vzorky testovány na cytotoxicitu, bylo u nich analyzováno chemické složení a drsnost povrchu. Dále byla ověřena geometrická přesnost technologie a nakonec byly provedeny tahové zkoušky ke zjištění mechanických vlastností. Tato měření a testování měla za cíl objasnit, zda technologie SLM neovlivňuje biokompatibilitu a jiné vlastnosti materiálu a tedy zda jsou díly vyrobené touto technologií vhodné pro medicínské použití. Práce se zaměřuje především na kraniální implantáty.

Klíčová slova: Aditivní technologie výroby, SLM, Selective Laser Melting, Individuální implantáty, Ti-6Al-4V

Annotation

Name and surname: Bc. Lucie Matoušková

Institution: Technical University of Liberec, Faculty of Health Studies

Title: Individual medical implants produced by Selective Laser Melting technology

Supervisor: doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D.

Pages: 91

Appendix: 5

Year: 2017

Annotation:

This diploma thesis investigates the possibility of producing medical parts by Selective Laser Melting technology (SLM). The tested material is biocompatible titanium alloy Ti-6Al-4V. In this study, the laboratory samples made by SLM technology were tested for cytotoxicity, chemical composition and the surface roughness. Further, geometric accuracy of SLM technology was tested and to determine the mechanical properties the tensile tests were performed. These measurements and testing were intended to clarify whether the SLM technology does not affect the biocompatibility and other properties of the implant and thus, whether the implants made by this technology are suitable for medical use. The study focuses mainly on cranial implants.

Key words: Additive manufacturing, SLM, Selective Laser Melting, Individual medical implants, Ti-6Al-4V

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů	13
1 Úvod.....	14
2 Teoretická část	16
2.1 Aditivní technologie výroby.....	16
2.1.1 Technologie Selective Laser Melting.....	17
2.1.1.1 Modelování objektu a stavební proces	18
2.2 Kostní tkáň	19
2.2.1 Mechanické vlastnosti kosti	21
2.3 <i>Cranium</i> – lebka	22
2.3.1 <i>Neurocranium</i>	23
2.3.2 <i>Splanchnocranium</i>	25
2.4 Náhrady kostní tkáně	26
2.4.1 Individuální náhrady	27
2.4.1.1 Kraniální implantáty.....	27
2.4.1.2 Kranioplastika	29
2.4.2 Titanové implantáty	29
2.5 Výroba individuálních implantátů technologií Selective Laser Melting	30
3 Výzkumná část	39
3.1 Použité materiály a metody	39
3.1.1 Kultivace buněk <i>in vitro</i>	39
3.1.2 Použitá média a chemikálie	40
3.1.3 Buněčná linie MG-63.....	42
3.1.4 MTT test.....	42
3.1.5 Fluorescenční mikroskopie.....	42
3.1.6 Skenovací elektronová mikroskopie	43
3.1.7 Energiově disperzní spektroskopie	45
3.1.8 Optická mikroskopie	45
3.1.9 Kontaktní profilometrie.....	46
3.1.10 Zkouška tahem.....	47
3.1.11 3D optické skenování.....	48
3.2 Návrh a výroba vzorků	49
3.2.1 Dokončovací úpravy vzorků.....	54
3.3 Vyhodnocení a výsledky	56
3.3.1 Testování cytotoxicity	56
3.3.1.1 Experiment 1 - neošetřené vzorky.....	57

3.3.1.2	Experiment 2 - různé úpravy vzorků.....	60
3.3.1.3	Experiment 3 - neošetřené vzorky.....	68
3.3.2	Analýza chemického složení	70
3.3.3	Analýza drsnosti povrchu	71
3.3.4	Tahové zkoušky	73
3.3.5	Ověření geometrické přesnosti	75
4	Diskuze	78
5	Závěr.....	81
	Seznam bibliografických citací	82
	Seznam obrázků.....	87
	Seznam grafů	89
	Seznam tabulek	90
	Seznam příloh	91

Seznam použitých zkratk a symbolů

Zkratka	Význam anglicky	Význam česky
AM	Additive manufacturing	Aditivní výroba
CAD	Computer aided design	Počítačem podporované konstruování
CNC	Computer numerical control	Počítačem řízené obrábění
CT	Computed tomography	Počítačová tomografie
EDS	Energy dispersive spectroscopy	Energiově disperzní spektroskopie
FM	Fluorescence microscopy	Fluorescenční mikroskopie
p.a.	Per analysis	Pro analýzu (třída čistoty)
RM	Rapid manufacturing	Rychlá výroba
RP	Rapid prototyping	Rychlé vytváření prototypů
SEM	Scanning electron microscopy	Skenovací elektronová mikroskopie
SLM	Selective laser melting	Selektivní tavení laserem
STL	Standard triangulation language	Standardní triangulační jazyk
2D	Two-dimensional	Dvourozměrný
3D	Three-dimensional	Trojrozměrný

Symbol	Jednotka	Popis
A	[%]	Prodloužení při přetržení
Ag	[%]	Tažnost na maximálním napětí
Al	[-]	Hliník
Ar	[-]	Argon
CO ₂	[-]	Oxid uhličitý
E	[MPa]	Youngův modul pružnosti
F	[N]	Síla
l ₀	[mm]	Původní délka
Ra	[μm]	Střední aritmetická úchylka profilu
Rp _{0,2}	[MPa]	Smluvní mez kluzu
Rm	[MPa]	Mez pevnosti
S	[m ²]	Průřez
Ti	[-]	Titan
V	[-]	Vanad
Δl	[mm]	Prodloužení zkušebního tělesa
ε	[%], [-]	Poměrná deformace
ρ	[g/cm ³]	Hustota
σ	[MPa]	Inženýrské napětí

1 Úvod

Aditivní technologie výroby někdy nazývané také jako „3D tisk“ jsou moderní metodou výroby umožňující tvorbu složitých geometrií a dílů pro specifické aplikace. V současnosti je aditivní technologie výroby používána nejen pro stavbu prototypových dílů, ale i dílů určených ke konečnému užití. Velký rozvoj těchto technologií pozorujeme i v biomedicínských aplikacích. Pomocí technologie 3D tisku lze například rekonstruovat z CT snímků rychle zhotovit reálné 3D modely určité části lidského těla. Tyto modely je možné využít pro plánování složitých operačních výkonů, nebo jako výukový model pro studenty. Dalším možným využitím této technologie je výroba medicínských dílů určených k implantaci do organismu, zejména náhrad kostí. Výhodou této technologie je především rychlost výroby. Díky své schopnosti tvořit i velmi složité geometrické tvary v krátkém čase a s relativně nízkými náklady, má aditivní technologie velký potenciál stát se žádanou metodou výroby individuálních implantátů. K výrobě sériových implantátů, např. kolenních nebo kyčelních náhrad se běžně využívají konvenční metody (např. CNC obrábění). Tyto implantáty se vyrábí v několika velikostech, což je pro tyto účely dostačující. V případě potřeby individuálního implantátu, například při řešení defektů lebky, jsou konvenční metody výroby značně neekonomické a časově náročné. Tyto defekty se tak v současné době řeší převážně použitím tzv. kostního cementu, který je ručně tvarován lékařem během operačního výkonu. Tato řešení však neposkytují žádaný kosmetický efekt. Aditivní technologie výroby se již používají k rychlé výrobě individuálních implantátů na některých specializovaných klinikách a institutech. Zhotovují se takto především kraniální, kraniofaciální a maxilofaciální implantáty, ale i náhrady částí pánve po onkologických onemocněních apod. V běžné praxi jde však zatím spíše o raritní případy.

Tato práce se zabývá možností výroby individuálních implantátů z biokompatibilní slitiny titanu Ti-6Al-4V aditivní technologií Selective Laser Melting (SLM). Technologie SLM je založena na principu spékání kovového prášku vrstvu po vrstvě dle předlohy dat 3D modelu. Cílem práce je seznámit se s problematikou výroby implantátů na míru, s modelováním takových implantátů a také s jejich výrobou pomocí technologie SLM. Dalším cílem je zhotovit laboratorní vzorky technologií SLM a následně experimentem zjistit, zda tato metoda výroby neovlivňuje biokompatibilitu a jiné vlastnosti materiálu a tedy zda jsou díly vyrobené touto technologií vhodné pro medicínské použití.

Sledovanými vlastnostmi je cytotoxicita a chemické složení materiálu, dále pak drsnost povrchu a mechanické vlastnosti dílů vyrobených technologií SLM a součástí práce je rovněž ověření geometrické přesnosti výroby.

2 Teoretická část

V teoretické části práce jsou popsány a vysvětleny základní pojmy týkající se dané problematiky a analyzovány některé odborné práce jiných autorů, související s tímto tématem.

2.1 Aditivní technologie výroby

Aditivní technologie výroby (tzv. Additive Manufacturing – dále jen „AM“), je termín označující soubor nekonvenčních výrobních technologií, které pracují na principu tvorby součástí přidáváním a spojováním částic. Někdy jsou tyto technologie označovány také jako „3D tisk“ [1, 2].

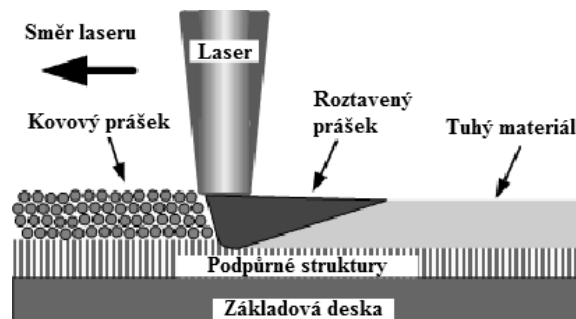
AM je automatizovaný výrobní proces založený na principu přidávání vrstev za účelem dosažení požadovaného 3D fyzického objektu na základě elektronických dat. Modely, které slouží jako podklad pro AM, lze získat prostřednictvím CAD nebo formou skenování skutečného modelu (tzv. reverzní inženýrství) [1, 3].

Aditivní technologie se někdy dále dělí na RP (Rapid Prototyping), neboli rychlou výrobu prototypů a RM (Rapid Manufacturing) - tedy výrobu finálních produktů. Dříve se pro AM technologie používalo obecné označení „Rapid Prototyping“. Když se však touto metodou začaly vyrábět i finální součástky, přibývalo upřesňujících označení (jedním z nich je i RM). Pro zpřehlednění byl proto Americkou společností pro testování a materiály (ASTM) stanoven jednotný název „Additive Manufacturing“ pro všechny aditivní technologie bez ohledu na výsledný produkt. AM se tak stal oficiálním standardním termínem a je definován právě jako proces spojování materiálu, obvykle vrstvu po vrstvě, vedoucí k výrobě fyzického objektu z 3D CAD dat. Materiál je přidáván po vrstvách, přičemž každá vrstva je 2D řez 3D objektu odvozeného z původních CAD dat. Jedná se o opak klasického obrábění, kdy je naopak materiál odebrán a vzniká tak odpad [1, 3].

Nespornou výhodou AM je kromě minimálního množství odpadového materiálu jeho schopnost vyrábět i velmi složité tvary a struktury v krátkém čase. Stroje pro aditivní výrobu se mohou lišit jak v použitých materiálech (kovy, polymery, atd.), tak i z hlediska formy vstupního materiálu a mechanismu spojování vrstev [1].

2.1.1 Technologie Selective Laser Melting

Selective Laser Melting (dále jen „SLM“) je jednou z technologií aditivní výroby, která je určena k výrobě kovových dílů. Jedná se o proces spékání kovového prášku za použití počítačem řízeného laserového paprsku. Díky vysoké energii laseru dojde k roztavení tenké vrstvy jemného prášku podle 2D řezu z původního 3D modelu. Díky přesné fokusaci laserového paprsku do požadovaného místa je zabezpečeno plné protavení materiálu a vzniklé díly jsou tak plně homogenní a dosahují až 100 % hustoty [1, 2]. Na následujícím schématu (Obr. 1) je znázorněno tavení kovového prášku laserovým paprskem.

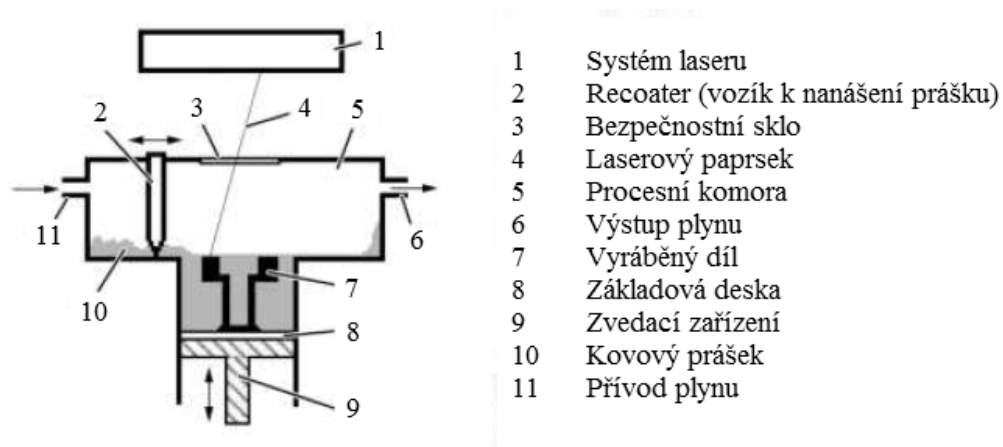


Obr. 1: Schéma tavení prášku laserovým paprskem [4]; upraveno

Technologie SLM je vhodná k výrobě součástí s komplikovanou geometrií nebo vnitřní strukturou, jež jsou obtížně vyrobitelné konvenčními technologiemi. Stavba dílu probíhá v inertní atmosféře dusíku (N_2) nebo argonu (Ar), díky které je možné deklarovat čistotu zpracovávaného materiálu. SLM umožňuje zpracování široké škály kovových materiálů, jako jsou například nerezové oceli, nástrojové oceli, kobalt-chromové slitiny a při využití inertní atmosféry argonu umožňuje pracovat i s reaktivními kovovými prášky jako jsou hliníkové a titanové slitiny [1, 5].

Součástí zařízení SLM jsou dva zásobníky s kovovým práškem. Z prvního zásobníku je prášek čerpán a druhý slouží k uložení zbytkového prášku, který lze po vyčištění prosévacím zařízením případně znovu použít při další výrobě. Procesní komora stroje se skládá ze stavební a dávkovací komory. V celém prostoru je vakuum s inertním plynem pro zajištění čistého prostředí. Do stavební komory je na mechanismus umožňující pohyb v ose Z umístěována základová deska, na které probíhá samotný tisk. Nad stavební komorou se nachází laserová jednotka s vychylovacími zrcátky. Laserový paprsek je přiváděn optickým vláknem a za pomoci zrcadel, která jsou schopna vysokofrekvenčního pohybu v osách X a Y je paprsek vychylován. Výkon laserového paprsku je důležitým

parametrem ovlivňujícím kvalitu povrchu součásti [1, 6]. Na následujícím obrázku je znázorněno schéma výroby dílu technologií SLM.



Obr. 2: Schéma výroby dílu technologií SLM [7]

2.1.1.1 Modelování objektu a stavební proces

Model požadovaného objektu je vymodelován v CAD systému. Tento model přesně popisuje fyzický objekt, který má být vyroben, povrchy proto musí být uzavřené, aby byl prostor jednoznačně definován. CAD data jsou následně převedena do formátu STL, který aproximuje povrchy modelu s využitím nejjednodušších polygonů – trojúhelníků [1, 8].

Tento soubor je následně nahrán do příslušného softwaru, ve kterém probíhá příprava modelu. V tomto kroku je model umístěn na virtuální plochu stroje (základovou desku) a na vybraná místa modelu se umístí podpůrné struktury. Cílem je použít co nejméně podpůrných struktur kvůli úspoře materiálu. Dále se nastaví požadovaný materiál, tloušťka tisknuté vrstvy a další parametry tisku (výkon laseru, rychlost, atd.). Model je v této části také rozdělen podle zvolené tloušťky vrstvy na 2D řezy. Každá vrstva tak představuje 2D obraz řezu v příslušné výšce tisknutého modelu. Na závěr se soubor s elektronickými daty exportuje do softwaru výrobního zařízení [1, 7].

Samotný proces tisku se skládá z několika kroků, které se opakují až do konce výrobního procesu. Na základovou desku je nanášena předem definovaná velmi tenká vrstva kovového prášku a do té je laserovým paprskem spékán tvar 2D řezu z 3D modelu. Nejprve dojde k vytvoření okrajů a poté zbylého plného profilu. Po vytisknutí vrstvy se základová deska posune o tloušťku tisknuté vrstvy směrem dolů (v ose Z) a celý proces se opakuje až do dokončení poslední vrstvy objektu. Paralelně s výrobou objektu probíhá

i výstavba podporných struktur v okolí, které objekt podpírají a brání jeho zhroucení [6, 7].

Kvůli zabránění oxidaci zpracovávaného kovu probíhá proces, jak již bylo popsáno výše, v inertní atmosféře dusíku nebo argonu. Aby se snížilo vnitřní pnutí ve vyráběném dílu, předehtívá se základová deska na cca 200°C [7].

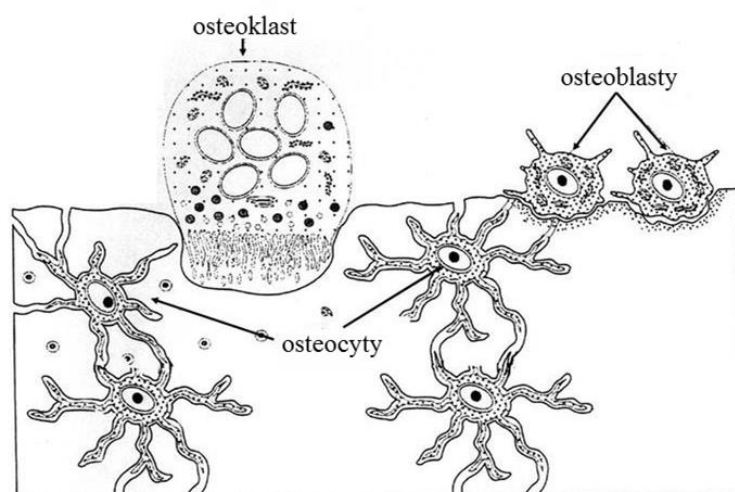
Ke snížení pnutí je možné po vytisknutí objektu provést žíhání. Z vyrobeného dílu se následně odstraní podpůrné struktury a dále je možné povrch dílu upravit např. tryskáním, broušením, leštěním, či jinými dokončovacími operacemi.

2.2 Kostní tkáň

Kost je tvrdá pojivová tkáň, která má podpůrnou a ochrannou funkci. Kostní tkáň představuje nejtvrďší a nejpevnější pojivo v lidském těle hlavně díky své jedinečné struktuře a schopnosti přizpůsobovat se. Kost, stejně jako ostatní pojiva, se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty. Mezibuněčná hmota (matrix) se skládá z organické složky (ossein) a anorganické složky (minerály). Ossein, který je tvořen kolagenními vlákny a amorfni hmotou (bílkoviny nekolagenního charakteru), propůjčuje kosti určitou míru pružnosti. Naopak anorganická složka, která je tvořena především vápníkem a fosforem ve formě krystalického hydroxyapatitu a amorfniho fosforečnanu vápenatého, propůjčuje kosti tvrdost a pevnost, ve vyšším poměru však také křehkost. Poměr mezi osseinem a minerální složkou se během života mění, podíl anorganické složky postupně roste. U novorozence obsahuje kost asi 48 % anorganických látek, zatímco u dospělého jedince se jejich podíl zvyšuje na více než 60 %. Kostí jsou proto v mládí pružnější a v pozdním věku naopak křehčí [9, 10].

U kostní tkáně rozeznáváme 3 typy buněk – osteoblasty, osteocyty a osteoklasty (viz Obr. 3 na následující straně). Kost vzniká činností osteoblastů, které vytvářejí základní kostní hmotu (matrix), kterou se obklopují a tím se z nich stávají osteocyty. Osteocyty jsou tedy osteoblasty, které byly začleněny do nově vytvořené mezibuněčné hmoty a později uzavřeny mineralizovanou kostí do tzv. lakun. Osteocyty kostní hmotu nevytváří, podílejí se však na regulaci hladiny vápníku. Posledním typem buněk jsou osteoklasty, které jsou zodpovědné za odbourávání kostní hmoty při remodelaci kosti [9, 10]. Osteoklasty jsou vícejaderné (15 – 20 jader) obrovské buňky, zatímco osteoblasty a osteocyty jsou buňky jednojaderné. Osteoblasty mají kubický tvar a dosahují velikosti

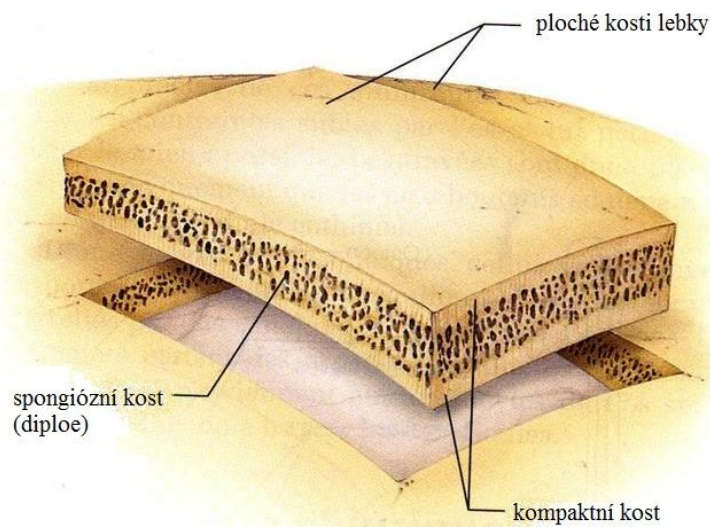
okolo 15 – 30 μm , vyskytují se v místě tvorby a remodelace kosti a s ostatními buňkami a okolím komunikují svými výběžky [11].



Obr. 3: Základní typy buněk kostní tkáně [12]; upraveno

Kostní tkáň rozdělujeme na fibrilární a lamelární. Fibrilární kostní tkáň se vyznačuje nepravidelným uspořádáním kolagenních vláken a vyskytuje se především během vývoje kosti. U dospělého jedince je přítomna například v okolí lebečních švů a vzniká také při hojení kostí po zlomeninách. Lamelární kostní tkáň je uspořádána do plochých plášťových vrstev (lamel), nebo do válcových soustav kruhových koncentrických lamel (osteonů). Osteon, někdy nazývaný také Haversův systém je základní stavební jednotkou kosti. Je tvořen souborem soustředných lamel uspořádaných kolem centrálního Haversova kanálku, kterým probíhají cévy a nervy [10].

Dále rozdělujeme kostní tkáň na kompaktní a spongiózní. Kompaktní (hutná) tkáň tvoří povrchovou vrstvu pod okosticí, zatímco spongiózní (trámčitá) kostní tkáň vytváří tzv. trabekulární systém uvnitř kostí. Kostní trámce nejsou uspořádané náhodně, ale do určitých směrů, podle působení tlaku a tahu na kost. Každá kost má svoji specifickou a typickou architekturu, která je dynamická a při změně zatížení schopná rychlé přestavby. Spongiózní kostní tkáň se nachází v koncových částech dlouhých kostí a uvnitř krátkých kostí. Ploché lebeční kosti mají specifickou stavbu, skládají se ze dvou vrstev kompaktní kosti (*lamina externa*, *lamina interna*), mezi nimiž se nachází trámčitá diploe (viz Obr. 4) [10].



Obr. 4: Stavba plochých kostí lebky [12]; upraveno

Na povrchu kosti se nachází bohatě nervově a cévně zásobený vazivový obal nazývaný okostice (*periosteum*), lebeční okostice se pak nazývá *pericranium*. Vnitřní strukturu kosti vyplňuje kostní dřeň. Červená kostní dřeň, která je orgánem krvetvorby, vyplňuje po narození především dřeňovou dutinu uvnitř dlouhých kostí. V dospělosti nahradí červenou kostní dřeň v dřeňových dutinách dřeň žlutá a červená dřeň se nachází především v trámčině koncových částí dlouhých kostí, v žebrech, hrudní kosti, lopatě kyčelní kosti a také v diploe plochých lebečních kostí [9, 10].

2.2.1 Mechanické vlastnosti kosti

Mechanické vlastnosti kosti jsou ovlivněny především pórovitostí, stupněm mineralizace a orientací kolagenních vláken. Kompaktní kost se vyznačuje přibližně 5 – 10% pórovitostí, zatímco spongiózní kost má pórovitost 75 – 95 % [13].

Odolnost tkáně proti mechanickému zatížení můžeme charakterizovat základními vlastnostmi jako je pevnost a pružnost. Kost se díky své struktuře řadí mezi nehomogenní a anizotropní materiály - mechanické vlastnosti kostní tkáně tedy podstatně závisí na směru, ve kterém zatížení působí. Tkáň může být namáhána v tahu, v tlaku, v ohybu, ve smyku, v krutu apod. [14].

Pružností rozumíme schopnost pevného tělesa získat po odstranění vnějších účinků síly původní tvar a pevnost je schopnost přenést zatížení bez porušení. Pružnost je definovaná hodnotou modulu pružnosti (Youngův modul). Youngův modul závisí pouze na vlastnostech materiálu, nikoli na jeho rozměrech. Důležitým bodem při zvyšujícím se

napětí je mez kluzu ($R_{p0,2}$), po překročení této meze se již tkáň nevrátí do původního stavu po odeznění zátěže - přestává tedy být elastickou a stává se plastickou. Další mezí je mez pevnosti (R_m), která je vždy vyšší než mez pružnosti a při překročení této meze dochází k porušení soudržnosti tkáně (v případě tahu k přetržení). Tyto meze se liší u kortikální a spongiózní kosti [13, 14].

Mechanické vlastnosti kostí se v průběhu života mohou měnit z důvodu tzv. remodelace kosti. Jedná se o odbourávání (resorpci) kostní tkáně a novotvorbu resorbované části. V oblastech velkého zatížení kosti se hustota trámčů zvyšuje a naopak v místech nízkého zatížení klesá [13, 15]. V následující tabulce jsou srovnány mechanické vlastnosti kosti s jinými materiály.

Tab. 1: Porovnání mechanických vlastností a hustoty kosti s titanem a ocelí [13, 14, 16]

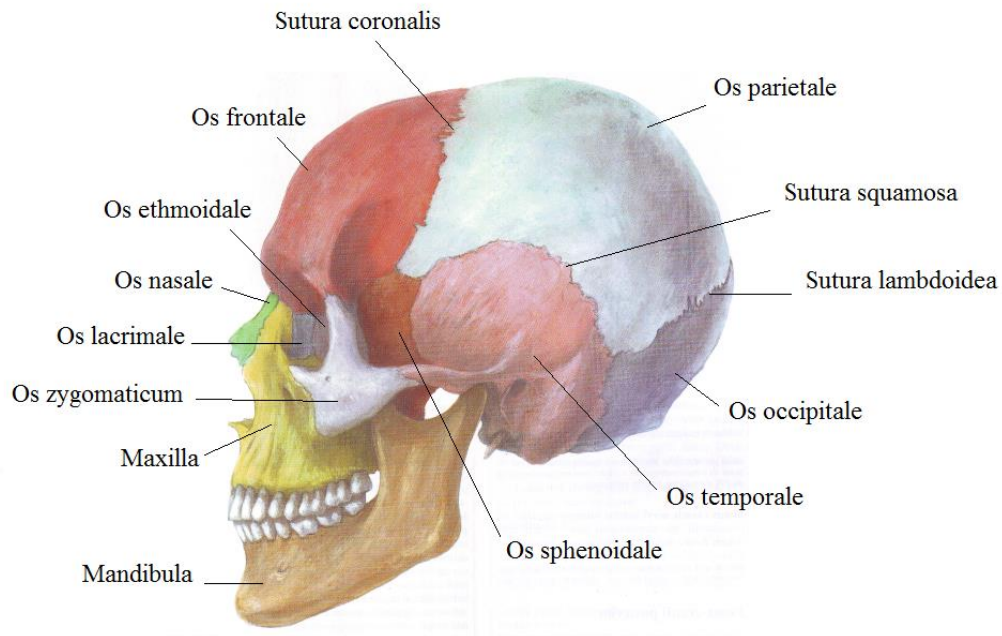
Materiál	Modul pružnosti E [MPa]	Mez kluzu $R_{p0,2}$ [MPa]	Mez pevnosti R_m [MPa]	Hustota ρ [g/cm ³]	Prodloužení při přetržení A [%]
Kompaktní kost	~ 15 000	114	100 – 180	1,7 – 2	1 – 3
Spongiózní kost	100 – 500	–	8 – 50	–	2 – 4
Titan	~ 110 000	485	760	4,5	14 – 18
Ti-6Al-4V	~ 116 000	897 – 1034	965 – 1103	4,43	8
Nerezová ocel	~ 190 000	792	930	8	43 – 45

Při volbě materiálu pro kostní náhrady je kromě ohledu na biokompatibilitu také snaha se co nejvíce přiblížit mechanickým vlastnostem kosti. Díky relativně nízkému Youngově modulu pružnosti (viz Tab. 1) je v tomto ohledu z kovových materiálů nejvýhodnější použití titanu a jeho slitin [15].

2.3 Cranium – lebka

Lebka (*cranium*) se skládá ze dvou hlavních oddílů, *neurocrania* a *splanchnocrania* (někdy též označované jako *viscerocranium*). *Neurocranium* neboli mozková část lebky je soubor lebečních kostí, které obklopují a chrání mozek, zrakové, sluchové a rovnovážné ústrojí. Kostí obličejové části lebky (*splanchnocrania*) obklopují a chrání část trávicího a dýchacího systému. Na lebce se vyskytují jak kosti ploché (především kosti klenby lební), tak ale i kosti nepravidelného tvaru (například kost lícní). Některé

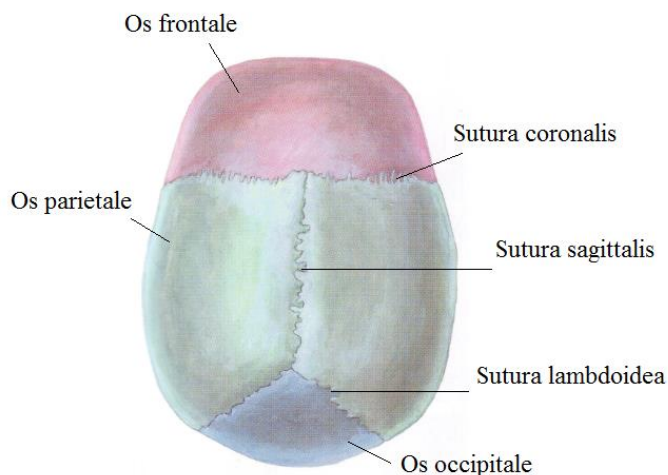
kosti lebky jsou pneumatizované (duté) a vytvářejí vedlejší nosní dutiny [9, 10]. Na následujícím obrázku je vyobrazen laterální pohled na lebku včetně popisu jednotlivých kostí.



