



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

PŘÍPRAVA A VLASTNOSTI BIOKERAMICKÝCH PORÉZNÍCH MATERIÁLŮ

PROCESSING AND PROPERTIES OF POROUS BIOCERAMIC MATERIALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jakub David

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Novotná, Ph.D.

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav materiálových věd a inženýrství
Student: **Jakub David**
Studijní program: Strojírenství
Studijní obor: Základy strojíního inženýrství
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Novotná, Ph.D.**
Akademický rok: 2015/16

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Příprava a vlastnosti biokeramických porézních materiálů

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Keramické materiály nacházejí v medicíně široké uplatnění, zejména jako náhrady tvrdých tkání. Speciální oblast tvoří porézní keramiky, které díky své struktuře umožňují vrůstání tkání. V současné době již není cílem trvale nahradit poškozenou tkáň syntetickým materiálem, nýbrž pomoci jí regenerovat se. Jedním ze slibných směrů je použití resorbovatelných porézních keramik na bázi kalcium fosfátů, které se postupem času rozpouštějí a současně jsou nahrazovány nově vznikající kostní hmotou. Existuje mnoho metod přípravy, které mají značný vliv na výslednou morfologii a vlastnosti keramických náhrad. Z tohoto důvodu je třeba provést aktuální literární rešerši, která pomůže určit směr následného experimentálního výzkumu.

Cíle bakalářské práce:

- 1) Sepsat literární rešerši zaměřenou na porézní biokeramické materiály
- 2) Pomocí zvolené techniky připravit porézní keramické materiály
- 3) Charakterizovat vlastnosti připravených materiálů

Seznam literatury:

Stuart, A. R. (2006): Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review, J. Am. Ceram. Soc. vol. 89, pp. 1771.

Carter, C. B. a Norton, M. G. (2007): Ceramic materials: science and engineering. Springer, New York.

Scheffler, M., & Colombo, P. (Eds.). (2006). Cellular ceramics: structure, manufacturing, properties and applications. John Wiley & Sons.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem
akademického roku 2015/16

V Brně, dne

L. S.

.....
prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.
ředitel ústavu

.....
doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na studium biokeramických porézních materiálů. Teoretická část je členěna do tří částí. První část charakterizuje biomateriály, jejich dělení a využití v kostním tkáňovém inženýrství. Druhá část se věnuje požadavkům biokeramických podpůrných systémů, anglicky zvané „scaffolds“. Ve třetí části jsou popsány metody výroby porézních struktur. Snahou praktické části bylo připravit metodou přímého pění biokeramické porézní materiály na bázi kalcium fosfátů. Byl studován zejména vliv složení suspenzí na výsledné vlastnosti připravených materiálů. Rovněž byla hodnocena morfologie materiálů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Z hlediska biologických vlastností byla testována degradabilita materiálů v simulované tělní tekutině.

Klíčová slova

Biokompatibilita, biomateriály, kalcium fosfáty, polyuretan, porézní keramika, scaffold.

ABSTRACT

Bachelor thesis is focused on the study of bioceramic porous materials. The theoretical part is divided into three parts. The first part describes biomaterials, their division and use in bone tissue engineering. The second part deals with the requirements of bioceramic support systems (scaffolds). The third section describes methods for the porous structures production. The effort of the practical part was to prepare by method of direct foaming bioceramic porous materials based on calcium phosphate. It studied mainly the affect of the suspension composition on the final properties of the synthesized material. Morphology of materials was also evaluated using scanning electron microscopy. Degradability of materials in simulated body fluid was tested in terms of biological properties.

Keywords

Biocompatibility, biomaterials, calcium phosphates, polyurethan, porous ceramic, scaffold.

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

DAVID, J. *Příprava a vlastnosti biokeramických porézních materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Lenka Novotná, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Příprava a vlastnosti biokeramických porézních materiálů vypracoval samostatně s použitím odborné literatury, uvedené v seznamu, který je součástí této práce.

Datum:

.....

Jakub David

Poděkování

Chtěl bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Lence Novotné, Ph.D. za pomoc při realizaci mé práce, za cenné rady a podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 BIOMATERIÁLY	9
2.1.1 Charakteristika biomateriálů	9
2.1.2 Dělení a využití biomateriálů	9
2.2 KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	13
2.2.1 Požadavky na biokeramické skafoldy.....	13
2.3 CHARAKTERIZACE PORÉZNÍCH BIOKERAMICKÝCH MATERIÁLŮ	14
2.3.1 Testování biologické kompatibility	14
2.3.2 Porozita a velikost pórů.....	15
2.3.3 Mechanické vlastnosti.....	17
2.4 METODY PŘÍPRAVY PORÉZNÍCH BIOKERAMIK.....	17
2.4.1 Replikační metoda	17
2.4.2 Metoda přímého pění (in situ)	19
2.4.3 Metoda pórotvorné látky	21
2.4.4 Rapid prototyping	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI.....	24
3.2 MATERIÁL, METODIKA	24
3.2.1 Použité materiály	24
3.2.2 Postup.....	24
3.3 VÝSLEDKY	28
3.3.1 Hmotnostní úbytek a smrštění po tepelném zpracování	28
3.3.2 Porozita a velikost pórů.....	29
3.3.3 Vyhodnocení degradability	33
4 ZÁVĚR.....	34
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35

1 ÚVOD

Pohyb a funkce lidské kosterní soustavy jsou součástí našeho každodenního života. Už naši předchůdci v dávných dobách dokázali díky své manuální zručnosti vyrábět pomocné a lovecké nástroje, které měly usnadnit přežití. Tato potřeba se odráží i do dnešní moderní společnosti, kdy je snahou člověka nejen omezit námahu, ale hlavně nahradit a regenerovat ty části lidského těla, které se během života opotřebovávají nebo jsou v důsledku úrazu či nemoci poškozeny.

Poškozené části lidského těla nahrazujeme tzv. implantáty. Ty musí splňovat nezbytné požadavky. Důležitou vlastností je například tzv. biokompatibilita s lidským organismem bez níž by nemohl implantát plnit svoji danou funkci. První kostní náhrady pochází již ze starého Egypta. Systematický vývoj biokompatibilních materiálů (dále jen biomateriálů) začal na počátku 20. Století [1]. Snahou vývoje bylo co nejlépe napodobit lidskou tkáň. Dnes mezi nejpoužívanější syntetické biomateriály patří kovy, polymery, kompozity a keramika. Vývoj biokeramiky, kterou se bude tato bakalářská práce zabývat, udělal v posledních čtyřiceti letech největší pokrok a stal se tak samostatným vědním oborem [8]. Použití keramiky v medicínských aplikacích začalo jejím využitím ve stomatologii. V poslední době je převážná část výzkumu zaměřená na keramické podpůrné systémy neboli tzv. porózní lešení (anglicky zvané „scaffolds“), které mají obrovský přínos v chirurgických aplikacích.

Pokročilé keramické materiály se dají rozdělit na dva typy, keramika hutná a keramika porézní. Hutná keramika se v medicíně používá pro nosné aplikace, například jak náhrada kyčelního kloubu. Zatímco se hutná keramika ve styku s tkání chová většinou inertně, porézní keramika vykazuje i chování bioaktivní, jak je vysvětleno v kapitole 2.1.2. Současný výzkum je více zaměřen na bioaktivní porézní keramické materiály, které jsou založeny převážně na kalcium fosfátech (TCP, HA, aj.). Důvodem je, že tvrdé tkáně, např. kosti a zuby, jsou tvořeny anorganickou složkou na bázi apatitu, který má podobné vlastnosti jako HA. Ze širšího hlediska můžeme do oblasti keramik řadit i uhlíkové materiály a skla.

Bakalářské práce se bude věnovat biokeramickým porézním materiálům, jejich struktuře, vlastnostem a technologii výroby. Práce je rozdělena na část teoretickou a experimentální. Teoretická část popisuje v prvotní fázi biomateriály, dále se zaměřuje na biokeramické podpůrné systémy, popisuje jejich chování v biologickém prostředí, požadavky a metody výroby. V experimentální části je popsán technologický postup přípravy porézních biokeramik na bázi kalcium fosfátů pomocí metody přímého pění (in situ), stručně charakterizovány vstupní materiály a použité přístroje. V poslední části experimentální části jsou charakterizované vlastnosti připravených materiálů a popsány jejich závislosti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BIOMATERIÁLY

Ačkoli je práce zaměřena na náhrady kostí, nejprve si definujeme pojem biomateriál. Věda zabývající se biomateriály využívá poznatků z chemie, biologie, medicíny, či z materiálových věd.

2.1.1 Charakteristika biomateriálů

Biomateriál lze definovat jako syntetický materiál, používaný k náhradě části živého systému pro obnovu jeho funkce. Příkladem může být nahrazení části těla, která ztratila v důsledku nemoci nebo úrazu svoji funkci. Rovněž se biomateriály využívají na pomoc při hojení, ke zlepšení výkonnosti, či ke korekci abnormality. Syntetické biomateriály se připravují v laboratořích, přičemž se využívá několik odlišných chemických postupů. V současnosti jsou široce aplikovány implantáty a protézy z kovových a nekovových materiálů (například z keramiky). Postupný výzkum a vývoj biomateriálů dnes umožňuje nahrazení podstatných částí lidského těla, jako jsou například kosti, tepny, oční čočky a dokonce i srdeční chlopně [1, 2].

Za důležitou podmínku, z hlediska aplikace biomateriálu do lidského těla, musíme považovat biokompatibilitu, tzv. snášenlivost látek zejm. materiálů v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál se posuzuje nejen podle vzájemného působení s prostředím a podle vlivu na infekční procesy, ale také podle rozsahu a kvality biodegradace. Je velmi důležité, aby materiál neovlivňoval např. koagulace, nevyvolával zánětovou reakci, neuvolňoval potenciálně toxické látky. Materiál musí být netoxický a zároveň nesmí působit mutagenně a karcinogenně. Také nesmí vyvolávat zánětlivé a alergické reakce [3, 4]. Biokompatibilitu lze tedy považovat za nezbytnou podmínku, která zvyšuje pravděpodobnost přijetí nového materiálu organismem. Existuje mnoho dalších požadavků na biomateriály, jak je vysvětleno v kap. 2.2.

2.1.2 Dělení a využití biomateriálů

Dělení biomateriálů lze provést dvěma způsoby. Prvním je dělení z hlediska interakce s živou tkání na bioinertní, bioaktivní a resorbovatelné. Druhým způsobem dělíme dle povahy materiálu, například na kovy, keramiku, aj.

Dělení dle interakce s živou tkání

Bioinertní materiály jsou například TiO_2 , ZrO_2 nebo $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Tyto materiály s organismem chemicky nereagují, pouze organismus reaguje na přítomnost cizího tělesa. Dochází k tvorbě fibrózního tkaniva a vzniku vazivového pouzdra kolem implantátu, aniž by záleželo, zdali je implantát ve styku s měkkou nebo tvrdou (kostní) tkání [2, 3, 4].

