ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI FAKULTA STROJNÍ

Studijní program:	N0715A270014 - Materiálové inženýrs a výrobní technologie	ství
Studijní specializace:	Bez specializace	

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kalcium-fosfátové kompozity modifikované práškovým biosklem

Autor:Bc. Pavlína BEBEROVÁVedoucí práce:doc. Ing. Tomáš KOVÁŘÍK, Ph.D.

Akademický rok 2023/2024

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI Fakulta strojní Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Osobní číslo: Studijní program: Téma práce: Zadávající katedra: Bc. Pavlína BEBEROVÁ S22N0047P N0715A270014 Materiálové inženýrství a výrobní technologie Kalcium-fosfátové kompozity modifikované práškovým biosklem Katedra materiálu a strojírenské metalurgie

Zásady pro vypracování

- 1. Úvod do problematiky kalcium-fosfátových kompozitů
- 2. Příprava a charakterizace bioskel
- 3. Motivace experimentu
- 4. Popis experimentu
- 5. Výsledky a diskuze
- 6. Závěr

Rozsah diplomové práce:50-70 stranRozsah grafických prací:fotodokumentace, obrázkyForma zpracování diplomové práce:tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Xu, H., Wang, P., Wang, L. et al. Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties. Bone Res 5, 17056 (2017). https://doi.org/10.1038/boneres.2017.56.

Wouter Habraken et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? Materials Today 19, 2 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008.

Noam Eliaz, Noah Metoki. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. Materials 10, 334 (2017). doi:10.3390/ma10040334.

Vedoucí diplomové práce:	Doc. Ing. Tomáš Kovářík, Ph.D. Katedra materiálu a strojírenské metalurgie
Konzultant diplomové práce:	Doc. Ing. Tomáš Kovářík, Ph.D. Katedra materiálu a strojírenské metalurgie
Datum zadání diplomové práce: Termín odevzdání diplomové práce:	16. října 2023 24. května 2024

L.S.

Doc. Ing. Vladimír Duchek, Ph.D. děkan Prof. Ing. Ludmila Kučerová, Ph.D. vedoucí katedry

Prohlášení o autorství

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci zpracovanou na závěr studia na Fakultě strojní Západočeské univerzity v Plzni.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této diplomové práce.

V Plzni dne:

podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce panu doc. Ing. Tomáši Kováříkovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, pomoc a vstřícnost při konzultacích. Dále děkuji Ing. Zdeňku Tišlerovi z výzkumně vzdělávacího centra ORLEN UniCRE a.s. za provedení analýzy MIP, panu Mgr.Petru Mikyskovi,Ph.D. z Geologického ústavu AV ČR, v. v. i., Oddělení analytických metod za provedení analýzy XRD a paní Ing. Štěpánce Jansové, Ph.D. z NTC za pomoc s nafocením struktur na SEM. Také děkuji výzkumnému týmu NTC CPB za pomoc při zpracování experimentální části této diplomové práce.

ANOTAČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

AUTOR	Příjmení Beberová		Jméno Pavlína		
STUDIJNÍ PROGRAM	N0715A270014 M	N0715A270014 Materiálové inženýrství a vy			
VEDOUCÍ PRÁCE	Příjmení (včetně titul doc. Ing. Kovářík, P	lů) h.D.	Jméno Tomáš		
PRACOVIŠTĚ	ZČU - FST - KMM				
DRUH PRÁCE	DIPLOMOVÁ	BAKALÁŘSKÁ		Nehodící se škrtněte	
NÁZEV PRÁCE	Kalcium-fosfátové kompozity modifikované práškovým biosklem				

FAKULTA	strojní	KATEDRA	KMM	ROK ODEVZD.	2024
---------	---------	---------	-----	-------------	------

POČET STRAN (A4 a ekvivalentů A4)

CELKEM	74	TEXTOVÁ ČÁST	54	GRAFICKÁ ČÁST	0
--------	----	--------------	----	---------------	---

STRUČNÝ POPIS (MAX 10 ŘÁDEK) ZAMĚŘENÍ, TÉMA, CÍL POZNATKY A PŘÍNOSY	Diplomová práce se zaměřuje na studium podmínek zpracování β-TCP prášku jako výchozího prekurzoru pro přípravu kalcium- fosfátových past, a možnosti využití práškového bioskla, jako vhodného plniva, připraveného metodou sol-gel a upraveného do práškové formy.
KLÍČOVÁ SLOVA ZPRAVIDLA JEDNOSLOVNÉ POJMY, KTERÉ VYSTIHUJÍ PODSTATU PRÁCE	anorganické kompozity, biomateriály, kalcium-fosfátové cementy, metoda sol-gel, bioaktivní sklo, β-TCP pasty

SUMMARY OF DIPLOMA SHEET

AUTHOR	SurnameNameBeberováPavlína						
STUDY PROGRAMME	N0715A270014 Mat	erials Science	ence and Manufacturing Technology				
SUPERVISOR	Surname (Inclusive of De doc. Ing. Kovářík, P	Surname (Inclusive of Degrees)Namedoc. Ing. Kovářík, Ph.D.Tomáš					
INSTITUTION	ZČU - FST - KMM						
TYPE OF WORK	DIPLOMA	BACHELOR		Delete when not applicable			
TITLE OF THE WORK	Modification of calcium phosphate composites with bioctive glass particles						

FACULTY	Mechanical Engineering	DEPARTMENT	Materials Engineering	SUBMITTED IN	2024
FACULTY	Engineering	DEPARTMENT	Engineering	SUBMITTED IN	2024

NUMBER OF PAGES (A4 and eq. A4)

Г

TOTALLY	74	TEXT PART	54	GRAPHICAL PART	0

BRIEF DESCRIPTION TOPIC, GOAL, RESULTS AND CONTRIBUTIONS	The thesis focuses on studying the processing conditions of β -TCP powder as a starting precursor for preparing calcium phosphate pastes, and the possibilities of utilizing powdered bioactive glass as a suitable filler, prepared by the sol-gel method and modified into powder form.
KEY WORDS	Inorganic composites, biomaterials, calcium-phosphate cements, sol-gel method, bioactive glass, β-TCP pastes