Obr. 5: Lebka ze strany [9]; upraveno

2.3.1 Neurocranium

Horní část *neurocrania* se nazývá lebeční klenba (*calva*), dolní část báze lební (*basis cranii*). *Calva* má tvar misky a je tvořena vpředu kostí čelní, za ní kostmi temenními, po stranách šupinami kosti spánkové a vzadu šupinou kosti týlní. Kosti *calvy* jsou spojeny čtyřmi švy - *sutura lambdoidea*, *sutura squamosa*, *sutura sagittalis* a *sutura coronalis* (viz Obr. 6), které v dospělosti postupně synostoticky zanikají (srůstají) [17].



Obr. 6: Lebka shora (*calva*) [9]; upraveno

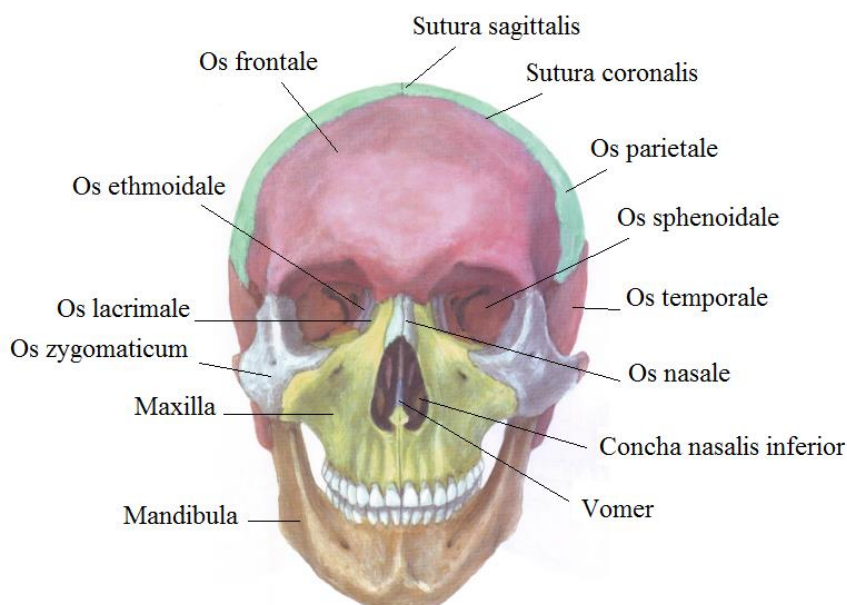
Báze lební se dělí na vnitřní bázi lební (*basis cranii interna*), na níž spočívá spodina mozku a na zevní bázi lební (*basis cranii externa*), která spoluvytváří povrch lebky. Zepředu je na ni nasazeno *splanchnocranium* a kloubně je spojena s prvním krčným obratlem (atlasem). Mezi kosti *neurocrania* řadíme kost čelní, týlní, klínovou, temenní, spánkovou a kost čichovou [9, 17].

Čelní kost (*os frontale*) je původem párová kost lebeční klenby. Jedná se o pneumatizovanou kost, vytvářející vedlejší nosní dutinu (*sinus frontalis*). Skládá se z nepárové šupiny, nosní části a párové očnicové části. **Týlní kost** (*os occipitale*) je nepárová kost v zadní části lebky tvořící lebeční spodinu i lebeční klenbu. Součástí kosti je velký otvor (*foramen magnum*), kterým prochází prodloužená mícha. **Klínová kost** (*os sphenoidale*) je součástí lebeční spodiny a je tvořena nepárovým tělem a třemi párovými ploténkami (velká a malá křídla a křídlovité výběžky). Součástí těla kosti je tzv. turecké sedlo, v němž je uložena hypofýza. Jedná se o pneumatizovanou kost s párovou vedlejší nosní dutinou (*sinus sphenoidalis*). Otvory v klínové kosti spojují střední lebeční jámu s dalšími významnými topografickými místy lebky (např. se středoušní dutinou, očnicí apod.). **Temenní kost** (*os parietale*) je párovou kostí klenby lebeční. Má čtvercový tvar a s ostatními kostmi klenby lebeční je spojena švy. **Kost spánková** (*os temporale*) patří mezi párové kosti, je tvořena šupinou, bubínkovou částí a skalní kostí. Bubínková část tvoří stěny kostěného vnějšího zvukovodu a uvnitř skalní kosti je ukryto střední a vnitřní ucho. Součástí kosti je také pneumatizovaný výběžek (*processus mastoideus*) obsahující malé sklípky. **Kost čichová** (*os ethmoidale*) má

vodorovnou a svislou ploténku a čichové labyrinty. Jedná se o nepárovou, pneumatizovanou kost lební báze, vytvářející vedlejší nosní dutiny [10, 18].

2.3.2 *Splanchnocranium*

V obličejové části lebky se nachází oční dutiny, kostěná dutina nosní a jámy spánkové. Mezi kosti *splanchnocrania* patří dolní skořepa nosní, slzní, nosní a radličná kost, kost lící a patrová, horní čelist, dolní čelist a jazyk [17]. Na následujícím obrázku je pohled na lebku zepředu, tedy především na její obličejovou část.



Obr. 7: Lebka zepředu [9]; upraveno

Dolní skořepa nosní (*concha nasalis inferior*) je na rozdíl od ostatních skořep považována za samostatnou kost. Je připojena k horní čelisti a shora ohraničuje dolní nosní průduch. **Kost slzní** (*os lacrimale*) je drobná párová kost tvořící mediální stěnu očníce. Společně s dolní skořepou nosní tvoří kostěný kanál (*canalis nasolacimalis*), který ústí do nosní dutiny a obsahuje slzovod. **Nosní kost** (*os nasale*) je drobná párová kost. Tvarem těchto kůstek je určen tvar nosního kořene. **Kost radličná** (*vomer*) tvoří zadní část nosní přepážky. Jedná se o nepárovou, sagitálně uloženou kost. **Lící kost** (*os zygomaticum*) tvoří společně s výběžkem spánkové kosti tzv. jařmový oblouk (*arcus zygomaticus*). Jedná se o párovou kost tvořící část dolní a boční stěny očníce. **Patrová kost** (*os palatinum*) je párová kost tvořená dvěma na sebe kolmými tenkými ploténkami.

Vodorovná ploténka spolu s horní čelistí tvoří tvrdé patro. **Horní čelist** (*maxilla*) patří mezi párové kosti a skládá se z těla a čtyř výběžků. Tělo horní čelisti je duté a nachází se v něm nejprostornější vedlejší nosní dutina (*sinus maxillaris*). Horní plocha kosti tvoří dno očníce a její dolní okraj. Horní čelist také tvoří tvar obličeje, nosí dutiny a tvrdého patra a nese horní zubní oblouk. **Dolní čelist** (*mandibula*) se skládá ze dvou částí, nepárového těla (*corpus mandibulae*) a párového ramene (*ramus mandibulae*) zakončeného dvěma výběžky. Tyto dvě části se stýkají v úhlu mandibuly (*angulus mandibulae*), který se během života mění v závislosti na prořezávání zubů. U novorozence je tento úhel 150 – 160°, po prořezání všech zubů se zmenšuje na 120° a při ztrátě chrupu se opět zvětšuje. Dolní čelist je jako jediná kost lebky s ostatními kostmi spojena kloubem. Součástí těla mandibuly je i nepárová vyvýšenina v oblasti brady (*protuberantia mentalis*). **Jazykka** (*os hyoideum*) je nepárová kost uložená v krčním svalstvu, sloužící jako závěs hrtanu. S ostatními kostmi lebky je spojena pouze pomocí svalů a vazů [10, 18].

2.4 Náhrady kostní tkáně

Účelem implantátu je nahradit chybějící část lidského těla. Jedná se o zdravotnický prostředek, který je určen k dlouhodobé implantaci (více než 30 dnů) do těla pacienta a spadá tak do rizikové třídy III [19].

Implantáty je možné rozdělit podle použitých materiálů na kovové (titanová slitina), nekovové (polymery a jiné) a kombinované (titan + hydroxyapatit). Pro konstrukci náhrad tvrdých tkání kostí nacházejí uplatnění především kovové materiály. Základním předpokladem pro použití materiálu ve zdravotnictví je jeho biokompatibilita. Tímto pojmem rozumíme vzájemnou interakci mezi materiálem a živou tkání. U anorganických materiálů implantovaných do živého organismu posuzujeme mimo mechanických a chemických vlastností také účinky biologické, tedy reakci organismu s plochou umělého materiálu [20].

Biomateriály je možné z hlediska biologické tolerance rozdělit na materiály biotolerantní, bioinertní a bioaktivní [20].

Biotolerantní materiály jsou charakteristické značnou korozí implantátu. Ionty kovů se uvolňují elektrolytickou korozí, následně difundují do tkáně, kde se zachytí nerozpustné části a může se projevit jejich toxicita. Do této skupiny patří ušlechtilé kovy

(např. zlato) a slitiny obecných kovů. U těchto materiálů se mezi implantátem a kostí tvoří spojovací vazivová mezivrstva, která z hlediska hojení není příliš vhodná [20].

Bioinertní materiály jsou biologicky neaktivní a jsou tkání plně akceptovány. U implantátů z těchto materiálů dochází ke kontaktní oseogenezi nazývané též oseointegrace, kdy je implantát během hojení postupně začleněn do kosti. K těmto materiálům řadíme například titan a jeho slitiny, uhlíkové materiály a některé druhy keramik [20].

Bioaktivní materiály tvoří pevnou chemickou vazbu na rozhraní implantát - kost. Tyto materiály se však využívají především jako povlaky s ohledem na jejich nepříliš velkou stabilitu. Mezi bioaktivní materiály řadíme například hydroxyapatit, který urychluje vrůstání kosti do materiálu a vznik pevné vazby [20].

2.4.1 Individuální náhrady

Nejčastějším postupem při výrobě implantátů je CNC obrábění z tvářených nebo odlitých materiálů. V případě potřeby individuálního implantátu - tedy určeného pro konkrétního pacienta, je však tento konvenční způsob výroby neekonomický a pomalý. Proto je v těchto případech velmi často využíváno levnějších alternativních metod výroby [8].

Hlavní výhodou AM technologií je právě rychlost a ekonomičnost výroby individuálních implantátů, ale také schopnost vyrobit implantát přizpůsobený konkrétním anatomickým a biomechanickým požadavkům. Implantát na míru tak zajistí velmi přesný operační výkon. Při využití AM technologií jsou potřebné informace získávány přímo z CT dat konkrétního pacienta. Výhodou tohoto postupu je tak nezkraslený a komplexní pohled na danou oblast [21].

2.4.1.1 Kraniální implantáty

Kraniální implantát slouží k uzavření defektu lebky. Nejčastější příčinou potřeby kraniálního implantátu je defekt v oblasti klenby lební po tzv. kraniektomii (otevření lebky). V případě defektu v oblasti báze lební, se často toto místo nechává bez náhrady z důvodu složitého operačního přístupu a také z důvodu přítomnosti poměrně masivních svalů, které mozek dostatečně chrání a není proto obvykle nutné defekt krýt implantátem. Dalším typem jsou defekty zasahující i do obličejové části lebky a vyžadující tak

rekonstrukci obličeje. Příčinou těchto defektů bývají jak traumata, tak ale i nádorová onemocnění nebo vývojové vady. Implantáty používané v těchto případech se často označují jako kraniofaciální, či maxilofaciální [22]. Vzhledem k relativně nízkému výskytu těchto defektů se dále zaměříme především na náhrady v oblasti klenby lebny.

Kraniektomie je zákrok, při němž je odstraněna část klenby lebny, nejčastěji z důvodu pouřazové nitrolební hypertenze. V případě potřeby kraniektomie je často snaha o uchování autologních (pacientovi vlastních) lebečních kostí pro následnou kranioplastiku. Kostní ploténka může být uchována buď zamražením, nebo může být všita do podkoží břicha pacienta. Tyto autologní štěpy však často selhávají z důvodu infekce nebo resorpce [22].

Mezi nejčastěji používané materiály k výrobě kraniofaciálních implantátů patří v dnešní době především metylmetakrylát, titan a jeho slitiny a polyetereterketon (PEEK) [22].

Při uzavírání defektů kostí krania (tzv. kranioplastice) se v České republice nejčastěji setkáváme s metodou, kdy lékař přímo na operačním sále během operace modeluje implantát z tzv. kostního cementu (methylmetakrylátu). Takový implantát však neumožňuje dokonale obnovit kraniofaciální kontury a zamezit tak kosmetickým deformacím. Další nevýhodou je zbytečné prodlužování operační doby, kvůli modelaci a tunutí implantátu. Proces tunutí by měl navíc probíhat mimo operační místo, jelikož se jedná o exotermní reakci a hrozí tak nežádoucí přehřívání mozku. Skutečnost, že materiál tuhne mimo operační místo, má za následek další snížení přesnosti výsledného implantátu [22].

Problémům spojených s tvarově nevyhovujícím implantátem je možné předejít použitím AM technologií, díky nimž by se zkrátila doba samotné operace (kranioplastiky), jelikož takto zhotovený implantát již nevyžaduje žádné úpravy na sále. Další výhodou AM technologií je výsledný kosmetický efekt implantátu. Implantát se konstruuje na základě dat o pacientovi získaných z CT snímků a je tak možné ho přesně přizpůsobit na chybějící část lebky [21].

Výroba implantátu AM technologií začíná 3D rekonstrukcí postižené oblasti z CT snímků. Proces rekonstrukce probíhá v softwarovém programu (například Geomagic) a začíná odstraněním nežádoucích struktur (kůže, svaly, tuk atd.) z CT dat pomocí techniky prahového segmentování. Tím je získán digitální 3D model lebky s defektem. V případě unilaterálního defektu je implantát virtuálně zrekonstruován podle zrcadlové symetričnosti lebky. V případě, kdy není možné defekt odečíst na základě symetrie, je řešením srovnávání lebky pacienta s modely nepoškozených lebek z databáze. Takto získaný počítačový model implantátu pak slouží jako vstupní data pro 3D tisk. K výrobě

kraniálních implantátů technologií AM je nejčastěji používaná titanová slitina Ti-6Al-4V [21, 23].

Kraniální implantát z titanové slitiny se zhotovuje s upevňovacími prvky, jejichž polohu určí lékař. Vhodné je také opatřit implantát několika otvory, či síťovanou strukturou k prevenci hromadění tekutiny pod implantátem [22].

2.4.1.2 Kranioplastika

Kranioplastika je operační výkon sloužící k uzavření defektu v lebce (klenbě lební) a tím obnovení integrity kostního krytu mozku. Nejčastěji se s potřebou kranioplastiky setkáváme po tzv. dekompresní kraniektomii, kdy je odstraněna část klenby lební z důvodu nitrolební hypertenze. Nitrolební hypertenze se vyskytuje především po poranění hlavy, kdy dochází ke krvácení do mozku, nebo k poúrazovému hydrocefalu (patologicky zvýšené množství mozkomíšního moku), a dále pak u zánětlivých onemocnění mozku. Po odeznění otoku mozku, může být defekt uzavřen kranioplastikou. Defekty lebky vyžadující kranioplastiku mohou být způsobeny také různorodými traumaty hlavy, či operačním řešením některých vrozených vad a nádorů [22].

Kontraindikací kranioplastiky je přítomnost hydrocefalu, infekce a otok mozku. Doba mezi dekompresní kraniektomií a kranioplastikou tak bývá přibližně 3 až 6 měsíců, v případě infekce může tato doba trvat i déle [22].

2.4.2 Titanové implantáty

Titan je velmi reaktivní kov, který rychle na svém povrchu vytváří tenkou vrstvu oxidu titaničitého (TiO_2), který je příčinou vzájemné netečnosti materiálu a živé tkáně. Čistý titan je používán především v dentální implantátech, k ostatním účelům se používají spíše slitiny titanu a to díky jejich vyšší tvrdosti [13, 15].

Nejrozšířenější titanovou slitinou je Ti-6Al-4V (tzv. Titan Grade 5), která je biokompatibilní a ve zdravotnictví je používána především k výrobě implantátů. Jedná se o alfa-beta slitinu titanu (89 – 91 %), hliníku (5,5 – 6,5 %) a vanadu (3,5 – 4,5 %) [13]. Vyznačuje se vynikajícími mechanickými vlastnostmi a odolností proti korozi v kombinaci s nízkou hmotností. Typická je pro tuto slitinu vysoká houževnatost, spolehlivé únavové vlastnosti, odolnost proti opotřebení a relativně nízký modul pružnosti ($\approx 116 \text{ GPa}$). Tyto vlastnosti jsou výhodné pro spojení s kostí, protože čím více

se modul pružnosti kosti (≈ 15 GPa) a implantovaného materiálu přibližuje, tím lépe se přenáší silové zatížení [13, 24]. Lepší přenos zatížení mezi přilehlou kostí a implantátem pomáhá předcházet atrofii kosti [15].

2.5 Výroba individuálních implantátů technologií Selective Laser Melting

Tato kapitola je věnována přehledu současného stavu poznání v oblasti výroby individuálních implantátů technologií SLM z titanové slitiny.

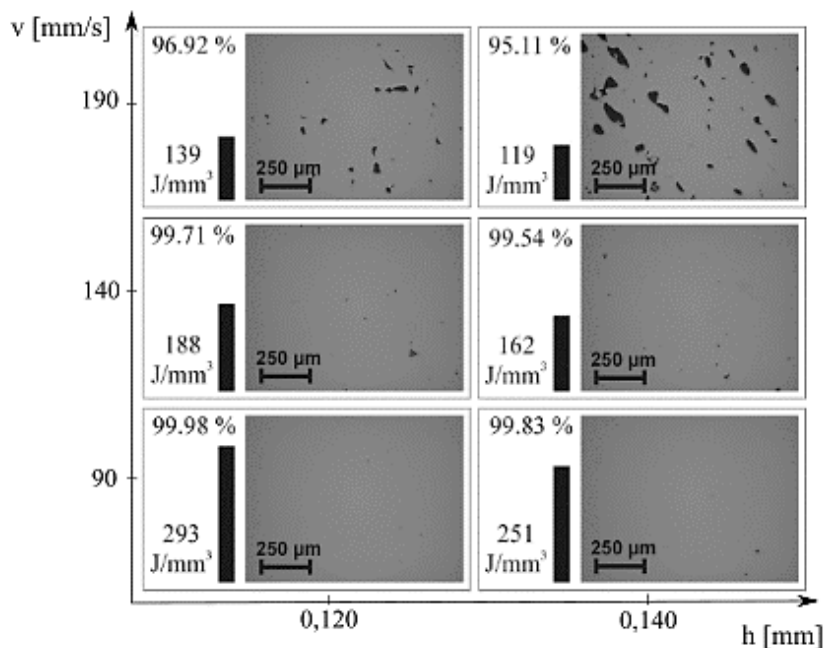
Abychom pomocí technologie SLM získali díl s požadovanými vlastnostmi, je třeba vhodně zvolit procesní parametry jako je například výkon laseru, rychlost laseru apod. Kromě toho je však třeba brát v úvahu i další aspekty, jako je například tvar a velikost vyráběného dílu a vlastnosti materiálu, se kterým pracujeme a podle toho vhodně zvolit umístění podpůrných struktur. V neposlední řadě záleží také na orientaci dílu vůči základové desce [7].

Výzkumem této inovační technologie a jejím použitím v biomedicínských aplikacích se zabývá mnoho studií. V této rešerši se budeme věnovat právě studiím a článkům na toto téma.

Vanderbroucke a kol. [25] se zabývá optimalizací procesu SLM pro dva biokompatibilní kovové materiály, Ti-6Al-4V a CoCrMo. Všechny zkušební vzorky byly v tomto případě tisknuty na zařízení *M3 Linear* německé firmy *Concept Laser GmbH*, které je vybaveno Nd:YAG laserem o výkonu 95 W s průměrem laserového paprsku 200 μm . Titanový prášek byl zpracováván v komoře se stálým průtokem argonu a obsahem kyslíku pod 0,1 %. Hlavními sledovanými parametry byl výkon laseru, tloušťka vrstvy prášku, rychlost laseru a vzdálenost sousedních drah laseru. Tyto čtyři parametry určují hustotu energie laserového paprsku, tedy energii působící na jednotku objemu. Tato veličina má vliv na hustotu výsledného produktu a můžeme ji vyjádřit vzorcem:

$$E_l = \frac{P}{v \cdot h \cdot t}, \quad (1)$$

kde E_l je laserová hustotní energie [J/mm^3], P je výkon laseru [W], v je rychlost laseru [mm/s], h představuje vzdálenost sousedních drah laseru [mm] a t je tloušťka vrstvy [mm].



Obr. 8: Výsledky studie parametrů pro Ti-6Al-4V [25]; upraveno

Na obrázku 8 je znázorněna závislost hustoty vyrobených dílů na parametrech tisku. Vyšší rychlost laseru a větší vzdálenost sousedních drah laseru vede k nižší hustotě energie, přičemž platí, že čím nižší hustota energie laseru, tím také nižší hustota výsledného dílu. Při hustotě energie 293 J/mm³ bylo dosaženo 99,98% hustoty produktu. Při použití nedostatečné hustoty energie nejsou částice prášku zcela roztaveny a vznikají tak póry. Naopak při použití vysoké hustoty energie dosahuje výrobek sice nejlepší hustoty, rapidně se však prodlužuje doba tisku. Z těchto pokusů byly proto stanoveny optimální parametry pro výrobu kvalitních dílů v přijatelném čase (viz Tab. 2).

Tab. 2: Optimalizované výrobní parametry pro materiál Ti-6Al-4V [25]

Teplota tavení [°C]	1650
Výkon laseru [W]	95
Tloušťka vrstvy [μm]	30
Rychlost laseru [mm/s]	125
Vzdálenost sousedních drah [μm]	130
Přesah [%]	35
Hustota energie [J/mm³]	195
Hustota výrobku [%]	> 99,8
Rychlost výroby [cm³/h]	1,8

Součástí studie je kromě optimalizace parametrů výroby, také testování mechanických vlastností vzorků, drsnosti povrchu vzorků a přesnosti technologie SLM.

S využitím optimalizovaných parametrů byly vyrobeny vzorky, u kterých byla následně pomocí Archimedova testu zjištěna hustota, dále byly na vzorcích provedeny tahové zkoušky k určení Youngova modulu pružnosti, meze pružnosti v tahu, meze pevnosti v tahu a prodloužení a nakonec byla změřena tvrdost podle Vickerse. Průměrné hodnoty z měření jsou shrnuty a porovnány s tabelovanými hodnotami v následující tabulce.

Tab. 3: Výsledky mechanických zkoušek na SLM vzorcích porovnané s tabelovanými hodnotami [25]

	SLM Ti-6Al-4V	Žíhaný Ti-6Al-4V	Úprava v roztoku (STA) Ti-6Al-4V
Hustota [g/cm³]	4,42	4,43	4,43
Youngův modul pružnosti [GPa]	94	110	110
Mez kluzu v tahu [MPa]	1125	920	1100
Mez pevnosti v tahu [MPa]	1250	1000	1200
Prodloužení při přetržení [%]	6	12	10
Tvrdost podle Vickerse [HV]	400	350	395

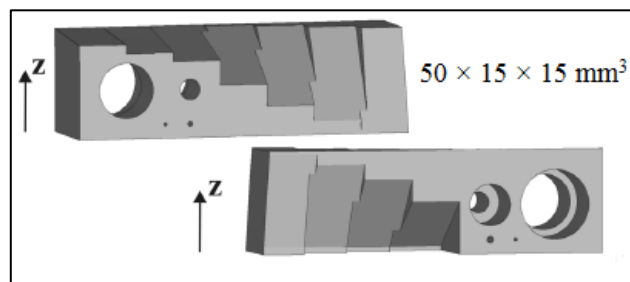
Podle této studie splňují díly vyrobené technologií SLM mechanické požadavky na výrobu. Výsledky (viz Tab. 3) z měření jsou velmi podobné tabelovaným hodnotám s výjimkou prodloužení při přetržení. U dílů vyrobených technologií SLM byla zjištěna nižší tažnost, což je podle výzkumného týmu způsobeno mírným křehnutím z důvodu tavení laserem. Tvrdost titanové slitiny se liší v závislosti na tepelném zpracování, u SLM vzorků je o něco vyšší kvůli velmi rychlému chladnutí materiálu po projití laserového paprsku.

Vzhledem k tomu, že drsnost povrchu postavených dílů je relativně vysoká, což může být pro některé aplikace nevhodné, byla v této studii [25] provedena také analýza vlivů ovlivňujících drsnost povrchu. Drsnost povrchu je závislá na tloušťce vrstvy prášku, úhlu sklonu k základní desce a na následném opracování povrchu. K analýze drsnosti povrchu byly vyrobeny tři krychle o hraně 12 mm, které se lišily povrchovým zpracováním. První byla bez následné úpravy povrchu, druhá byla ošetřena tryskáním skleněnými elementy a u třetí byl povrch ošetřen keramickými elementy za použití ultrazvuku. Pro každý vzorek byla měřena drsnost povrchu na horní ploše a dvou bočních plochách v několika směrech. Mezi drsností horní plochy a bočních ploch nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Po úpravě povrchu skleněnými kuličkami, případně keramikou je však patrný výrazný pokles drsnosti povrchu (viz Tab. 4).

Tab. 4: Drsnost povrchu testovacích dílů Ti-6Al-4V (různé dokončovací úpravy) [25]

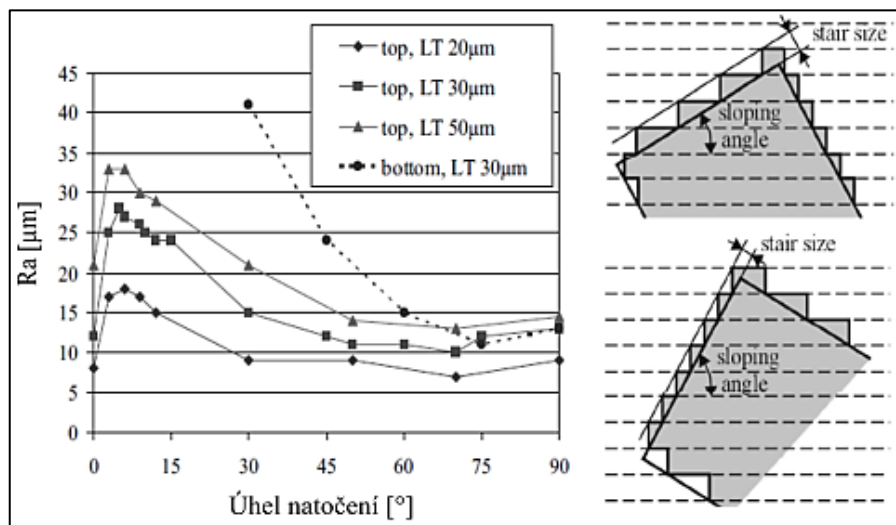
	Horní plocha	Boční plocha
SLM		
Ra	18	20
Rz	92	110
Tryskané		
Ra	12	13
Rz	70	81
Ultrazvuk		
Ra	10	11
Rz	45	64

K posouzení vlivu sklonu vůči platformě na drsnost povrchu byl vyroben testovací díl s různě nakloněnými plochami v rozsahu 0 – 90° z horní strany a 30 – 90° ze spodní strany (viz Obr. 9). Tyto díly byly postaveny ve třech provedeních, kdy se lišila tloušťka vrstvy prášku (20, 30 a 50 μm).



Obr. 9: Model k měření drsnosti povrchu při různém sklonu vůči platformě [25]

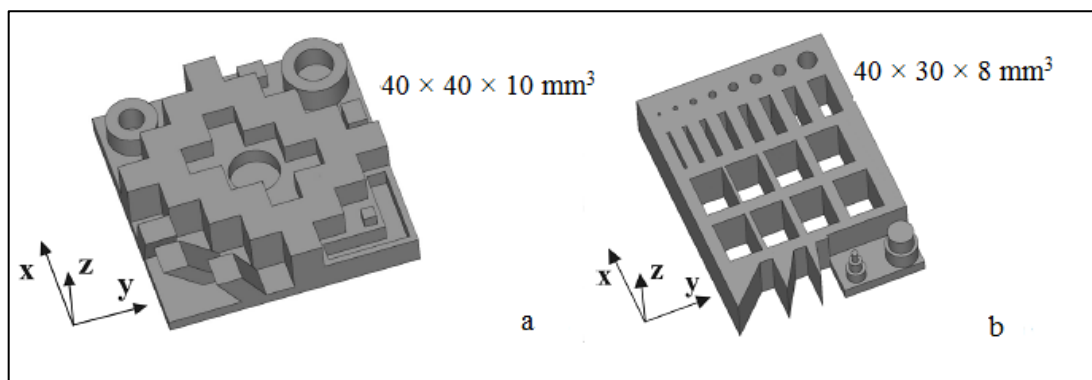
Na následujícím obrázku je znázorněn vliv úhlu plochy k platformě na drsnost povrchu. Drsnost by měla teoreticky úměrně klesat s hodnotou kosinu úhlu šikmé stěny.



Obr. 10: Vyhodnocení drsnosti povrchu [25]

Schodovitý efekt technologie SLM tak může být snížen vhodným umístěním dílu na platformu stroje. Při větším úhlu dochází k nanesení většího počtu vrstev, čímž se vytvoří více schodů s menší horní plochou a drsnost povrchu je tak nižší.

K testování procesního omezení, proveditelnosti a přesnosti technologie SLM byly navrženy dva testovací díly (viz Obr. 11).