Biomateriály, schopné vytvářet přímé a pevné vazby s živou tkání, nazýváme bioaktivní materiály. V organismu působí trvale bez přítomnosti fibrózních vaziv. Tvoří přechod mezi inertními a resorbovatelnými materiály. Pokud je materiál porézní, přilehlé měkké tkáně vrůstají do pórů, čímž zajišťují nízkou pohyblivost implantátu. Mezi bioaktivní materiály řadíme bio-aktivní sklo-keramiku a některé typy bioskla, případně anorganicko-organických kompozitů. Nejvýznamnější anorganickou složkou používaných náhrad kostí je hydroxyapatit, který má podobné vlastnosti jako porézní kostní minerál apatit. Ten tvoří převážnou část trámčité (spongiózní) kosti. Trámčitá kost je přírodní kompozit z kolagenových vláken. Příkladem organické složky tedy může být biodegradabilní kolagen. Zatímco bioskla, kvůli své nízké mechanické pevnosti, nemohou být mechanicky zatěžována (nehodí se k nosným aplikacím), bioaktivní sklo-keramické materiály na bázi wollastonitu a apatitu mají výrazně lepší mechanické vlastnosti. Díky tomu se využívají v neurochirurgii, ortopedii nebo obličejové chirurgii [3, 4, 5].

Poslední a nejzajímavější skupinu biomateriálu nazýváme resorbovatelné (vstřebatelné) materiály. Po jejich aplikaci mají jen omezenou dobu účinku, protože jsou biologickým systémem postupně rozpouštěny a vstřebány, což je velmi žádoucí. Rychlost vstřebatelnosti použitých materiálů by měla odpovídat rychlosti regenerace lidské kostní tkáně. Ta závisí mimo jiné na stáří jedince a pohybuje se v rozmezí 3 - 6 měsíců. Například syntetický HA se v těle rozpouští velmi pomalu, zatímco trikalciumfosfát (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) naopak příliš rychle. Vhodná je tedy kombinace obou dvou. Z hlediska Hlavní funkcí resorbovatelných materiálů je dočasná náhrada kostí před samotnou regenerací kostní tkáně (osifikace). Při tomto procesu nedochází k tvorbě fibrózního rozhraní. Oproti běžnému metabolickému přísunu iontů implantáty výrazně zvyšují jejich tok důležitý pro tvorbu kostní tkáně. Příkladem vhodných materiálů jsou některá bioskla, dvoufázový kalciumfosfát, vyrobený z TCP a HA nebo některé materiály na bázi vápenatých solí (sírany, uhličitany a fosforečnany) [2, 3, 5].

Dělení dle materiálové povahy

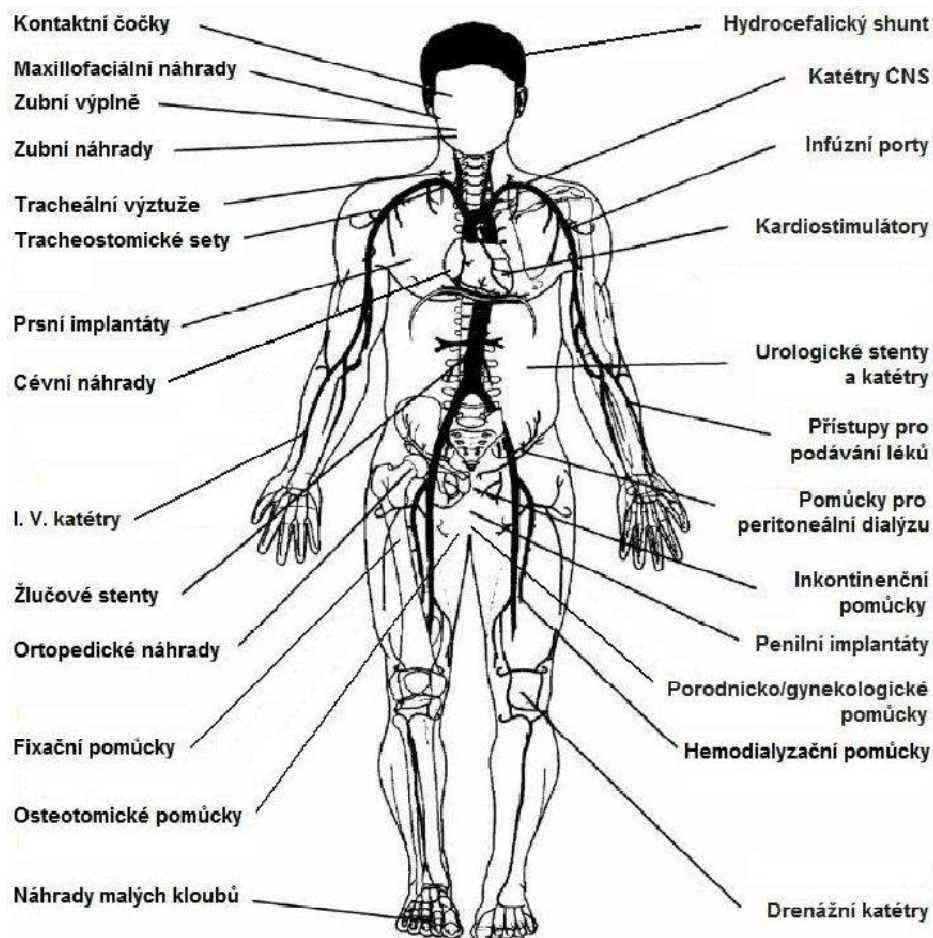
Kovy se používají zejména kvůli své vysoké mechanické odolnosti vůči opotřebení a nárazům, pevnosti a houževnatosti. Jejich obrovskou nevýhodou je koroze v kontaktu s fyziologickým prostředím, z čehož také plyne jejich nízká biokompatibilita. Dalšími nevýhodami jsou odlišné mechanické vlastnosti oproti biologickým tkáním. Youngův modul pružnosti kovů (100 - 250 GPa) je mnohonásobně větší než u lidské kosti (20 GPa). Příkladem kovových biomateriálů jsou Au, Ag, Ti a jeho slitiny, nerez a slitiny Co-Cr. Kovy se aplikují jako zubní implantáty, kloubní náhrady a šrouby [6, 7].

Polymerní biomateriály se využívají díky své nízké hustotě, elasticitě a snadné výrobě. Nevýhodou je, že se v důsledku své nízké mechanické pevnosti a odolnosti s časem opotřeby. K těmto materiálům patří polyetylen, PCL, PLGA, PGA, fibrin, PLLA, chitosan, kyselina hyaluronová nebo silikonová pryž. Na obrázku 2.1 jsou uvedeny příklady jako zubní nebo prsní implantáty, stehy, uši, nosy, kyčelní pouzdra a dokonce i srdeční chlopně. [6, 7].

Často využívaným přírodním, polymerním materiálem je kolagen, který na náš organismus působí velmi pozitivně díky jeho vlastnostem (netoxický, biokompatibilní, bioresorbovatelný, není antigenní). Získává se nejčastěji z vepřové kůže nebo kůže skotu, protože jsou fyziologicky stejné, jako je kolagen v lidském těle [8].

Keramické biomateriály jsou v současnosti velice populární. Prvním důvodem je skutečnost, že podstatnou část kosti tvoří minerální fáze. Druhým je vysoká biokompatibilita. Hlavními nevýhodami keramiky jsou křehkost, nízká pevnost v tahu a nízká elasticita. Nejčastěji se využívá kalciumfosfátová keramika pro náhrady kostních tkání. Pro zubní a ortopedické implantáty vyhovují oxid hlinitý (Al_2O_3) nebo oxid zirkoničitý (ZrO_2). Z keramiky se také vyrábí lékařské nástroje a zařízení [6, 7].

Kompozitní biomateriály kombinují nejvhodnější vlastnosti z kovových, polymerních, keramických a přírodních materiálů. Tímto dosáhnou požadované vysoké biokompatibility, pevnosti a odolnosti vůči korozi. Značnou výhodou u kompozitních biomateriálů je možnost jejich výroby na míru. Příkladem jsou uhlíkové kompozity nebo kostní cementy, využívané pro kloubní a kolenní implantáty, zubní náhrady a srdeční chlopně, viz. Obr. 2.1 [6, 7].



Obr. 2.1 Příklady využití různých typů biomateriálů na lidském těle [7].

Vzhledem k tématu této práce a k tomu, že mají keramické materiály nejpodobnější chemické složení a vlastnosti jako lidská kost, se budeme dále zabývat kostními náhradami, zejména náhradám spongiózní (trámčité) kosti.

2.2 KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je nový obor zdravotnické technologie. Ke vzniku vedl v posledních dvou desetiletích nárůst potřeb, s cílem opravy, zachování nebo výměny poškozených orgánů a tkání. Tkáňové inženýrství může být definováno jako multidisciplinární obor, využívající poznatků inženýrské a biologické vědy, k vývoji biologických náhrad [9].

V současnosti se k náhradě kosti nejčastěji využívají porézní lešení, dále jen skafoldy (z anglického "scaffolds"). U skafoldů se před aplikací osadí jejich simulovaný lidský matrix (trámečky) kostními buňkami in vitro, vysvětleno dále v kap. 2.3. Ty umožňují simulovat lidský extracelulární matrix. Díky tomu dochází k množení, migraci a růstu tkáňových buněk. Podmínkou je naprostá biokompatibilita a podpora buněčné adheze a růstu. Časem dochází k rozpadu resorbovatelného skafoldu, který je nahrazen vlastním buněčným matrixem [8, 9].

Pro kostní tkáňové inženýrství se nejčastěji využívají materiály získané synteticky, které obsahují vápenatou a fosforečnanovou skupinu. V roce 1920 byly provedeny první klinické pokusy k nápravě kostních defektů, jež využily sloučeniny na bázi fosforečnanu vápenatého. Následně bylo postupně v klinické medicíně úspěšně aplikováno mnoho keramických sloučenin, jako jsou dikalcium fosfát dihydrát, trikalcium fosfát, oktakalcium fosfát (OCP) nebo $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (brašit). Tyto sloučeniny, použité při výrobě, umožní skafoldu dosáhnout pórovité struktury, která je nezbytná pro vrůstání kostní tkáně [7].

2.2.1 Požadavky na biokeramické skafoldy

Biokeramické skafoldy mají v současné moderní medicíně velký význam pro náhrady poškozených kostí, u kterých dochází vlivem stáří nebo nádorových onemocnění k degradaci kostní tkáně. Tu je nezbytné odstranit. Právě biokeramické skafoldy umožní vzniklé vakantní místo nahradit, protože poskytují místo a prostor k proliferaci a růstu nových buněk. Při vývoji skafoldu je kladen velký důraz na jeho biologické vlastnosti a vstřebatelnost, zmíněné v kap. 2.1.1. [11].

Mezi další nezbytné vlastnosti patří trojrozměrná struktura skafoldu, podobná struktuře kosti, jež umožňuje buňce přepravu kyslíku a živin pro vaskularizaci tkání a kapilár. Zásadní vliv má na proliferaci (množení) buněk a vaskularizaci tkáně velikost pórů v materiálu. Póry musí být vzájemně propojené. Jejich velikost by měla v ideálním případě dosahovat 150 až 500 μm . Žádoucí je také mikroporozita skafoldu ($<100 \mu\text{m}$), umožňující přenos živin, buněčnou adhezi a proliferaci buněk [10].

Z hlediska mechanických vlastností skafoldu je důležité, aby při manipulaci s ním nedošlo ke zborcení struktury. Rovněž by měl vydržet namáhání během běžné fyzické aktivity. Z těchto požadavků plyne, že by mechanické vlastnosti skafoldu měly ideálně odpovídat mechanickým vlastnostem hostitelské kosti [10, 12]. Youngův modul kosti odpovídá 15 - 20 GPa, pevnost v tlaku 100 až 200 MPa. Důležitá je i snadná tvarovatelnost skafoldu, aby odpovídal tvaru defektu kosti [10].