Obsah

Poděkování	oděkování							
Přehled pou	užitých zkratek a symbolů	7						
Seznam obr	Seznam obrázků							
Seznam tab	ulek							
Úvod		11						
1 A	norganické biomateriály							
1.1	Aplikace biomateriálů	12						
2 K	ostní tkáňové inženýrství							
2.1	Vlastnosti kostních scaffoldů							
2.1.1	Tuhost	14						
2.1.2	Pórovitost	14						
2.1.3	Povrchová topografie	16						
2.1.4	Mechanická integrita	17						
2.1.5	Biokompatibilita, bioaktivita a biodegradace	17						
2.1.6	Vstřikovatelnost							
2.1.7	Reologické vlastnosti							
3 B	iokeramika	19						
3.1	Porézní biokeramika							
3.2	Kalcium-fosfátová keramika	21						
3.2.1	Vlastnosti kalcium-fosfátové biomeramiky	21						
3.2.2	CaP fáze	23						
3.2.3	Cementy	24						
3.3	Kalcium-fosfátové kompozity							
3.3.1	Modifikace materiálu							
3.3.2	Kalcium-fosfátové cementy v kombinaci s bioaktivním sklem							
4 β	-TCP							
4.1	Syntéza β-TCP							
4.1.1	Reakce v pevném stavu							
4.1.2	Tepelná konverze							
4.1.3	Přímé vysrážení							
5 B	ioaktivní sklo							
5.1	Metoda sol-gel							

	5.2	Příprava sol-gel bioskla	33
	5.2.1	Vlastnosti bioskel vyrobených metodou sol-gel	34
6		Návrh experimentální části	35
7		Experiment	36
	7.1	Vstupní suroviny pro výrobu kalcium-fosfátové pasty	38
	7.2	Vstupní suroviny pro výrobu sol-gel bioaktivního skla	38
	7.3	Postup přípravy kalcium-fosfátové pasty	39
	7.4	Postup přípravy bioaktivního skla metodou sol-gel	39
8		Výsledky analýz	42
	8.1	Termomechanická analýza BG	42
	8.2	Rtuťová intruzní porozimetrie BG	43
	8.3	Rentgenová difrakce BG	44
	8.4	Prvková analýza BG	45
	8.5	Hodnocení morfologie BG pomocí SEM	49
	8.6	Analýza distribuce velikosti částic práškového BG	49
	8.7	Analýza distribuce velikosti částic prášku β-TCP	51
	8.8	Hodnocení vstřikovací schopnosti past	51
	8.9	Dynamická viskozita	54
	8.10	Kinetika tuhnutí	57
	8.11	Mikrostruktura a mineralogické složení	61
9		Diskuse výsledků	66
1()	Závěr	68
Se	eznam p	oužitých zdrojů	69

Přehled použitých zkratek a symbolů

ZČU	Západočeská univerzita v Plzni
FST	Fakulta strojní
KMM	Katedra materiálu a strojírenské metalurgie
HA	Hydroxyapatit
ТСР	Fosforečnan tri-vápenatý
β-ΤСΡ	β-fosforečnan tri-vápenatý
α-ΤСΡ	α-fosforečnan tri-vápenatý
CaP	Kalcium-fosfát
PMMA	Polymethylmetakrylát
CPC	Kalcium-fosfátový kostní cement
DCPD	Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého, brushit
DCPA	Hydrogenfosforečnan vápenatý, monetit
CDHA	Hydroxyapatit s nedostatkem vápníku
TTCP	Tetrakalcium fosfát
BG	Bioaktivní sklo
ACP	Amorfní fosforečnan vápenatý
TEOS	Tetraethyl ortosilikát
TMOS	Tetramethyl ortosilikát
PEO	Polyethylenglykol
TIPT	Isopropoxid titaničitý
K_VS	Výchozí stav kyselého systému
K_0,25TRX	Kyselý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky
K_0,5TRX	Kyselý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky
K_VS_BG	Výchozí stav kyselého systému modifikovaný BG
K_0,25TRX_BG	Kyselý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG
K_0,5TRX_BG	Kyselý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG
Z_VS	Výchozí stav zásaditého systému
Z_0,25TRX	Zásaditý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky
Z_0,5TRX	Zásaditý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky
Z_VS_BG	Výchozí stav kyselého systému modifikovaný BG
Z_0,25TRX_BG	Zásaditý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG
Z_0,5TRX_BG	Zásaditý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG

ТМА	Termomechanická analýza
MIP	Rtuťová intruzní porozimetrie
XRD	Rentgenová difrakce
RTG	Rentgen
EDS	Energiově-disperzní spektroskopie
WDXRF	Vlnově disperzní rentgenová fluorescence
SLS	Statický rozptyl světla
Gʻ	Elastický modul pružnosti
G"	Ztrátový modul pružnosti
®	Symbol registrované ochranné známky