Obr. 11: Zkušební díly pro testy procesních omezení [25]

Oba zkušební díly byly analyzovány pro zjištění přesnosti. První testovací díl (Obr. 11a) byl použit ke zjištění přesnosti stavby v osách X, Y a Z a k měření přesnosti válcových a šikmých prvků. Rovinná plocha o tloušťce 2 mm byla určena ke zjištění deformací v důsledku teplotního namáhání. Druhý testovací díl (Obr. 11b) byl určen k ověření přesnosti a rozlišení procesu. Na dílu se nacházejí malé otvory s kruhovým a obdélníkovým průřezem a tenké stěny o rozměrech 0,5 – 3 mm. Ostré hrany s úhlem 15 – 45° byly určeny k testování vlivu akumulace tepla ve špičce úhlu. Referenční geometrické tvary obou testovacích dílů byly třikrát změřeny dotykovou sondou na 3D NC souřadnicovém stroji. Nejmenší rozměry byly měřeny na optickém mikroměřicím stroji. Naměřené odchylky jsou zobrazeny v tabulce 5. K navrženým rozměrům jsou vztahovány jak absolutně (Abs.), tak relativně (Rel.), vždy v průměrné (Mean) a maximální hodnotě (Max).

Tab. 5: Odchylky rozměrů od návrhu zkušební dílu [25]

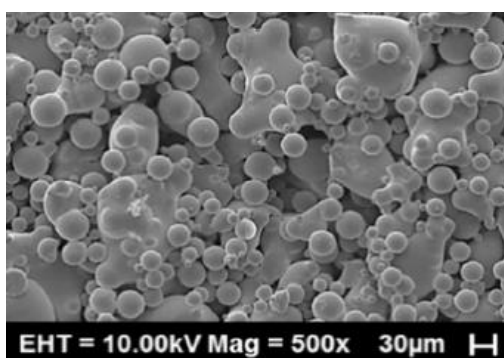
	Směr X		Směr Y		Směr Z		Průměry		Úhly	
	Mean	Max	Mean	Max	Mean	Max	Mean	Max	Mean	Max
Abs. [μm]	15	36	17	30	11	21	24	36	0,51°	1,33°
Rel. [%]	0,25	0,97	0,30	1,40	0,21	0,52	0,38	0,90	-	-

Naměřená přesnost splňuje požadavky většiny biomedicínských aplikací. Všechny detaily vzorku znázorněné na Obr. 11 byly vytvořeny s vysokou přesností, s výjimkou otvoru o průměru 0,5 mm, kde okolní teplo natavilo i sypký prášek uvnitř otvoru.

Mezi vlastnosti titanového implantátu vyrobeného AM technologií z kovového prášku patří vysoká pevnost, nízká hmotnost, vysoká korozivzdornost, dobrá biokompatibilita, nízká teplotní roztažnost a dobrá obrobiteľnosť [25].

Studie [26] se zabývala vlastnostmi dílů z titanové slitiny Ti-6Al-4V vyrobených technologií SLM pro biomedicínské aplikace. V této studii byly porovnávány 3 typy vzorků - neupravené vzorky vyrobené technologií SLM, mechanicky leštěné vzorky vyrobené technologií SLM a mechanicky leštěné vzorky vyrobené konvenčními technologiemi. Konkrétně bylo testováno chemické složení povrchu vzorků, drsnost povrchu a jeho morfologie a nakonec bylo provedeno testování cytotoxicity.

Vzorky byly vyrobeny pomocí zařízení *Renishaw AM250* v inertní atmosféře argonu. Chemické složení bylo zjišťováno pomocí XPS analýzy. Složení povrchu neupraveného vzorku bylo dle [26] signifikantně odlišné od vzorku vyrobeného konvenčními metodami. Na všech vzorcích byly detekovány prvky C, N, O, Ti a Al. Na leštěných vzorcích byl pozorován slabý signál vanadu (0,3 %), u neleštěných vzorků byl však obsah vanadu zcela nulový. Zatímco na neupraveném vzorku se tedy nacházely pouze oxidy titanu a hliníku, na leštěných vzorcích se nacházely i oxidy vanadu. Podle [26] může být však výsledek XPS analýzy ovlivněn drsností povrchu. Na povrchu neupravených SLM vzorků byly pozorovány částečně roztavené částice (viz Obr. 12).



Obr. 12: Snímek ze SEM neupraveného povrchu dílu Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM [26]

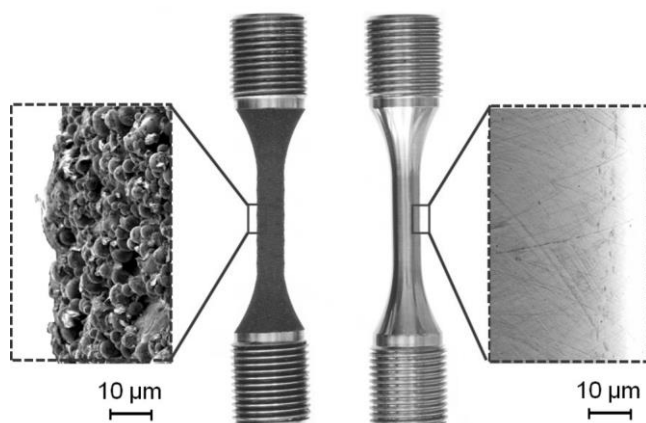
Pozorovaná drsnost povrchu (R_a) měřená pomocí plošného profilometru byla u neupraveného vzorku $17,6 \pm 3,7$ μm . Přítomnost částečně roztavených částic na povrchu dílů je u technologie SLM zcela běžná. Tyto částice lze odstranit povrchovými

úpravami (broušením, leštěním apod.). Mezi faktory ovlivňující drsnost povrchu dílu vyrobeného technologií SLM lze zařadit natočení dílu vůči základové desce, použitý materiál, velikost částic prášku, tloušťku vrstvy, výkon laseru, parametry a strategii výroby.

Dále bylo provedeno testování cytotoxicity. Použitými buňkami byly myší fibroblasty 3T3. Při zkoušce cytotoxicity extraktů po 24 a 72 hodinách byl použit LDH test. Buňky vystavené působení extraktu upraveného i neupraveného vzorku dosahovaly srovnatelné životaschopnosti jako buňky negativní kontroly. Proliferace buněk rostoucích přímo na povrchu vzorků byla testována po jednom, pěti a sedmi dnech za použití testu PrestoBlue. Ani zde nebyly prokázány jakékoli účinky materiálu vyrobeného technologií SLM na buňky 3T3. Buňky rostly srovnatelně jak na leštěných vzorcích, tak i na vzorcích bez jakékoli úpravy. Úprava vzorků v tomto případě neměla vliv na buněčnou proliferaci [26].

Vědecký tým z Německa [27] se zabýval mechanickými vlastnostmi titanové slitiny Ti-6Al-4V vyrobené technologií SLM. Všechny zkušební vzorky byly vyrobeny pomocí zařízení *Concept Laser M2 (LaserCusing®)*. Zkušební tyče byly vyráběny vertikálně s jejich hlavní osou a výroba probíhala v inertní atmosféře argonu. V tomto případě byla použita tloušťka vrstvy 40 μm .

Tahové zkoušky byly provedeny jak na neupravených zkušebních tyčích, tak i na tyčích, které byly po výrobě obrobeny (viz Obr. 13).



Obr. 13: Zkušební tyče pro zkoušku tahem - neupravená (vlevo), obrobená (vpravo) [27]

Výsledné mechanické vlastnosti neupravených a obrobených tyčí vyrobených technologií SLM byly porovnány s konvenčně vyrobeným materiálem. Navíc byl sledován i vliv tepelného zpracování vzorků na mechanické vlastnosti. U obrobených

vzorků byly porovnány tři různé tepelné úpravy - žíhání při 700°C po dobu 1 hodiny, žíhání při 900°C po dobu 2 hodin a tzv. izostatické lisování za tepla (HIP) při teplotě 900°C a tlaku 100 MPa po dobu 2 hodin v atmosféře argonu. Výsledné hodnoty ze zkoušek tahem jsou zobrazeny v následující tabulce [27].

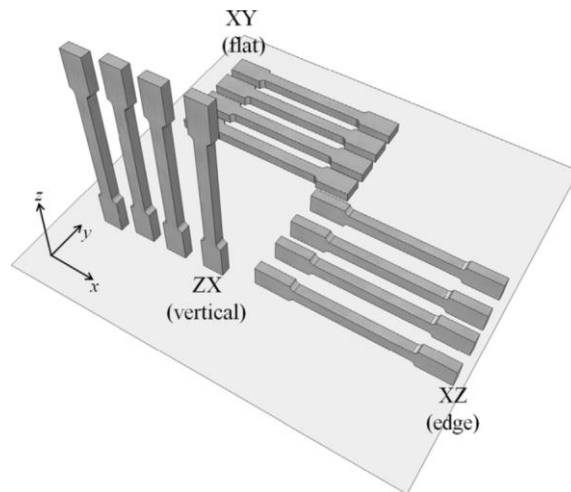
Tab. 6: Porovnání mechanických vlastností různě upravených vzorků Ti-6Al-4V [27]

Ti-6Al-4V	E [GPa]	Rp_{0,2} [MPa]	Rm [MPa]	A [%]
Reference	112,8	922	984	19,3
SLM, Neupraveno	109,9	736	1051	11,9
SLM, Obrobena	112,4	986	1155	10,9
<i>Tepelné zpracování, obrobena</i>				
SLM, žíhání 700°C	117,4	1051	1115	11,3
SLM, žíhání 900°C	118,8	908	988	9,5
SLM, HIP	115,4	885	973	19,0

Mez pevnosti zkušebních těles vyrobených technologií SLM bez tepelného zpracování je vyšší ve srovnání s tepelně zpracovanými tělesy, zatímco tažnost je u tepelně neupravených vzorků nižší. Lepších mechanických vlastností tak dosahují tělesa tepelně zpracovaná [27].

Mechanické vlastnosti dílů vyrobených technologií SLM zkoumala také studie [28]. Zkušební tyče byly vyrobeny na zařízení *EOSINT M280 (EOS GmbH)*. Testovaným materiálem byla opět titanová slitina Ti-6Al-4V. Tahové zkoušky se uskutečnily na zařízení *Instron 1342*. Pro porovnání byly některé vzorky vyrobené technologií SLM následně tepelně zpracovány žíháním (650°C, 3 hodiny). U neupraveného zkušebního tělesa byla pozorována mez pevnosti 1265 MPa a prodloužení při přetržení 9,4 %. U žíhaného tělesa byla pozorována nižší mez pevnosti, konkrétně 1170 MPa, zatímco tažnost se zvýšila na 10,9 %. Tyto výsledky vyhovují mezinárodním standardům pro biomedicínské aplikace [28].

Studie [29] rovněž zkoumala mechanické vlastnosti titanové slitiny Ti-6Al-4V vyrobené technologií SLM. Zaměřila se však především na vliv orientace dílu při výrobním procesu na tyto vlastnosti. Pro zkoušky tahem byly proto zhotoveny vzorky stavěné ve třech odlišných orientacích na základové desce (viz Obr. 14).



Obr. 14: Ukázka orientace zkušebních tyčí (tzv. psí kostí) při tisku - na ploše (XY), na hraně (XZ), vertikálně (ZX) [29]

Všechny vzorky byly vyrobeny na SLM zařízení *Renishaw AM250*. Jedna skupina vzorků nebyla po vytištění nijak upravena a druhá skupina byla tepelně zpracována žíháním při 730°C po dobu 2 hodin v atmosféře N₂. Obě skupiny zkušebních tyčí byly následně mechanicky leštěny. Před zkouškou tahem byla změřena drsnost povrchu vzorků (*Ra*). U neupravených vzorků dosahovala drsnost na laterální ploše 28,587 μm a na horní ploše 6,834 μm. U vzorků upravených leštěním byla naměřená drsnost 0,395 μm. Z výsledků tahových zkoušek vyplývá, že orientace stavěných dílů při tisku ovlivňuje mechanické vlastnosti výsledného dílu, především jeho tažnost. Tyče orientované při tisku na hraně vykazovaly v tomto případě nejlepších mechanických vlastností a velkého prodloužení při přetržení. Naopak nejhorších mechanických vlastností dosahovaly tyče tisknuté na ploše, které se již během tisku v důsledku teplotního namáhání zdeformovaly. Opět bylo prokázáno, že žíhané vzorky dosahují nižší meze pevnosti, ale zároveň většího prodloužení při přetržení než vzorky tepelně neošetřené [29].

3 Výzkumná část

Výzkumná část práce se zabývá testováním a hodnocením vlastností dílů vyrobených technologií SLM s ohledem na možné využití této technologie k výrobě individuálních implantátů, především pak kraniálních implantátů po dekompresní kraniektomii. Testována je v této práci cytotoxicita dílů vyrobených technologií SLM, drsnost jejich povrchu a také mechanické a chemické vlastnosti. Součástí práce je také hodnocení geometrické přesnosti technologie.

3.1 Použité materiály a metody

V této kapitole jsou popsány materiály a metody použité ve výzkumné části práce, tedy k testování a hodnocení vlastností dílů vyrobených technologií SLM.

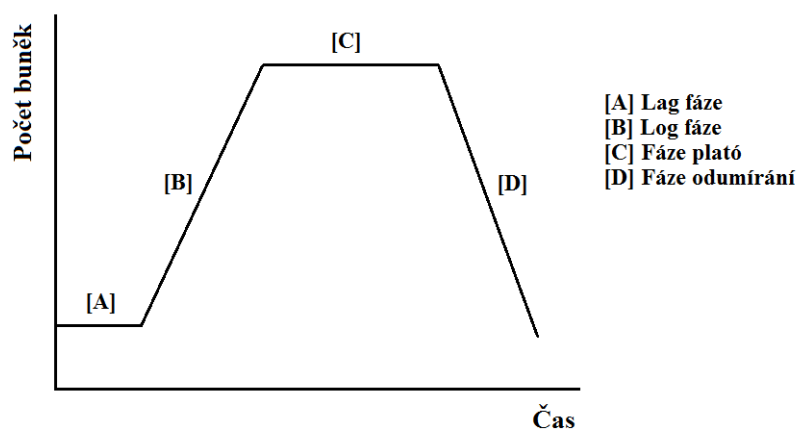
3.1.1 Kultivace buněk *in vitro*

Cílem experimentů *in vitro* (ve zkumavce) je co nejvíce napodobit podmínky v organismu. Jako primární kulturu označujeme první kulturu izolovaných buněk z laboratorního zvířete nebo z člověka. Primární kultura může pocházet jak ze zdravé tkáně, tyto buňky však mají omezenou životnost, tak i z tkáně nádorové, u které je kultivace mnohem snazší a dochází zde k rychlé a neomezené proliferaci (dělení buněk). Po získání primární kultury probíhá množení buněk a jejich tzv. pasážování - tedy naředění a přenesení do nových kultivačních nádob, čímž vzniká sekundární kultura (subkultura). Při pasážování je třeba adherentní buňky nejprve uvolnit od kultivačního povrchu i od sebe navzájem pomocí trypsinu a následně přenést do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem [30].

Buněčné kultury rozdělujeme na adherentní a v suspenzi. Adherentní buněčné kultury rostou na vhodném kultivačním povrchu, nejčastěji na dně polystyrenové kultivační nádoby s hydrofilním povrchem. U buněčných kultur pěstovaných v suspenzi (např. krevní buňky) je naopak snaha o promíchávání kultury [30].

Růst buněčné kultury můžeme rozdělit do 4 fází - statická fáze, exponenciální fáze, stacionární fáze a fáze odumírání (viz Obr. 15). Během statické fáze (lag fáze) probíhá příprava na buněčné dělení, následuje exponenciální (log) fáze, při níž dochází k intenzivnímu množení buněk. Po vyčerpání živin nastává stacionární fáze (plató), kdy

se počet buněk nemění, akumulují se však toxické produkty, což vede nakonec k odumírání buněk [30].



Obr. 15: Růstová křivka buněčné kultury [30]; upraveno

Při kultivaci *in vitro* je snaha o udržení log fáze, před dosažením plató fáze se provádí pasážování, tedy naředění na takové množství, aby kultura opět rostla. Stav, kdy je vytvořena souvislá vrstva buněk, které se vzájemně dotýkají, nazýváme konfluenci [30].

Abychom co nejvíce napodobili prostředí organismu, je třeba dodržovat určité kultivační podmínky. Povrch kultivační nádoby musí být hydrofilní a netoxický, dále je třeba vhodně zvolit složení kultivačního média a regulovat teplotu a složení atmosféry. Kultivace probíhá standardně v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% koncentraci CO₂, což odpovídá poměrům v extracelulární tekutině [30].

Při práci s buněčnými kulturami, je třeba dodržovat určité zásady pro ochranu proti kontaminaci. Všechny roztoky, laboratorní sklo i jednorázové prostředky musí být sterilní a všechny postupy se provádí za aseptických podmínek ve sterilním prostředí laminárního boxu (třídy Biohazard) [30].

V tomto experimentu byl použit laminární box *Telstar Bio II Advance*.

3.1.2 Použitá média a chemikálie

Kultivační médium tvoří vrstvu nad adherovanými buňkami. Minimum Essential Medium (dále jen „MEM“) je základní médium pro růst buněčných linií. Médium obsahuje anorganické soli, pufrý, glukózu, esenciální aminokyseliny, vitaminy, bílkoviny, růstové faktory, mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky. Pro doplnění významných organických látek, jako jsou růstové faktory, bílkoviny, vitaminy a stopové

prvky, je vhodné přidat fetální bovinní sérum (FBS). Dále je možné přidat neesenciální aminokyseliny (NEAA) a L-Glutamin pro podporu růstu buněk a také směs antibiotik a antimykotik (penicilin, streptomycin, amfotericin B) pro zabránění kontaminace. Kompletní médium (87 % MEM, 10 % inaktivovaného FBS, 1 % antibiotik, 1 % L-Glutaminu a 1 % NEAA) je potřeba po smíchání všech jeho složek přefiltrovat přes 0,2 µm filtr kvůli případné kontaminaci. Médium obsahuje navíc acidobazický indikátor, který je jasně červený při pH 7,2 – 7,4. Při vyšším pH je barva do fialova a naopak při nízkém pH se barva mění do žluta. Jelikož buňky vylučují kyselé metabolity, médium postupně žloutne a je nutné ho 2× – 3× týdně obměňovat [30].

Trypsin (Lonza) je enzym (proteáza) používaný k uvolnění adherentních buněk od kultivačního povrchu i od sebe navzájem [30].

Trypanová modř je barvivo, které difunduje přes plazmatickou membránu buněk do intracelulárního prostoru. Ze živých buněk je však rychle transportováno opět ven. Toto barvivo se používá pro stanovení viability a absolutního počtu buněk [31].

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromid) je žlutý, ve vodě rozpustný roztok používaný při testování životaschopnosti (viability) buněk pomocí MTT testu [32].

Okyselený isopropanol je používaný k rozpuštění krystalů formazanu při MTT testu. Okyselený isopropanol se připravuje smícháním 50 ml isopropanolu (IPA) a 20 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové (35% HCl) [31].

Roztok PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) je fyziologický roztok pufrovaný fosfátem. Používá se k oplachům buněk při zachování pH ~ 7,4 [31].

Glutaraldehyd je chemikálie používaná pro zafixování buněk v dané pozici pro detekci například elektronovou nebo fluorescenční mikroskopií. Při fixaci v glutaraldehydu je zachována struktura buňky i intracelulární detaily. Vzorky se fixují v pufrovaném glutaraldehydu (2,5% glutaraldehyd v PBS) po dobu 15 minut v lednici [31].

Vzestupná ethanolová řada (60, 70, 80, 90, 96, 100 %) se používá pro odvodnění buněk. Postupně se buňky proplachují ethanolem od nejnižší po nejvyšší koncentraci. Přičemž každá koncentrace se nechává působit po dobu 10 minut [31].

Roztok DAPI je fluorescenční barvivo (fluorochrom), které se používá k barvení jader buněk (váže se na jadernou DNA). Barvivo se nechává působit po dobu 5 minut a takto obarvené vzorky je vhodné před samotnou mikroskopií uchovávat ve tmě. Při fluorescenční mikroskopii jádra buněk obarvených fluorochromem DAPI svítí modře.

Triton X-100 je chemická látka určená k lýze (rozkladu) buněk. Médium s Tritonem X-100 (1 %) je používáno u pozitivních kontrol při testování cytotoxicity [31].

3.1.3 Buněčná linie MG-63

MG-63 je nádorová buněčná linie z lidského osteosarkomu. Jedná se o adherentní buněčnou kulturu, která je podobná lidským osteoblastům a je tak často používána při testování cytotoxicity materiálů v kostním inženýrství [33]. Podobně jako lidské osteoblasty dosahují i buňky MG-63 velikosti 15 – 30 μm , jsou jednojaderné a s okolím komunikují výběžky [11].

Buňky MG-63 (ATCC) byly kultivovány v kompletním médiu v inkubátoru (5% CO_2 , 37°C). Počet buněk byl určen pomocí automatického počítáče buněk *LunaTM* od společnosti *Logos Biosystems*.

3.1.4 MTT test

MTT test je založen na měření viability buněk prostřednictvím jejich metabolické aktivity. Žlutý, ve vodě rozpustný roztok MTT je viabilními buňkami metabolicky redukován na modrofialový nerozpustný formazan. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny v okyseleném isopropanolu. Zabarvený roztok je přepipetován do čistých jamek a na spektrofotometru je měřena absorbance při 570 nm a referenční vlnové délce 650 nm. Výslednou absorbanci vzorků tak získáme jako rozdíl absorbancí při 570 a 650 nm. Absorbance je bezrozměrná veličina, která udává, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem. Hodnota absorbance roztoku odpovídá viabilitě buněk [32].

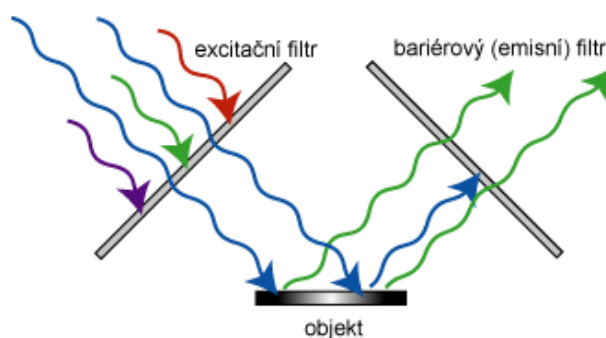
Pro měření absorbance v tomto experimentu byl použit spektrofotometrický analyzátor *BioTek ELx808* (viz Příloha A) s nastavenou vlnovou délkou 570 a 650 nm. Konečná absorbance byla vypočtena jako rozdíl mezi absorbancí při 570 nm a při referenční vlnové délce 650 nm.

3.1.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je fyzikální jev, při kterém molekuly některých látek absorbují světelné záření o určité vlnové délce (excitace) a část takto získané energie opět vyzáří (emise) v podobě záření o nižší energii, tedy delší vlnové délce a jiné barvě [34].

Fluorescenční mikroskopie se velmi často používá k zobrazení struktury buněk, k určení počtu buněk nebo k určení poměru mezi živými a mrtvými buňkami. Ke zviditelnění molekul a buněk, které nemají autofluorescenci se používá fluorescenční barvení. Fluorescenční barviva (fluorochromy) se samy vážou na konkrétní buněčné struktury (např. DAPI na DNA). Barva (vlnová délka) excitovaného i emitovaného světla závisí na vlastnostech právě fluorochromu [35].

Fluorescenční mikroskop je podobný optickému mikroskopu, je však doplněný o silný zdroj světla a dva typy filtrů - excitační a bariérový. Excitační filtr se nachází mezi zdrojem světla a vzorkem a slouží k excitaci fluorochromu světlem o vybrané vlnové délce. Díky bariérovému (emisnímu) filtru, který je umístěn mezi vzorkem a okulárem, je odfiltrováno excitující záření a do okuláru tak proniká pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí [34, 35]. Na následujícím obrázku je znázorněn princip filtrů u fluorescenční mikroskopie.



Obr. 16: Princip excitačního a bariérového filtru [34]

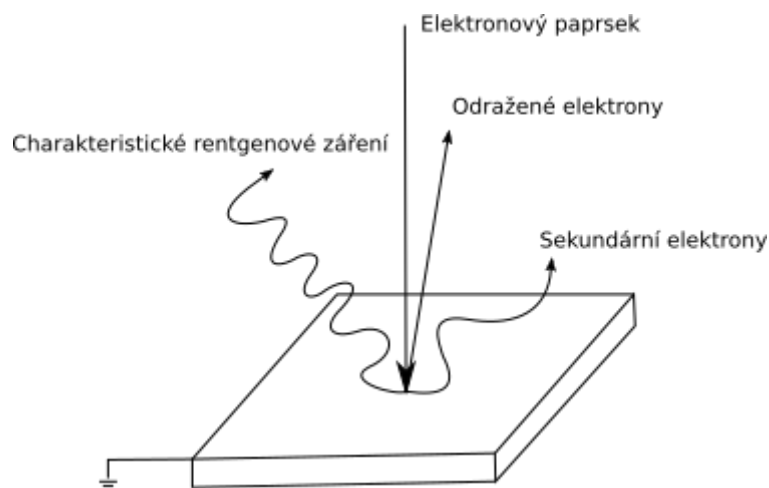
V tomto experimentu byl použit fluorescenční mikroskop *Nikon ECLIPSE Ti-E/B* (viz Příloha A) se světelným zdrojem *X - Cite® 120Q, Lumen Dynamics*.

3.1.6 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) slouží k zobrazení povrchu vzorku a je důležitým prostředkem k materiálovému výzkumu. Pracuje s úzkým elektronovým paprskem a díky tomu dosahuje mnohem vyšší rozlišovací schopnosti a tím i efektivního zvětšení (až 1 000 000×) než světelný mikroskop. Mezní rozlišovací schopnost je totiž úměrná vlnové délce použitého záření a elektrony mají podstatně kratší vlnovou délku než viditelné světlo. Elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku v jakémsi

neviditelném rastru a výsledný obraz se vytváří postupným skenováním. Z tohoto důvodu je SEM někdy označován také jako „rastrovací elektronový mikroskop“ [36].

K vytváření obrazu jsou využívány od povrchu zpětně odražené elektrony a sekundární elektrony (viz Obr. 17), vzniklé interakcí atomů vzorku s elektrony elektronového paprsku. Tyto elektrony jsou přijímány detektorem a zpracovány tak, že získáme ostrý obraz povrchu vzorku [36, 37].



Obr. 17: Interakce elektronového paprsku s povrchem vzorku; upraveno [37]

V evakuovaném válci jsou z wolframového vlákna (katody) emitovány elektrony. Emitované elektrony jsou fokusovány Wehneltovým válcem a urychlovány kruhovou anodou. Urychlovací napětí elektronů je nejčastěji 0,1 – 30 kV. Mezi katodou a anodou se nachází místo překřížení drah elektronů a pod ním se nachází cívky vyvolávající magnetické pole (tzv. kondenzátorové čočky), které usměrňují elektronový paprsek. Pak paprsek prochází clonou tvořenou tenkým plíškem s otvorem uprostřed a na konci válce je umístěn objektiv. Objektivová čočka obsahuje vychylovací cívky, které zajistí, že elektrony dopadnou vždy na velmi malou plochu povrchu vzorku a tedy, že povrch je zkoumán postupně bod po bodu a řádek po řádku (tzv. rastrován) [13, 36].

Vzorky, které chceme zobrazit pomocí SEM, musí být elektricky vodivé. Nevodivé materiály se pokrývají vrstvou vhodného kovu nebo uhlíku, čímž se zajistí odvod elektrického náboje. Vrstva kovu musí být dostatečně silná, aby zajistila dobrou vodivost i na velmi reliéfním vzorku, ale zároveň aby nezkreslila tvar vzorku [36, 37]. K mikroskopu je také možné připojit zařízení k analýze chemického složení tzv. EDS analyzátor [36].

Skenovací elektronová mikroskopie byla použita k pozorování morfologie buněk a jejich adheze na povrchu titanových vzorků. Analýza byla provedena na přístroji *VEGA3 SB – Easy Probe* od společnosti *TESCAN* (viz Příloha A). Vzorky byly kvůli vodivosti pozlaceny pomocí přístroje *Quorum Q150R ES*.

3.1.7 Energiově disperzní spektroskopie

Díky energiově disperzní spektroskopii (tzv. EDS analýze) je možné zjistit jaké prvky a v jakém množství se ve vzorku nacházejí. EDS analyzátor se používá jako přídatné zařízení ke skenovacímu elektronovému mikroskopu a slouží k detekci charakteristického rentgenového záření, které rovněž vzniká interakcí elektronů elektronového paprsku s atomy vzorku (viz Obr. 17 v kap. 3.1.6). Rentgenové záření se dělí na spojité brzdné záření a záření charakteristické pro určité prvky. Brzdné záření vzniká zbrzděním primárních elektronů ve vzorku, zatímco charakteristické rentgenové záření vzniká, pokud jsou primárními elektrony vyraženy jednotlivé elektrony vnitřních slupek atomu. Tyto elektrony jsou následně nahrazeny elektrony z vyšších energetických hladin a rozdílová energie je vyzářena ve formě rentgenového záření. Tato energie je charakteristická pro každý prvek [36, 38].

Na záznamu z EDS analýzy se pak brzdné záření podílí na spojitém pozadí a charakteristické záření prvků obsažených ve vzorku tvoří tzv. *peaky* (špičky). Výstupem analýzy EDS je tedy spektrum četnosti rentgenového signálu, kde každý *peak* ve spektru odpovídá konkrétnímu prvku a jeho výška je úměrná koncentraci tohoto prvku ve vzorku [36, 38].

K analýze chemického složení byl použit EDS analyzátor připojený ke skenovacímu elektronovému mikroskopu *VEGA3 SB – Easy Probe TESCOAN*.

3.1.8 Optická mikroskopie

Optická (světelná) mikroskopie je jednoduchá zobrazovací metoda používaná v mnoha oborech. Slouží k zobrazení a hlavně zvětšení širokého spektra materiálů a látek. K zobrazení se používá viditelná část elektromagnetického spektra. Světelný mikroskop umožňuje zvětšit obraz vzorku až tisíckrát. Rozlišovací schopností mikroskopu se rozumí vzdálenost dvou bodů, které mikroskop ještě zobrazí jako dva samostatné body. V případě optického mikroskopu je to až 0,2 μm . Optický mikroskop se skládá

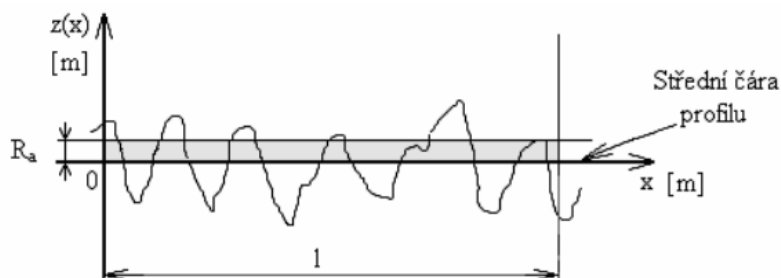
z osvětlovací části, kterou tvoří zdroj světla, kondenzor a clona, dále pak z mechanické části, jíž tvoří podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem a nakonec z optické soustavy, tedy objektivů a okulárů [39].