Při vzrůstajícím objemu pórů v materiálu skafoldu klesá jeho pevnost. Z toho důvodu je třeba najít kompromis mezi oběma vlastnostmi, v závislosti na aplikaci skafoldu.

2.3 CHARAKTERIZACE PORÉZNÍCH BIOKERAMICKÝCH MATERIÁLŮ

U porézních biokeramických materiálů charakterizujeme jejich vlastnosti, které jsou žádoucí pro následné nahrazení využití v kostním tkáňovém inženýrství.

2.3.1 Testování biologické kompatibility

Biologickou kompatibilitu implantátů hodnotíme laboratorními testy. Užívá se dvou typů testování:

- in vitro
- in vivo

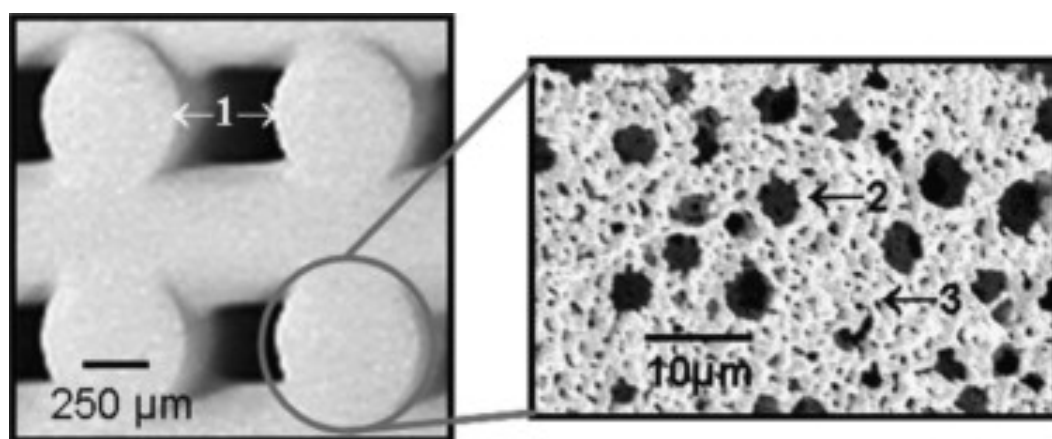
Testování vzorků mimo živý organismus nazýváme in vitro. Tato metoda probíhá v nádobě (sklo, plast), ve které je simulováno fyziologické prostředí, kterému je zkoumaný materiál vystaven. Tímto způsobem je studována interakce buněk s materiálem za definovaných fyziologických podmínek, jako jsou například teplota, nebo množství CO₂. In vitro lze přímo testovat reakci lidských buněk na přidaný typ materiálu, ačkoliv je metoda oproti metodě in vivo značně zjednodušená. Důvodem je, že není možné zohlednit vlivy okolních tkání a orgánů. Rovněž metodou in vitro nelze napodobit některé činnosti hormonů, enzymů, či jiných chemických látek v lidském těle [13, 14].

Významnější metoda, zvaná in vivo, testuje materiál přímo v živém organismu. Při klinických testech na lidském těle nedochází k zanedbání žádných faktorů, ale s ohledem na bezpečnost se používá pouze v konečné fázi výzkumu. Proto se nejčastěji testuje na zvířatech, kdy jsou drobné vzorky materiálu aplikovány do kosti hostitele. Po určité době se vyhodnocují chemicko-fyzikální interakce na rozhraní implantát-kostní tkáň. Z hlediska hodnocení je velmi důležitý postup vkládání i způsob zacházení

s daným vzorkem. Reakce kostní tkáně na implantát se liší v závislosti na typu materiálu a také dle pacienta [13, 14]. Výroba implantátu může být uskutečněna až po těchto testech.

2.3.2 Porozita a velikost pórů

Porozita je definována jako procento volného objemu v pevném materiálu. Jedná se o morfologickou vlastnost, tudíž není závislá na typu materiálu [15]. V kostním tkáňovém inženýrství dělíme porozitu z hlediska velikosti na makroporozitu (velikost pórů $> 100 \mu\text{m}$) a mikroporozitu (velikost pórů $< 100 \mu\text{m}$) [10]. Na obrázku 2.2 lze pozorovat srovnání makroporozity a mikroporozity HA skafoldu.



Obr. 2.2 Srovnání pórů HA skafoldu, 1) makropóry, 2) a 3) mikropóry v trámečku skafoldu [12].

Vlivy porozity

Pokud chceme dosáhnout co nejrychlejšího upevnění implantátu v těle a docílit tak rychlejší regenerace kostní tkáně, je zapotřebí nejen vysoká porozita implantátu, ale hlavně dostatečná velikost pórů. Pouze vysokou porozitou ve struktuře implantátu nelze zajistit vrůstání tkáně do implantátu. Díky vhodné kombinaci těchto dvou aspektů docílíme vzniku zcela nové kostní tkáně, jenž bude mít vlastnosti odpovídající kosti původní [11].

Průměrná velikost osteonů v lidském těle je přibližně $220 \mu\text{m}$ [15]. S ohledem na tuto skutečnost se udává, že optimální velikost pórů ve skafoldech, pro dostatečné zajištění hloubky vrůstu kostní tkáně a její vaskularizaci, je alespoň $300 \mu\text{m}$, maximálně pak 1 mm [10]. Menší velikost pórů může vést k zaškrcení nově vzniklých cév, čímž dochází k tzv. hypoxii tkáně. Na vznik nové tkáně má vliv také geometrie pórů. Jestliže jsou póry příliš dlouhé nebo zakřivené, nově vznikající tkáň do implantátu špatně vrůstá [15].

Spongiózní (trámčita) kost má porozitu v rozmezí 30 až 90 % [10]. Proto je nutné stanovit porozitu skafoldu, kterým chceme poškozenou kost nahradit.

Výpočet porozity

Při určení porozity se využívá několika metod výpočtu. Pro výpočet celkové porozity Π platí rovnice:

$$\Pi = 1 - \frac{\rho_{scaffold}}{\rho_{material}} \quad (1)$$

kde $\rho_{scaffold}$ vyjadřuje objemovou hustotu skafoldu měřenou jako jeho podíl hmotnosti a objemu, $\rho_{material}$ je teoretická hustota materiálu, z něhož je skafold zhotoven [15].

Další metoda, užívaná k měření porozity i velikosti pórů, je založená na intruzi rtuti. Skafold se umístí do penetrometru, kde se do něj pod tlakem vstříkuje rtuť. Takto mohou být změřeny póry o velikostech 3 nm – 1 mm [16]. Podle Washburnovy rovnice poloměr pórů r , které mohou být zaplněny, klesá s rostoucím tlakem P :

$$P = 2\sigma \cos\theta / r \quad (2)$$

kde σ vyjadřuje povrchové napětí a θ je kontaktní úhel. K výpočtu otevřené porozity π slouží vztah:

$$\pi = \frac{V_{intrusion}}{V_{scaffold}} \quad (3)$$

kde je $V_{intrusion}$ celkový objem pohlcené rtuti a $V_{scaffold}$ objem skafoldu. Pomocí vztahů (1) a (3) lze odhadnout uzavřenou porozitu ω tak, že:

$$\omega = \Pi - \pi \quad (4)$$

Pro určení otevřené porozity π se také využívá metody přesunutého objemu. Ta je dána rovnicí:

$$\pi = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \quad (5)$$

Naimpregnovaný skafold je ponořen do látky, ve které se nerozpouští, o známém objemu V_1 . Následný střídavý cyklus přetlaku a podtlaku donutí vtéct kapalinu do pórů. Po dokončení cyklování se zjistí celkový objem skafoldu a kapaliny, označený V_2 . V poslední fázi se skafold vyjme z nádoby, v níž zůstane objem kapaliny V_3 [15].

2.3.3 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti biokeramických implantátů úzce souvisí s výší jejich porozity, velikostí zrn, atd. S rostoucí porozitou klesá (přibližně exponenciálně) mechanická pevnost v tlaku. Tuto závislost popisuje např. Barraleta a kol. [17], kdy u fosforečnanové keramiky klesla pevnost v tlaku z 37 MPa při celkové porozitě 31 % na 430 kPa při celkové porozitě 63 %.

Další mechanická vlastnost, lomová houževnatost, nepřesahuje u HA biokeramiky hodnotu $1,2 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ [19]. Důvodem je chybějící kolagen, který tvoří 85 až 90 % organické části matrixu u lidské kosti [10]. Lidská houbovitá kost má $2 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, kost hutná $12 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$. Obecně platí, že se lomová houževnatost zvyšuje s klesající velikostí zrn [19].

2.4 METODY PŘÍPRAVY PORÉZNÍCH BIOKERAMIK

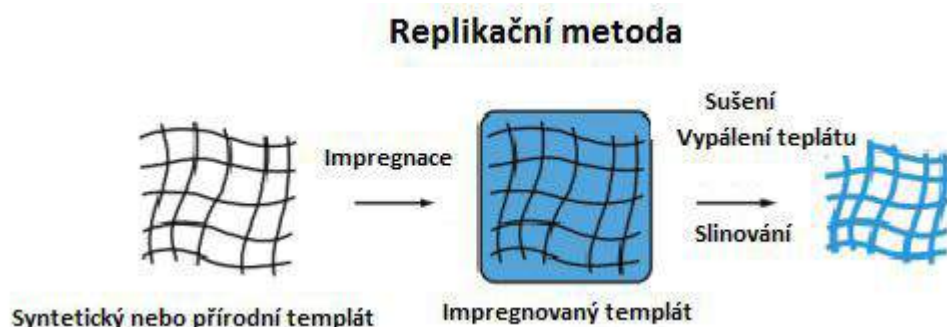
Syntéza a technologická příprava biokeramických materiálů patří z hlediska odbornosti a potřebných praktických zkušeností mezi náročné a detailně propracované výrobní postupy. Na typu metody a technologickém postupu přípravy závisí výsledná kvalita a struktura vyrobeného biomateriálu [4]. Postup výroby porézní biokeramiky, který platí pro všechny biomateriály, se obecně skládá z vytvoření prvotní směsi, ze které se následným tvarováním získává požadovaná porézní struktura. Následuje vysoušení, odstranění pojiv a slinování [20]. Syntéza keramických prášků patří mezi důležité faktory přípravy, proto se požaduje jejich vysoká čistota, kulový tvar a monodispérznost [4].

Byla navržena široká škála metod pro výrobu porézních biokeramik. Tyto metody umožňují simulovat 3D strukturu kostní tkáně a její charakteristiky. Každá metoda se nejlépe hodí pro výrobu určitého rozsahu vzájemného propojení a velikosti pórů [21]. Propojení a velikost pórů souvisí s relativní hustotou materiálu, která ovlivňuje celkovou pevnost [22].

2.4.1 Replikační metoda

Většina keramických pěn je v současnosti vyráběna *průmyslově pomocí replikační techniky, která se používá od roku 1963* [22]. Jak je patrné z obr. 2.3 technika spočívá v impregnaci pružného templátu (šablony) v keramické suspenzi, jejíž přebytek se z materiálu následně odstraní, např. lisováním nebo odstředěním. Aby bylo možné templát dobře smáčet, je žádoucí minimální velikost pórů přibližně 200 μm [22].