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Buňky navázané na substrát pomocí integrinů [I]	. 14
Obrázek 2 - Schéma úrovně a méžné organizace porézních struktur [II] [III]	. 15
Obrázek 3 - dva typy β-TCP scaffoldů: (a) porézní scaffold bez kanálků; (b) porézní scaffo přímými kanálky o průměru 1 mm; (c) vizualizace otevřené pórovitosti pomocí SEM; (snímky z rentgenové mikrotomografie [IV]	ld s d,e) . 16
Obrázek 4 - (a) Mechanické leštění, často používané jako kontrola ve výzkumných studiích. Pískování a leptání kyselinou. (c) Pulzní laserová depozice částic. (d a e) Laserové texturov nanosekundovým pulzním laserem. (f) SEM snímek kostní tkáně. [V]	(b) /ání . 17
Obrázek 5 – Injekční implantace materiálu do defektu kosti [VI]	. 18
Obrázek 6 - Simulace struktury kostní tkáně integrací kanálků a makropórů [VII]	. 21
Obrázek 7 - CaP fázový diagram [VIII]	. 24
Obrázek 8 - Diagram základního složení BG a schopnosti vázat se na kost [IX]	. 27
Obrázek 9 - Tvorba HCA vrstvy [X]	. 31
Obrázek 10 - Produkty sol-gelové syntézy [XI]	. 33
Obrázek 11 - Experimentální schéma	. 37
Obrázek 12 - Schéma přípravy bioskla metodou sol-gel	. 40
Obrázek 13 - Diagram termomechanické analýzy BG	. 43
Obrázek 14 - Graf velikosti pórů BG	. 44
Obrázek 15 - Difraktogram BG po kalcinaci na 850 °C	. 45
Obrázek 16 - Snímky z EDX analýzy – rozložení jednotlivých prvků, zvětšení 5000x	.47
Obrázek 17 - EDX plošná prvková analýza BG	.48
Obrázek 18 - Morfologie BG (SEM)	. 49
Obrázek 19 - Analyzátor distribuce velikosti částic	. 50
Obrázek 20 - SLS histogram prášku BG	. 50
Obrázek 21 - SLS histogram prášku β-TCP	. 51
Obrázek 22 - Smrštění a příčné lámání při vysychání kalcium-fosfátové pasty (vlevo pr umíchaná pasta, vpravo vyschlá pasta)	ávě . 52
Obrázek 23 - Analýza vstřikovatelnosti CPC past, kyselé systémy	. 53
Obrázek 24 - Analýza vstřikovatelnosti CPC past, zásadité systémy	. 54
Obrázek 25 - Graf dynamické viskozity pro kyselé systémy	. 55
Obrázek 26 - Graf dynamické viskozity pro zásadité systémy	. 56
Obrázek 27 - Graf dynamické viskozity, porovnání kyselého a zásaditého systému	. 57
Obrázek 28 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů	. 58
Obrázek 29 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů modifikovaných BG	. 59

Obrázek 30 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů modifikovaných aktivní látkou	povrchově 60
Obrázek 31 - SEM K_VS, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	
Obrázek 32 - SEM K_VS_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	
Obrázek 33 - SEM K_0,5TRX_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	63
Obrázek 34 - SEM K_0,5TRX_BG a EDS analýza částice BG, zvětšení 500x	63
Obrázek 35 - SEM Z_VS, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	64
Obrázek 36 - SEM Z_VS_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	64
Obrázek 37 - SEM Z_0,5TRX_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x	65
Obrázek 38 - XRD vzorků K_VS a Z_VS	65

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Požadované vlastnosti CaP materiálů pro lékařskou aplikaci [30]	
Tabulka 2 - Složení a označení vzorků	
Tabulka 3 - Procentuální zastoupení prvků BG z EDS analýzy	
Tabulka 4 - Plošná prvková analýza BG	
Tabulka 5 - WDXRF sol-gel bioskla	
Tabulka 6 - Kinetika tuhnutí, čas tuhnutí	

Úvod

V dnešní době hraje tkáňové inženýrství klíčovou roli v oblasti léčby onemocnění spojených s otevřenými ránami, defekty či ztrátou tkáně v důsledku úrazu. V této souvislosti jsou stávající výzkumné činnosti zaměřeny na vývoj pokročilých materiálů pro tkáňové náhrady, které mohou efektivně podporovat regeneraci tkání a dosáhnout optimální integrace s tělním prostředím.

Byla již provedena řada studií zkoumajících vliv kalcium-fosfátových cementů na vazbu kostí. Problémovým bodem zůstává jejich příliš pomalá či příliš rychlá resorpce. Pomalá resorpce potlačuje spojení kostní tkáně s povrchem implantátu, rychlá resorpce vede k vyplavení kalcium-fosfátové pasty z místa defektu.

Za účelem zpomalení rychlé resorpce jsou navrhovány kompozitní pasty modifikované druhou fází. Různé kombinace působí různé biologické reakce založené na odlišném chemickém složení, struktuře, povrchové chemii nebo pórovitosti.

Rozhodujícími faktory přidání bioaktivního skla do kalcium-fosfátové pasty jsou bioaktivní vlastnosti bioskla spojené s tvorbou hydroxyapatitové vrstvy po styku se simulovanou tělní tekutinou.

Ze studií vlivu modifikace kalcium-fosfátových past biosklem vyplývá, že trvalé tvorby apatitové vrstvy po implantaci kostního cementu do těla lze s větší pravděpodobností dosáhnout u pasty se začleněním bioskla nežli u nemodifikované verze. Kromě toho je možné ovlivnit pH a uvolňování terapeutických iontů úpravou fyzikálně-chemických vlastností a složení částic BG. Další výhodou zařazení bioskla je zvýšení pevnosti tlaku výplňové pasty.[1]

Tato práce se zaměřuje na přehled a analýzu keramických materiálů a jejich potenciál v kontextu kostního tkáňového inženýrství. Motivací experimentálního programu je studium podmínek přípravy kalcium-fosfátových past modifikovaných práškovým biosklem. Cílem je ověřit vhodnost využití práškového bioskla, vytvořeného metodou sol-gel, jako plnivo kalcium-fosfátových past pro kostní výplně s ohledem na přítomnost povrchově aktivní látky.