K pořizování snímků a sledování buněk v okolí vzorků byl použit optický mikroskop *Nikon ECLIPSE Ti-E/B* (viz Příloha A).

3.1.9 Kontaktní profilometrie

Profilometrie je jeden ze způsobů analýzy morfologie povrchu. Profilometr je přístroj určený k měření profilu povrchu, ke zjištění drsnosti povrchu, tvaru struktury, atd. Profilometr může pracovat na mechanickém nebo optickém principu. U mechanické profilometrie dochází k přímému kontaktu stylusu (hrotu) se vzorkem. Důležité je nastavení přitlačné síly, která se udává v mg a nejčastěji se pohybuje v rozmezí od 1 mg do 50 mg. Vyšší přitlačná síla tak může eliminovat vliv nečistot na výsledky měření, neúměrně vysoká síla však může naopak způsobit mechanické poškození vzorku. Rozlišení metody závisí na rozměrech použitého stylusu a nastavených parametrech měření. Při měření drsnosti povrchu na kontaktním profilometru se stylus pohybuje po povrchu vzorku, vychyluje se ve vertikálním směru podle nerovností povrchu a tyto nerovnosti tím snímá. Princip snímání je založen na feritovém magnetu, který důsledkem vychylování stylusu zajíždí do cívky a mění tak indukčnost [7, 40].

Drsností povrchu rozumíme odchylky od střední čáry profilu, která je volena tak, aby součet odchylek (nerovností) byl nulový. Všechny parametry nerovnosti se pak vztahují k této střední čáře. Drsnost povrchu je nejčastěji posuzována dle střední aritmetické úchyly R_a , která je podle normy ČSN EN ISO 4287 definována jako aritmetický průměr absolutních hodnot souřadnic $Z(x)$ v rozsahu základní délky [7, 40]. Na následujícím obrázku je znázorněn způsob určení střední aritmetické úchyly R_a .



Obr. 18: Znázornění parametru R_a [7]

Pro analýzu drsnosti povrchu vzorků v tomto experimentu byl použit hrotový profilometr *Dektak XT* od firmy *Bruker* (viz Příloha A).

3.1.10 Zkouška tahem

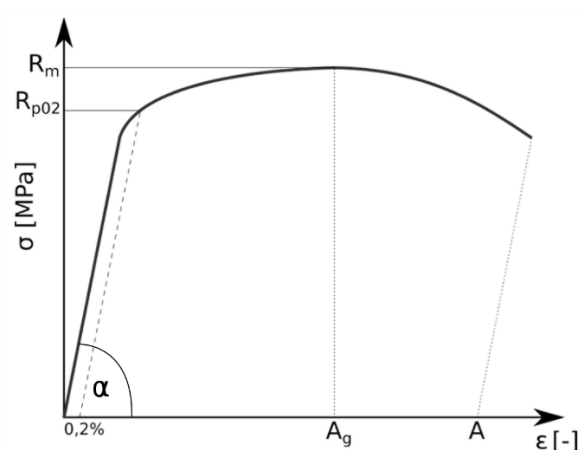
Zkouška tahem je jednou z nejčastěji používaných zkoušek mechanických vlastností. Spočívá v jednoosém tahovém zatížení zkušební tělesa vzrůstající silou většinou až do přetržení na dvě části s cílem zjistit pevnostní a plastické vlastnosti materiálu. Zkušební těleso má normovaný tvar a rozměry a upevňuje se mezi upínací čelisti zařízení. Během zkoušky je měřeno zatížení působící na zkušební těleso a jeho prodloužení pomocí extenzometru. Výstupem zkoušky je tzv. pracovní diagram, tedy závislost absolutního prodloužení Δl na zátěžné síle F . V praxi se však provádí přepočet na tzv. smluvní hodnoty a výstupem je pak smluvní diagram závislosti poměrné deformace ε na inženýrském napětí σ . Přepočet na smluvní hodnoty se provádí podle následujících vztahů:

$$\sigma = \frac{F}{S_0}, \quad (2)$$

kde F je zátěžná síla a S_0 je počáteční průřez zkušební tyče,

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} (\cdot 100), \quad (3)$$

kde Δl je prodloužení zkušební tyče a l_0 její počáteční délka [7, 41]. Typický smluvní diagram je znázorněn na Obr. 19.



Obr. 19: Smluvní diagram [41]; upraveno

Z provedené zkoušky se vyhodnocují napět'ové charakteristiky (mez kluzu a mez pevnosti) a deformační charakteristiky (tažnost a případně také kontrakce).

Mez kluzu v tahu je napětí, při kterém dochází k prvním trvalým deformacím zkušební tyče. Jedná se o přechod od elastických k plastickým deformacím. U převážné většiny materiálů je tento přechod relativně plynulý a je definován napětím, při kterém plastická deformace dosáhne předepsané hodnoty vyjádřené v procentech počáteční délky. V těchto případech mluvíme o smluvní mezi kluzu ($Rp_{0,2}$). Smluvní mez kluzu je tedy napětí, které způsobí trvalou deformaci o velikosti 0,2 % z l_0 [7, 41].

Mez pevnosti v tahu je smluvní napětí, odpovídající největšímu zatížení, které předchází porušení tyče. Youngův modul pružnosti je tuhost materiálu v lineární části a lze jej vyjádřit vztahem:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} . \quad (4)$$

Graficky lze Youngův modul interpretovat jako směrnici rovnice přímky vedené k tečně křivky, sestavené ze záznamu tahové zkoušky, z počátku souřadného systému (viz Obr. 19):

$$E = tg \alpha . \quad (5)$$

Tažnost na maximálním napětí A_g je poměrná podélná trvalá deformace vyjádřená v procentech. Dále se vyhodnocuje prodloužení při přetržení A vyjádřené rovněž v procentech [7, 41].

Zkoušky tahem probíhaly v tomto experimentu na univerzálním trhacím stroji *TIRA* (viz Příloha A) vybaveném mechanickým extenzometrem *EPSILON TECH 3542*, který měří protažení zkušebního tělesa v průběhu tahové zkoušky.

3.1.11 3D optické skenování

Optické 3D skenery pracují na bezkontaktním principu. Na základě odraženého záření od skenovaného objektu počítají 3D souřadnice bodu. Aktivní optické 3D skenery mají zdroj určitého druhu záření a odpovídající přijímač. Tímto zářením může být buď elektromagnetické záření určité vlnové délky (viditelné světlo, laser, rentgen), nebo zvukové vlny (ultrazvuk). Pasivní optické skenery žádný zdroj záření nemají a využívají pouze odraz paprsků přirozeného záření okolního světla [42].

Aktivní optický 3D skener je tvořen projektorem, dvěma kamerami s CCD čipem a řídicí jednotkou. Každý nakonfigurovaný senzor definuje ve směru skenování 3D oblast, v níž lze měřený objekt skenovat - tzv. měřicí objem. Aktivní optické skenery mohou používat různé metody pro výpočet prostorové souřadnice bodu. Nejčastěji jsou však založeny na principech optické triangulace, fotogrammetrii a metodě „Fringe Projection“. Zdroj světla spolu se snímačem a osvětleným bodem na zkoumaném objektu tvoří tzv. triangulační trojúhelník. Metoda „Fringe Projection“ je založena na promítání vzorů proužků na měřený objekt projektorem skeneru, tyto proužky jsou pak snímány dvěma kamerami s CCD čipem. Pro zpřesnění se před samotným skenováním na povrch objektu nanáší matnicí prášky. Automatické složení jednotlivých záběrů do jednoho celku je zajištěno pomocí referenčních značek, které se umísťují přímo na měřený objekt, případně do jeho okolí (měřicí stůl, upínací přípravek apod.). Objekt se snímá postupně a pootočení je vždy takové, aby byly nasnímány minimálně tři referenční značky z předchozího snímku. Software následně zachycené obrazy zpracuje a vypočítá prostorové souřadnice jednotlivých bodů v prostoru [42].

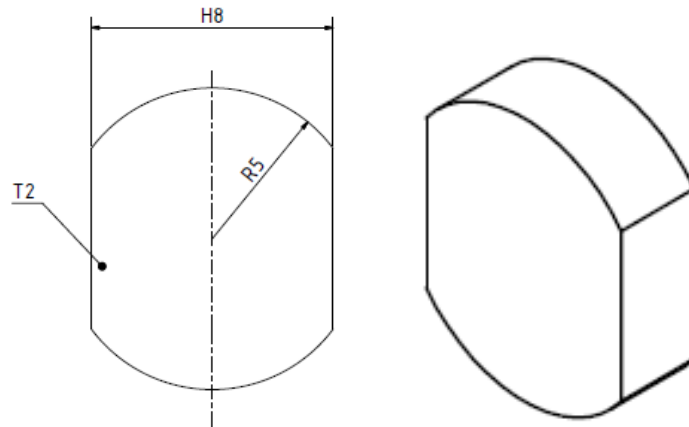
V každém obraze může být dle rozlišení CCD čipu stovky až miliony změřených bodů na povrchu součásti. Optická digitalizace nachází díky své vysoké přesnosti uplatnění především při komplexních kontrolách rozměrové a tvarové přesnosti vyrobených dílů, kdy je naskenovaný objekt srovnáván s CAD modelem. Zda je daný naskenovaný díl vyroben přesně podle CAD dat zjistíme pomocí barevné mapy odchylek. Z takové analýzy lze vyčíst, zda je výrobek vyroben v dané toleranci, případně lze takto určit problematické oblasti [42].

K ověření geometrické přesnosti vzorků byl použit optický 3D skener *Atos II* od firmy *GOM* (viz Příloha A).

3.2 Návrh a výroba vzorků

Výroba laboratorních vzorků probíhala v Laboratoři prototypových technologií a procesů na Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace. Tisk všech vzorků byl proveden na zařízení *SLM 280^{HL}* (viz Příloha A) od společnosti *SLM Solutions GmbH*, použitým materiálem byl prášek biokompatibilní titanové slitiny Ti-6Al-4V rovněž od společnosti *SLM Solutions GmbH*. Použitá základová deska byla vyrobena ze stejné titanové slitiny.

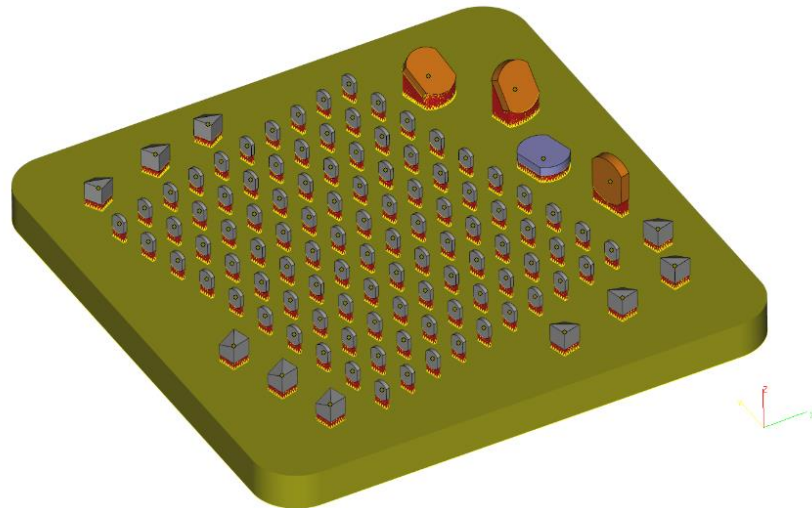
Pro účely testování vlastností materiálu vyrobeného technologií SLM, byly vyhotoveny celkem 4 typy vzorků. K testování cytotoxicity materiálu byla zvolena zkušební tělíska o velikosti plochy $\sim 72,3 \text{ mm}^2$ a tloušťce 2 mm. Plocha vzorku byla vymodelována jako kruh o poloměru 5 mm, který byl pro lepší manipulaci se vzorkem zmenšen o dvě kruhové úseče (viz Obr. 20). Šířka vzorku mezi kruhovými úsečemi byla 8 mm.



Obr. 20: Tvar a rozměry laboratorního vzorku pro testování cytotoxicity

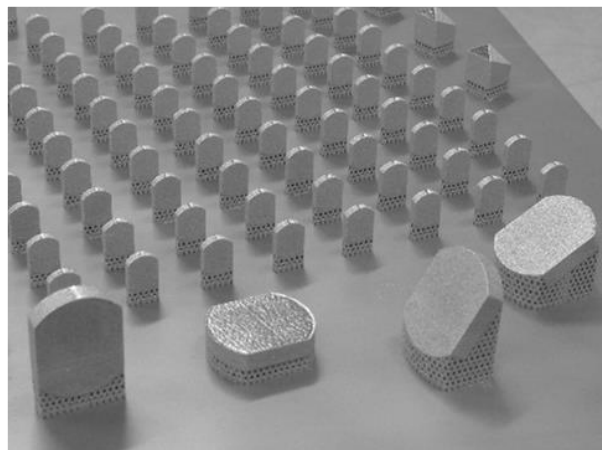
Vzorky pro analýzu drsnosti povrchu byly stejného tvaru jako vzorky pro testování cytotoxicity, pouze byly upraveny rozměry. Poloměr kružnice byl v tomto případě 12,5 mm, šířka vzorku v místě zúžení kruhovými úsečemi byla 20 mm a tloušťka vzorku 5 mm.

K modelování testovacích vzorků byl použit program *Autodesk Inventor 2017*. V programu *Materialise Magics 21* byla provedena úprava umístění dílů na virtuální základové desce (umístění v rovině XY) a následně byl každý díl posunut v ose Z nad základovou desku a byly vygenerovány podpůrné struktury. Na následujícím obrázku (Obr. 21) je znázorněno uspořádání vzorků na virtuální základové desce v programu *Magics*.



Obr. 21: Modely vzorků pro testování cytotoxicity ($n = 100$) a pro analýzu drsnosti povrchu ($n = 4$) na virtuální základové desce, včetně podpurných struktur

Při 3D tisku kovů je snaha o co nejmenší ozařovanou plochu z důvodu úspory materiálu použitého na podpurné struktury a rovněž z důvodu nižšího vnitřního pnutí. Tělíška pro testování cytotoxicity byla proto tištěna ve svislé poloze. Vzorky pro analýzu drsnosti povrchu byly orientovány tak, aby plocha každého vzorku svírala se základovou deskou jiný úhel (0° , 30° , 60° a 90°) a bylo tak možné zhodnotit vliv úhlu natočení na drsnost povrchu. Na následující fotografii jsou vytištěné vzorky pro testování cytotoxicity a drsnosti povrchu.

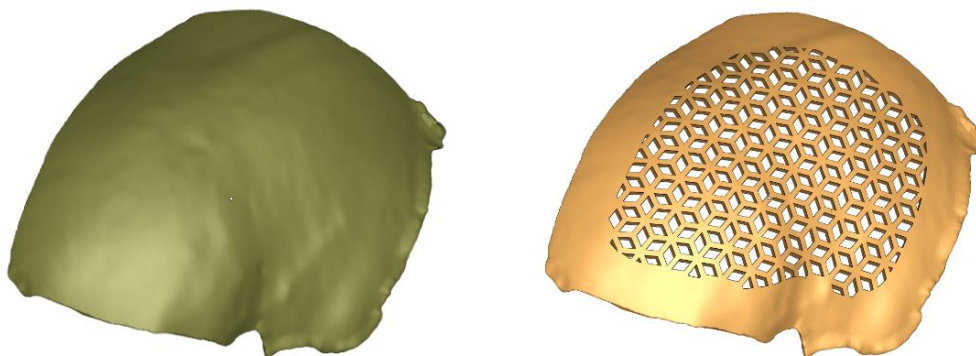


Obr. 22: Vytištěné vzorky pro testování cytotoxicity a analýzu drsnosti povrchu spojené podpurnými strukturami se základovou deskou

Pro účely testování mechanických vlastností bylo vyrobeno celkem 6 zkušebních tyčí pro tahové zkoušky. Tyče byly vymodelovány stejně jako předchozí vzorky v programu *Autodesk Inventor 2017* a následně umístěny spolu s podpurnými strukturami na virtuální

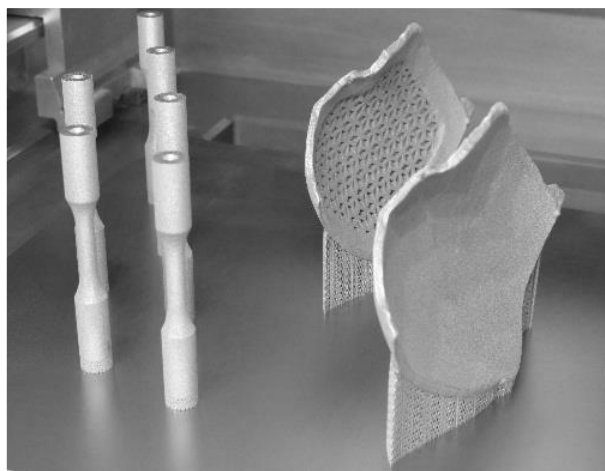
základovou desku v programu *Materialise Magics 21*. Tyče byly rovněž tisknuty ve vertikální poloze (viz Obr. 24 na následující straně). Průměr zkušební tyče v zúženém místě byl 6 mm (přesné rozměry viz Příloha C).

V posledním případě se jedná o reálnou geometrii implantátu na míru, který byl vyhotoven pro pacienta po dekompresní kraniektomii. K modelování implantátu z CT dat byl použit program *Geomagic*. Pro ověření geometrické přesnosti technologie SLM byly vyrobeny dva implantáty (viz Obr. 23). Kromě geometrické přesnosti technologie SLM, byl sledován také rozdíl v geometrické stálosti plného a strukturovaného implantátu. Jelikož v případě menší ozařované plochy vzniká nižší tepelné namáhání a tedy i vnitřní pnutí, je předpoklad, že strukturovaný implantát se bude méně deformovat a bude tak dosahovat vyšší přesnosti.



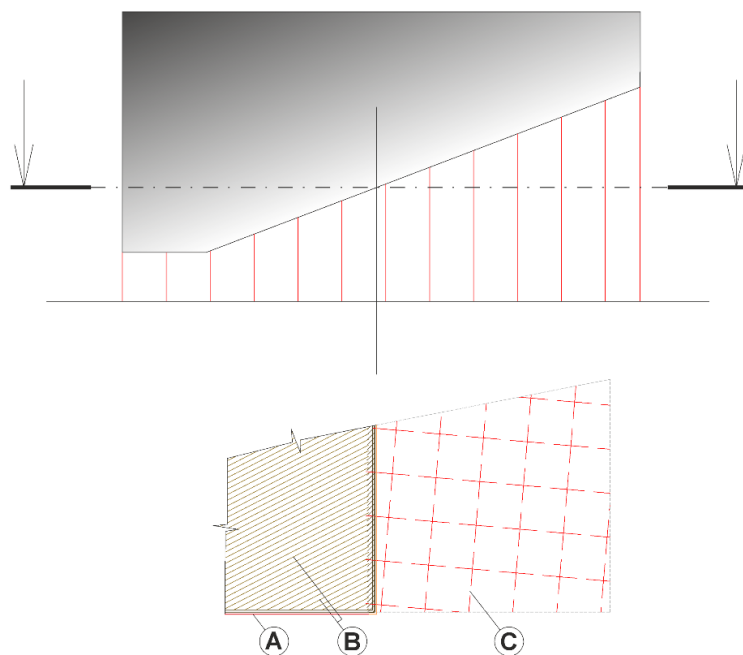
Obr. 23: Plný a strukturovaný 3D model kranialního implantátu na míru

Trámce u strukturovaného implantátu byly vymodelovány tak, aby během tisku směřovaly pouze ve vertikálním či šikmém směru. Tím, že nejsou použity trámce v horizontálním směru, vzniknou pouze malé tisknuté plochy a není tak třeba podpůrných struktur u těchto trámců. Umístění na virtuální základovou desku a vygenerování podpůrných struktur bylo provedeno opět v programu *Materialise Magics 21*. Při umístění implantátů na virtuální základovou desku a generování podpůrných struktur byla snaha o použití co nejmenšího počtu podpůrných struktur a zároveň o takové umístění, aby docházelo k co možná nejmenšímu vnitřnímu pnutí. Vzhledem ke geometrii kranialních implantátů, kdy se jedná o relativně tenký díl s velkou plochou, je pravděpodobné, že vnitřní pnutí by mohlo způsobovat kroucení a jiné deformace implantátu. Vytištěné vzorky pro tahové zkoušky a implantáty na míru k ověření geometrické stálosti jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 24).



Obr. 24: Vytisknuté vzorky pro tahové zkoušky ($n = 6$) a ověření geometrické přesnosti ($n = 2$) spojené podpurnými strukturami se základovou deskou

Tisk probíhal dle strategie uvedené na obrázku 25, v každé vrstvě byly nejprve vytvořeny okraje a následně byla vyplněna i vnitřní oblast 2D řezu. Zároveň se vzorky byly tisknuty i jejich podpurné struktury ze stejného materiálu.



Obr. 25: Oblasti skenování laserovým paprskem - okraje vytvářeného 2D řezu dílu (A), vnitřní oblast vytvářeného 2D řezu dílu (B), podpory (C)

Tisk probíhal dle parametrů od výrobce zařízení i prášku *SLM Solutions GmbH* (viz Tab. 7). Tyto parametry jsou dle výrobce optimalizované pro výrobu dílů s minimální porozitou, vysokou kvalitou povrchu a s předepsanými mechanickými vlastnostmi.

Tab. 7: Parametry použité pro výrobu vzorků

	Okraje	Vnitřní oblast	Podpory
Výkon laseru [W]	100	275	200
Tloušťka vrstvy [μm]	30	30	30
Rychlost laseru [mm/s]	400	1100	900
Vzdálenost sousedních drah laseru [mm]	0,08	0,12	-
Počet stop	2	1	1
Úhel natočení následující vrstvy	-	15°	-

Hustota energie laseru (rovnice 1 viz kap. 2.5) dosahovala při tisku okrajů hodnoty přibližně 104 J/mm³ a při tisku vnitřní oblasti asi 69 J/mm³.

3.2.1 Dokončovací úpravy vzorků

U 10 vzorků pro testování cytotoxicity a proliferace buněk v prvním experimentu byly pouze odstraněny podpurné struktury a vzorky byly následně očištěny v ultrazvukové čističce *Sonorex Longlife* od společnosti *BANDELIN* (2 × 15 minut v acetonu p.a., 2 × 20 minut v destilované vodě). Ve druhém experimentu byla porovnávána proliferace buněk na různých úpravách povrchu vzorků. Celkem 20 vzorků bylo po vytištění a odstranění podpurných struktur otryskána tlakem vzduchu, dalších 20 vzorků bylo otryskáno skleněným abrazivem (balotinou) a posledních 20 vzorků bylo opět bez úpravy, pouze byly odstraněny podpurné struktury a nerovnosti po nich zabroušeny na malé stolní brusce s kotoučem z korundu (Al₂O₃). U všech úprav následovalo čištění v ultrazvukové čističce s prodlouženou dobou čištění (2 × 30 minut v acetonu p.a., 3 × 15 minut v destilované vodě). V rámci třetího experimentu byly u 11 vzorků pouze odstraněny podpurné struktury bez zabrušování a následovalo opět čištění ultrazvukem (2 × 30 minut v acetonu p.a., 3 × 15 minut v destilované vodě).

U testovacích vzorků pro měření drsnosti povrchu byly odstraněny podpurné struktury a u každého vzorku byla jedna polovina horní plochy otryskána balotinou a druhá ponechána bez jakékoli úpravy.

Vyráběné díly mohou mít během tisku tendenci se vlivem vnitřního pnutí deformovat, polovina zkušebních tyčí pro zkoušku tahem (n = 3) a také oba implantáty pro ověření geometrické přesnosti byly proto po vytištění tepelně upraveny žíháním. Tepelné zpracování provedla společnost *Bodycote HT, s.r.o.* z Vratislavic nad Nisou, která se na tyto techniky specializuje. Cyklus žíhání zahrnoval postupné zahřátí vzorků, výdrž na žíhací teplotě 620°C v atmosféře argonu po dobu přibližně 2 hodin a následné

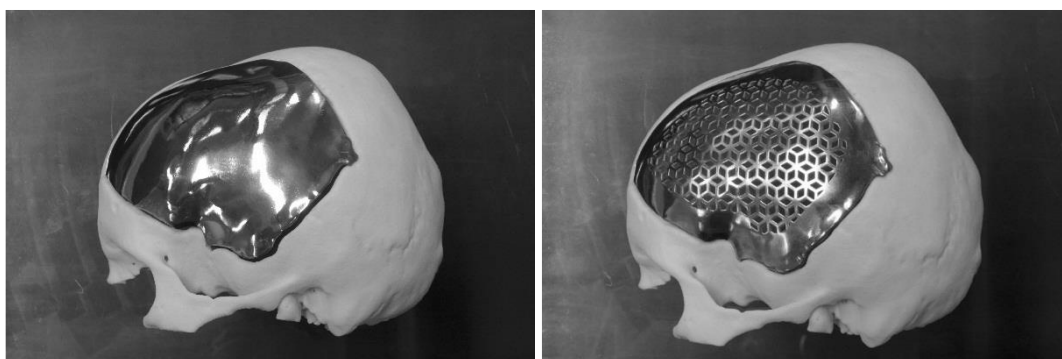
pomalé ochlazování na teplotu cca 20°C. Následně byly vzorky odsekány od základové desky a podpůrných struktur.

Všechny zkušební tyče (n = 6) pro zkoušku tahem byly navíc broušeny na hrotové brusce pro vyšší jakost povrchu a tím i vyšší vypovídací hodnotu. Pro jednodušší upnutí tyčí na trhací stroj byly na koncích tyčí vybroušeny závity M12 (viz Obr. 26).



Obr. 26: Dokončené zkušební tyče pro zkoušku tahem

Dokončovací úpravy implantátů na míru byly provedeny společností *BEZNOSKA, s.r.o.*, konkrétně se jednalo o ruční broušení obou ploch implantátů keramickými tělísky *SIC-ALU 80 V27 W* od firmy *LUKAS*. Vnitřní plochy implantátů byly dále ručně broušeny lamelovými kotouči od firmy *HOLEX* o zrnitosti 150 a 240. Vnější plochy byly pak broušeny lamelovými kotouči o zrnitosti 240 a následně leštěny kotoučem a leštící pastou *Pragopol S*. Dokončené implantáty jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 27).



Obr. 27: Dokončené implantáty přiložené na reálném modelu lebky s defektem

3.3 Vyhodnocení a výsledky

3.3.1 Testování cytotoxicity

Testování se uskutečnilo v Laboratoři tkáňového inženýrství na Katedře netkaných textilií a nanovlákných materiálů.

Pro testování cytotoxicity *in vitro* byly vytištěny titanové vzorky. Před samotným experimentem byly vzorky sterilizovány v autoklávu při standardních podmínkách (121°C, 23 minut, 101,5 kPa). Experimenty byly prováděny s buněčnou linií MG-63 (ATCC).

Celkem byly provedeny 3 experimenty. V prvním experimentu byly testovány titanové vzorky, které byly po vytisknutí očištěny ultrazvukem (2 × 15 minut v acetonu p.a., 2 × 20 minut v destilované vodě) a sterilizovány v autoklávu. Pomocí MTT testu byla testována cytotoxicita extraktů materiálu, dále byla hodnocena cytotoxicita přímým kontaktem pomocí optické mikroskopie a nakonec byla provedena analýza morfologie a adheze buněk na skenovacím elektronovém mikroskopu.

S přihlédnutím k výsledkům z prvního experimentu, kdy se ze vzorků uvolňovaly mikročástice materiálu, byly v dalším experimentu porovnávány 3 různé úpravy povrchu vzorků – tryskání balotinou (dále jen „Tryskané“), tryskání tlakem vzduchu (dále jen „Vzduch“) a žádná úprava (dále jen „Neošetřeno“). Všechny vzorky byly navíc opět očištěny ultrazvukem, kde byla však navýšená doba čištění (2 × 30 minut v acetonu p.a., 3 × 15 minut v destilované vodě) a následně sterilizovány v autoklávu. V tomto experimentu byl použit MTT test k hodnocení proliferace buněk a fluorescenční mikroskopie k hodnocení počtu viabilních buněk rostoucích přímo na titanových vzorcích. Dále byla opět použita optická mikroskopie k hodnocení buněk v okolí vzorků a skenovací elektronová mikroskopie k hodnocení morfologie a adheze buněk na povrchu vzorků.

V posledním experimentu byly opět sledovány neošetřené vzorky, jelikož jako jediné vykazovaly vysokou variabilitu ve výsledcích. Vzorky byly vyčištěny ultrazvukem (2 × 30 minut v acetonu p.a., 3 × 15 minut v destilované vodě) a sterilizovány v autoklávu. Bylo zopakováno testování cytotoxicity extraktů materiálu a proliferace buněk na povrchu vzorků pomocí MTT testu.

Zkouška na cytotoxicitu extraktů pomocí MTT byla provedena podle ČSN EN ISO 10993-5.

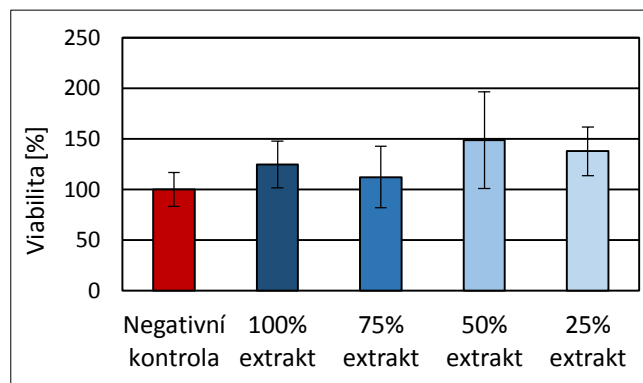
Při statistickém vyhodnocení naměřených dat byla použita 5% hladina významnosti. U všech dat byl proveden test normality a s ohledem na nenormální rozdělení většiny dat byla použita interpretace medián \pm interkvartilové rozpětí (IQR) ve sloupcovém grafu. K určení statistické významnosti rozdílů byl použit neparametrický Mann-Whitney test.