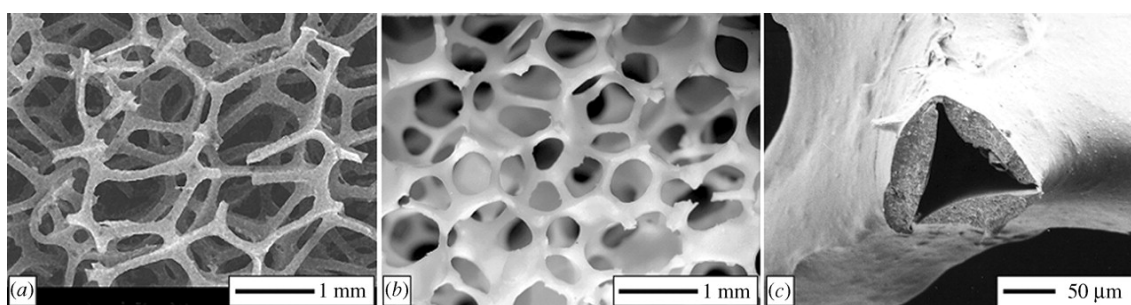
Následuje sušení a vypálení templátu při teplotách 300 – 800 °C [18] a slinování (1100 - 1700°C) [22]. Vypalování musí být provedeno dostatečně pomalou rychlostí, z důvodu zabránění vytváření napětí a defektů v keramické struktuře [22]. Ke zlepšení odolnosti vůči vzniku defektů ve struktuře jsou do keramické suspenze přidány pojiva a změkčovadla, například fosforečnan hlinitý, draslík, aj. Slinováním dojde ke zhutnění materiálu a propojení jednotlivých zrn [18].



Obr. 2.3 Replikační metoda [18]

Templátem je většinou polymerní pěna na bázi polyuretanu, polyvinylchloridu či polystyrenu [22]. Další alternativou je replikace pomocí přírodních materiálů, jako jsou dřevo, rostlinné stonky, korály, latex, celulóza a jiné [18]. Přírodní pěna musí mít reprodukovatelné a vhodné vlastnosti jako jsou například schopnost získat zpět svůj tvar po stlačení, omezené tolerance pro velikost buněk a jejich distribuci [22]. Také je nezbytné její naprosté vyhoření v průběhu spékání. Hlavní výhodou přírodních šablon je jejich složitá morfologie, kterou je obtížné připravit uměle [10].

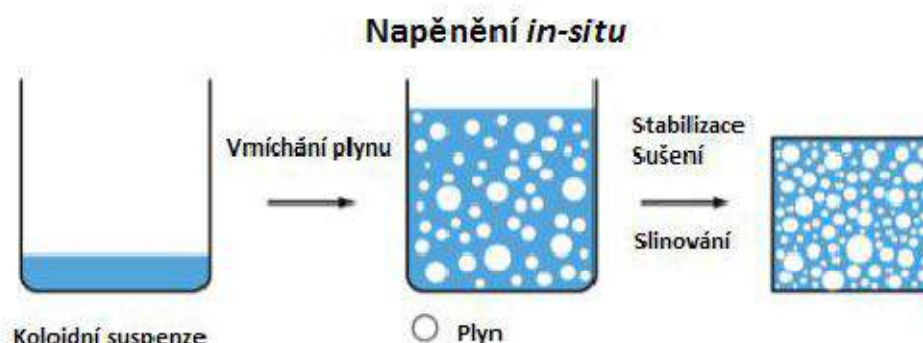
Na obrázku 2.4 jsou zobrazeny struktury polyuretanové houby a keramické pěny.



Obr. 2.4 (a) mikrosnímek šablony polyuretanové pěny z rastrovacího elektronového mikroskopu; (b) keramická síť (Al_2O_3); (c) detail duté keramické vzpěry [22].

2.4.2 Metoda přímého pění (in situ)

Základem metody přímého pění je začlenění plynné fáze do keramické suspenze, jako je na obr. 2.5. Na množství obsaženého plynu závisí celková porozita [18]. Ta se pohybuje v rozmezí 45 % až 95 % [10]. Nadouvadlem může být těkavá kapalina s nízkou teplotou varu, pevná látka jako je například CaCO_3 prášek, který se rozkládá při zahřívání nebo plyn, vytvořený in situ chemickými reakcemi. Nukleace plynových bublin uvnitř kapalně suspenze je ovlivněna přítomností suspendovaných částic, bubliny mají zpočátku kulovitý tvar a později rostou jako mnohostěnné buňky [22].



Obr. 2.5 Pění in situ [18]

Vlhké pěny podléhají tzv. Oswaldovu zrání, z toho důvodu, že jsou termodynamicky nestabilní. To vede k nárůstu velikosti pórů. Z toho důvodu je směs nutné stabilizovat [18].

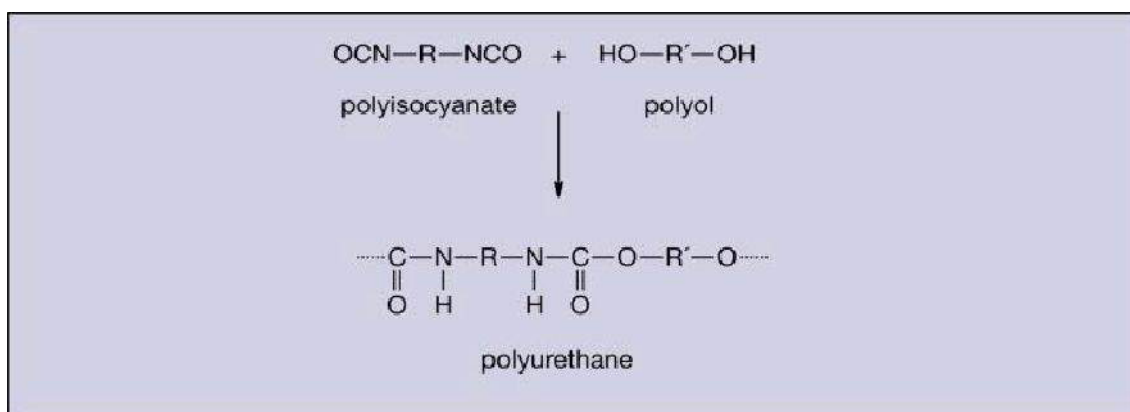
Na rozdíl od metody replikační umožňuje metoda pění in situ výrobu jak uzavřených, tak i otevřených buněk (makropórů) pěny s širokou distribucí velikosti pórů mezi 10 μm až několika milimetry. [10]. Zároveň jsou keramické vzpěry hustější a mají omezené množství defektů, což vede ke zlepšení mechanické pevnosti. Pevnost v tlaku může dosáhnout až 30 MPa při porozitě 70 %. Naopak, je touto metodou obtížnější vyrobit materiál s úzkou distribucí velikosti buněk. Také z hlediska struktury dochází k nežádoucí anizotropii, způsobené rozdílnou expanzí ve směru nárůstu vůči příčnému směru během pění [22]. Metoda rovněž není vhodná pro velké rozměry vzorků, protože u nich během slinování dochází k popraskání [10].

Jako pojivo a zároveň i jako pěnidlo pro keramický prášek, lze použít polyuretanové (PU) pěny. PU pěny jsou rovněž pěněny in situ a proto se nabízí k výrobě keramických pěn [23, 24].

POLYURETANY

Polyuretany jsou významnou třídou polymerů, používaných pro velké množství výrobků. Polyuretanové aplikace jako povlaky, vlákna, pěny a elastomery demonstrují flexibilitu uretanové chemie a tvořivost polymerních vědců. Experimenty pro výrobu polyuretanů v laboratoři nejsou snadno dostupné. A to zejména pro polyuretanové pěny [23].

Polyuretanem je každý typ polymeru, který obsahuje uretanové vazby (-NH-CO-O-). Průmyslově se polyuretany vyrábí pomocí adiční reakce mezi polyisokyanátem a látkami, které mají aktivní atom vodíku, jako jsou například polyoly (polyalkoholy), viz. obr. 2.6 [23].



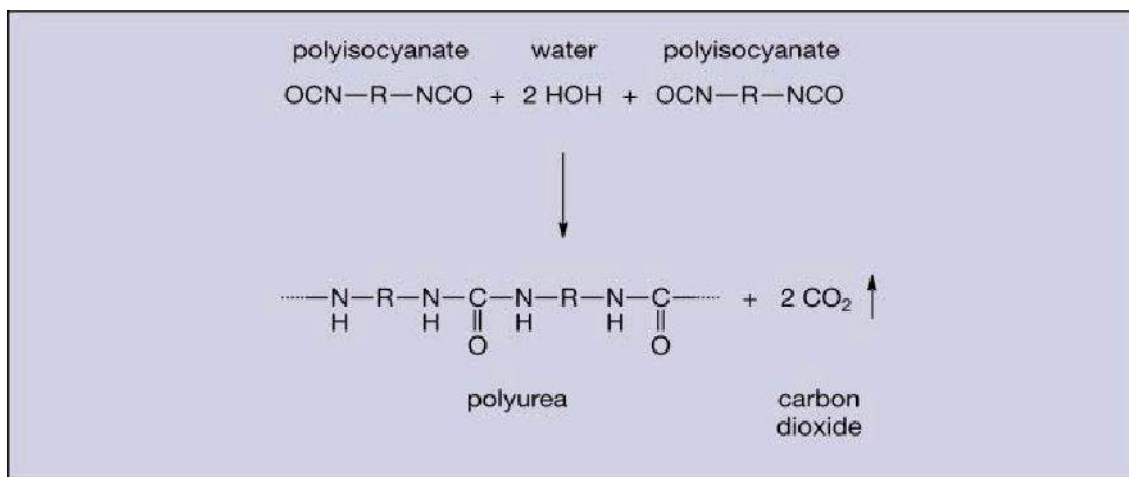
Obr. 2.6 Reakční rovnice polyuretanu [24]

Pro kompletní polymeraci musí být stejné množství izokyanátu (NCO) a alkoholu (OH) skupiny. V praxi se používá malý přebytek izokyanátu ke kompenzaci vlhkosti (vody), která je obvykle přítomna v polyolech a rovněž s izokyanáty reaguje. Tuto chemickou reakci popisuje obr. 2.7. Míru poměru mezi množstvím NCO a OH skupin vyjadřuje takzvaný NCO index, počítaný dle vztahu [23]:

$$I_{\text{NCO}} = \frac{m_{\text{ISO}} \times n_{\text{ISO}}}{[(m_{\text{H}_2\text{O}} \times n_{\text{H}_2\text{O}} + m_{\text{POLY}} \times n_{\text{POLY}})]} \quad (6)$$

kde m jsou hmotnosti a n ekvivalentní čísla isokyanátu, vody a polyolu.

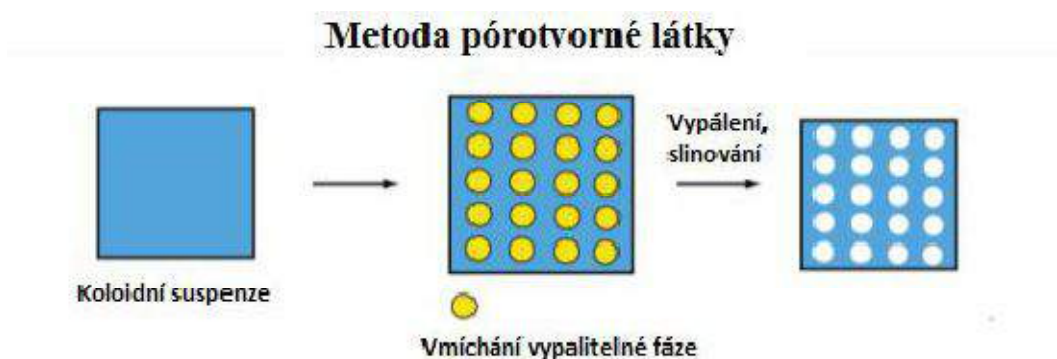
Například NCO index roven 1,05 vyjadřuje 5 % přebytek NCO skupin v molech, než je třeba k úplné reakci se skupinami OH [23].