1 Anorganické biomateriály

Biomateriál je definován jako materiál, používaný k náhradě části živého sytému, který je schopný interagovat s biologickým systémem nebo fungovat v jeho těsné blízkosti. Jsou to polymery, kovy, keramika, nebo také přírodní materiály, které jsou díky jejich struktuře nebo funkci vhodné pro náhradu nebo obnovu tkání v lidském těle. [2] [3]

Tyto materiály jsou využívány k vytvoření komponent, které mohou zastoupit části lidského těla, jež ztratily svou funkci po úrazu nebo onemocnění, a též k výrobě přípravků a nástrojů, jež přicházejí do přímého kontaktu s lidskými tkáněmi. Jejich výběr je motivován jejich bezpečností, spolehlivostí a fyziologickou kompatibilitou pro lidské tělo. Cílem jejich aplikace je urychlit a usnadnit hojení a napravit funkci poškozené části těla. [3]

Na materiály používané pro medicínské účely jsou kladeny vysoké požadavky. Prvním a nejdůležitějším předpokladem pro možnost aplikace daného materiálu je jeho biokompatibilita. Biokompatibilní materiál v těle nevyvolává svým chemickým složením imunologické reakce, není toxický, nezpůsobuje alergické reakce a není karcinogenní. Dalšími důležitými aspekty pro výběr vhodného biomateriálu jsou jeho mechanické a fyzikální vlastnosti. Ty musejí být přiměřené funkci nahrazované tkáně, musí mít přijatelnou pevnost, tuhost a odolávat cyklickému namáhání, kterému je nahrazovaná tkáň vystavována. Biomateriál musí být možné zpracovat nebo formovat do požadovaných tvarů. V neposlední řadě je kladen důraz na dlouhodobou stabilitu a ekonomickou dostupnost biomateriálu. [4]

1.1 Aplikace biomateriálů

Důvodem pro nahrazení měkkých nebo tvrdých tkání v lidském těle je jejich poškození nebo ztráta funkce, způsobené souborem destruktivních procesů, které zahrnují fraktury, infekce, nádorová onemocnění a další.

Jednou z nejčastějších oblastí pro aplikaci biomateriálů je ortopedie. Uplatňují se při náhradách kloubů kyčelních, kolenních, ramenních, kotníků nebo loktů, které byly poškozeny osteoartritidou (postupné opotřebení chrupavky) nebo revmatoidní artritidou (autoimunitní onemocnění, charakteristické chronickými záněty kloubů).

Biomateriály nacházejí využití též ve spojení s problémy kardiovaskulárního nebo oběhového systému. Onemocnění a degradace srdeční chlopně, která se během roku otevře a uzavře více než 40 milionkrát, se může projevit změnou její struktury, která následně brání úplnému otevření nebo uzavření. Chirurgická oprava nebo náhrada je v tomto případě často nevyhnutelná. Poškozené chlopně lze operativně nahradit implantáty, stejně tak jako například nefunkční srdeční tepny. Cévní protézy se vyrábějí převážně z polymerů.

Také oftalmologie našla velké využití biomateriálů, především polymerních, ve spojení s léčbou zraku. Více než 50 % populace starší 75 let trpí šedým zákalem. Implantáty, které se aplikují do takto postižených očí se nazývají intraokulární čočky a vyrábějí se z několika transparentních biomateriálů jako je PMMA, silikon nebo hydrogel.

Bakteriální onemocnění zubů dokáže poškodit nebo úplně zničit nejen samotné zuby, ale také měkkou tkáň dásní. Mezi nejčastější problémy v dutině ústní patří zubní kaz, demineralizace zubů nebo rozpouštění zubů spojené s metabolickou aktivitou plaku. Tyto problémy následně způsobují ztrátu zubů. Dentální implantáty se vyrábějí z široké škály biomateriálů od amalgámových slitin po keramiku. [4] [5]

2 Kostní tkáňové inženýrství

Již od roku 1940 se věda intenzivně věnuje použití biokompatibilních materiálů v oblasti ortopedie. Jeden z nejznámějších příkladů je aplikace kostních štěpů, tj. vyplnění defektu kosti vzniklého buď úrazem, nebo chirurgickým odstraněním neživotných tkání. Od 70. let minulého století je velká snaha o optimalizaci mechanických vlastností materiálu, zajištěných patřičnou porozitou a mikrostrukturou, ve snaze podpořit vhodnou organizaci kostních buněk a vytvořit ideální podmínky pro regeneraci kosti.

Z důvodu složitých interakcí mnoha biochemických procesů v těle procházejí kosti neustálou dynamickou přestavbou. Tyto komplexní děje se připisují primárně dvěma typům buněk, osteoblastům (buňky podílející se na tvorbě kosti) a osteoklastům (buňky podílející se na vstřebávání kostí), které kostní tkáň neustále rozkládají a tvoří novou. Opravné procesy nastávají již při malém poškození kosti. Pokud je však defekt většího charakteru v důsledku metabolické poruchy nebo traumatologické příčiny, ozdravný proces musí být podpořen implantací pevné trojrozměrné náhrady neboli tkáňového nosiče. Ten následně slouží jako podpora pro růst a vývoj buněk, umožňuje jim vytvářet novou tkáň a celkovou přestavbu kosti (tzv. remodelace). [5] [6]

Tkáňový nosič může být také označen termínem "scaffold" (*z anglického lešení, skelet*) tj. 2D nebo 3D struktura připomínající lešení, která může sloužit k osázení vhodnými buňkami *in vitro* (mimo živý organismus), nebo sama podporovat migraci nových buněk *in vivo* (v živém organismu).

Nadkritické defekty, které mají rozměr větší než 2,5krát poloměr poškozené kosti, nejsou schopné samovolné regenerace. Tato velká poranění vznikají v důsledku chronické infekce, úrazu, po chirurgickém odstranění tumoru, nebo např. po nevydařené operaci totální kloubní náhrady. V případě, že je takto rozsáhlý defekt pouze fixován, není možné dosáhnout úplného uzdravení kostní tkáně kvůli chybějícímu propojení kostních fragmentů.