3.3.1.1 Experiment 1 - neošetřené vzorky

V prvním experimentu byly sterilizované vzorky titanu ($n = 5$) inkubovány každý v 1 ml kompletního média po dobu 24 hodin na třepačce (100 rpm, 37°C). Buňky byly nasazeny do 96jamkové mikrotitrační destičky (pasáž 11, 10^4 buněk/jamka) a ponechány po dobu 24 hodin v inkubátoru (5% CO₂, 37°C).

Po 24 hodinách bylo extrakční médium přefiltrováno (0,22 μ m). Z jamek s buňkami bylo odsáto kompletní médium a do každé jamky se přidalo 100 μ l média či extraktu. Byl sledován cytotoxický efekt u 4 různých koncentrací extraktu vzorků (100%, 75%, 50% a 25%), pro porovnání byly použity negativní kontroly (čisté médium) a pozitivní kontroly (médium s přidavkem cytotoxického Tritonu X-100). Pozitivní kontrola sloužila pouze k ověření správnosti testu a není dále hodnocena. Pro každou koncentraci extraktu a pro negativní i pozitivní kontrolu bylo nasazeno vždy 10 jamek.

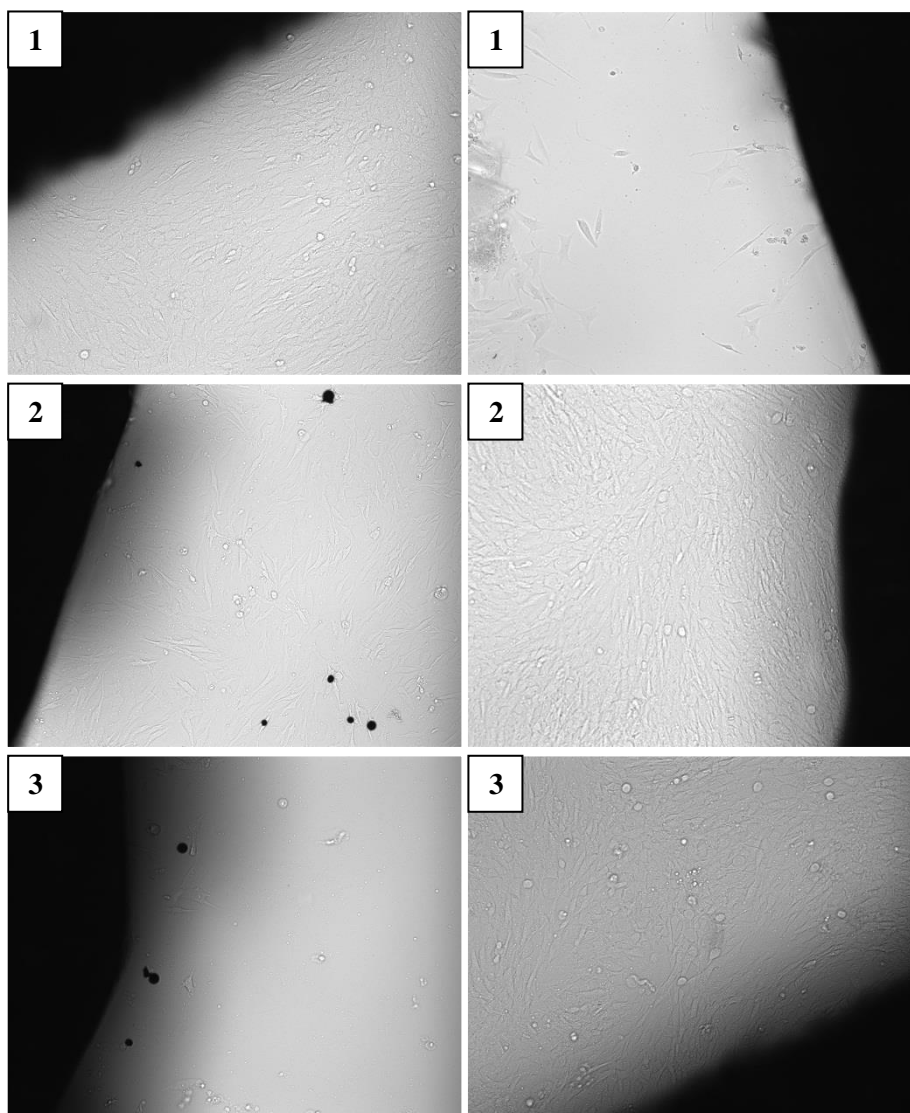
Po 24 hodinách inkubace (5% CO₂, 37°C) takto připravené destičky byla měřena buněčná viabilita pomocí MTT testu. Z jamek bylo odsáto médium/extrakt a bylo přidáno 50 μ l roztoku MTT. Destička se ponechala inkubovat 4 hodiny při 37°C. Poté bylo odsáto MTT a vzniklé fialové krystaly byly rozpuštěny přidáním 100 μ l okyseleného isopropanolu. Poté byla změřena absorbance roztoků při 570 a 650 nm. Naměřená hodnota absorbance byla přepočítána na procenta buněčné viability (viabilita buněk negativní kontroly byla brána jako 100 %). Výsledky jsou znázorněny v následujícím grafu (Graf 1).



Graf 1: Výsledky zkoušky cytotoxicity extraktů Ti-6Al-4V měřené pomocí MTT testu.
Medián ± IQR (n = 10)

Extrakty vzorků titanu nevykazovaly cytotoxické účinky. Viabilita buněk byla dokonce vyšší než u negativní kontrol. Viabilita buněk u 100% extraktu Ti-6Al-4V byla přibližně o 25 % vyšší než viabilita buněk v čistém médiu (negativní kontrola).

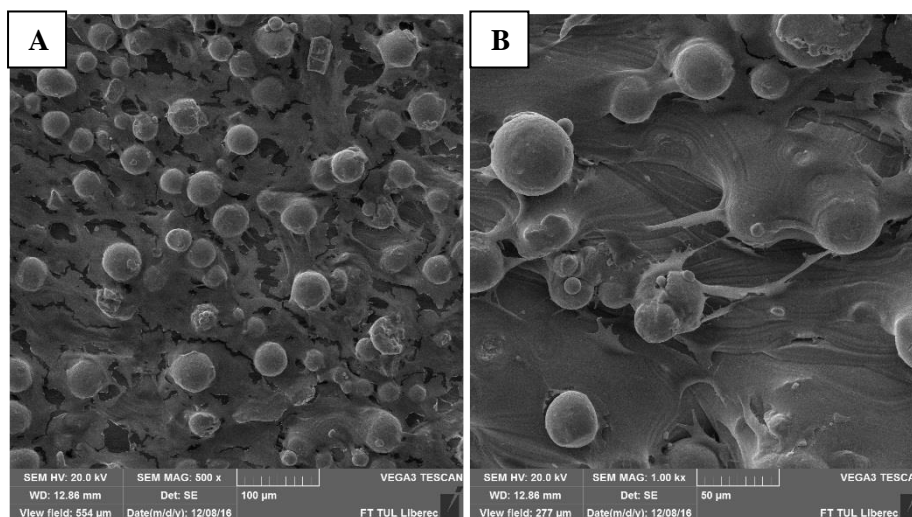
Pro pozorování cytotoxicity přímým kontaktem byly vysety buňky MG-63 na dno 6jamkové kultivační destičky (pasáž 11, 5×10^4 buněk/jamka). Po dosažení stupně konfluence byl doprostřed jamky přidán testovaný materiál ($n = 3$). Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37°C. Po uplynutí této doby byly buňky v okolí materiálu hodnoceny pomocí optické mikroskopie. Výsledky jsou zaznamenány na obrázku 28 na následující straně.



Obr. 28: Snímky z optické mikroskopie buněk v okolí testovaného materiálu - první vzorek (1), druhý vzorek (2), třetí vzorek (3); zvětšení 100 ×

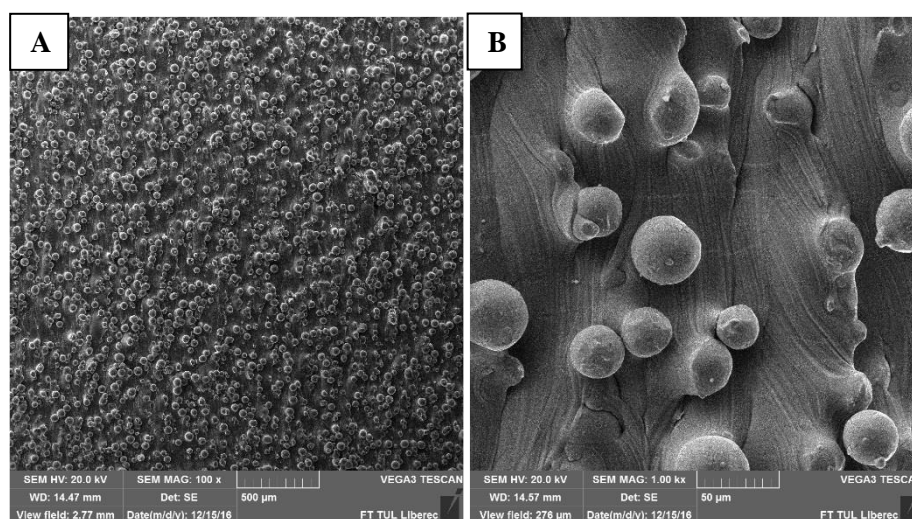
Do okolního média se uvolňovaly mikročástice materiálu, tyto částice však nevykazovaly cytotoxický efekt (viz první snímek vzorek 2). Materiál byl z větší části obklopen viabilními buňkami, pouze v některých částech byly buňky odumřelé (viz druhý snímek vzorek 1, první snímek vzorek 3). Zóny s odumřelými buňkami však mohly vzniknout posunem vzorku po dně jamky během manipulace s destičkou.

Pro hodnocení morfologie a adheze buněk na elektronovém mikroskopu byl sterilní vzorek inkubován s buňkami (pasáž 11, 10^4 buněk/jamka) v kompletním médiu po dobu 1 týdne. Po uplynutí 1 týdne kultivace byl vzorek dvakrát propláchnut v PBS a fixován ve 2,5% glutaraldehydu v PBS po dobu 15 minut (4°C). Následně byl vzorek dehydratován pomocí ethanolové řady a po oschnutí byl přenesen na SEM terčík, pozlacen a analyzován na SEM. Výsledky jsou zaznamenány na obrázku 29.



Obr. 29: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V – měřítko 100 µm (A), měřítko 50 µm (B)

Po 7 dnech kultivace byl vzorek zcela porostlý buňkami. Na snímcích jsou zřetelná neúplně roztavená zrna titanového prášku, která jsou běžně součástí neupraveného povrchu dílu vyrobeného technologií SLM. Pro porovnání jsou na následujícím obrázku zobrazeny snímky ze SEM titanového vzorku bez buněk.



Obr. 30: Snímky ze SEM povrchu vzorku Ti-6Al-4V bez buněk – měřítko 500 µm (A), měřítko 50 µm (B)

3.3.1.2 Experiment 2 - různé úpravy vzorků

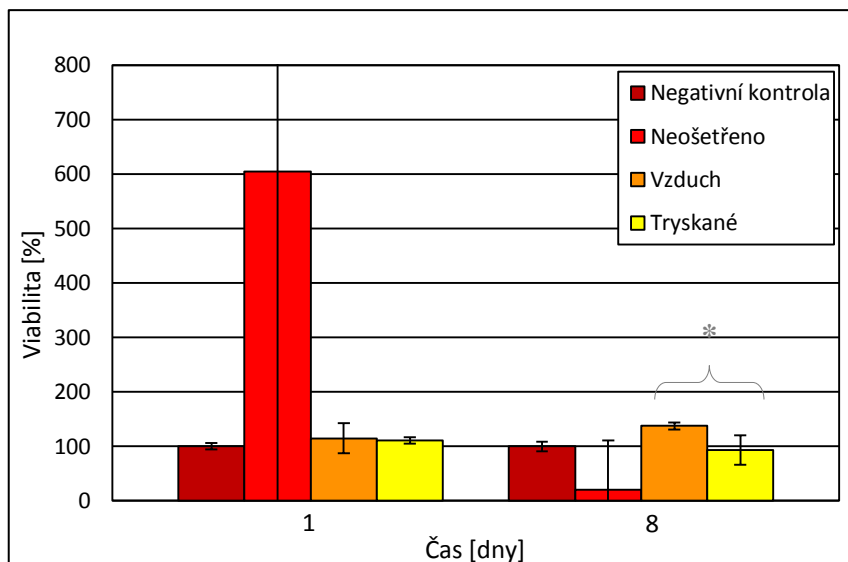
Ve druhém experimentu byl sledován rozdíl v proliferaci buněk na různě upraveném povrchu vzorků. Sledování proliferace probíhalo po jednom a osmi dnech od nasazení buněk a k hodnocení byl použit MTT test, SEM a fluorescenční mikroskopie.

Sterilní vzorky byly umístěny na dno 24 jamkové destičky (každá úprava $n = 20$ vzorků) a následně byly na vzorky nasazeny buňky MG-63 v kompletním médiu (pasáž 11, 10^4 buněk/jamka), stejně byly buňky nasazeny i do 16 prázdných jamek dalších dvou mikrotitračních destiček jako negativní kontroly (buňky bez materiálu) pro MTT test.

Po jednom dni, respektive osmi dnech inkubace (5% CO_2 , 37°C) byla vždy provedena optická mikroskopie všech vzorků, včetně kontrol. Následně byl proveden od každé úpravy vždy u 8 vzorků MTT test, u 1 vzorku SEM a u 1 vzorku fluorescenční mikroskopie. Při kontrole na optickém mikroskopu bylo u neošetřených vzorků nalezeno větší množství odlupujících se částic materiálu než u ošetřených vzorků. Také se u neošetřených vzorků vyskytovaly zóny inhibice a více mrtvých buněk v okolí. U vzorků ošetřených vzduchem a balotinou bylo nalezeno méně odlupujících se částic a v okolí vzorků se vyskytovaly živé buňky.

Při MTT testu bylo jak po jednom, tak i po osmi dnech do třech nových 24jamkových destiček napipetováno $750\ \mu\text{l}$ média a přeneseno od každé úpravy 8 vzorků, následně bylo přidáno $250\ \mu\text{l}$ roztoku MTT. U negativních kontrol bylo pouze odsáto médium a přidáno rovněž $750\ \mu\text{l}$ média a $250\ \mu\text{l}$ roztoku MTT. Destičky se ponechaly 4 hodiny v inkubátoru (5% CO_2 , 37°C). Poté bylo odsáto MTT a vzniklé fialové krystaly byly rozpuštěny přidáním 1 ml okyseleného isopropanolu. Následně byly roztoky přepipetovány do 96jamkové destičky a byla změřena absorbance při vlnové délce 570 a 650 nm.

S ohledem na rozdíl ve velikosti plochy titanových vzorků ($\sim 72,3\ \text{mm}^2$) a dna jamky 24jamkové destičky ($\sim 191,1\ \text{mm}^2$) u negativní kontroly, byly výsledné absorbance přepočteny na stejnou jednotku plochy ($1\ \text{mm}^2$) a pro vyšší přehlednost převedeny na procenta viability. Negativní kontrola byla vždy položena rovna 100% viabilitě. Výsledky testování proliferace buněk přímo na povrchu vzorků pomocí MTT testu jsou zobrazeny v grafu 2.



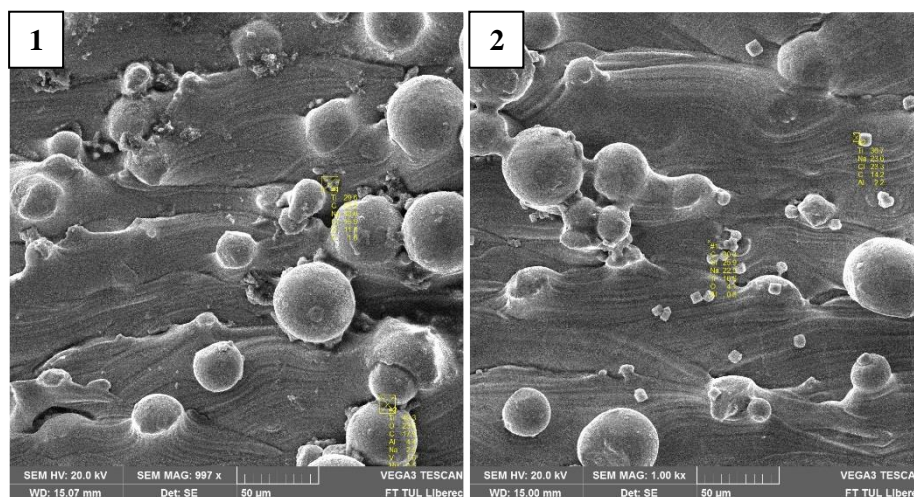
Graf 2: Výsledky MTT testu u různých úprav vzorků. *Medián ± IQR* ($n = 8$), *Mann-Whitney test* (Symbol * značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

Neošetřené vzorky vykazovaly velkou míru variability z neznámého důvodu. Při MTT testu po jednom dni od nasazení buněk byly u 50 % neošetřených vzorků naměřeny extrémně vysoké hodnoty absorbance. Při testování dalších 8 neošetřených vzorků po osmi dnech od nasazení byla situace zcela opačná, na 5 vzorcích buňky téměř nerostly. Výsledky u tohoto typu vzorků jsou natolik rozporuplné a odchylka měření natolik vysoká, že jsou tyto vzorky statisticky nehodnotitelné.

Oproti tomu vzorky ošetřené vzduchem i vzorky tryskané vyšly v tomto testu velmi dobře. Viabilita buněk rostoucích na titanových vzorcích byla dokonce vyšší než u negativní kontroly. Po jednom dni inkubace byla v porovnání s negativní kontrolou na vzorcích tryskaných vzduchem pozorována téměř o 15 % vyšší viabilita a u vzorků tryskaných balotinou byla viabilita vyšší o necelých 11 %. Mezi vzorky ošetřenými vzduchem a vzorky tryskanými nebyly však v tomto testu na 5% hladině významnosti zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

U vzorků po osmi dnech byla viabilita buněk rostoucích na vzorcích ošetřených vzduchem vyšší téměř o 38 % oproti buňkám negativní kontroly. Oproti tomu u vzorků tryskaných byla viabilita buněk o necelých 7 % nižší než u negativní kontroly. V tomto případě byly nalezeny statisticky významné rozdíly ve viabilitě buněk mezi vzorky ošetřenými vzduchem a vzorky tryskanými. Vzorky ošetřené vzduchem tak pravděpodobně více přispívají k proliferaci buněk než povrch tryskaný balotinou.

Vzhledem k rozporuplným výsledkům MTT testu u neošetřených vzorků byla během měření po jednom dni inkubace provedena také SEM včetně EDS analýzy u dvou vzorků po MTT testu (viz Obr. 31). Pro objasnění příčiny variability, byl porovnán vzorek, který proliferaci buněk podporoval (značen „OK“) se vzorkem, na kterém buňky téměř nerostly (značen „KO“).



Obr. 31: SEM a EDS analýza neošetřených vzorků po MTT - OK (1), KO (2); měřítko 50 µm

Na materiálu na kterém buňky nerostly, byly pomocí SEM nalezeny částice kubického tvaru. U každého vzorku byla provedena EDS analýza dvou oblastí (viz Obr. 31). Výsledky analýzy jsou zobrazeny v následující tabulce.

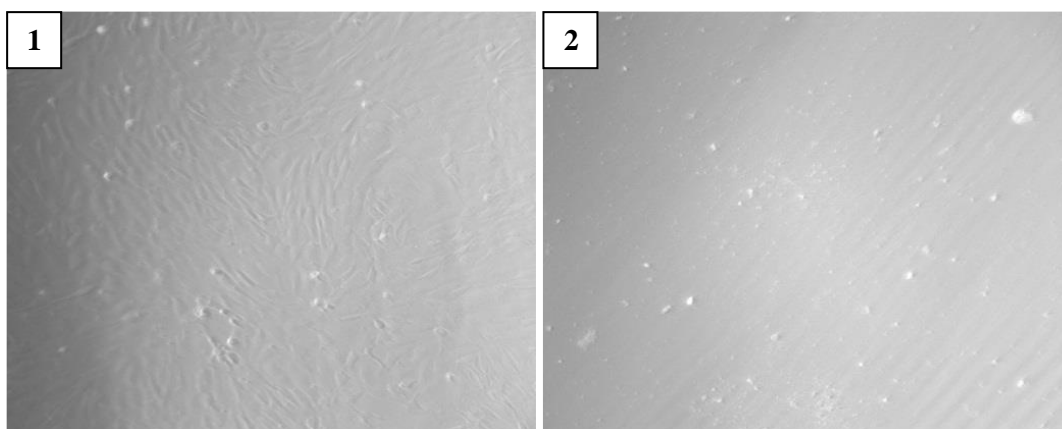
Tab. 8: Výsledky EDS analýzy OK a KO neošetřeného vzorku

		Ti	Al	V	C	Na	Cl	O	Mg
OK	Oblast 1	30	-	2	23	19	16	12	-
	Oblast 2	49	4	2	18	2	-	24	0,5
KO	Oblast 1	17	0,6	-	30	23	26	4	-
	Oblast 2	37	2	-	14	24	23	-	-

Pomocí EDS analýzy nebyla nalezena příčina cytotoxicity některých neošetřených vzorků. Ve spektru se vyskytovaly stejné prvky jako u vzorku, na kterém buňky rostly. U vzorku, na kterém buňky nerostly, byl pouze zvýšený obsah sodíku (Na) a chloridu (Cl). V případě částic kubického tvaru se proto pravděpodobně jednalo o krystaly solí. Také byl u tohoto vzorku nalezen nižší obsah kyslíku (O), což by mohlo znamenat, že nebyla vytvořena vrstva oxidu titaničitého (TiO₂).

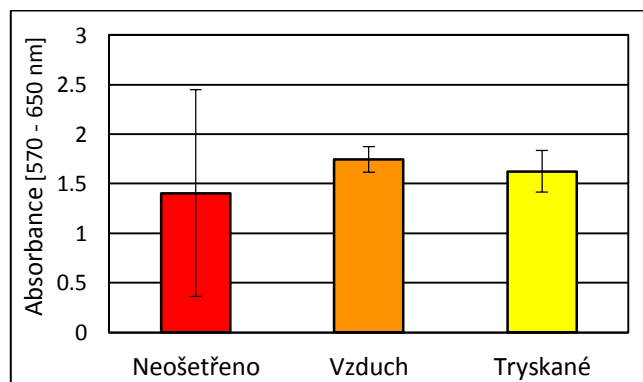
Po osmi dnech inkubace byla provedena také optická mikroskopie okolí vzorků. Při této kontrole byla u vzorků ošetřených vzduchem a tryskáním nalezena konfluentní

vrstva buněk, zatímco v okolí neošetřených vzorků byla konfluentní vrstva pouze u některých vzorků, u jiných byly významné inhibiční zóny a mrtvé buňky (viz Obr. 32).



Obr. 32: Snímky z optické mikroskopie buněk v okolí neošetřených vzorků po 8 dnech inkubace - konfluentní vrstva (1), mrtvé buňky (2); zvětšení 100×

Z důvodu nálezu pod optickým mikroskopem, byla u vzorků inkubovaných osm dní změřena navíc i viabilita buněk v okolí vzorků - tedy buněk, které zůstaly na dně jamky po odebrání vzorků. Výsledky jsou zobrazeny v následujícím grafu (Graf 3).

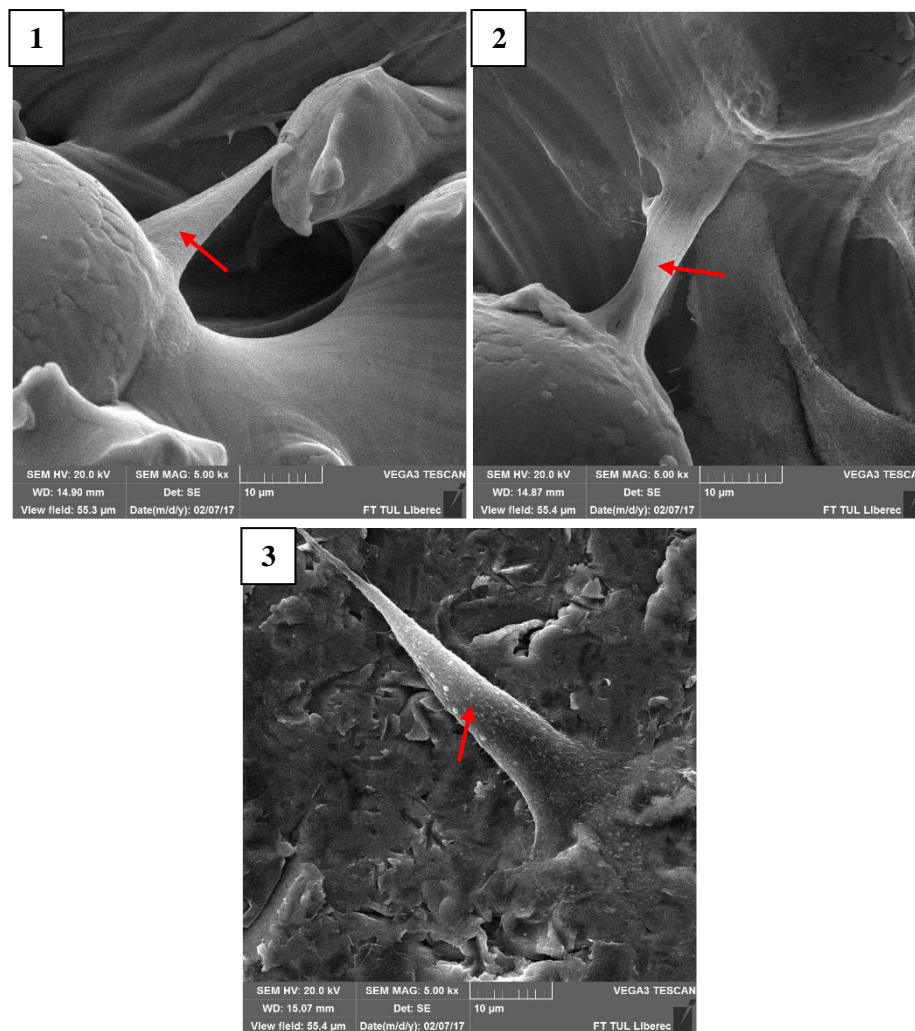


Graf 3: Výsledky MTT testu okolí vzorků po 8 dnech. *Medián ± IQR (n = 8)*

Mezi absorbancí naměřenou v okolí vzorků ošetřených vzduchem a trykáním nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl, zatímco v okolí neošetřených vzorků byla absorbance snižena, ovšem opět s velkou mírou variability.

K analýze proliferace a adheze buněk na povrchu vzorků byla použita skenovací elektronová mikroskopie. Analýza byla provedena od každé úpravy vždy na jednom vzorku. Příprava vzorků na SEM probíhala stejně jako v předchozím experimentu. Vzorky byly stejně jako u MTT testu vyhodnocovány po jednom a osmi dnech od nasazení buněk. Na následujícím obrázku (Obr. 33) můžeme vidět fotografie

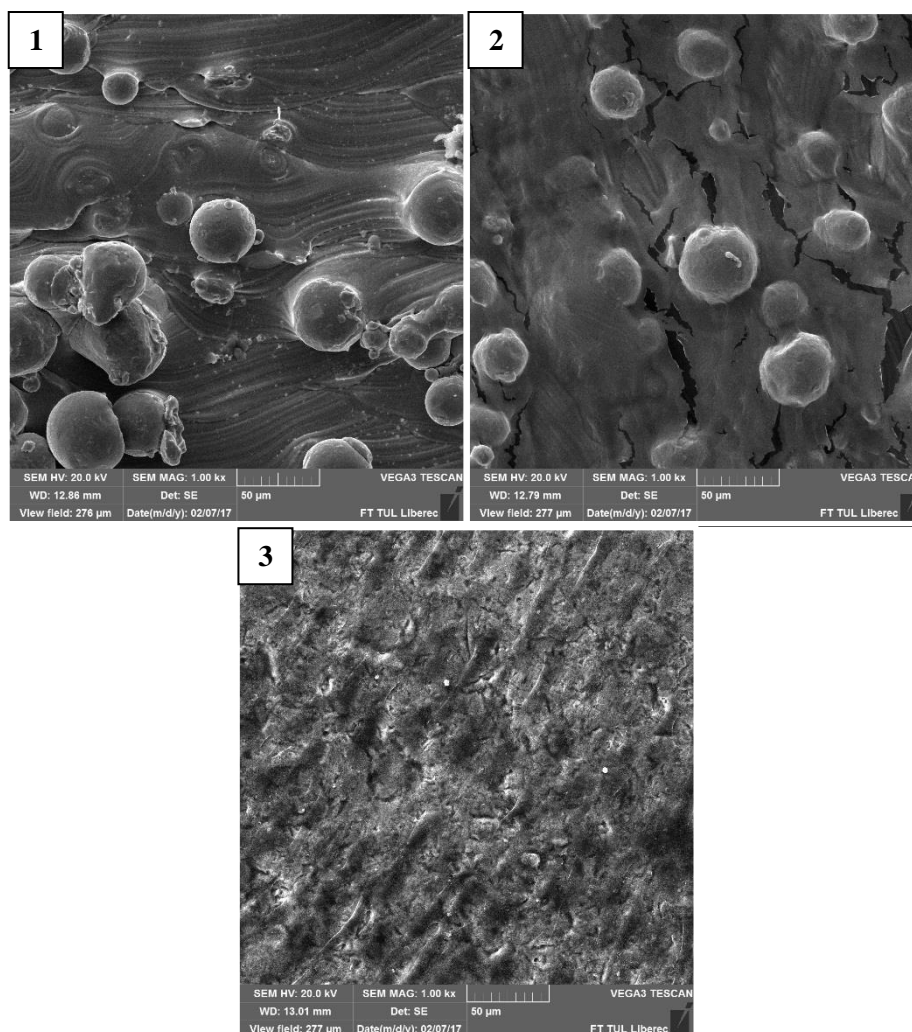
z elektronové mikroskopie povrchu vzorků s buňkami po jednom dni inkubace. Bylo nutné použít větší zvětšení, jelikož buňky zatím nevytvořily konfluentní vrstvu a nebyly tedy tak dobře patrné.