Obr. 2.7 Reakční rovnice polyuretanu za použití H₂O [24]

2.4.3 Metoda pórtvorné látky

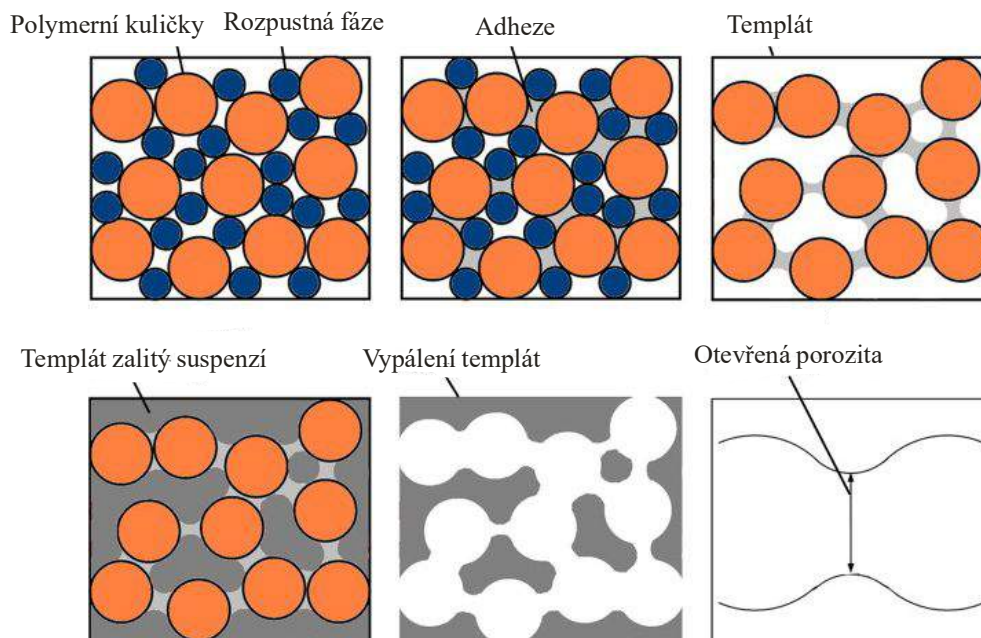
Základem této metody, jak je vidět na obr. 2.8, je vytvoření kompozitu ze dvou fází (suspenze a obětovaná fáze) [18]. Příkladem je dvoufázový kompozit, složený z keramického roztoku a pórtvorné přísady na bázi polymeru, grafitu nebo škrobu. Kompozit se zahřeje na teplotu degradace rozptýlené fáze. Dispergovaný materiál je vypálen a jeho spaliny difundují základním materiálem do okolí. Takto vznikne keramická struktura s póry v místech, kde se původně nacházely částice polymeru. U této metody je velkou výhodou odlévání suspenze do forem, díky čemuž nenastávají problémy s napěňováním a stabilizací pěny [18]. Porozita se u takto připravených biokeramik pohybuje mezi 20 - 90 %, velikost pórů v rozmezí 1 až 700 μm. Nevýhodou metody pórtvorné látky je špatná vzájemná propojitelnost pórů [10].



Obr. 2.8 Metoda pórtvorné látky [18]

Zajímavou metodu přípravy porézní struktury popisují ve své práci Yufei Tang a kol. [26]. Základem je tvorba směsi kuliček polymeru a fáze NaCl, která je rozpustná ve vodě. Vysledná směs se prolíje látkou na polymerní bázi a zajistí se tak slepení

kuliček, viz obr. 2.9. Templát vznikne poté, kdy se získaná struktura propláchne deionizovanou vodou, ve které se NaCl rozpustí a odplaví. Templát se zalije keramickou suspenzí a nechá se slinout. Díky vysoké teplotě dochází k vypálení polymerní fáze a vzniku porézní struktury s otevřenou porozitou [26].

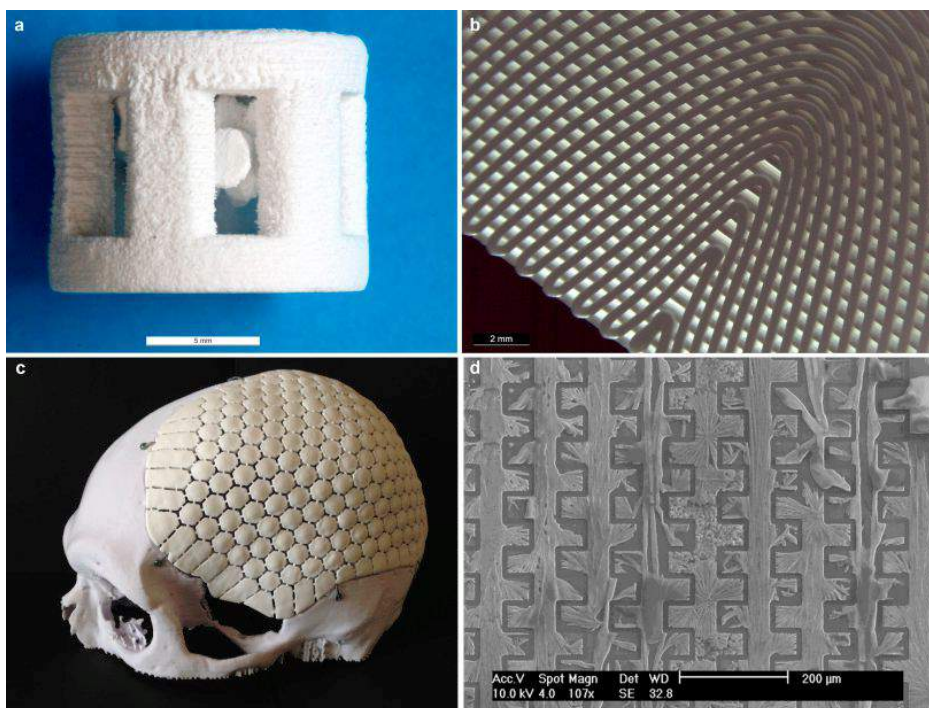


Obr. 2.9 Výroba templátu za pomoci polystyrenových a NaCl [26].

2.4.4 Rapid prototyping

Metody rapid prototyping (také označované jako solid free-form fabrication, SFF) umožňují vyrábět 3D keramiku předem navrhnutou v CAD programech nebo pomocí digitálních dat z počítačové tomografie či magnetické rezonance. U těchto metod tedy není potřeba žádná forma pro polotovár, ten vznikne opakovaným nanášením jednotlivých vrstev [28]. Obrovskou výhodou těchto metod je možnost výroby složitých tvarů implantátu, s přesnou velikostí pórů a dalšími rozměry [29]. To vede k výrazně lepším mechanickým vlastnostem implantátu, než u běžných metod [30].

Mezi nejčastěji používané techniky patří 3D tisk, stereolitografie, robocasting, selektivní laserové spékání (SLS) nebo tání (SLM) a tavící nanášení (FDC) [10]. Příklady získaných struktur pomocí metod rapid prototyping jsou ukázány na obr. 2.10.



Obr. 2.10 Příklady struktur zhotovených pomocí metod rapid prototyping. a) 3D tisk skafoldu, b) struktura materiálu získaná metodou robocasting, c) implantát pro léčbu mozkových kostních defektů, d) vzor prostaty vytvořený na křemíkovém podkladu pomocí FDC [27].

ROBOCASTING

Metoda, zvaná robocasting se využívá zejména pro nanášení suspenze s vysokým obsahem keramických částic a minimálním obsahem organických látek (~ 1 %). Nanášení se obvykle provádí v olejové lázni, aby se zabránilo vysychání suspenze. [29]. Aby byla suspenze schopna proudit přes trysku, musí mít nízkou viskozitu. Vysokým modulem pružnosti v klidu a vysokým napětím na mezi kluzu se zajistí tvarová stálost při nanášení [30].

3D TISK

3D tisk je velice vhodnou metodou k výrobě implantátů pro aplikaci do poškozených míst kosti, kde vzniknou nepravidelné tvary [31]. Za pomoci trysky se po malých vrstvách nanáší granulovaný keramický prášek. Mezikrokem je přidání pojiva (polymeru) mezi každou vrstvou. Po dokončení 3D modelu následuje tepelné vytvrzení pojiva, jeho vypálení a slinování modelu [28].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Cílem experimentální části bylo pomocí zvolené metody připravit porézní biokeramické materiály s požadovanými mechanickými a biologickými vlastnostmi, zmíněnými v kap. 2.2, které by mohly sloužit jako náhrada kostních tkání.

3.2 MATERIÁL, METODIKA

Zvolenou metodou k přípravě biokeramických pěn byla metoda přímého pění (in situ), popsána v kap. 2.3.2.

3.2.1 Použité materiály

Komerční keramický prášek beta-trikalciumfosfát (Fluka, Švýcarsko); chemický vzorec $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, o měrném povrchu $1,6 \text{ m}^2/\text{g}$ a střední velikosti aglomerátů $7,7 \text{ }\mu\text{m}$.

Ongronat® 2500 MDI (BorsodChem Zrt., Maďarsko). MDI (2,2'/2,4' a 4,4'-metylen-difenyldiisokyanát) je aromatický isokyanát a klíčová polyuretanová surovina s obsahem isokyanátových funkčních skupin (NCO) 30,5%. Ongronat je vhodný k výrobě tuhých nebo konstrukčních pěn a lepidel.

Polyol Stepanpol PS-2412 (Stepan Company, USA). Stepanpol PS-2412 je modifikovaný anhydrid kyseliny ftalové na bázi aromatického polyesterového polyolu, určeného pro použití v aplikacích s tvrdými pěny. Hydroxylové číslo je 230-250 mg KOH/g s obsahem vody maximálně 0,15 hm%.

3.2.2 Postup

Příprava vzorků

Pomocí reakcí mezi diisokyanátem ONGRONAT 2500 a polyolem Stepanpol PS-2412 bylo připraveno 17 porézních polyuretan/CaP kompozitních vzorků. Podrobné složení připravených vzorků je uvedeno v Tab. 1, kde označení vzorků tvoří: *izokyanátový index_množství vody vzhledem k polyolu (v hm%)_hmotnost β -TCP v gramech*. Stejně označení vzorků je použito v celé experimentální části této bakalářské práce.