Strategie aplikace biomateriálů v tkáňovém inženýrství lze obecně rozdělit na *in vivo* a *in vitro*. První se zaměřuje na vytvoření porézních scaffoldů, které usnadňují růst buněk a mohou být aplikovány *in vivo* bez další nutné modifikace. Druhá strategie zahrnuje kultivaci, která může trvat několik hodin až několik týdnů. V tomto případě je scaffold *in vitro* osazen buněčnými kulturami s cílem vyvinout náhradní tkáň, která bude po implantaci funkčně kompletně nahrazovat původní hostitelskou. [5] [7]

2.1 Vlastnosti kostních scaffoldů

Pro vytvoření ideálního scaffoldu pro regeneraci kosti je třeba se zaměřit na žádoucí vlastnosti biomateriálu. Vzhledem k tomu, že kost je složitá třírozměrná struktura, která slouží jako mechanická opora v biologickém prostředí, je nutné, aby její náhrada napodobovala mezibuněčnou hmotu (složitá síť látek, včetně bílkovin, glykoproteinů a dalších molekul, která obklopuje buňky v tkáních, poskytuje mechanickou oporu a reguluje interakci mezi buňkami) a splňovala biologická a mechanická kritéria pro správný vývoj osteogeneze (proces tvorby kostní tkáně). Z tohoto důvodu je třeba při volbě materiálu a návrhu kostních náhrad zohlednit nejen biokompatibilitu a snášenlivost s lidským tělem, ale také porozitu, tuhost, stav povrchu, nebo celkovou mechanickou integritu. [8]

2.1.1 Tuhost

Tuhost je jednou z nejdůležitějších vlastností, která podle nedávné studie silně reguluje diferenciaci kmenových buněk (proces, kdy se kmenová buňka mění ve specializovaný typ buňky, která má konkrétní funkci a charakteristiku) a také ovlivňuje migraci kostních buněk, která je základem pro migraci buněk hostitelskou tkání. Kostní tkáňové inženýrství se snaží o to, aby tuhost nahrazovaného materiálu byla co nejpodobnější lidské kosti. Pórovitá kost, která se nachází na koncích dlouhých kostí, dále v pánevní kosti, lebce, obratlích a žebrech, a zajišťuje pružnost kostní tkáně, má modul pružnosti 0,1 až 2 GPa. Zatímco kost kortikální, která zaujímá cca 80 % celkové hmoty je hustá a tvrdá, tvoří převážně vnější vrstvu a zajišťuje tuhost kosti, má modul pružnosti mezi 15 a 20 GPa. Kortikální kostí jsou tvořeny především dlouhé kosti. Výsledky výzkumu tuhosti scaffoldu a míry diferenciace buněk (*in vivo* i *in vitro*) prokázaly, že matrice s vyšší tuhostí mají díky silnější diferenciaci kmenových buněk vyšší adhezi buněk k substrátu, lepší schopnost proliferace (proces množení buněk) a osteogeneze. [8]

Buňky se vážou na substrát pomocí transmembránových receptorů zvaných integriny, jejichž mimobuněčná část se připojuje na substrát a nitrobuněčná část je spojena s cytoskeletem (cytoskelet je systém vláken uvnitř buňky, jejíž funkcí je transport látek a opora buňky). Po navázání buněk mezibuněčnou hmotu se začnou integriny shlukovat a do míst těchto shluků jsou přiváděny proteiny, které vytvářejí bodové spoje s mezibuněčnou hmotou, které umožňují buňce přenášet signály a interagovat. Mezi proteiny vzniká napětí kontrakcí a relaxací vláken. Právě na tuhém substrátu generují buňky větší síly, což vede k větší tvorbě adhezí a vysoce organizovaného cytoskeletu. Substrát s nízkou tuhostí není schopen vyvinout tak velký odpor, aby vyvážil síly generované buňkami, proto se nevytvoří dostatečné množství napěťových vláken a buňky vyvolávají pouze menší síly. [8] [9] [10]



Obrázek 1 - Buňky navázané na substrát pomocí integrinů [I]

2.1.2 Pórovitost

Dalším významným faktorem pro volbu materiálu a návrhu kostního scaffoldu je kromě typu porozity, i rozměr, tvar, orientace a množství přítomných pórů. Ačkoli zvýšená pórovitost

snižuje mechanické vlastnosti scaffoldu, má zásadní význam pro migraci buněk, proliferaci, prorůstání kostní tkáně, vaskularizaci (vytváření cévní sítě) a difúzi kyslíku a živin k buňkám. Pórovitost zajišťuje také fixaci kostní tkáně na implantovaný materiál. [8] [11]

Aspekt, který hraje v regeneraci kostní tkáně neméně významnou roli, je zastoupení a distribuce velikostí pórů v implantovaném materiálu. Bylo zjištěno, že scaffoldy obsahující škálu pórů od mikroskopických po makroskopické vykazují vyšší osteokonduktivitu, nežli materiál sestávající pouze z makropórů. Další obohacující poznatek odhalil, že póry podlouhlého a zakřiveného tvaru brání pronikání mezenchymálních kmenových buněk a kapilár, což vede ke snížené tvorbě tuhé kosti, a to především u vnějšího povrchu. [8] [12].

Definice porozity a popis klasifikace velikosti pórů vychází z chemické nomenklatury Mezinárodní unie čisté a aplikované chemie (International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC), viz obrázek č. 2.



Obrázek 2 - Schéma úrovně a méžné organizace porézních struktur [II] [III]

Studie β -TCP (β - fosforečnan tri-vápenatý) scaffoldů s různou porézní strukturou ukázala, že pozitivní vliv na tvorbu a prorůstání kostní tkáně mají struktury u nichž byly vytvořeny propojené kanálky. Ve srovnání se scaffoldy bez kanálků vykazují větší intenzitu tvorby proteinů podporujících vznik nové tkáně a výměny živin. Dále studie prokázala, že kanálky významně podporují uchycení a infiltraci buněk a tvorbu nových krevních cév *in vitro*. Úspěšná syntéza β -TCP biokeramiky prokázala možnost tvorby propojených kanálů o velikosti až 1 mm, viz obrázek č. 3.[13]



Obrázek 3 - dva typy β-TCP scaffoldů: (a) porézní scaffold bez kanálků; (b) porézní scaffold s přímými kanálky o průměru 1 mm; (c) vizualizace otevřené pórovitosti pomocí SEM; (d,e) snímky z rentgenové mikrotomografie [IV]

2.1.3 Povrchová topografie

Topografie povrchu je významným faktorem pro výběr materiálu scaffoldu, neboť je v přímém kontaktu s buňkami hostující tkáně. Před procesem dělení a růstem buněk dochází na povrchu scaffoldu k adsorbci proteinů. Množství adsorbovaných proteinů je závislé právě na geometrii povrchu a změnou velikosti plochy lze ovlivnit buněčné reakce.