Obr. 33: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V po 1 dni inkubace - Neošetřeno (1), Vzduch (2), Tryskané (3); měřítko 10 μm

Na snímcích jsou buňky vyznačené šipkou. U neošetřeného vzorku šlo v tomto případě o kus, který proliferaci podporoval. Buňky na něm rostly a natahovaly se svými výčnělky mezi mikroskopickými zrny na povrchu materiálu. Stejně se buňky zachytávaly i u vzorku ošetřeného vzduchem, u kterého je zachována drsnost povrchu materiálu. U vzorku trypaného balotinou je drsnost povrchu snižena a buňky v tomto případě nebyly hladké jako na ostatních dvou typech vzorků. Mohlo by se jednat o mnoho malých výčnělků, kterými se buňky snaží přichytit k materiálu.

Na obrázku 34 můžeme vidět fotografie z elektronové mikroskopie povrchu vzorků s buňkami po osmi dnech inkubace.

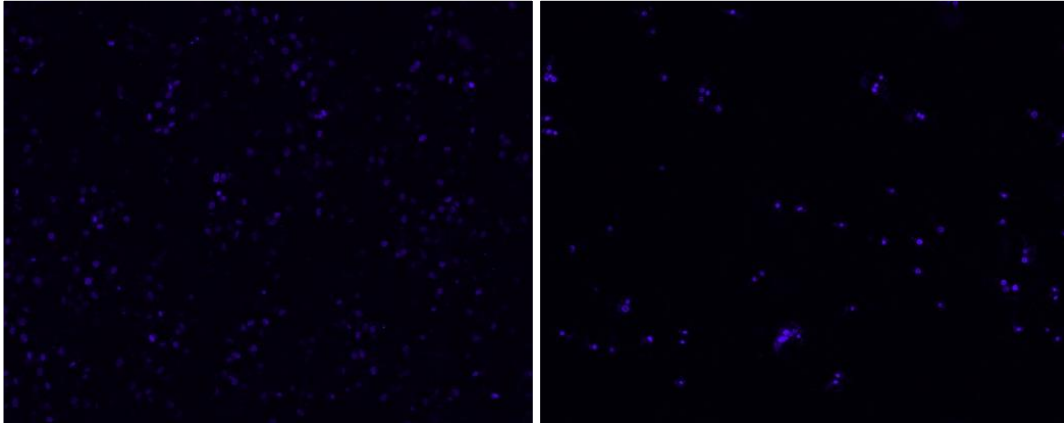


Obr. 34: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V po 8 dnech inkubace - Neošetřeno (1), Vzduch (2), Tryskané (3); měřítko 50 µm

Při hodnocení proliferace buněk po osmi dnech inkubace pomocí SEM nebyly na neošetřeném vzorku nalezeny téměř žádné buňky. V tomto případě se pravděpodobně jednalo o neošetřený vzorek, který růst buněk inhiboval. Oproti tomu na vzorku ošetřeném vzduchem byla nalezena konfluentní vrstva buněk. Na snímku patrné praskliny jsou způsobeny manipulací se vzorkem. Konfluentní vrstva buněk byla patrná i u vzorku tryskaného balotinou.

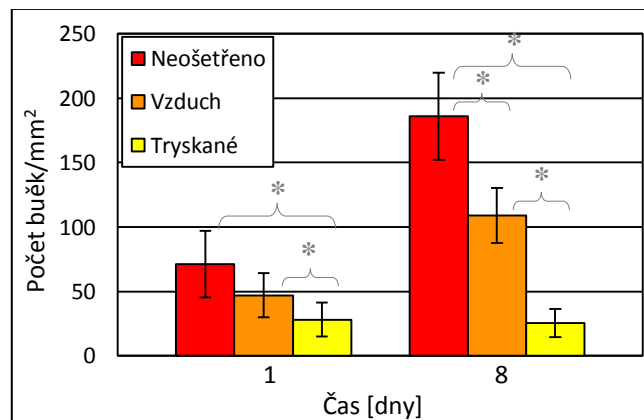
Další použitou metodou k hodnocení proliferace buněk jak po jednom, tak i po osmi dnech byla fluorescenční mikroskopie. Při přípravě vzorků na fluorescenční mikroskopii bylo potřeba buňky na vzorcích fixovat a následně nabarvit fluorescenčním barvivem. Nejprve bylo odsáto médium, následovaly 2 proplachy v PBS a přenesení vzorků do jamek s glutaraldehydem (4°C, 15 minut). Poté byly provedeny 2 proplachy v PBS a bylo aplikováno barvivo DAPI. Barvivo bylo po 5 minutách odsáto a znovu byly provedeny dva proplachy v PBS. Vzorky byly ponechány v PBS bez přístupu světla

a před samotným mikroskopováním byly vyjmuty pinzetou a vloženy na mikroskopické sklíčko. Na následujícím obrázku je ukázka snímků z fluorescenční mikroskopie, ze kterých je následně počítán počet buněk.



Obr. 35: Snímky z fluorescenční mikroskopie jader buněk obarvených DAPI; zvětšení 100×

U každého vzorku byl počet buněk počítán pomocí skriptu v programu *Matlab* celkem z 10 zorných polí (zvětšení 100×) napříč celým vzorkem. Počet buněk byl následně přepočten na jednotku 1 mm². V následujícím grafu (Graf 4) jsou zobrazeny výsledky z fluorescenční mikroskopie.



Graf 4: Počet buněk na různých úpravách vzorků po 1 a 8 dnech. *Medián ± IQR* ($n = 8$), *Mann-Whitney test* (Symbol * značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

U neošetřeného vzorku šlo v obou případech (po 1 i 8 dnech) zrovna o kus, který proliferaci buněk podporoval. Počet buněk byl u těchto vzorků nejvyšší. Z důvodu časové náročnosti však byla fluorescenční mikroskopie provedena vždy pouze u jednoho vzorku

na rozdíl od metody MTT testu, kde bylo měřeno 8 vzorků. Výsledky proto neukazují srovnatelný rozptyl.

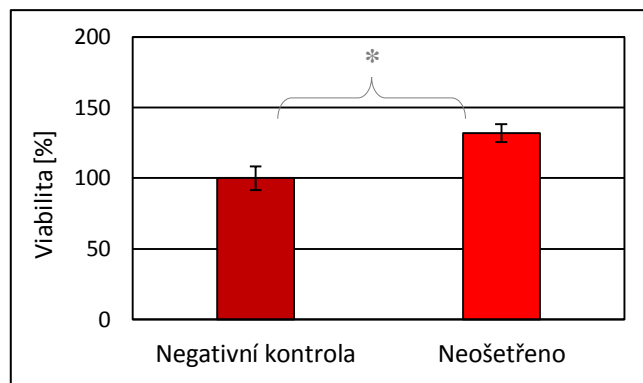
Po jednom dni inkubace nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v počtu buněk u neošetřeného vzorku a u vzorku ošetřeného vzduchem. U vzorku tryskaného balotinou však byl počet buněk snížen o 61 % oproti neošetřenému vzorku a o 40 % oproti vzorku ošetřenému vzduchem.

U vzorků po osmi dnech inkubace byly výsledky obdobné, statisticky významné rozdíly byly však nalezeny mezi všemi úpravami vzorků. Nejvíce buněk bylo opět na neošetřeném vzorku, na vzorku ošetřeném vzduchem bylo o 41 % méně buněk než na neošetřeném vzorku. Nejméně buněk rostlo opět na vzorku tryskaném balotinou, kde byl pokles o 86 % oproti neošetřenému vzorku a o téměř 77 % oproti vzorku tryskanému vzduchem.

Je možné konstatovat, že v tomto experimentu byla u neošetřených vzorků pozorována vysoká variabilita ve výsledcích. U těchto vzorků se vyskytovaly vadné kusy, na kterých buňky téměř nerostly. Příčina cytotoxicity těchto vzorků nebyla zjištěna. Možnou příčinou by však mohl být fakt, že u těchto vzorků jako jediných byly zabroušeny zbytky po podpůrných strukturách. Ačkoliv byla použita korundová bruska, během procesu mohlo dojít k zanešení nečistot do vzorků. V dalším experimentu proto bude zopakováno testování u neošetřených vzorků bez zabroušení podpůrných struktur. Podpůrné struktury tak budou pouze odříznuty jako u ostatních vzorků. Vzorky ošetřené vzduchem dosahovaly v tomto experimentu lepších výsledků než vzorky tryskané balotinou. Při ošetření vzduchem zůstává zachována drsnost povrchu, která pravděpodobně přispívá k adhezi buněk. U vzorků ošetřených vzduchem a vzorků tryskaných bylo nalezeno méně mikročástic uvolňujících se do média než u neošetřených vzorků.

3.3.1.3 Experiment 3 - neošetřené vzorky

V posledním experimentu byl zopakován MTT test u 10 neošetřených vzorků a cytotoxicita extraktů. Při kontrole optickou mikroskopií byly opět nalezeny uvolněné mikročástice materiálu do média, v okolí se však vyskytovaly živé buňky. Při testování proliferace buněk pomocí MTT testu byl použit stejný postup jako v předchozím experimentu. Výsledky byly opět přepočteny na stejnou jednotku plochy a převedeny na procenta (viz Graf 5).

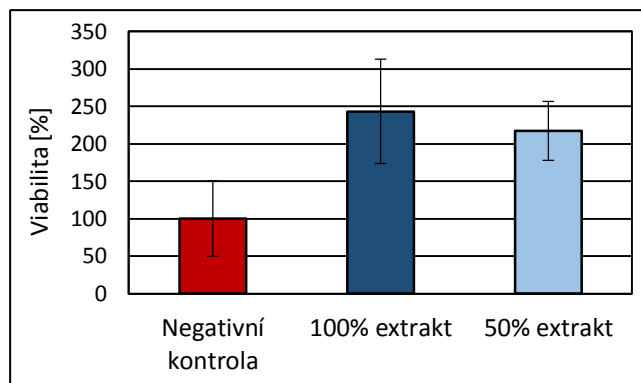


Graf 5: Výsledky MTT testu u neošetřených vzorků. *Medián \pm IQR ($n = 8$), Mann-Whitney test (Symbol * značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)*

Neošetřené vzorky dosahovaly téměř o 32 % lepších výsledků než negativní kontrola. V tomto případě dosahovaly všechny neošetřené vzorky obdobných hodnot absorbance a můžeme tedy konstatovat, že pravděpodobnou příčinou inhibice buněk na některých vzorcích v předešlém experimentu, bylo skutečně zabrušování podpůrných struktur.

Jelikož výsledky cytotoxicity extraktů z prvního experimentu mohly být ovlivněny filtrací extraktů a také obsahem fetální bovinního séra v médiu (protektivní účinky), byla zkouška na cytotoxicitu extraktů v posledním experimentu zopakována. Vzorek byl inkubován v 5 ml čistého MEM bez aditiv po dobu 7 dnů na třepačce (100 rpm, 37°C). Buňky byly nasazeny do 96jamkové mikrotitrační destičky (pasáž 13, 10⁴ buněk/jamka) v kompletním médiu a ponechány po dobu 24 hodin v inkubátoru (5% CO₂, 37°C). Poté bylo z jamek s buňkami odsáto kompletní médium a do každé jamky se přidalo 100 μ l čistého MEM či extraktu. Hodnoceny byly 2 koncentrace extraktu vzorku (100% a 50%). Pro porovnání byly opět použity negativní kontroly (čisté MEM) a pozitivní kontroly (MEM s přidavkem cytotoxického Tritonu X-100). Pro každou koncentraci extraktu a pro negativní i pozitivní kontrolu bylo nasazeno 10 jamek.

Po 24 hodinách inkubace (5% CO₂, 37°C) byla měřena buněčná viabilita pomocí MTT testu stejně jako v předchozím testování. Výsledky jsou znázorněny v Grafu 6 na následující straně.

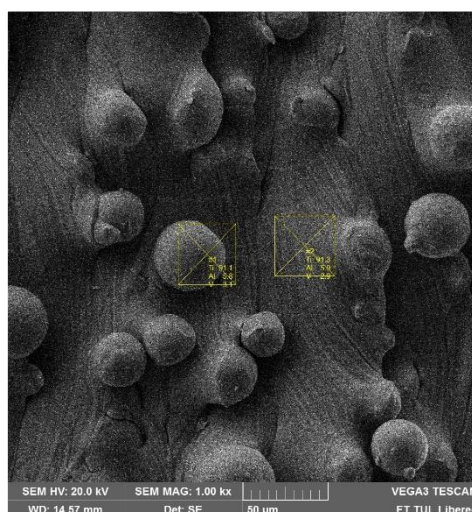


Graf 6: Výsledky zkoušky cytotoxicity extraktů Ti-6Al-4V měřené pomocí MTT testu.
Medián ± IQR (n = 10)

Extrakty titanového vzorku nevykazovaly ani v tomto případě cytotoxické účinky. Buňky vystavené působení 100% extraktu dosahovaly dokonce o 143 % vyšší viability než buňky v čistém MEM, u 50% extraktu byla viabilita vyšší o 117 % oproti čistému MEM. Z těchto výsledků vyplývá, že materiál Ti-6Al-4V vyrobený technologií SLM není pro buňky toxický a naopak pravděpodobně podporuje buněčnou proliferaci.

3.3.2 Analýza chemického složení

Analýza chemického složení byla provedena v Laboratoři tkáňového inženýrství na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů. K analýze byly použity neošetřené vzorky určené pro testování cytotoxicity. Ke zjištění chemického složení byla provedena EDS analýza 2 oblastí na povrchu vzorku (viz Obr. 36).



Obr. 36: EDS analýza povrchu vzorku Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM

Analýza potvrdila přítomnost hlavních prvků titanové slitiny Ti-6Al-4V, výsledky jsou shrnuty a porovnány s tabelovanými hodnotami v následující tabulce.

Tab. 9: Chemické složení titanové slitiny Ti-6Al-4V v hmotnostních procentech

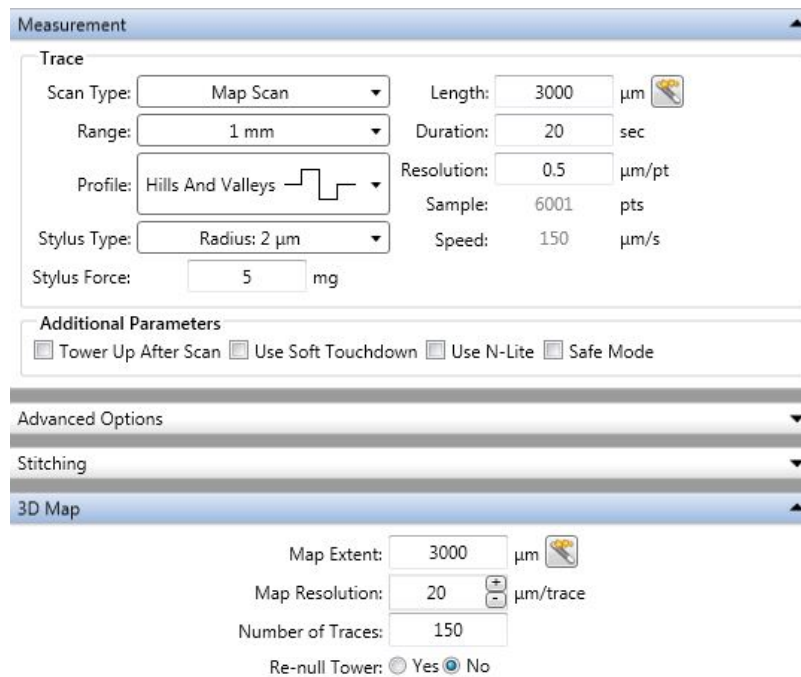
		Ti	Al	V	C
Ti-6Al-4V [13]		89 - 91	5,5 – 6,5	3,5 – 4,5	< 0,08
SLM Ti-6Al-4V	Oblast 1	91,1	5,8	3,1	-
	Oblast 2	91,3	5,9	2,9	-

Z výsledků můžeme konstatovat, že technologie SLM nepozměňuje chemické složení dílů. Při EDS analýze byly nalezeny pouze hlavní prvky slitiny, bez jakýchkoli příměsí či nečistot. Nalezena byla pouze lehká odchylka v obsahu vanadu (V).

3.3.3 Analýza drsnosti povrchu

Drsnost povrchu vzorků byla měřena na hrotovém profilometru *Dektak XT* (viz Příloha A) na Oddělení přípravy a analýzy nanostruktur. Analýza byla provedena na 4 vzorcích, které se lišily úhlem natočení plochy (0°, 30°, 60°, 90°) vůči základové desce při tisku. Pokud je totiž plocha tvořena jinak než kolmo k základové desce stroje, dochází k odskoku jednotlivých hran plochy. Výsledná drsnost ploch s různým sklonem vzhledem k základové desce by se tak měla lišit. Drsnost povrchu by měla teoreticky úměrně klesat s hodnotou kosinu úhlu šikmé stěny.

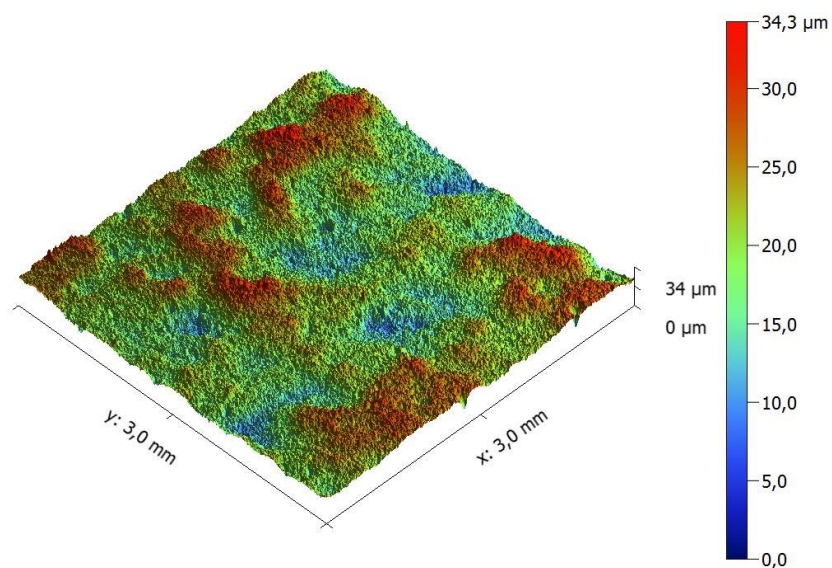
U každého vzorku byla navíc polovina plochy tryskána balotinou a druhá polovina ponechána bez jakékoli úpravy. Celkem tak bylo analyzováno 8 různých povrchů. Drsnost povrchu byla analyzována z podrobného 3D skenu profilu o ploše 3 × 3 mm při nastavených parametrech skenování (viz Obr. 37).



Obr. 37: Parametry skenování hrotovým profilometrem

Obslužný program vyhodnotil naměřené hodnoty a zobrazil je pomocí grafického záznamu nerovností povrchu a číselnými hodnotami příslušných parametrů drsnosti.

V programu *Gwyddion* byla následně naměřená data zpracována a byly vygenerovány 3D mapy profilu povrchů (viz Příloha B). Na následujícím obrázku je znázorněn povrch s nejmenší drsností, který byl naměřen u vzorku tisknutém se sklonem 90° vůči základové desce a tryskaném balotinou.



Obr. 38: Znázornění povrchu s nejnížší drsností (natočení 90°, tryskané balotinou)

Pomocí programu *Gwyddion* byly následně zobrazeny naměřené parametry drsnosti. V tabulce 10 jsou znázorněny výsledky z měření drsnosti povrchu u jednotlivých úhlů natočení a úprav povrchu. Hodnocenými parametry byla střední aritmetická úchylka *Ra* a maximální hodnota (Max).

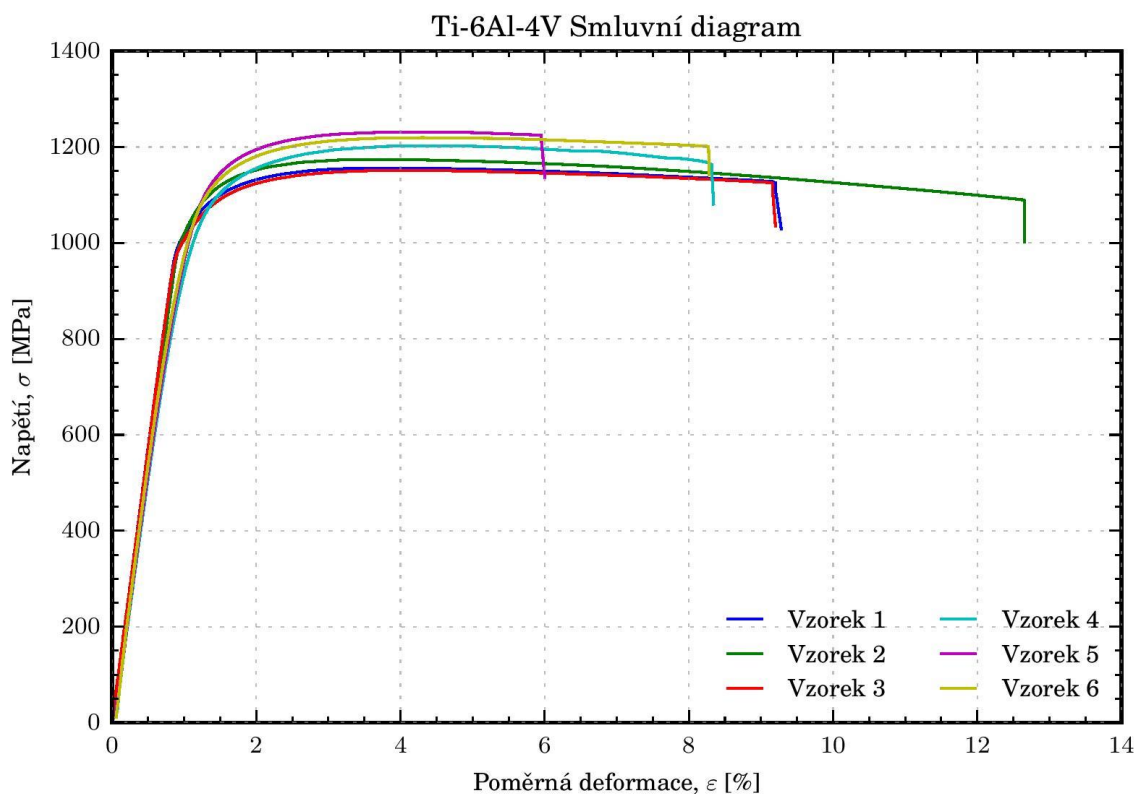
Tab. 10: Výsledky měření drsnosti povrchu

	Ra [μm]	Max [μm]
0°		
Neupraveno	8,6	79,7
Tryskané	9,9	75,2
30°		
Neupraveno	14,4	160,9
Tryskané	7,4	72,6
60°		
Neupraveno	14,3	124,5
Tryskané	4,1	40,3
90°		
Neupraveno	13,3	139,5
Tryskané	3,4	33,3

Z výsledků vyplývá, že z neupravených povrchů dosahuje nejnižší drsnosti plocha s natočením 0° vůči základové desce. Následně drsnost povrchu skutečně úměrně klesá s hodnotou kosinu úhlu šikmé stěny. Dále můžeme konstatovat, že po úpravě povrchu vzorků tryskáním balotinou je patrný výrazný pokles drsnosti. A u tryskaných povrchů dosahovala nejnižší drsnosti plocha o natočení 90° vůči základové desce.

3.3.4 Tahové zkoušky

Tahové zkoušky byly provedeny na Oddělení tváření kovů a plastů. Vzorek byl upnut do trhacího stroje *TIRA* (viz Příloha A) a následně předepnut na hodnotu 300 N pro vymezení vůlí v závitech a následné zamezení posuvu kvůli připnutí extenzometru. Extenzometr byl připnut s počáteční délkou mezi hroty 10 mm. Zkouška tahem probíhala v režimu řízení polohy rychlostí 1 mm/min až do přetržení vzorku. Z naměřených dat se vypočítalo inženýrské napětí a poměrná deformace (viz kap. 3.1.10) a byly stanoveny smluvní diagramy tahových zkoušek, které charakterizují závislost poměrné deformace na inženýrském napětí. V následujícím grafu (Graf 7) jsou znázorněny výsledky z tahových zkoušek všech 6 vzorků.



V následující tabulce jsou znázorněny mechanické vlastnosti naměřené u jednotlivých vzorků a porovnány s tabelovanými hodnotami.

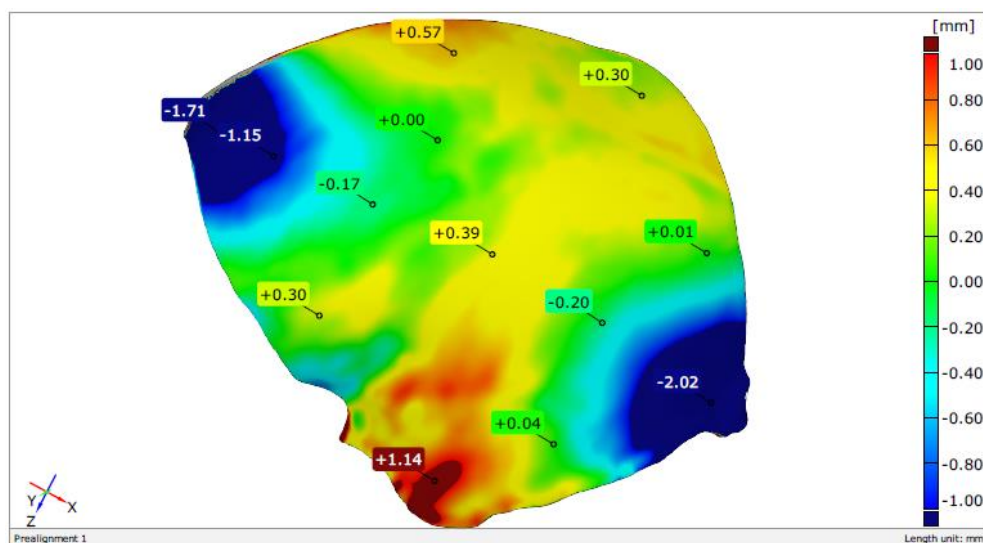
Tab. 11: Porovnání mechanických vlastností materiálu Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM s tabelovanými hodnotami - žíhané (1 – 3), nežíhané vzorky (4 – 6)

	R_{p0,2} [MPa]	R_m [MPa]	Ag [%]	A10mm [%]	E [MPa]
Ti-6Al-4V [13]	897 – 1034	965 – 1103	-	8	116000
Vzorek 1	1044,3	1156	2,72	8,38	114344
Vzorek 2	1067,3	1174,4	2,6	11,74	109904
Vzorek 3	1030,3	1151,6	2,95	8,29	114144
Vzorek 4	1043,8	1202,8	3,23	7,27	100823
Vzorek 5	1089,3	1231,7	2,91	4,9	103383
Vzorek 6	1070,5	1219,5	3,19	7,21	106334

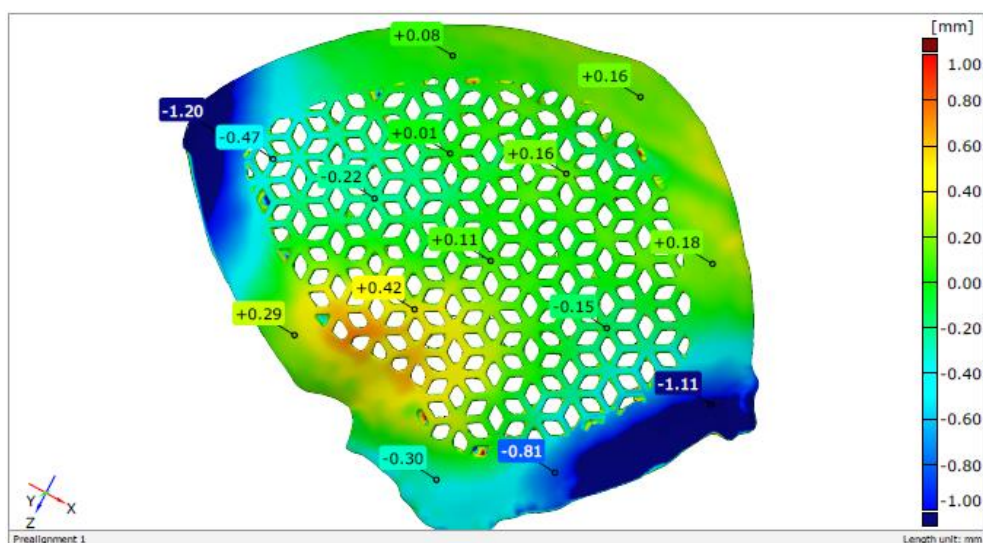
Z výsledků lze konstatovat, že mechanické vlastnosti dílů vyrobených technologií SLM jsou srovnatelné s tabelovanými hodnotami. Žíhané vzorky dosahují nižšího maximálního napětí a většího prodloužení do přetržení než vzorky nežíhané. Žíhané vzorky se také více přibližují tabelovanému Youngově modulu pružnosti než vzorky nežíhané.

3.3.5 Ověření geometrické přesnosti

Geometrická přesnost byla měřena na Katedře výrobních systémů a automatizace. Pro kontrolu geometrické přesnosti dvou vzorových implantátů byl použit optický 3D skener *ATOS II* (viz Příloha A) rozšířený o počítačem řízený rotační stůl. U obou implantátů byla naskenovaná jejich horní plocha a následně porovnána s CAD modelem. Pomocí softwaru *GOM Inspect Professional V8* byly vygenerovány barevné mapy odchylek a jejich řezy (viz Příloha D). Na následujících obrázcích (Obr. 39, 40) jsou zobrazeny barevné mapy odchylek od CAD modelu.