Tab. 1 Hmotnostní složení připravených vzorků

<i>označení vzorku</i>	<i>polyol [g]</i>	<i>voda [mg]</i>	<i>izokyanát [g]</i>	<i>β-TCP [g]</i>
1,05_0_4	3,09	0	1,91	4
1,05_2_4	2,55	51	2,40	4
1,05_4_4	2,17	87	2,74	4
0,9_0_4	3,27	0	1,73	4
0,9_0_5	3,27	0	1,73	5
0,9_0_6	3,27	0	1,73	6
0,9_0_7	3,27	0	1,73	7
0,9_0_8	3,27	0	1,73	8
0,9_2_4	2,74	55	2,21	4
0,9_2_6	2,74	55	2,21	6
0,9_2_8	2,74	55	2,21	8
0,9_4_4	2,36	94	2,55	4
0,9_4_5	2,36	94	2,55	5
0,9_4_6	2,36	94	2,55	6
0,75_0_4	3,47	0	1,53	4
0,75_2_4	2,96	59	1,98	4
0,75_4_4	2,58	103	2,32	4

Požadované množství polyolu, deionizované vody a keramického prášku bylo během 5 minut pečlivě smícháno v třecí misce. Poté se za přidání izokyanátu hmota míchala až do dosažení úplné homogenity směsi (maximálně 1 minutu). Výsledná směs byla v co nejkratší době umístěna do formy, kde se nechala po dobu 24 hodin. Během této doby probíhala reakce mezi kyanitovými a hydroxylovými skupinami, během níž se uvolňoval oxid uhličitý, čímž došlo k napěnění kompozitní směsi. Po vytvrdnutí, ukázka na obrázku 3.1, byly vzorky vyjmuty z forem, rozřezány na požadované tvary, zváženy a přeměřeny. Na obrázku 3.3a jsou ukázány finální tvary vzorků před tepelným zpracováním.

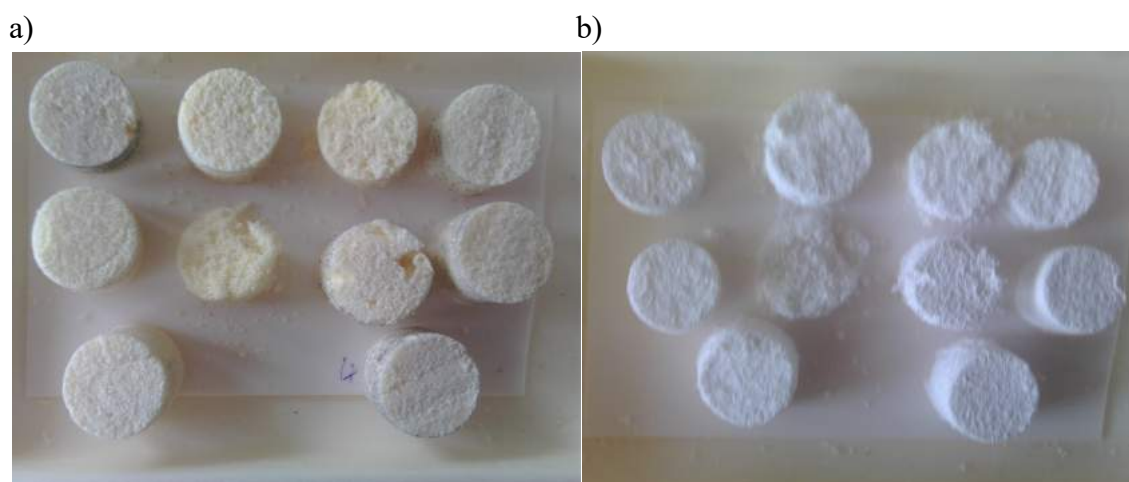
**Obr. 3.1** Ukázka vytvrzených pěn.

Tepelné zpracování

Polyuretanová část vzorků byla vypálena v peci při 1050 °C; doba pálení 2 hodiny. Nárůst teploty byl zvolen 0,5 °C/min, aby nedošlo vlivem rychlého nárůstu teploty k velké expanzi polyuretanu, což by mohlo způsobit destrukci makrostruktury. Poté byli vzorky dány do zařízení VITA Zyrcomat T (obr. 3.2) ke slinutí na 3 hodiny při teplotě 1200 °C, s nárůstem 5 °C/min (chlazení při poklesu 10 °C/min). Po slinutí (viz. Obr. 3.3b) byly vzorky opět zváženy a přeměřeny.



Obr. 3.2 Fotografie slinovacího zařízení VITA Zyrcomat T.



Obr. 3.3 Srovnání vzorků: a) před, b) po tepelném zpracování

Vytvoření keramografických výbrusů

Vzorky byly zality epoxidovou pryskyřicí (SpeciFix-20 Kit) za sníženého tlaku pomocí přístroje Struers Epovac. Před zalitím se nechaly vzorky vakuovat po dobu 30 minut. Takto zalité vzorky se nechaly vytvrdit (minimálně 8 hodin).

Následovalo broušení vzorků na zařízení Struers TegraForce-5. Po odbroušení přebytné vrstvy epoxidové pryskyřice (70 minut) byly vzorky broušeny nesusledným broušením po dobu 20 minut, při 300 ot/min a přitlačné síle 30 N. Při broušení bylo nutné smáčení vodou. Při leštění byly postupně použity 3 kotouče, se zrnitostmi 9, 3 a 1 μm , přitlačných silách 25, 20, 15 N, a příslušnými smáčedly DiaPro. Doba trvání leštění byla 10 min u každého kotouče.

Stanovení porozity a velikosti pórů

Celková porozita byla stanovena dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo vypočtení porozity (po slinutí) za použití vztahu (1), viz. kapitola 2.2, pomocí geometrického objemu, hmotnosti a teoretické hustoty materiálu, z něhož byl skafold zhotoven. Ve druhém případě bylo využito obrazové analýzy pomocí softwaru ImageJ. Snímky každého vzorku byly získány pomocí elektronového rastrovacího mikroskopu (SEM). Pro analýzu bylo třeba nejdříve převést snímek na binární zobrazení pomocí prahování. Celková porozita se poté stanovila jako procentuální zastoupení černých pixelů, které představovaly póry. Velikost pórů byla naměřena pomocí segmentace obrazu funkcí Watershed. Z naměřených průřezů pórů jsou výpočtem stanoveny průměry pórů. Analytická data obrazu byla založena jen na 2D náhodných řezech. Průměrná velikost pórů je ve skutečnosti větší, než bylo pomocí ImageJ stanoveno, protože nejsou póry vždy říznuty v ose. Pro korekci velikosti pórů byl použit stereologický korekční faktor, který má hodnotu 0,785 [32]. Tímto faktorem byly vypočtené průměry poděleny.

Testování rozpustnosti v Tris-HCl pufru

Cílem testu bylo simulovat podmínky *in vivo* a zjistit, zda jsou vzorky biodegradovatelné, tedy dojde-li k rozpustnosti v těle. Podmínky *in vivo* byly simulovány pomocí roztoku Tris-HCl, který má pH srovnatelné s krevní plazmou [33]. Pro tento test byly vybrány 4 vzorky se subjektivně největší pevností, aby se eliminovalo nežádoucí ovlivnění hmotnosti případnými zlomením trámečků, a dány do roztoku Tris-HCL o teplotě 36,3 °C a pH 7,21. Množství použitého Tris-HCl, ve kterém byl vzorek ponořen, záviselo na hmotnosti vzorku. Na 100 mg hmotnosti vzorku bylo použito 10 ml Tris-HCl. Takto se nechaly v inkubátoru, za neustálého třepání,

na 7, 14, 21 a 35 dní, při konstantní teplotě 37 °C. Po těchto úsecích byly vzorky vždy vyjmuty z roztoku, opláchnuty v deionizované vodě a sušeny na vzduchu při teplotě 90

°C, poté při 150 °C. Po vysušení byly vzorky převáženy a dány zpět do nového, čistého roztoku.

3.3 VÝSLEDKY

3.3.1 Hmotnostní úbytek a smrštění po tepelném zpracování

Připravené vzorky byly zváženy a změřeny před a po tepelném zpracování. Z těchto hodnot jsem stanovil jednotlivé hmotnostní úbytky, které jsou v tabulce Tab. 2 porovnány s teoretickým úbytkem hmotnosti. Teoretický úbytek hmotnosti byl stanoven jako hmotnost polyuretanu/hmotnost keramického prášku vynásobeno 100 %.

Tab. 2 Hmotnostní úbytky po tepelném zpracování.

<i>Vzorek</i>	<i>Naměřený hmotnostní úbytek [%]</i>	<i>Teoretický hmotnostní úbytek [%]</i>	<i>Odchylka naměřené od teoretické hodnoty [%]</i>
1,05_0_4	61,5	55,6	10,6
1,05_2_4	58,8	55,6	5,8
1,05_4_4	57,1	55,6	2,7
0,9_0_4	54,8	55,6	1,4
0,9_2_4	50,0	55,6	10,1
0,9_4_4	46,2	55,6	16,9
0,75_0_4	57,1	55,6	2,7
0,75_2_4	55,6	55,6	0,0
0,75_4_4	55,2	55,6	0,7
0,9_0_5	50,0	50,0	0,0
0,9_0_6	45,3	45,5	0,4
0,9_0_7	44,2	41,7	6,0
0,9_0_8	43,1	38,5	11,9
0,9_2_6	44,8	45,5	1,5
0,9_2_8	42,9	38,5	11,4
0,9_4_5	42,4	50,0	15,2
0,9_4_6	40,0	45,5	0,3

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že hmotnostní úbytek po tepelném zpracování závisí jednak na procentuálním zastoupení vody (0, 2, 4 % hmotnosti polyolu) a také hlavně na množství keramického prášku β -TCP (4-8 g). V prvních třech částech tabulky je vidět, že hmotnostní úbytek klesá s rostoucím obsahem vody ve vzorku. Závislost na izokyanátovém indexu nebyla nalezena. Největší úbytky hmotností nastaly u vzorků s NCO indexem 1,05. Z poslední části tabulky vyplývá, že úbytek hmotnosti klesá s rostoucím množstvím použitého keramického prášku ve vzorku. To je způsobeno

rostoucím poměrem β -TCP vůči polyuretanu, který se při 1050 °C v peci vypálil. Odchylky naměřených hodnot od hodnot teoretických jsou pravděpodobně způsobeny chybou v měření nebo možným odrolením částí při manipulaci se vzorkem.

Smrštění rozměrů vzorků vlivem tepelného zpracování bylo stanoveno dle vztahu (6) a (7). Průměr vzorku se smrští o $25,5 \pm 4,1$ %, výška vzorku o $33,5 \pm 6,3$ %.

Smrštění výšky:

$$h = \left(1 - \frac{h_1}{h_0}\right) \times 100 \quad (6)$$

Smrštění průměru:

$$d = \left(1 - \frac{d_1}{d_0}\right) \times 100 \quad (7)$$

kde h_0 (d_0) vyjadřují výšku (průměr) před tepelným zpracováním a h_1 (d_1) po něm.

3.3.2 Porozita a velikost pórů

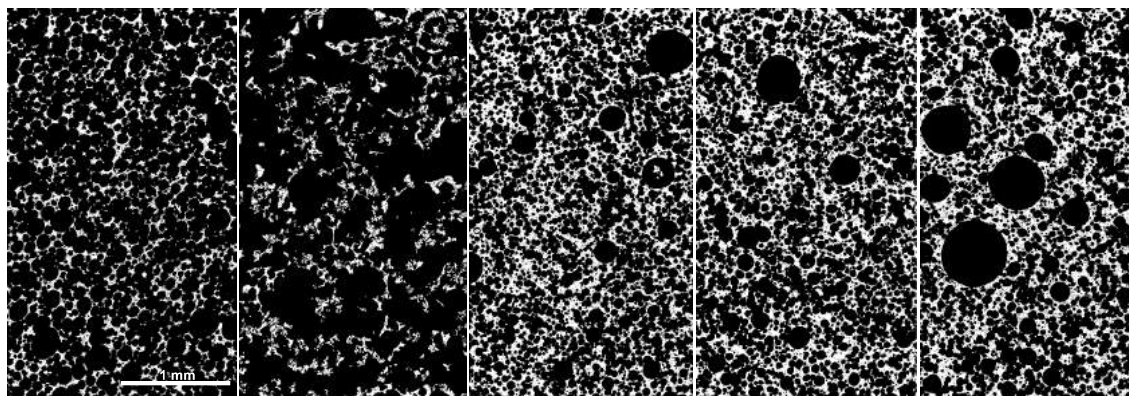
Srovnání vypočtené a stanovené (obrazová analýza) porozity jednotlivých vzorků je shrnuto v tabulce Tab. 3. V posledním sloupci tabulky jsou uvedeny příslušné průměrné velikosti pórů, získané pomocí softwaru ImageJ.