Drsnost povrchu pozitivně ovlivňuje buněčnou aktivitu, proto se vědci snaží využívat různé techniky povrchových úprav. Příkladem je pískování nebo leptání kyselinou. Hrubý povrch zvyšuje adsorpci proteinů, adhezi buněk, proliferaci a osteogenní diferenciaci.

Další možností úpravy povrchu jsou modifikace drsnosti nebo tvorba reliéfu povrchu formou pravidelných či nepravidelných vzorů, drážek, důlků a kavit, generovaných pomocí laserové expozice. [8]

Výhodou těchto technik je obvykle rychlá strojní výroba, spojená s velkou variabilitou výsledných struktur. Na obrázku č. 4 jsou zobrazeny snímky z elektronového mikroskopu ukazující příklady povrchu titanu po zpracování různými technikami modifikace povrchu.



Obrázek 4 - (a) Mechanické leštění, často používané jako kontrola ve výzkumných studiích. (b) Pískování a leptání kyselinou. (c) Pulzní laserová depozice částic. (d a e) Laserové texturování nanosekundovým pulzním laserem. (f) SEM snímek kostní tkáně. [V]

2.1.4 Mechanická integrita

Implantovaný scaffold musí odolávat tlakovému a tahovému zatěžování, smykovému namáhání a proudění tělních tekutin. Za klíčové je považována schopnost kostní náhrady odolávat únavě tak, aby byla dostačující pro bezpečné využití. Podle studií mechanického zatěžování houbovité kosti bylo zjištěno, že na proliferaci, mineralizaci a tvorbu nové kosti má lepší vliv cyklické zatěžování nežli statické. Bylo zjištěno, že i krátkodobé cyklické namáhání vyvolává vyšší stimulaci buněk a zlepšuje osteogenní efekt. Únava v oblastech s vysokým stresem posiluje buněčnou schopnost opravy defektu a urychluje regeneraci. [8]

2.1.5 Biokompatibilita, bioaktivita a biodegradace

Biokompatibilita označuje schopnost materiálu nebo látky vzájemně interagovat s biologickým systémem či tkání bez vzniku škodlivých nebo nepřiměřených reakcí. Materiály považované za biokompatibilní jsou navrženy tak, aby nevyvolávaly nadměrnou imunitní reakci, nebo nevykazovaly toxické účinky. Protože jsou kostní implantáty navrhovány jako trvalé náhrady, je nutné, aby byl použitý materiál bioaktivní, případně bioresorpční a postupně byl rozložen. Rychlost degradace musí odpovídat potřebné rychlosti regenerace, tj. remodelace kosti. Bioaktivní látky mají schopnost aktivně ovlivňovat procesy spojování kostní tkáně s povrchem implantovaného materiálu a růstu kostní tkáně. [14]

2.1.6 Vstřikovatelnost

U určitých chirurgických a regeneračních postupů je potřebné, aby materiál použitý pro obnovu kosti byl lehce tvarovatelný či vstřikovatelný. Záměrem je, aby se implantovaný materiál přizpůsobil tvaru a velikosti poruchy kosti a vyplnil defekt v plném rozsahu prostřednictvím minimálně invazivního chirurgického zákroku. [14]

Vstřikovatelnost kalcium fosfátových past pro výplň kostních defektů lze charakterizovat jako schopnost hmoty být vytlačena otvorem stříkačky, aniž by došlo k oddělení kapalné a pevné složky a homogenita pasty zůstala zachována. Dále je nutné, aby nedošlo k narušení pěnové struktury. Vstřikovatelnost lze měřit podle síly potřebné pro vytlačení nebo dle množství vytlačené hmoty za určitý časový úsek. Měření vstřikovatelnosti není normováno.

Vstřikovatelnost stoupá se zvyšujícím se poměrem mezi kapalnou fází a práškem. Nicméně větší poměr tekuté k práškové složce zhoršuje mechanické vlastnosti pasty. Lepší vstřikovatelnosti se dá dosáhnout též využitím vysokomolekulárních pěnidel. Injektáž je nutné provést bezprostředně po napěnění z důvodu zachování kulovitého tvaru vytvořených pórů.

Soudržnost lze definovat jako schopnost napěněné hmoty držet si svůj tvar při kontaktu s tělními tekutinami až do ztuhnutí. Kostní cement musí po implantaci odolat krevnímu tlaku a proudění fyziologických tekutin, tak aby nedošlo ke zborcení jeho struktury. Soudržnost je závislá na velikosti částic prášku, začlenění polymerních příměsí, poměru kapalné fáze a prášku, pH, osmotickém tlaku a dalším. Se zvyšujícím se rozměrem pórů a jejich propojením se snižuje schopnost soudržnosti pěny. [15] [1]



Obrázek 5 – Injekční implantace materiálu do defektu kosti [VI]

2.1.7 Reologické vlastnosti

Reologické vlastnosti cementových past jsou klíčovými faktory při hodnocení a optimalizaci jejich zpracovatelnosti a vlastností. Jsou rozhodujícími pro určení toku a procesu injektáže, tuhnutí a tvrdnutí hmoty. Reologie se zabývá tokovým chováním kapalin a deformací tuhých těles, které za určitých podmínek vykazují vlastnosti kapalin.

Na reologické vlastnosti cementových past má zásadní vliv poměr kapalné a práškové složky, jemnost prášku nebo přídavné složky pasty. Studie zaměřené na vliv jemnosti prášku ukázaly, že se zvětšujícím se měrným povrchem částic dochází k vyšší adsorpci vody a silnějším interakcím mezi částicemi, což odpovídá vyšším hodnotám viskozity. Dalším poznatkem je rostoucí tekutost pasty s narůstající distribucí částic.