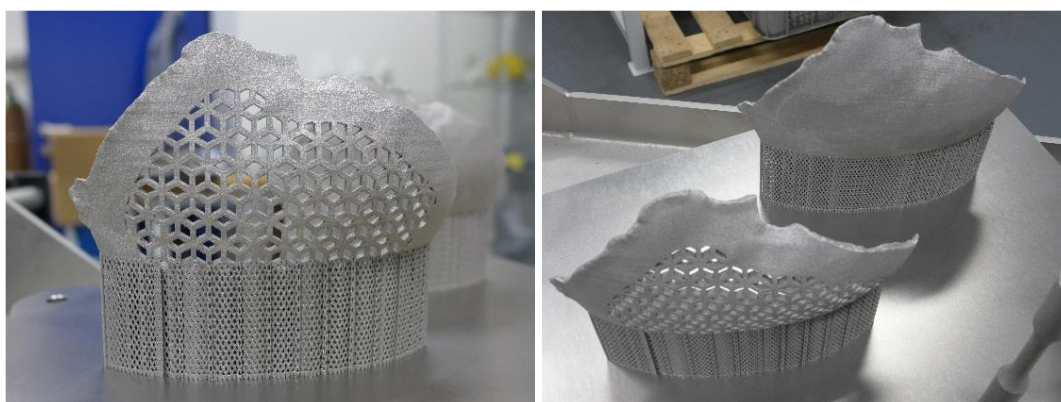


Obr. 39: Barevná mapa odchylek plného implantátu od CAD modelu



Obr. 40: Barevná mapa odchylek strukturovaného implantátu od CAD modelu

Z 3D map je patrné, že implantáty v určitých oblastech dosahují poměrně vysokých odchylek od CAD modelu. Jedná se především o oblasti, které při tisku nebyly vyztuženy podpurnými strukturami (viz Obr. 41). Z důvodu vnitřního pnutí v důsledku teplotního namáhání došlo v těchto oblastech k deformaci implantátu. V ose X byly v okrajových částech implantátu naměřeny záporné odchylky, implantát se v těchto místech tedy deformoval ve směru konvexity zakřivené plochy. V ose Z měl implantát naopak tendenci se vyklenout, odchylky tak byly kladné.



Obr. 41: Vytištěné implantáty připojené podpurnými strukturami k základové desce

U strukturovaného implantátu byla nejvyšší naměřená odchylka 1,62 mm a u plného implantátu 2,02 mm. Z výsledků lze konstatovat, že strukturovaný implantát dosahoval vyšší přesnosti než implantát plný.

Pomocí přesné váhy *A&D GF-300* byla navíc určena hmotnost implantátů. Hmotnost plného implantátu byla přibližně 119,1 g a u implantátu se strukturou byla hmotnost 79,3 g, váhový úbytek při použití zvolené struktury je tedy 33,4 %. Z CAD modelů byl také určen celkový objem obou implantátů, kde plný implantát zabíral prostorově 29 068,8 mm³ a strukturovaný implantát 19 169,6 mm³. Ze vztahu:

$$\rho = \frac{m}{V}, \quad (6)$$

kde ρ je hustota materiálu, m hmotnost a V objem, byla určena hustota implantátů. V případě plného implantátu byla vypočtena hodnota 4,10 g/cm³ a v případě strukturovaného implantátu 4,14 g/cm³. Pro porovnání byla také vypočtena přibližná hmotnost kosti o stejném objemu. Pro výpočet byl použit objem plného implantátu a hustota kompaktní kosti 1,7 g/cm³. Hmotnost kosti o daném objemu by byla tedy asi 49,4 g. Výpočet je však velmi orientační, jelikož bylo počítáno pouze s nejnižší

tabelovanou hustotou kompaktní kosti, ploché lebeční kosti se však skládají ze dvou vrstev kompakty, mezi nimiž je trámčitá diploe. Hustota trámčité kosti je ale natolik individuální, že není v tabulkách uvedena. Lze tedy předpokládat, že skutečná váha kosti o daném objemu by byla ještě nižší.

4 Diskuze

V posledních letech, kdy zaznamenáváme velký rozvoj aditivních technologií ve výrobě, je tendence tyto technologie začlenit i do biomedicínského průmyslu. Aditivní technologie výroby by mohly být velmi výhodné pro biomedicínské aplikace díky jejich schopnosti tvořit komplexní geometrii v krátkém čase [25]. S ohledem na zcela odlišný výrobní proces při využití aditivních technologií oproti konvenčnímu zpracování je nutné ověřit vlastnosti takto vyrobených dílů. Možností výroby medicínských dílů z biokompatibilní slitiny Ti-6Al-4V za použití aditivních technologií se zabývá mnoho studií [25, 26, 43]. V současné době se některé studie [44, 45] zabývají také aditivní výrobou titanových implantátů s porézní strukturou.

V této práci bylo provedeno testování slitiny Ti-6Al-4V vyrobené aditivní technologií SLM. Nejprve byl materiál testován *in vitro*. K biologickému testování byly použity osteoblasty MG-63. Materiál nevykazoval cytotoxické účinky, naopak byly pozorovány protektivní účinky extraktů materiálu. K obdobným výsledkům dospěla i studie [26], která ovšem své experimenty prováděla na fibroblastech 3T3. Při zkoumání cytotoxicity přímým kontaktem pod optickým mikroskopem byly v okolí vzorků nalezeny mikročástice materiálu uvolňující se do média. Ačkoliv ani tyto částice nevykazovaly cytotoxický efekt, existuje zde riziko, že by v lidském organismu mohly putovat a působit tak jiné nežádoucí účinky. Tryskáním dílů tlakem vzduchu se počet uvolňujících se částic snížil. Nejméně částic se pak vyskytovalo v okolí vzorků tryskaných balotinou. Vaithilingam a kol. [26] rovněž upozornil na fakt, že na povrchu dílů vyrobených technologií SLM se nachází neúplně roztavené částice prášku materiálu, které způsobují relativně vysokou drsnost povrchu. Vhodnou úpravou povrchu dílu lze tyto částice odstranit [26].

Při testování proliferace a adheze buněk na povrchu materiálu byly porovnávány 3 různé úpravy povrchu. U neošetřených vzorků se vyskytla vysoká variabilita ve viabilitě a proliferaci buněk. Některé vzorky proliferaci buněk podporovaly, jiné naopak. Při zopakování experimentu se však již tato variabilita nevyskytla. V prvním případě se pravděpodobně jednalo o zanesení nečistot do vzorků během broušení zbytkových částí po podpůrných strukturách. Buňky proliferovaly nejvíce na neošetřených vzorcích, u kterých byla naměřena drsnost povrchu (Ra) cca 13 μm , nižší proliferace byla zaznamenaná na vzorcích ošetřených tlakem vzduchu a nejnižší na vzorcích tryskaných

balotinou ($Ra \approx 3 \mu\text{m}$). K proliferaci a adhezi buněk tak pravděpodobně přispívá vyšší drsnost povrchu. Výsledky jiných studií se v tomto ohledu často rozcházejí. Některé uvádí, že drsnost povrchu přispívá k adhezi a proliferaci buněk, jiné naopak uvádí, že drsnost má v tomto ohledu negativní účinky. Obecně se dá říci, že povrchy s nerovnostmi většími než $100 \mu\text{m}$ mají na adhezi a proliferaci buněk spíše pozitivní vliv, nejvíce kontroverzních výsledků dosahují povrchy s nerovnostmi v řádu 1 až $100 \mu\text{m}$, naopak povrchy s nerovnostmi menšími než 100nm se považují za žádoucí faktor, který má pozitivní vliv na buněčnou adhezi a proliferaci [46].

Analýza chemického složení materiálu vyrobeného technologií SLM neprokázala žádné nečistoty v materiálu, analyzovány byly pouze hlavní prvky slitiny Ti-6Al-4V. Biokompatibilita materiálu by tak měla být zcela zachována.

Nejnižší drsnost povrchu byla naměřena u plochy tištěné se sklonem 0° vůči základové desce. Toto umístění je však nevýhodné kvůli větší ozařované ploše a tím i vyššímu teplotnímu namáhání [25]. Nižší drsnost povrchu na horních plochách než na laterálních naměřily i vědecké týmy [25, 29]. Při tisku dochází k tzv. schodovitému efektu, který může být snížen vhodným umístěním dílu na platformu stroje. Při větším úhlu dochází k nanesení většího počtu vrstev, čímž se vytvoří více schodů s menší horní plochou a drsnost povrchu je tak nižší [25]. To odpovídá i výsledkům v této práci, kde druhé nejnižší drsnosti dosahovala plocha tištěná se sklonem 90° . Naopak nejvyšší drsnosti dosahovaly vzorky vyráběné se sklonem 30° . Úpravou povrchu vzorků tryskáním balotinou došlo k výraznému poklesu drsnosti. U tryskaného povrchu dosahovala nejnižší drsnosti plocha tištěná se sklonem 90° .

Výsledky tahových zkoušek korespondují s předpoklady. Při použití optimalizovaných výrobních parametrů dosahují díly vyrobené technologií SLM předepsaných mechanických vlastností. Lepších výsledků dosahovaly díly, které byly po výrobě tepelně zpracovány žíháním. K tomuto závěru dospěly i další studie [27, 28].

Při ověřování přesnosti s jakou byly technologií SLM vyrobeny geometrie implantátu, byly zjištěny relativně velké odchylky od CAD modelu. Tyto odchylky je pravděpodobně možné minimalizovat vhodnějším uspořádáním podpůrných struktur. Při porovnání plného a strukturovaného implantátu, dosahoval vyšší přesnosti implantát strukturovaný. Příčinou je menší plocha ozařovaná laserem při výrobě strukturovaného implantátu a tedy i nižší tepelné namáhání a s tím spojená deformace. Z výsledků studie [25] je zřejmé, že technologií SLM je možné vyrobit i velmi malé detaily s vysokou přesností. Nepřesnosti výroby jsou tak způsobeny především vnitřním pnutím z důvodu

tepelného namáhání. Pro zpřesnění výroby je proto třeba zvolit optimálně rozmístěné podpůrné struktury a snížit ozařovanou plochu. Výhodou strukturovaného implantátu je mimo nižší deformace také váhový úbytek.

5 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na zjištění vlastností dílů vyrobených technologií SLM z titanové slitiny Ti-6Al-4V s ohledem na možné využití této technologie k výrobě individuálních implantátů. Hlavními sledovanými vlastnostmi byla cytotoxicita materiálu a jeho chemické složení, dále pak drsnost povrchu, mechanické vlastnosti a také geometrická přesnost vyrobených dílů.

Nejprve byly zhotoveny modely zkušebních vzorků a těles. Byla popsána výroba vzorků na komerčním zařízení *SLM 280^{HL}* a jejich následné úpravy. Po uskutečnění všech testů a měření je možné konstatovat, že materiál vyrobený technologií SLM nevykazuje cytotoxické účinky. Pod optickým mikroskopem ovšem byly pozorovány odlupující se částice materiálu. Tyto částice však také nevykazovaly cytotoxický efekt. Dále je možné konstatovat, že materiál vyrobený technologií SLM a následně tepelně zpracovaný žiháním dosahuje předepsaných mechanických vlastností. Analýzou chemického složení byly detekovány pouze hlavní prvky slitiny Ti-6Al-4V bez jakýchkoli příměsí či nečistot. Při porovnání různých úprav povrchu vzorků, buňky nejvíce proliferovaly na neošetřených vzorcích a na vzorcích ošetřených tlakem vzduchu, které si zachovaly drsnost povrchu, nejméně buňky rostly na vzorcích tryskaných balotinou. U dalšího typu vzorků byla měřena drsnost povrchu pomocí hrotového profilometru. Po zhodnocení výsledků lze prohlásit, že úhel natočení vyráběného dílu na platformě stroje má vliv na výslednou drsnost povrchu. Dále bylo prokázáno, že tryskání dílů skleněnými elementy významně snižuje drsnost povrchu. V průběhu kontroly geometrie implantátů vyrobených technologií SLM byly zjištěny relativně velké nepřesnosti způsobené vnitřním pnutím a nedostatečně zvolenými podpůrnými strukturami.

Výsledky této práce poukazují na to, že technologie SLM je velmi slibnou metodou pro výrobu implantátů na míru. V dalším výzkumu je však ještě třeba otestovat další dostupné povrchové úpravy, aby se zamezilo odlupování částic materiálu. Dále je třeba optimalizovat rozmístění podpůrných struktur, tak aby se zvýšila přesnost výroby a nedocházelo tak k deformacím ani tak tenkého dílu jakým je kraniální implantát. Jako další postup lze také navrhnout opakování těchto experimentů pro další typy úprav povrchu, aby bylo možné lépe posoudit rozdíl v interakci buněk s materiálem. V případě pozorování vlastností materiálu by bylo zajímavé do experimentu zahrnout i díly s porézní strukturou vyrobené technologií SLM.

Seznam bibliografických citací

- [1] CHUA, Chee Kai a Kah Fai LEONG. *3D printing and additive manufacturing: principles and applications*. Fourth edition of Rapid prototyping: principles and applications. New Jersey: World Scientific, 2015. ISBN 978-981-4571-40-1.
- [2] GEBHARDT, Andreas. *Understanding additive manufacturing: rapid prototyping, rapid tooling, rapid manufacturing*. Munich: Hanser Publishers, c2011. ISBN 978-1-56990-507-4.
- [3] *Přehled technik využívaných při Rapid Prototyping* [online]. Liberec: Technická univerzita v Liberci, Katedra výrobních systémů a automatizace, 2012. [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.ksa.tul.cz/getFile/id:2516>
- [4] KURZYNOWSKI, Tomasz, Edward CHLEBUS, Bogumiła KUŹNICKA a Jacek REINER. *Parameters in selective laser melting for processing metallic powders* [online]. 2012 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1117/12.907292. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.907292>
- [5] 3D tisk SLM, 2014. In: *Department of Reverse Engineering and Additive Technologies* [online]. Brno: Brno University of Technology [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://3dlaboratory.cz/rapid-prototyping/>
- [6] PAGÁČ, Marek, 2016. Začínáme s 3D tiskem kovů 2: Technologie 3D tisku kovů (SLM). *Konstruktér* [online]. [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.konstrukter.cz/2016/11/23/zaciname-s-3d-tiskem-kovu-2-technologie-3d-tisku-kovu-slm/>
- [7] FRÖMEL, Jiří. *Optimalizace parametrů výrobního procesu pro 3D tisk z kovového prášku* [online]. Liberec, 2015 [cit. 2016-11-17]. Dostupné z: <http://knihovna-opac.tul.cz/externalResources/theses/31750?type=0>. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Jiří Šafka.
- [8] GIBSON, I., D. W. ROSEN a B. STUCKER. *Additive manufacturing technologies: rapid prototyping to direct digital manufacturing*. New York: Springer, c2010. ISBN 978-1-4419-1119-3.
- [9] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3817-8.
- [10] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. Praha: Triton, c2013. ISBN 978-80-7387-674-6.
- [11] Mikrostruktura a složení kostní tkáně. In: *Studijní materiály předmětu PŘF* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2016 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2016/Bi6868/um/EKS_Mikrostruktura_KT_2016.pdf
- [12] LE TISSU OSSEUX. In: *Histologie* [online]. Lyon: Université de Lyon, 2009 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux--2009->

- [13] RATNER, B. D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS, ed. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Third edition. Amsterdam: Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [14] Základní složky pohybového systému: Mechanické vlastnosti kostí, 2011. *Základy sportovní kineziologie: Fakulta sportovních studií Masarykovy univerzity* [online]. Brno: Martina Bernaciková [cit. 2017-02-13]. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/1451/e-learning/kineziologie/elportal/pages/zakladni_slozky.html
- [15] PRUITT, Lisa A. a Ayyana M. CHAKRAVARTULA. *Mechanics of biomaterials: fundamental principles for implant design*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-0-521-76221-2.
- [16] *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 3. vyd. Praha: Prometheus. Pomocné knihy pro žáky (Prometheus), 1995. ISBN 80-858-4984-4.
- [17] POSPÍŠILOVÁ, Blanka a Olga PROCHÁZKOVÁ. *Anatomie pro bakaláře I: obecná anatomie, systémy pohybové a orgánové*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2010. ISBN 978-80-7372-675-1.
- [18] NĚMCOVÁ, Veronika, 2011. *Lebka: princip stavby a vývoje. Přehled kostí neurocrania a splanchnocrania* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Anatomický ústav [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://anat.lf1.cuni.cz/souhrny/lekzs08a.pdf>
- [19] *Narizení vlády č. 54/2015 Sb.: o technických požadavcích na zdravotnické prostředky* [online], 2015. [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <https://portal.gov.cz/app/zakony/zakon.jsp?page=0&nr=54~2F2015&rpp=15#seznam>
- [20] ŠIMŮNEK, Antonín. *Dentální implantologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2008. ISBN 978-80-87009-30-7.
- [21] NARAYAN, Roger, ed. *Rapid prototyping of biomaterials: principles and applications*. Oxford: Woodhead publishing Limited, 2014. ISBN 978-0-85709-599-2.
- [22] GREENBERG, Mark S. *Handbook of neurosurgery*. Eighth edition. New York: Thieme, 2016. ISBN 978-1-62623-241-9.
- [23] CRONSKÄR, Marie. *The use of additive manufacturing in the custom design of orthopedic implants*. Sundsvall: Mid Sweden University, 2011. ISBN 9789186694425.
- [24] TAUBERT, Andreas, João F. MANO a J. Carlos RODRÍGUEZ-CABELLO, ed. *Biomaterials surface science*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-3-527-33031-7.
- [25] VANDENBROUCKE, Ben a Jean-Pierre KRUTH. Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts. *Rapid Prototyping Journal* [online]. 2007, **13**(4), 196-203 [cit. 2016-10-12]. DOI: 10.1108/13552540710776142. ISSN 1355-2546. Dostupné z: <http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/13552540710776142>
- [26] VAITHILINGAM, Jayasheelan, Elisabetta PRINA, Ruth D. GOODRIDGE, Richard J.M. HAGUE, Steve EDMONDSON, Felicity R.A.J. ROSE a Steven D.R. CHRISTIE. Surface chemistry of Ti6Al4V components fabricated using selective laser

melting for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **67**, 294-303 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.054.

ISSN 09284931. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116304738>

[27] KASPEROVICH, Galina a Joachim HAUSMANN. Improvement of fatigue resistance and ductility of TiAl6V4 processed by selective laser melting. *Journal of Materials Processing Technology* [online]. 2015, **220**, 202-214 [cit. 2017-03-24].

DOI: 10.1016/j.jmatprotec.2015.01.025. ISSN 09240136. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924013615000278>

[28] KRAKHMALOV, P., G. FREDRIKSSON, I. YADROITSAVA, N. KAZANTSEVA, A. du PLESSIS a I. YADROITSEV. Deformation Behavior and Microstructure of Ti6Al4V Manufactured by SLM. *Physics Procedia* [online]. 2016, **83**, 778-788 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.phpro.2016.08.080. ISSN 18753892. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875389216301870>

[29] SIMONELLI, M., Y.Y. TSE a C. TUCK. Effect of the build orientation on the mechanical properties and fracture modes of SLM Ti-6Al-4V. *Materials Science and Engineering: A* [online]. 2014, **616**, 1-11 [cit. 2017-03-24].

DOI: 10.1016/j.msea.2014.07.086. ISSN 09215093. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921509314009538>

[30] VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. In: *1. Lékařská fakulta Univerzita Karlova* [online]. Praha: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2007 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

[31] PAVLÍKOVÁ, Tereza. *In vitro testování biodegradabilních cévních náhrad s malým průměrem*. Liberec, 2015. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Jana Horáková.

[32] ČSN EN ISO 10993-5, *ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*, 2010. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.

[33] MG-63 (ATCC® CRL-1427™): Culture method. In: *ATCC* [online]. 2016 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1427.aspx?geo_country=cz#culturemethod

[34] Fluorescenční mikroskopie. *Botanická mikrotechnika* [online]. Praha:

Přírodovědecká fakulta UK, 2008 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z:

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>

[35] SEHADOVÁ, Hana. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie* [online]. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, 2011 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescenci-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>

[36] CAIS, Jaromír. *Elektronová mikroskopie. Metalografie: Metodická příručka* [online]. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, 2015 [cit. 2017-01-03]. ISBN 978-80-86302-67-6. Dostupné z:

http://www.csvs.cz/projekty/2014_veda_pro_zivot/data/11_KA3_Jaromir_Cais_2_Elektrova_%20mikroskopie_a_%20EDS_%20analyza_metodicka_prirucka.pdf

[37] FÖRCH, Renate., Holger. SCHÖNHERR a A. Tobias A. JENKINS. *Surface design: applications in bioscience and nanotechnology*. Weinheim, c2009. ISBN 978-3-527-40789-7.

[38] BRANDON, David a Wayne KAPLAN. *Microstructural characterization of materials*. 2nd ed. Chichester, England: Wiley, 2008. ISBN 978-047-0027-851.

[39] KARASOVÁ, Alexandra a Andra NISTOR. Optická (světelná) mikroskopie. In: *Fakulta chemicko-inženýrská* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/8_cFAA.pdf?redirected

[40] ČECH, Radovan. *Studování povrchu mechanickým profilometrem* [online]. Brno, 2010 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/269329/prif_b/bp.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Petr Mikulík.

[41] Statické zkoušky: Zkouška tahem. In: *Západočeská univerzita v Plzni* [online]. Plzeň: ZČU, 2009 [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: <http://home.zcu.cz/~dyxon/DATA/Nauka%20o%20M/Zkouska.pdf>

[42] MENDŘICKÝ, Radomír a Petr KELLER. Obsluha měřicích zařízení: Bezkontaktní metody. In: *Vývojové a reverzní inženýrství* [online]. Liberec: Katedra výrobních systémů a automatizace, Technická univerzita v Liberci, 2015 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <http://www.ksa.tul.cz/getFile/id:2520>

[43] YADROITSEV, I., P. KRAKHMALOV a I. YADROITSAVA. Selective laser melting of Ti6Al4V alloy for biomedical applications: Temperature monitoring and microstructural evolution. *Journal of Alloys and Compounds* [online]. 2014, **583**, 404-409 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.jallcom.2013.08.183. ISSN 09258388. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838813020689>

[44] PARTHASARATHY, Jayanthi, Binil STARLY a Shivakumar RAMAN. A design for the additive manufacture of functionally graded porous structures with tailored mechanical properties for biomedical applications. *Journal of Manufacturing Processes* [online]. 2011, **13**(2), 160-170 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.jmapro.2011.01.004. ISSN 15266125. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526612511000053>

[45] OTAWA, Naruto, Tomoki SUMIDA, Hisashi KITAGAKI, et al. Custom-made titanium devices as membranes for bone augmentation in implant treatment: Modeling accuracy of titanium products constructed with selective laser melting. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* [online]. 2015, **43**(7), 1289-1295 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.05.006. ISSN 10105182. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010518215001493>

[46] BACA KOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, **29**(6), 739-767

- [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004. ISSN 0734-9750.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000802>
- [47] ELx808: Absorbance Reader. In: *BioTek* [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.biotek.com/products/detection-microplate-readers/elx808-absorbance-reader/>
- [48] VEGA3. In: *TESCAN* [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <https://www.tescan.com/en-us/technology/sem/vega3>
- [49] ECLIPSE Ti-E/B. In: *Nikon* [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: https://www.nikoninstruments.com/cz_CZ/Vyroby/Inverzni-mikroskopy/Eclipse-Ti-E
- [50] Bruker: Stylus Profilery: Dektak. In: *BRUKER* [online]. [cit. 2017-04-23].
Dostupné z: <https://www.bruker.com/products/surface-and-dimensional-analysis/stylus-profilometers.html>
- [51] *Metodika zpracování kvalifikačních prací 2016 (bakalářské, diplomové)* [online].
Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2016 [cit. 2017-03-30].
ISBN 978-80-7494-317-1. Dostupné z:
http://www.fzs.tul.cz/images/pro_stud/m_m/Methodika-zpracovni-kvalifikacnich-praci-2016-24.11.pdf

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma tavení prášku laserovým paprskem [4]; upraveno	17
Obr. 2: Schéma výroby dílu technologií SLM [7]	18
Obr. 3: Základní typy buněk kostní tkáně [12]; upraveno.....	20
Obr. 4: Stavba plochých kostí lebky [12]; upraveno.....	21
Obr. 5: Lebka ze strany [9]; upraveno	23
Obr. 6: Lebka shora (calva) [9]; upraveno	24
Obr. 7: Lebka zředu [9]; upraveno.....	25
Obr. 8: Výsledky studie parametrů pro Ti-6Al-4V [25]; upraveno	31
Obr. 9: Model k měření drsnosti povrchu při různém sklonu vůči platformě [25]	33
Obr. 10: Vyhodnocení drsnosti povrchu [25]	33
Obr. 11: Zkušební díly pro testy procesních omezení [25]	34
Obr. 12: Snímek ze SEM neupraveného povrchu dílu Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM [26].....	35
Obr. 13: Zkušební tyče pro zkoušku tahem - neupravená (vlevo), obrobená (vpravo) [27]	36
Obr. 14: Ukázka orientace zkušebních tyčí (tzv. psí kostí) při tisku - na ploše (XY), na hraně (XZ), vertikálně (ZX) [29]	38
Obr. 15: Růstová křivka buněčné kultury [30]; upraveno	40
Obr. 16: Princip excitačního a bariérového filtru [34].....	43
Obr. 17: Interakce elektronového paprsku s povrchem vzorku; upraveno [37].....	44
Obr. 18: Znázornění parametru Ra [7].....	46
Obr. 19: Smluvní diagram [41]; upraveno	47
Obr. 20: Tvar a rozměry laboratorního vzorku pro testování cytotoxicity	50
Obr. 21: Modely vzorků pro testování cytotoxicity (n = 100) a pro analýzu drsnosti povrchu (n = 4) na virtuální základové desce, včetně podpůrných struktur	51
Obr. 22: Vytištěné vzorky pro testování cytotoxicity a analýzu drsnosti povrchu spojené podpůrnými strukturami se základovou deskou	51
Obr. 23: Plný a strukturovaný 3D model kraniálního implantátu na míru	52
Obr. 24: Vytištěné vzorky pro tahové zkoušky (n = 6) a ověření geometrické přesnosti (n = 2) spojené podpůrnými strukturami se základovou deskou.....	53
Obr. 25: Oblasti skenování laserovým paprskem - okraje vytvářeného 2D řezu dílu (A), vnitřní oblast vytvářeného 2D řezu dílu (B), podpory (C)	53
Obr. 26: Dokončené zkušební tyče pro zkoušku tahem	55
Obr. 27: Dokončené implantáty přiložené na reálném modelu lebky s defektem	55
Obr. 28: Snímky z optické mikroskopie buněk v okolí testovaného materiálu - první vzorek (1), druhý vzorek (2), třetí vzorek (3); zvětšení 100 ×	59
Obr. 29: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V – měřítko 100 μm (A), měřítko 50 μm (B)	60
Obr. 30: Snímky ze SEM povrchu vzorku Ti-6Al-4V bez buněk – měřítko 500 μm (A), měřítko 50 μm (B).....	60
Obr. 31: SEM a EDS analýza neošetřených vzorků po MTT - OK (1), KO (2); měřítko 50 μm.....	63
Obr. 32: Snímky z optické mikroskopie buněk v okolí neošetřených vzorků po 8 dnech inkubace - konfluentní vrstva (1), mrtvé buňky (2); zvětšení 100×	64
Obr. 33: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V po 1 dni inkubace - Neošetřeno (1), Vzduch (2), Tryskané (3); měřítko 10 μm.....	65
Obr. 34: Snímky ze SEM buněk MG-63 na povrchu vzorku Ti-6Al-4V po 8 dnech inkubace - Neošetřeno (1), Vzduch (2), Tryskané (3); měřítko 50 μm.....	66
Obr. 35: Snímky z fluorescenční mikroskopie jader buněk obarvených DAPI; zvětšení 100×	67
Obr. 36: EDS analýza povrchu vzorku Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM	70

Obr. 37: Parametry skenování hrotovým profilometrem	72
Obr. 38: Znáznění povrchu s nejnižší drsností (natočení 90°, tryskané balotinou)	72
Obr. 39: Barevná mapa odchylek plného implantátu od CAD modelu	75
Obr. 40: Barevná mapa odchylek strukturovaného implantátu od CAD modelu	75
Obr. 41: Vytiskované implantáty připojené podpůrnými strukturami k základové desce	76

Seznam grafů

Graf 1: Výsledky zkoušky cytotoxicity extraktů Ti-6Al-4V měřené pomocí MTT testu	58
Graf 2: Výsledky MTT testu u různých úprav vzorků	62
Graf 3: Výsledky MTT testu okolí vzorků po 8 dnech	64
Graf 4: Počet buněk na různých úpravách vzorků po 1 a 8 dnech	67
Graf 5: Výsledky MTT testu u neošetřených vzorků	69
Graf 6: Výsledky zkoušky cytotoxicity extraktů Ti-6Al-4V měřené pomocí MTT testu	70
Graf 7: Smluvní diagram tahové zkoušky - žíhané vzorky (1 – 3), nežíhané vzorky (4 – 6)	74

Seznam tabulek

Tab. 1: Porovnání mechanických vlastností a hustoty kosti s titanem a ocelí [13, 14, 16]	22
Tab. 2: Optimalizované výrobní parametry pro materiál Ti-6Al-4V [25].....	31
Tab. 3: Výsledky mechanických zkoušek na SLM vzorcích porovnané s tabelovanými hodnotami [25]	32
Tab. 4: Drsnost povrchu testovacích dílů Ti-6Al-4V (různé dokončovací úpravy) [25]	33
Tab. 5: Odchyly rozměrů od návrhu zkušebního dílu [25].....	34
Tab. 6: Porovnání mechanických vlastností různě upravených vzorků Ti-6Al-4V [27].....	37
Tab. 7: Parametry použité pro výrobu vzorků	54
Tab. 8: Výsledky EDS analýzy OK a KO neošetřeného vzorku	63
Tab. 9: Chemické složení titanové slitiny Ti-6Al-4V v hmotnostních procentech.....	71
Tab. 10: Výsledky měření drsnosti povrchu.....	73
Tab. 11: Porovnání mechanických vlastností materiálu Ti-6Al-4V vyrobeného technologií SLM s tabelovanými hodnotami - žíhané (1 – 3), nežíhané vzorky (4 – 6).....	74

Seznam příloh

Příloha A - Použitá zařízení

Příloha B - 3D mapy drsnosti povrchu

Příloha C - Výkres s okótovanými rozměry tyče pro zkoušku tahem

Příloha D - Řezy barevnými mapami odchylek

Příloha E - Fotografie z měření

Příloha A - Použitá zařízení

1. Zařízení pro selektivní tavení laserem *SLM 280^{HL}*

Výroba laboratorních vzorků probíhala v Laboratoři prototypových technologií a procesů na Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace. Všechny vzorky byly vyrobeny na zařízení *SLM 280^{HL}* od firmy *SLM Solutions GmbH*. Jedná se o 3D tiskárnu na zpracování kovových prášků.