Tab. 3 Srovnání vypočtené porozity a stanovené porozity pomocí obrazové analýzy.

<i>Vzorek</i>	<i>Celková vypočtená porozita [%] 1200 °C/2 h</i>	<i>Celková stanovená porozita [%]</i>	<i>Průměrná velikost pórů [μm]</i>
1,05_0_4	83,3	78,5	90,6
1,05_2_4	87,3	86,0	143,9
1,05_4_4	87,6	85,5	137,7
0,9_0_4	83,8	83,9	115,7
0,9_2_4	85,0	78,5	107,4
0,9_4_4	85,8	80,6	111,6
0,75_0_4	82,3	80,0	97,5
0,75_2_4	85,8	81,6	115,5
0,75_4_4	86,4	86,2	144,3
0,9_0_5	79,6	×	×
0,9_0_6	72,9	71,1	75,2
0,9_0_7	75,8	73,3	79,1
0,9_0_8	72,8	69,0	78,5
0,9_2_6	79,2	78,5	116,4
0,9_2_8	79,3	80,0	108,1
0,9_4_5	78,9	83,9	117,9
0,9_4_6	73,8	84,8	130,2

Vliv prášku β -TCP

Byl studován vliv keramického prášku β -TCP na strukturu a vlastnosti připravovaného materiálu. Bylo připraveno 5 vzorků s různými hmotnostmi prášku (4-8 g) a izokyanátovým indexem 0,9, bez přidání H_2O . Po slinutí vzorky vykazovaly velmi nízkou mechanickou pevnost a docházelo k vydrolování trámeček po okrajích vzorků. Proto s nimi byla další manipulace velmi obtížná, což mohlo mít vliv na nepřesné stanovení porozity pomocí výpočtu z geometrického objemu, hmotnosti a teoretické hustoty β -TCP. Nicméně by tato metoda stanovení porozity měla být přesnější. Důvodem je, že při přípravě suspenze nebylo dosaženo úplné homogenity a porozita z obrazové analýzy je dána pouze jedním řezem každého vzorku. Z vypočtených hodnot je patrná klesající závislost porozity i průměrné velikosti pórů se vzrůstajícím plněním keramického prášku β -TCP, s výjimkou vzorku s plněním 6 g. Jednotlivé velikosti pórů a jejich distribuce jsou uvedeny na obrázku 3.4. Z obrázku je vidět u vzorku s plněním 5 g propojení jednotlivých pórů. Důvodem je, že během experimentu došlo k narušení struktury a téměř k úplnému rozpadnutí vzorku. Z toho důvodu není vzorku v tabulce Tab. 3 uvedena jak porozita, tak i průměrná velikost pórů z obrazové analýzy.



Obr. 3.4 Přehled průřezů vzorků ($I_{NCO} = 0,9$; 0 % H_2O) s plnivem 4 g (vlevo) až 8 g (vpravo) β -TCP. Snímky pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem.

Vliv přidání vody

Pro výzkum vlivu množství vody na strukturu materiálu byly připraveny vzorky s různým zastoupením deionizované H_2O v polyuretanu (0, 2 a 4 % hmotnosti polyolu). Na obrázku 3.5 je vidět, že přidání vody má vliv na povrch materiálu. Vzorky s mírným obsahem vody mají oproti vzorkům bez vody hladší povrch. Už po vytvrzení a rozřezání vzorků, viz. obrázek 3.6, bylo možné zpozorovat mírně rostoucí závislost porozity na množství přidání vody.

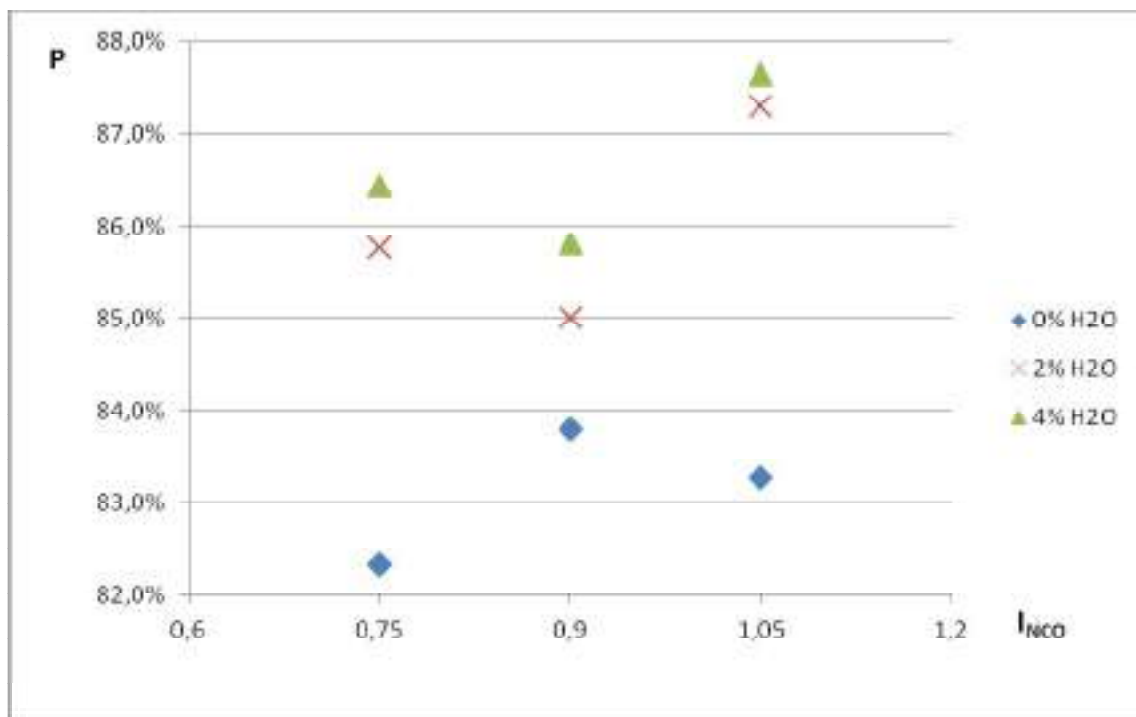


Obr. 3.5 Ukázka vytvrzených vzorků s plnivem 4 g β -TCP: zleva 0, 2, 4 % H_2O ; shora $I_{NCO} = 1,05$; 0,9 a 0,75.

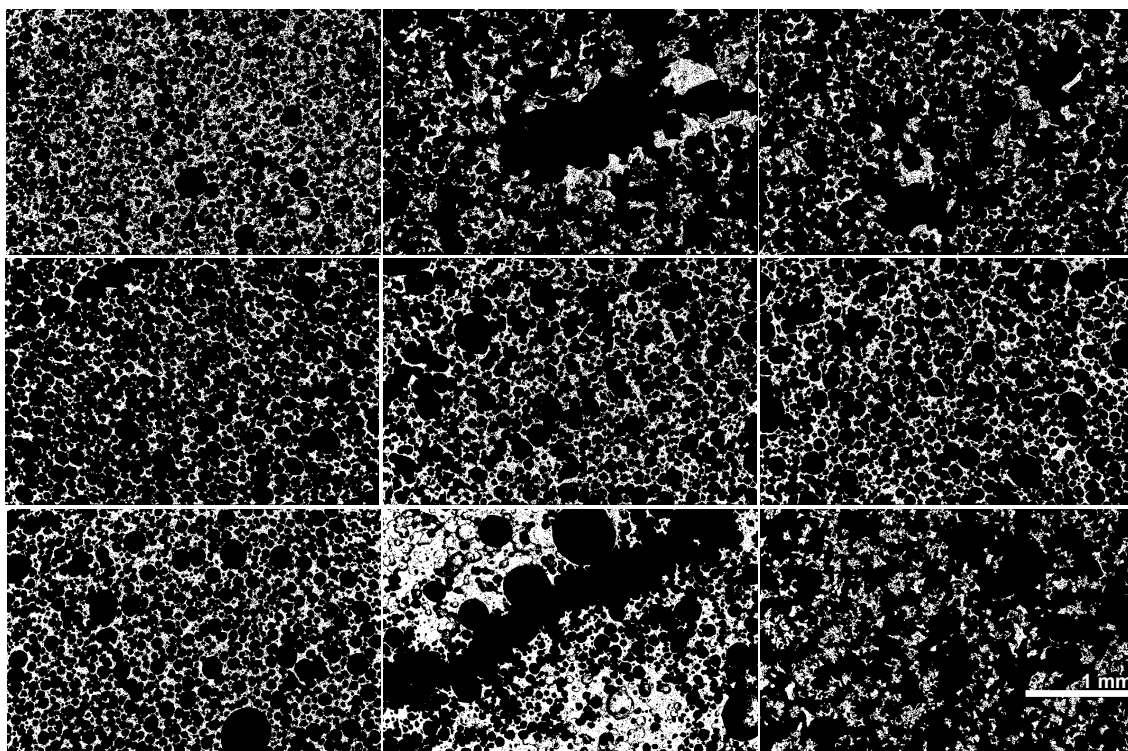


Obr. 3.6 Vzorky s $I_{NCO} = 1,05$ po rozřezání: zleva 0, 2, 4 % H_2O .

Z obrázku 3.6 je také patrná závislost velikosti pórů na množství přidané vody. Při vynesení hodnot vypočtené porozity do grafu na obrázku 3.7, můžeme rovněž pozorovat zvyšující se porozitu s množstvím přidané vody. Největší změna nastala u izokyanátového indexu 1,05 a to mezi vzorkem bez přidání vody a vzorkem s 2 % vody. Tuto závislost potvrzují rovněž snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu, na obrázku 3.8, s výjimkou prostřední části, kde jsou vyobrazeny struktury vzorků s $I_{NCO} = 0,9$.



Obr. 3.7 Graf závislosti celkové porozity na množství přidané H₂O.

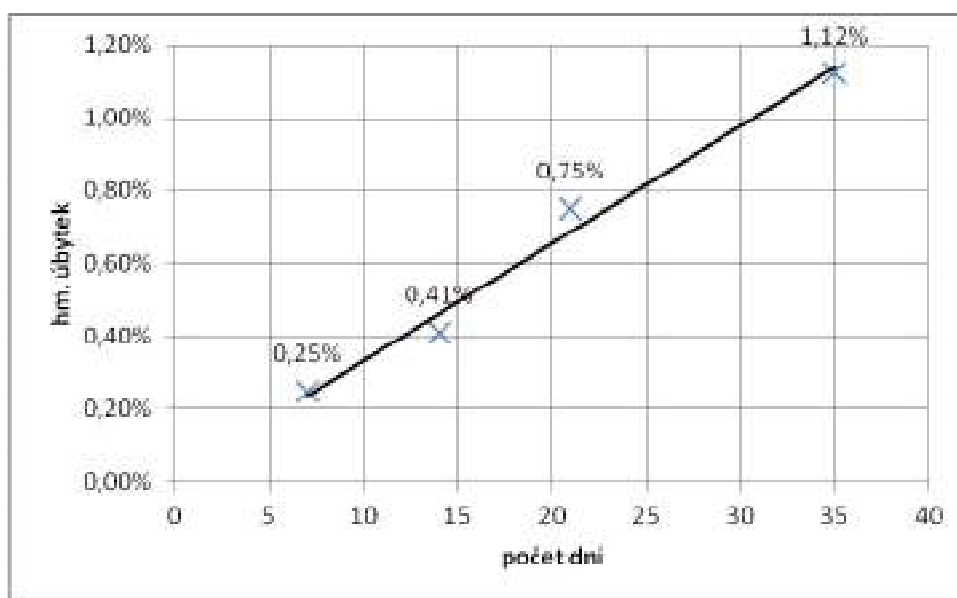


Obr. 3.8 Snímky ze SEM, odpovídající vzorkům z obrázku 3.3.