Viskozita je definována jako veličina udávající poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami proudící kapaliny. Charakterizuje vnitřní tření kapaliny a je závislá na přitažlivých silách mezi částicemi. Kapaliny, pro které platí Newtonův zákon vyjadřující přímou úměru rychlosti deformace a napětí, jsou nazývány newtonovské kapaliny. Jedná se především o nízkomolekulární látky a změna viskozity závisí na teplotě. Pro ne-newtonovské kapaliny, tedy nelineárně viskózní látky platí, že se zdánlivá viskozita mění se změnou rychlosti deformace nebo tečným napětím.

Většina kostních cementů patří mezi viskoelastické materiály - vykazují jak viskózní, tak elastické vlastnosti. Cementy přímo po umíchání charakterizují převážně vlastnosti kapalin, zatímco po ztuhnutí převážně vlastnosti pevných látek. U viskoelastického materiálu se část vložené mechanické energie při harmonickém namáhání využije pro odlehčení tohoto materiálu, zbytek se mění v tepelnou energii. Poměrná deformace je tedy fázově zpožděna za působícím napětím. Pomocí oscilačních smykových podmínek lze analyzovat elastické a viskózní chování cementové pasty, a získat informace o disperzitě a shlukování částic.[16] [17] [18] [19]

Pro studium možnosti vstřikování, vývoje mikrostruktury a vlivu různých podmínek na proces tuhnutí se provádějí statické a dynamické reologické zkoušky. Statická reologie spočívá v měření smykových napětí při postupném lineárním zvyšování a snižování rotačních smykových rychlostí. Při dynamických reologických zkouškách je vzorek vystaven mechanické oscilační deformaci. Měří se jeho viskózní a elastické vlastnosti při probíhající deformaci, za účelem zkoumání vnitřní struktury. Pro zkoumání kinetiky tuhnutí a souvisejících časově závislých změn viskózního a elastického chování se používá rotační reometr, pomocí něhož je možné získat tokovou křivku vyjadřující závislost smykového napětí a rychlosti deformace. [20]

Oscilační smykovou deformaci lze vyjádřit vztahem:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

kde γ_0 = amplituda smykové deformace, ω = frekvence kmitání a t = čas. Smykové napětí buzené deformačním kmitem se skládá ze dvou složek: 1) reálná složka - energie uložená elastická G', vyjadřuje poměr elastického napětí k deformaci, a 2) imaginární složka - energie disipovaná v tepelnou G'', vyjadřuje poměr viskózní složky k napětí. Rovnice vyjadřující smykové napětí má tedy podobu:

$$\tau = G'(\omega) \gamma_0 \sin(\omega t) + G''(\omega) \gamma_0 \cos(\omega t).$$

Fázový rozdíl je vyjádřen: tan $\delta = G''(\omega)/G'(\omega)$. V oblasti lineární viskoelasticity G', G'' a tan δ nezávislé na amplitudě deformace. Pozorováním odezvy zkoumaného materiálu při různých frekvencích lze získat informace o jeho chování. Všeobecně lze pozorovat u CaP cementů, že pro vyšší frekvence dominuje elastická odezva, pro nižší frekvence naopak viskózní. [21]

3 Biokeramika

3.1 Porézní biokeramika

Velký potenciál porézní keramiky v tkáňovém inženýrství kostí spočívá v její inertnosti v kombinaci s mechanickou stabilitou, která je zajištěna prorůstáním kosti do pórů keramiky. Použití porézní keramiky je ale omezeno na málo mechanicky namáhané aplikace. Implantát

tvořený samotnou nízkopevnostní pórovitou keramikou tvoří ideální strukturální model pro růst kostní tkáně. Avšak nevyhovuje vysokým požadavkům na mechanické vlastnosti.

Pro aktivní prorůstání kostních buněk implantovaným materiálem je zásadní velikost, četnost, tvar a orientace pórů. Celková poréznost scaffoldu závisí na řadě faktorů včetně materiálových vlastností. Horní hranici velikosti pórů a jejich množství určují požadavky na mechanickou odolnost. Velikost pórů dosahujících 100 µm je dostatečná pro růst kosti propojenými póry a zachování vaskularity a životaschopnosti. Rozměr pórů nad 500 µm je, dle publikovaných prací již nežádoucí, neboť se zmenšujícím se měrným povrchem klesá adheze buněk k substrátu. Následkem menšího kontaktu buněk a povrchu se snižuje míra proliferace a tvorba nové regenerované kosti. Prostor v místě spojení jednotlivých pórů musí být větší než 50 µm, poté jsou kostní buňky schopny migrovat implantovaným materiálem a vyplnit tak celý porézní prostor. Porézní materiál je v porovnání s neporézním výrazně křehčí a slabší a jeho pevnost s rostoucí porozitou klesá. Pro stabilizaci implantátu je žádoucí plynulé vrůstání kosti do pórů keramiky, tak aby během stárnutí implantovaného materiálu nedocházelo k výraznému poklesu pevnosti systému implantát-kost. [8] [12] [22]

Hlavním cílem tkáňového inženýrství při výrobě kostního scaffoldu je co nejvíce napodobit strukturu a vlastnosti přirozené kosti. Integrací sítě propojených kanálků a makropórů do struktury (podobně jako je zobrazeno na obrázku č. 6) lze simulovat přirozenou morfologii kostní tkáně. [23]

Porézní struktury se vytvářejí pomocí porogenů (porogen je označení pro látku nebo materiál, který se využívá k tvorbě dutin v jiném materiálu, přidává se například do polymerů nebo keramiky, z nichž se následně vypálí). Často se využívají látky, které při zahřívání produkují oxid uhličitý. [22]

Porézní struktura vznikající při přípravě kostních scaffoldů metodou částečného slinování je závislá na velikosti částic prášku a slinovací teplotě. Platí, že čím vyšší je teplota procesu, tím menší množství a velikost pórů lze získat. Velikost částic prášku je zde zásadní a je doporučeno aplikovat velikost dva až pětkrát větší, než je požadovaná výsledná velikost částic.[6] [24]

Další používanou metodou přípravy porézní keramiky je replikační metoda, kdy se polymerní pěna ponoří do keramické suspenze. Po vysušení se pěna odstraní, čímž vznikne replika se strukturou shodnou s polymerní pěnou.