Tab. 1: Parametry zařízení *SLM 280^{HL}* [7]

Užitečný pracovní prostor	280 × 280 × 350 mm ³
Výkon laseru	400 W, YLR-Faser-Laser
Nastavitelná tloušťka vrstvy	20 – 100 μm
Rychlost výroby	až 35 cm ³ /h
Rozměry stroje	1800 × 1900 (2400) × 1000 mm (Š × V × H)
Minimální tloušťka stěny	180 μm
Hmotnost stroje bez materiálu	cca 1000 kg



Obr. 1: Zařízení *SLM 280^{HL}* [7]

2. Spektrofotometr *BioTek ELx808*

Absorbance byla měřena v Laboratoři tkáňového inženýrství na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů na spektrofotometru *ELx808* od společnosti *BioTek* (viz Obr. 21). Spektrofotometr je určen pro měření absorbance v 96jamkových mikrotitračních destičkách.



Obr. 2: Spektrofotometr *BioTek ELx808* [47]

3. Skenovací elektronový mikroskop *VEGA3 SB – Easy Probe TESCAN*

Analýza na skenovacím elektronovém mikroskopu byla provedena v Laboratoři tkáňového inženýrství na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů. Součástí skenovacího elektronového mikroskopu *VEGA3 SB – Easy Probe* od společnosti *TESCAN* byl EDS analyzátor *QUANTAX* od společnosti *Bruker*.



Obr. 3: Skenovací elektronový mikroskop *VEGA3 SB – Easy Probe TESCAN* [48]

4. Optický a fluorescenční mikroskop *Nikon ECLIPSE Ti-E/B*

Optická i fluorescenční mikroskopie byla provedena na inverzním mikroskopu *Nikon ECLIPSE Ti-E/B*. Pro fluorescenční mikroskopii byl navíc připojen světelný zdroj *X - Cite® 120Q, Lumen Dynamics*.



Obr. 4: Optický a fluorescenční mikroskop *Nikon ECLIPSE Ti-E/B* [49]

5. Hrotový profilometr *Dektak XT*

Drsnost povrchu byla analyzována na Oddělení přípravy a analýzy nanostruktur za použití hrotového profilometru *Dektak XT* od společnosti *Bruker*.



Obr. 5: Hrotový profilometr *Dektak XT* [50]

6. Optický 3D skener *ATOS II*

K ověření geometrické přesnosti byl použit optický 3D skener *ATOS II* od firmy *GOM*. Měření probíhalo na Katedře výrobních systémů a automatizace.



Obr. 6: Optický 3D skener *ATOS II*

7. Univerzální trhací stroj *TIRA*

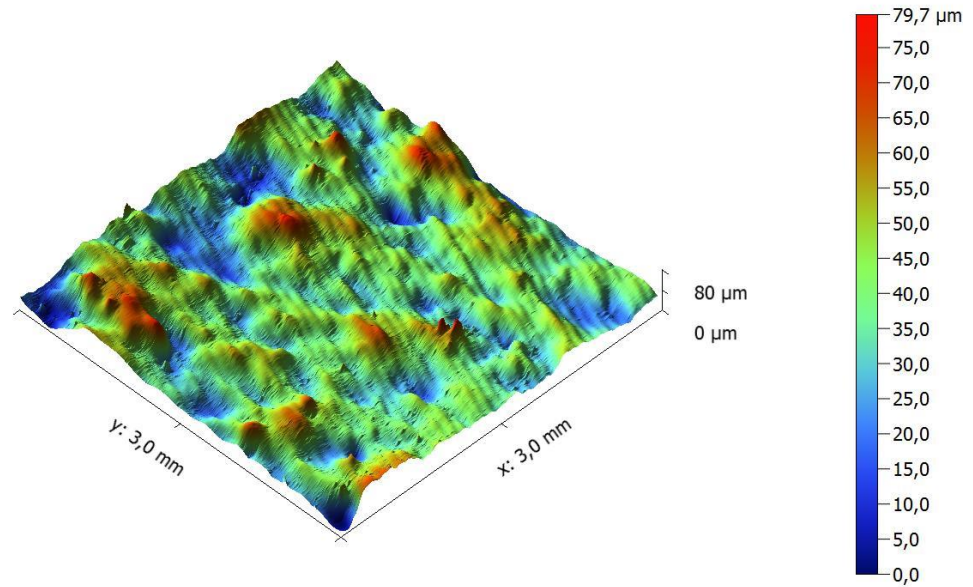
Zkoušky tahem probíhaly v Laboratoři zkoušení kovů na Oddělení tváření kovů a plastů. Zařízením použitým při měření mechanických vlastností vzorků byl univerzální trhací stroj *TIRA*.



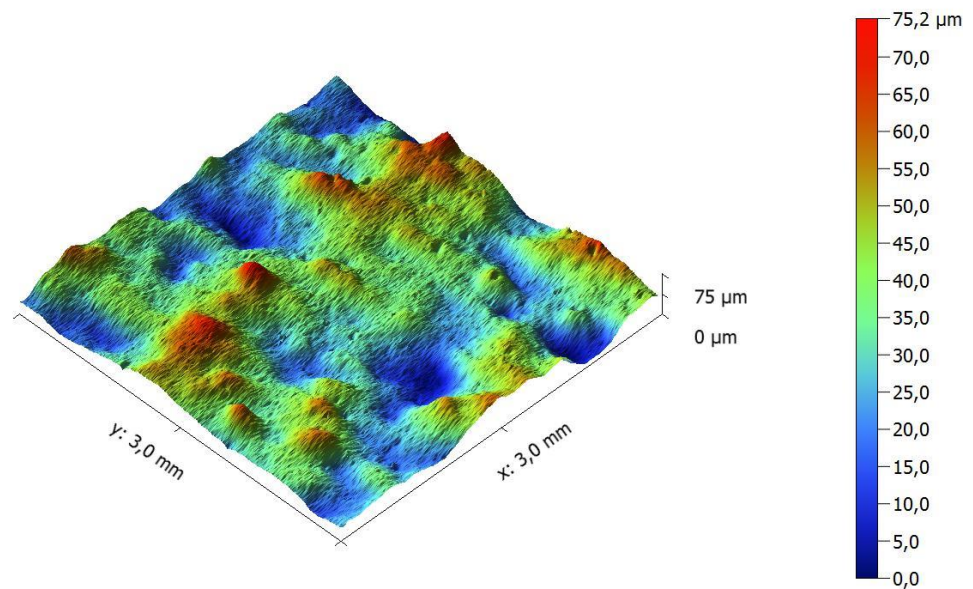
Obr. 7: Univerzální trhací stroj *TIRA*

Příloha B - 3D mapy drsnosti povrchu

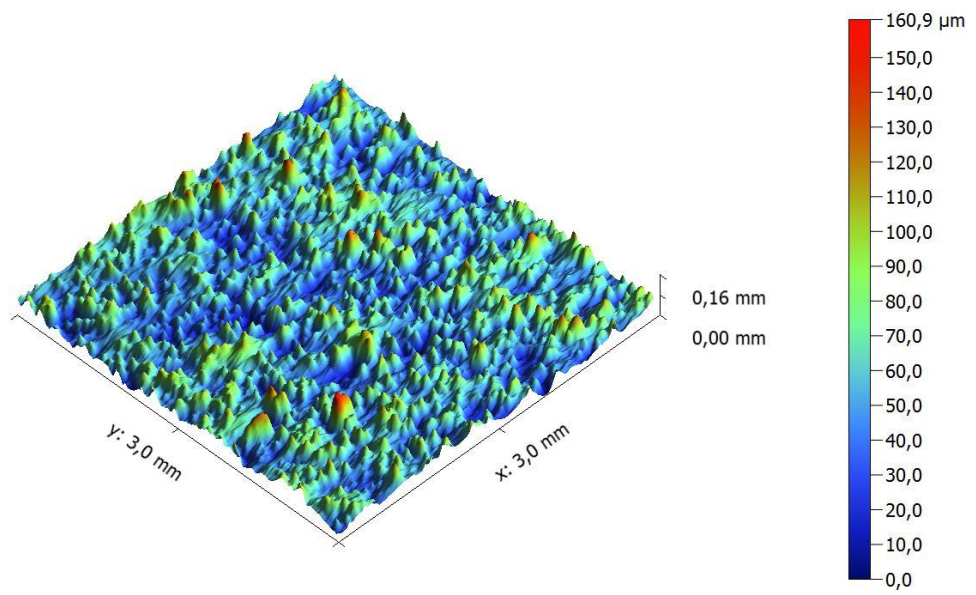
1. Natočení 0°, neupraveno



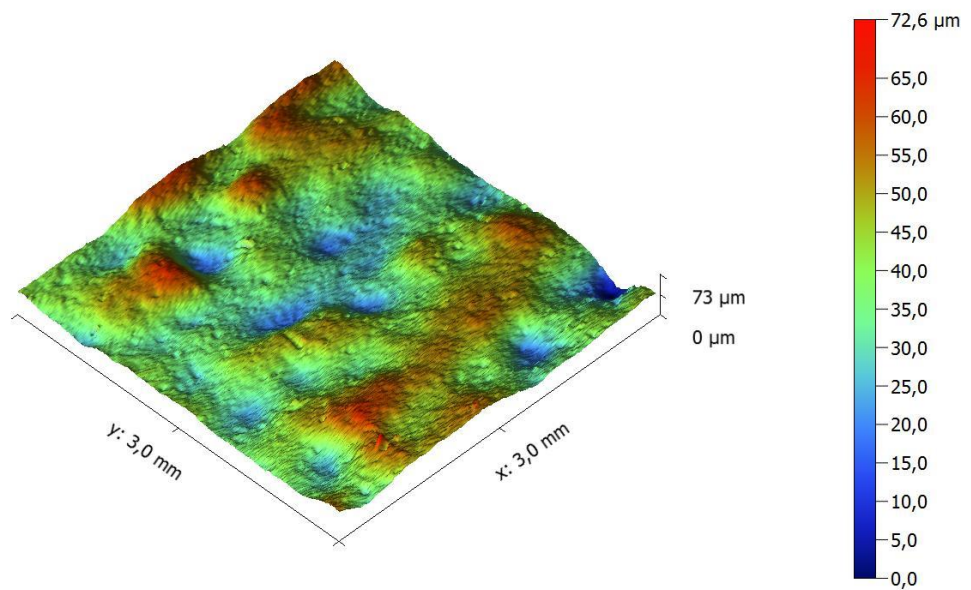
2. Natočení 0°, tryskané balotinou



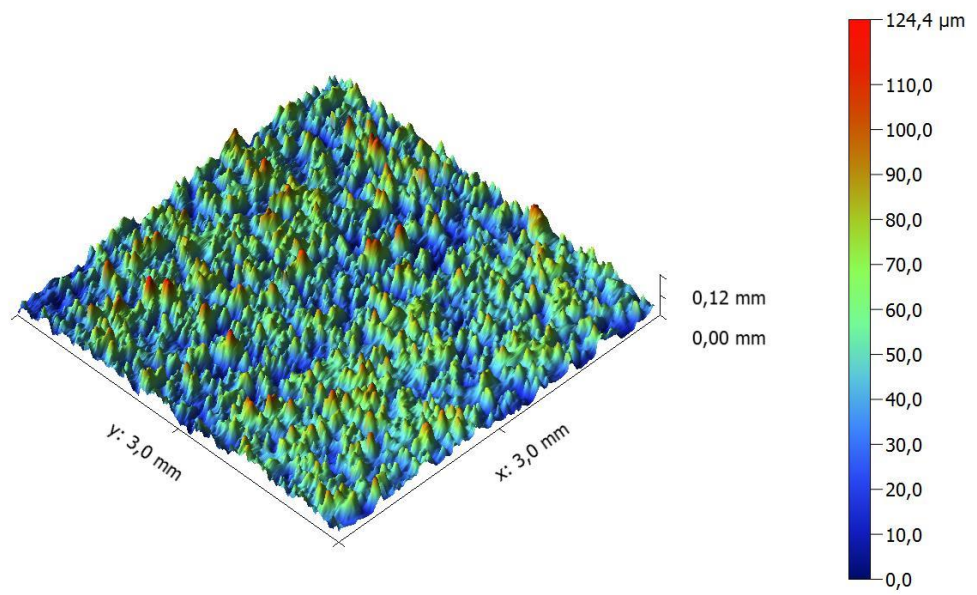
3. Natočení 30°, neupraveno



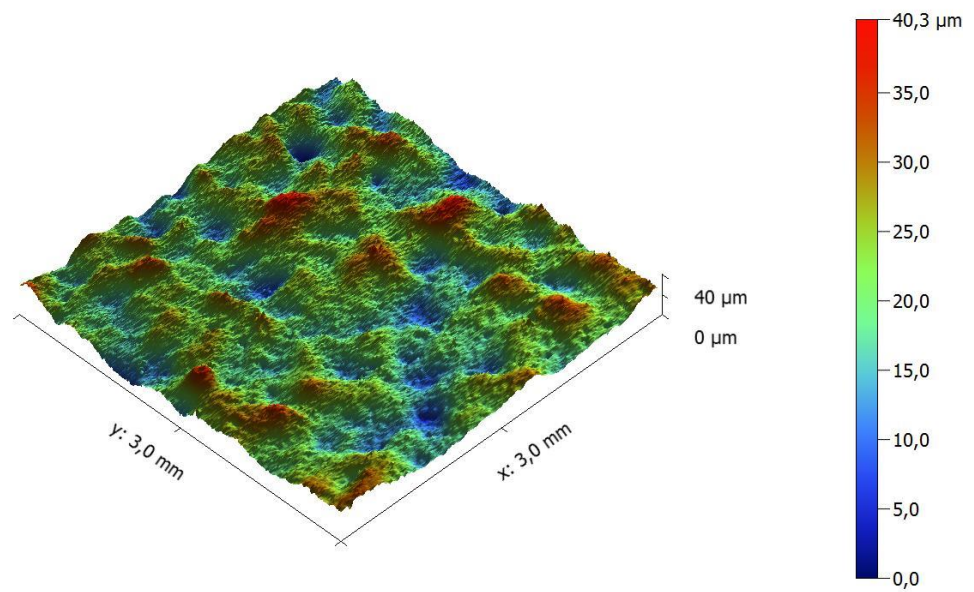
4. Natočení 30°, tryskané balotinou



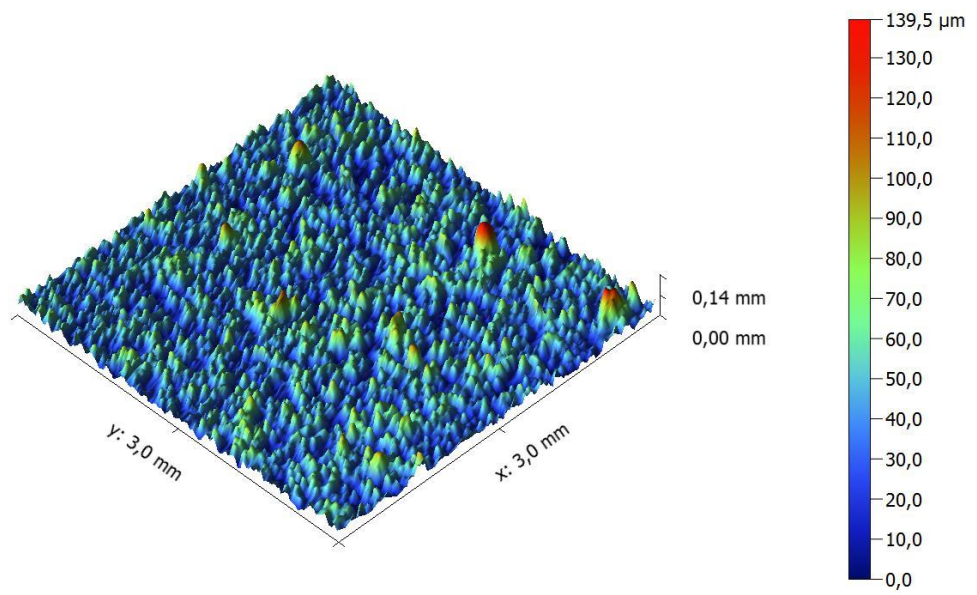
5. Natočení 60°, neupraveno



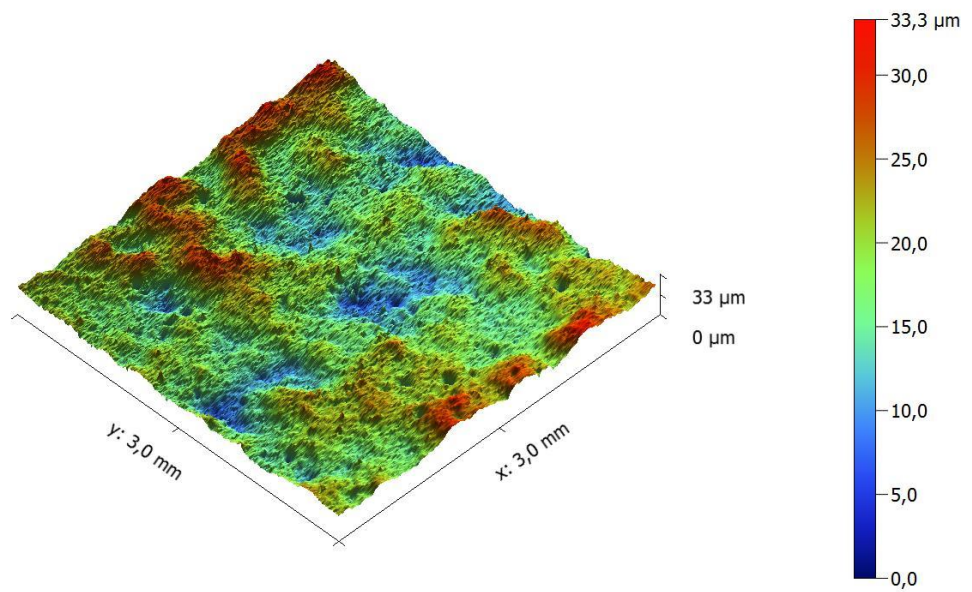
6. Natočení 60°, tryskané balotinou



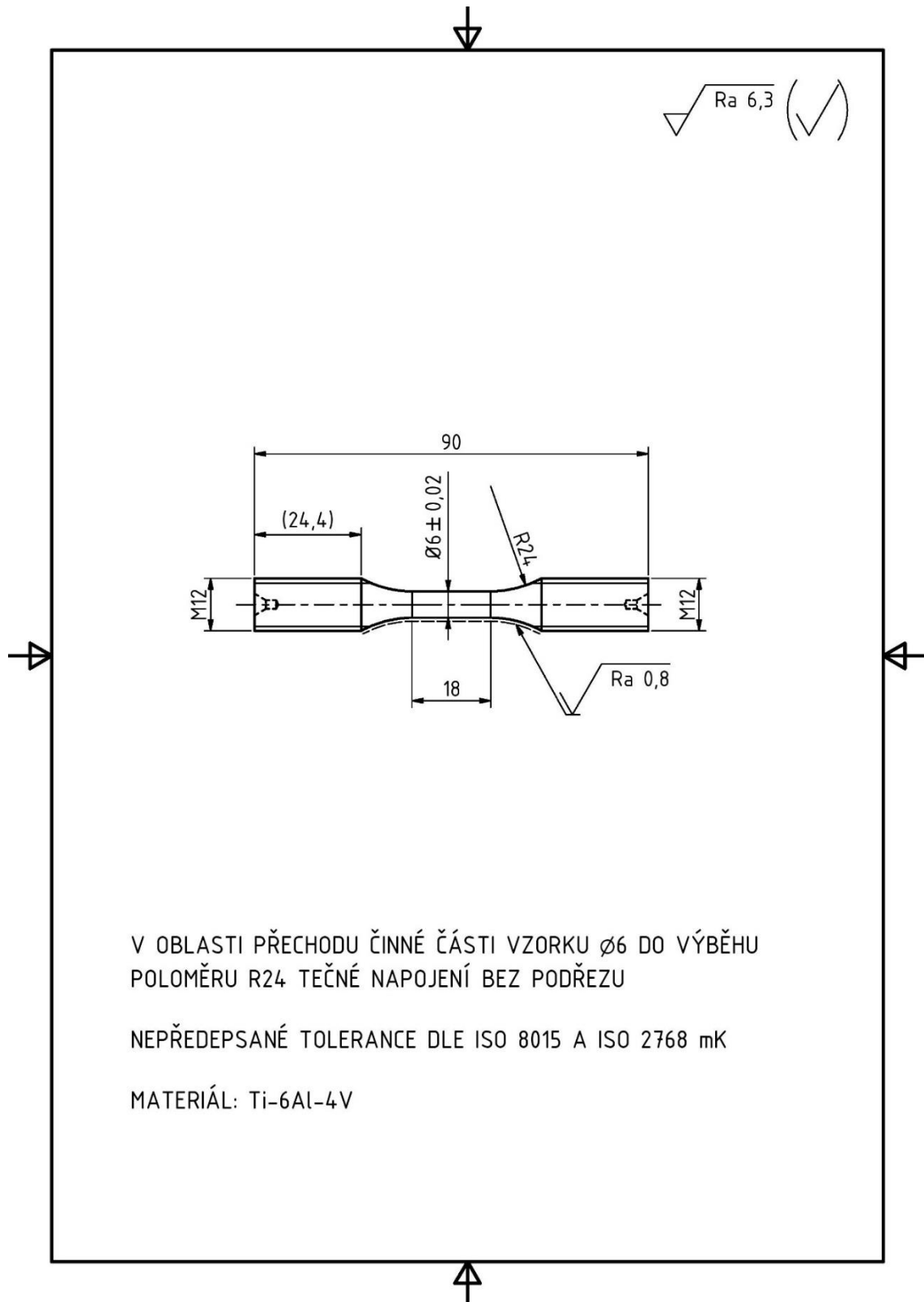
7. Natočení 90°, neupraveno



8. Natočení 90°, tryskané balotinou

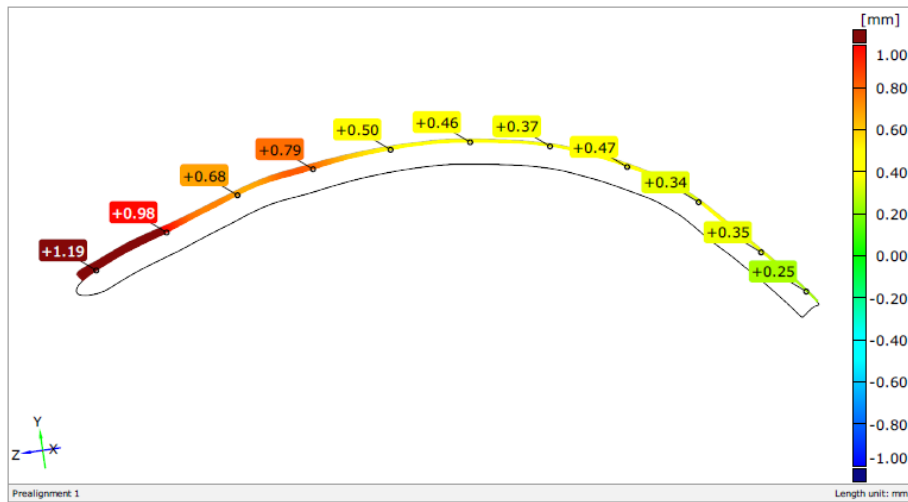


Příloha C - Výkres s okótovanými rozměry tyče pro zkoušku tahem

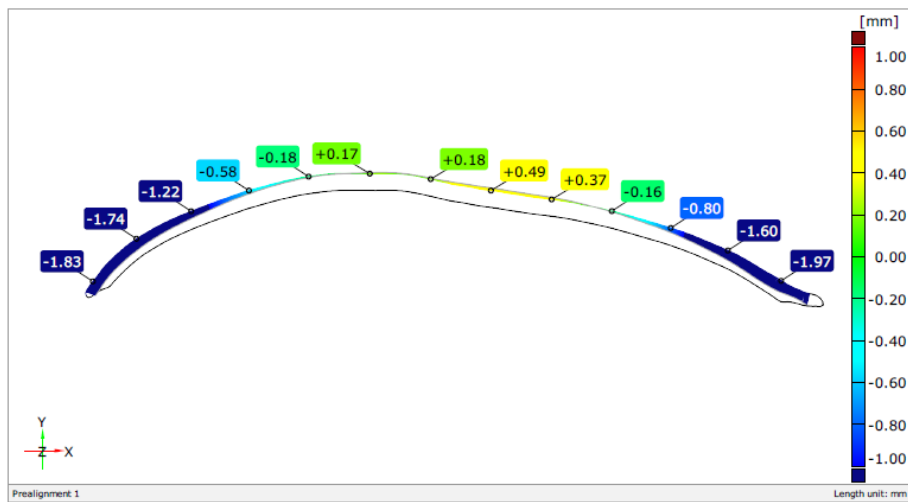


Příloha D - Řezy barevnými mapami odchylek

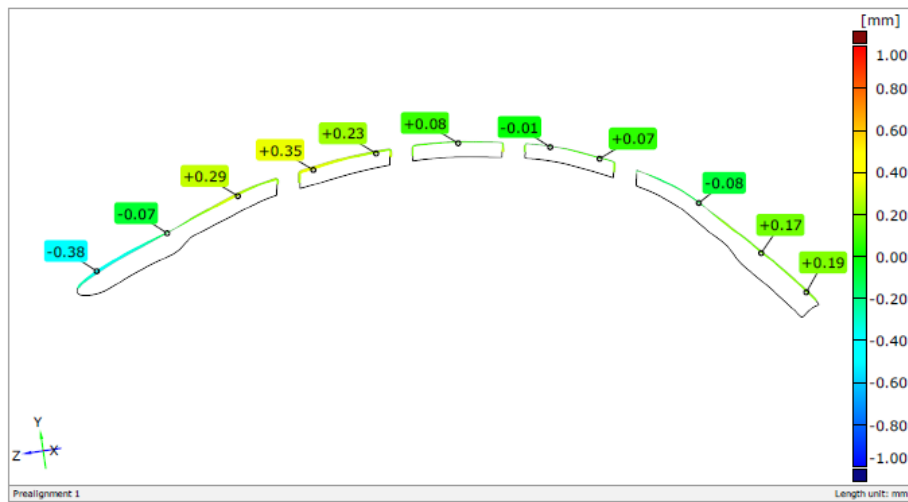
1. Plný implantát, řez v ose Z



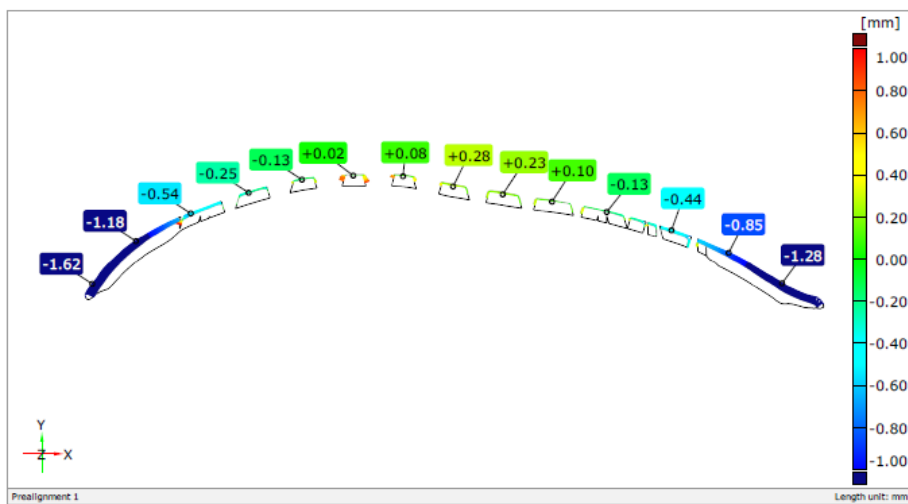
2. Plný implantát, řez v ose X



3. Strukturovaný implantát, řez v ose Z

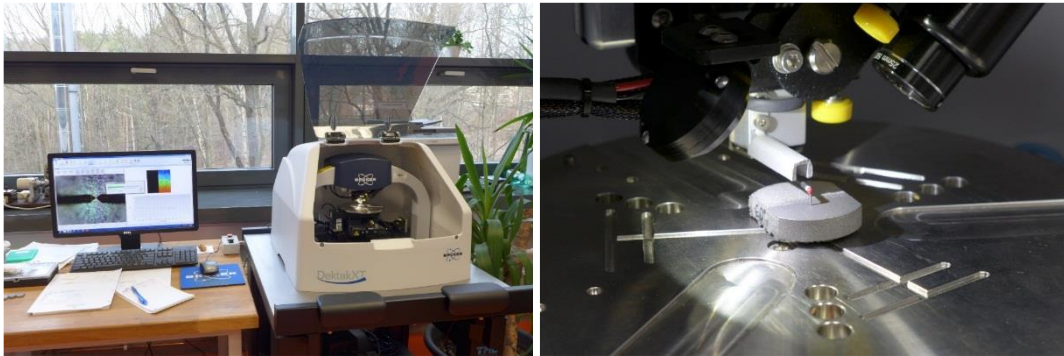


4. Strukturovaný implantát, řez v ose X

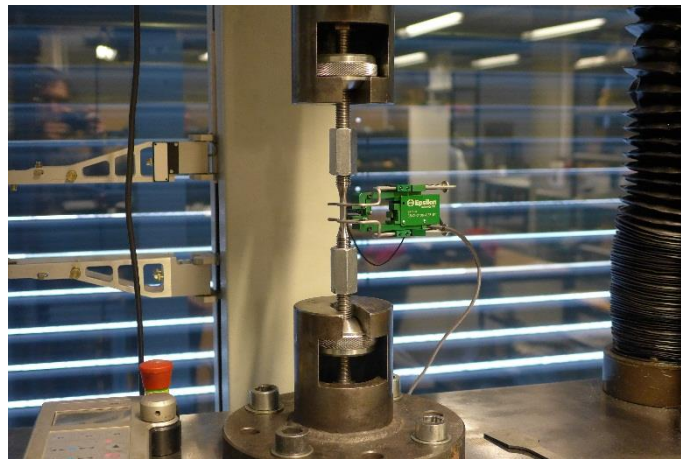


Příloha E - Fotografie z měření

1. Měření drsnosti povrchu



2. Tahové zkoušky



3. 3D skenování