V prostřední části obrázku 3.8 je na horním i dolním snímku možné pozorovat popraskání vzorků (černé oblasti) vlivem vnitřního pnutí při broušení materiálu. To bylo způsobeno neúplným zalitím vzorků epoxidovou pryskyřicí.

3.3.3 Vyhodnocení degradability

Cílem tohoto testu bylo zjistit, zda jsou vyrobené materiály degradabilní. Už po prvních 7 dnech nastal nepatrný 0,25 % úbytek hmotnosti. Z naměřených hodnot hmotností po úsecích 7, 14, 21 a 35 dní byly stanoveny jednotlivé hmotnostní úbytky použitých vzorků. V závislosti na stejném chemickém složení všech čtyř vzorků, by měla jejich rozpustnost probíhat stejně rychle. Proto byly procentuální úbytky hmotnosti za daný čas aritmeticky zprůměrovány a zaneseny do grafu, znázorněném na Obr. 3.9.



Obr. 3.9 Hmotnostní úbytek materiálu v kontaktu s Tris-HCl.

Body grafu byly proloženy křivkou, která poukazuje na lineární závislost. Degradabilita materiálu sice byla dokázána, avšak vzhledem k velmi pomalé tendenci by takový materiál pro kostní tkáňové inženýrství vhodný nebyl. Po pěti týdnech došlo přibližně k 1,12 % úbytku hmotnosti. V případě stejně rychlé degradace materiálu v lidském těle by k úplnému rozpuštění došlo za 3125 dní, tedy za přibližně 8,5 let.

4 ZÁVĚR

Prvním cílem bakalářské práce bylo sepsat literární rešerši zaměřenou na biokeramické porézní materiály, které díky své struktuře umožňují vrůstání tkání. Teoretická část práce nejprve popisuje vlastnosti, dělení a aplikace biomateriálů, s důrazem na biokeramické podpůrné systémy neboli skafoldy, které nachází uplatnění v kostním tkáňovém inženýrství. Zmíněny jsou požadavky na vlastnosti biokeramického skafoldu a popsány metody jejich výroby.

Cílem experimentální části bylo pomocí zvolené metody připravit porézní biokeramické materiály a charakterizovat jejich vlastnosti. Pomocí metody přímého pění (in situ) bylo připraveno několik vzorků s různými poměry keramického prášku β -TCP a polyuretanu (PU). Porovnán byl hmotnostní úbytek při slinutí materiálu vzhledem k vypočteným teoretickým hodnotám a stanoveno smrštění průměru (25,5 %) a výšky (33,5 %) po slinutí. V závislosti na množství β -TCP a přidané vody v PU se docílilo různých hodnot požadované porozity (72 - 87 %), která byla nejdříve vypočtena z hmotnosti, objemu a teoretické hustoty materiálu. Poté byl materiál analyzován SEM a pomocí softwaru ImageJ stanovena porozita v rozmezí 69 až 86 % i velikosti pórů 75 - 144 μm , která je pro náhradu trámčité kosti příliš malá. Z hlediska požadavku biokeramického skafoldu na biodegradabilitu byly 4 vzorky testovány v roztoku Tris-HCl, který simuluje podmínky in vivo. Biodegradabilita byla potvrzena, avšak její rychlost je ve srovnání s rychlostí regenerace kostní tkáně mnohonásobně menší.

Psaní této bakalářské práce bylo pro mě velkým přínosem. Rozšířil jsem svoje znalosti a pronikl tak hlouběji do dané problematiky, nejen z teoretického, ale i z praktického hlediska. Obecně se domnívám, že cíle, které jsme si stanovili, se podařilo naplnit.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] PARIDA, Patitapabana, Ajit BEHERA a Suash Chandra MISHRA. Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)*. 2012, Vol. 1, No. 3, pp. 31-35. ISSN 2252-8814.

[2] MATLÁK, Jiří. *Polymerní biokompatibilní materiály*. Brno, 2011. Bakalářská práce. VUT, Fakulta strojního inženýrství, Ústav materiálových věd a inženýrství. Vedoucí práce Ing. EVA NOVOTNÁ, Ph.D., Paed IGIP.

[3] URBAN, Karel, STRNAD, Zdeněk. *Bioaktivní sklokeramika nahrazující kost : Neživé náhrady srůstající s živou tkání*. Vesmír. 1. 1. 2000, č. 79, s. 130-133. Dostupné z WWW: <<http://www.cts.cuni.cz/vesmir>>.

[4] DOBOŠ, Petr. *Příprava biokeramických materiálů pro medicínské aplikace*. Brno, 2010. Bakalářská práce. VUT, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů. Vedoucí práce doc. Dr. Ing. MARTIN PALOU.

[5] BEST, S.M., A.E. PORTER, E.S. THIAN a J. HUANG. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008, vol. 28, issue 7, s. 1319-1327. DOI:10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001. Dostupné z WWW: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221907005961>>.

[6] SÁENZ, Alejandro, Eric RIVERA-MUÑOZ, Witold BROSTOW a Victor M. CASTAÑO. Ceramic biomaterials: an introductory overview. *Journal of Materials Education*. 1999, Vol. 21, 5-6, s. 297 - 306. Dostupné z WWW: <<http://www.unt.edu/LAPOM/>>.

[7] PARK, J.; LAKES, R. S. *Biomaterials: An introduction*. 3rd edition. USA : Springer, 2007. 561 s. ISBN 978-0-387-37880-0.

[8] SLOVÍKOVÁ, Alexandra; VOJTOVÁ, Lucy; JANČÁŘ, Josef. Preparation and modification of collagen-based porous scaffold. *Chemical papers* [online]. [cit. 2016-02-28]. 2008, 4, Dostupné z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/4g2j4g8254675055/>>.

[9] BARRÉRE, F., et al. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive. *Materials Science and Engineering*.

- [10] NOVOTNÁ, Lenka. *Bioceramic materials for advanced medical applications*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 99 p. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Jaroslav Cihlár, CSc.
- [11] DOROZHGIN, Sergey. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials*. 2013, roč.. 6, č. 9, s. 3840-3942.
- [12] HAMMEL, E.C., O.L.-R. IGHODARO a O.I. OKOLI. Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review. *Ceramics International*. 2014, vol. 40, issue 10, část A, pp. 15351-15370, ISSN 0272-8842.
- [13] THE MARSHALL PROTOCOL KNOWLEDGE BASE. *Autoimmunity Research Foundation*. [online]. [cit. 2016-03-01]. Dostupné z WWW: <http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies>.
- [14] RAVAGLIOLI A., KRAJEWSKI A. *Bioceramics: Materials, Properties, Applications*, London: Chapman and Hall, 1992. 422 s. ISBN:0 412 34960 4.
- [15] KARAGEORGIOU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, issue 27, pp. 5474-5491, ISSN 0142-9612.
- [16] DUDÁK, M., VÁCLAVÍK, M. Rtuťová porozimetrie. [online]. Dostupné z WWW: <<https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/RP.pdf>>.
- [17] BARRALET, J.E., GROVER, L., GAUNT, T., WRIGHT, A.J., GIBSON, I.R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials*. 2002, roč. 23, č. 15, s. 3063-3072.
- [18] STUDART, Andre R., GONZENBACH, Urs T., TERVOORT, Elena, GAUCKLER, Ludwig, J, SCHMIDT, H. K. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society*. 2006, roč. 89, č. 6, s. 47-67.
- [19] DOROZHGIN, Sergey. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 7, s. 1465–1485.
- [20] ŠŤASTNÝ, Přemysl. *Moderní metody přípravy porézní biokeramiky*. Brno, 2014. Bakalářská práce. VUT, Fakulta strojního inženýrství, Ústav materiálových věd a inženýrství. Vedoucí práce prof. Ing. MARTIN TRUNEC, Dr.

- [21] BAINO, F., CADDEO, S., NOVAJRA, G., VITALE-BROVARONE, C. Using porous bioceramic scaffolds to model healthy and osteoporotic bone. *Journal of the European Ceramic Society*. 2016. DOI:10.1016/j.jeurceramsoc.2016.01.011.
- [22] COLOMBO, P., MORENO, Rodrigo, VAßEN, Robert, IONESCU, Emanuel, RIEDEL, Ralf. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics: A Review. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2006, roč. 364, č. 1838, s. 109-124.
- [23] PINTO, Moisés L. Formulation, Preparation, and Characterization of Polyurethane Foams. *Journal of Chemical Education*. 2010, roč. 87, č. 2, s. 212-215.
- [24] KAPPS, Manfred, BUSCHKAMP, Siegfried. The production of rigid polyurethane foam. *Business Development*. 2004.
- [25] GONZENBACH, Urs T., STUDART, André R., STEINLIN, David, TERVOORT, Elena, GAUCKLER, Ludwig J. Processing of Particle-Stabilized Wet Foams Into Porous Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 2007, roč. 90, č. 11, s. 3407-3414.
- [26] TANG, Yufei, MIAO, Qian, ZHAO, Kang, ZHU, Minke, WU, Zixiang. Random stacking template of polymer spheres and water soluble particles to fabricate porous hydroxyapatite with interconnected pores. *Ceramics International*. 2014, roč. 40, č. 5, s. 6631-6638.
- [27] HABRAKEN, W., HABIBOVIC, P., EPPLE, M., BOHNER, M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials today*. 2016, roč. 19, č. 2, s. 69-87.
- [28] SIGMUND, Wolfgang M., BELL, Nelson S., BERGSTRÖM, Lennart. Novel Powder-Processing Methods for Advanced Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 2004, roč. 83, č. 7, s. 1557-1574.
- [29] ABARRATEGI, Ander, et.al. Biological Properties of Solid Free Form Designed Ceramic Scaffolds with BMP-2: In Vitro and In Vivo Evaluation (Solid Free Form BMP). *PLoS ONE*. 2012, 7, 3, e34117. doi:10.1371/journal.pone.0034117.
- [30] EQTESADI, Siamak, MOTEALLEH, Azadeh, PAJARES, Antonia, GUIBERTEAU, Fernando, MIRANDA, Pedro. Influence of sintering temperature on the mechanical properties of ϵ -PCL-impregnated 45S5 bioglass-derived scaffolds

fabricated by robocasting. *Journal of the European Ceramic Society*. 2015, roč. 35, č. 14, s. 3985-3993.

[31] HUNG, Kun-Che, TSENG, Ching-Shiow, DAI, Lien-Guo, HSU, Shan-hui. Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2016, roč. 83, s. 156-168.

[32] LOCK, P. A., JING, X. D., ZIMMERMAN, R. W., SCHLUETER, E. M. Predicting the permeability of sandstone from image analysis of pore structure, *Journal of applied physics*, 2002, vol. 92, pp. 6311.