Metoda pěnění spočívá v mechanickém dmýchání plynu do suspenze. Po zatuhnutí si keramika zachovává vzniklé kulovité póry. [23]



Obrázek 6 - Simulace struktury kostní tkáně integrací kanálků a makropórů [VII]

3.2 Kalcium-fosfátová keramika

3.2.1 Vlastnosti kalcium-fosfátové biomeramiky

Kalcium-fosfátová keramika je ideálním kostním substitučním materiálem. Vyniká celou řadou užitečných vlastností, zejména osteoinduktivitou (schopnost stimulace buněk k jejich diferenciaci na kostitvorné buňky), osteokonduktivitou (materiál je schopen poskytovat mechanickou podporu a strukturu pro růst nové kostní tkáně) a biodegradabilitou. Dalšími cennými vlastnosti je nízká hustota, vysoká povrchová odolnost, chemická stabilita a výhodné chemické složení. Uvolňování iontu vápníku a fosforu reguluje aktivaci osteoblastů a osteoklastů, což usnadňuje regeneraci kostí. Ovlivňováním pórovitosti a povrchových vlastností lze regulovat adhezi a růst kostních buněk a regulovat tak tvorbu kostního minerálu. Bioaktivita, rozpustnost, stabilita nebo mechanická pevnost se liší v závislosti na typu kalciumfosfátu. Tyto vlastnosti jsou klíčové pro různé aplikace. K využití těchto charakteristik jsou různé fosforečnany vápníku využívány buď samostatně, nebo kombinovány s jinými materiály, s cílem eliminovat jejich nevýhody a zvýraznit přínosy.

Kalcium-fosfátové materiály se díky svým vynikajícím bioaktivním vlastnostem a účinnosti na regeneraci kostní tkáně používají v různých formách, nejčastěji jako kostní cementy, nátěry anebo samostatné scaffoldy. [25] [26] [27]

Bioaktivita	Schopnost materiálu interagovat s biologickým systémem nebo živým organismem a vykazovat pozitivní biologické účinky.
Biokompatibilita	Schopnost materiálu spolupracovat s biologickým systémem, a přitom nevyvolávat nežádoucí reakce.
Bioaktiví fixace	Reaktivní povrch implantovaného materiálu je schopen tvořit chemickou vazbu s kostí, čímž zamezuje tvorbě vláknitého pouzdra.
Biologická stabilita	Materiál je schopen si zachovat své vlastnosti in vivo.
Krystalinita	Vyšší podíl krystalické fáze zpomaluje resorpci materiálu v tělních prostředící.
Dobrá adheze a stabilita na rozhraní kost/implantát	Snížení rizika mechanického poškození při zatížení.
Osteointegrace	Proces vrůstání kostní tkáně do implantátu a schopnost vytvářet tak pevné spojení.
Osteokondukce	Schopnost materiálu a jeho struktury navázat na osteoblasty a kmenové buňky, které následně migrují, rostou a tvoří novou kost.
Osteoindukce	Proces stimulace buněk k jejich diferenciaci na osteoblasty (buňky tvořící kostní tkáň).
Resorpce	Proces postupné degradace implantovaného materiálu a jeho nahrazení kostí.
Léčebné schopnosti	Schopnost sloužit jako podklad pro rozvod léčiv a růstových faktorů.
Nasákavost	Schopnost materiálu přitahovat nebo odpuzovat molekuly vody.

Tabulka 1 - Požadované vlastnosti CaP materiálů pro lékařskou aplikaci [30]

Kalcium-fosfáty lze zařadit to kategorie minerálních látek, které jsou dominantně tvořené fosforečnými anionty a vápenatými kationty. Jde o anorganickou minerální složku lidských kostí, kde tvoří 60 % objemu.

Ionty vápníku, tvořící kostní hmotu, se v kostní tkáni nejčastěji vyskytují ve formě fosforečnanu vápenatého. Tyto ionty přispívají k formaci a tvorbě kosti prostřednictvím kalcifikace. Také ovlivňují proces regenerace kostí prostřednictvím buněčné signalizace. Vápník aktivuje zralé kostní buňky pomocí tvorby oxidu dusnatého a podporuje růst buněk, které přispívají k regeneraci kostní tkáně. Navíc ionty vápníku regulují tvorbu a resorpční funkci osteoklastů.

Ionty fosforu jsou v lidském těle zastoupeny ve velkém množství, z nichž 80 % je obsaženo v kostních tkáních společně s ionty vápníku ve formě fosforečnanu vápenatého. Fosforečnany

v lidském těle mají dobrý vliv na tvorbu a růst kostních tkání, podporují diferenciaci a růst osteoblastů a omezují diferenciaci osteoklastů a kostní resorpci. [26]

Poměr vápníku a fosforu v kostech v lidském těle se pohybuje mezi 1,3 a 1,66 (Ca/P) v závislosti na zdravotním stavu a věku člověka. Při implantaci resorbovatelného materiálu je nutné, aby koncentrace produktů nebyla nadměrná a byla souladu s fyziologickým prostředím. [28]

Pouze některé z kalcium-fosfátových sloučenin jsou vhodné pro implantaci do kostních tkání. Pokud je poměr Ca/P menší než 1, není sloučenina vhodná, neboť se s klesajícím poměrem vápníku a fosforu zvyšuje její rozpustnost a rychlost hydrolýzy.

Porézní keramika využívaná pro náhradu kostí se vyrábí na bázi hydroxyapatitu (HA) nebo fosforečnanu tri-vápenatého (TCP) případně jejich kombinace. HA disponuje větší mechanickou pevností a až dvacetkrát nižší rozpustností v tělesných tekutinách než TCP. TCP je oproti HA více bioaktivní. Kombinace obou spojuje vynikající mechanickou stabilitu s výraznou bioaktivitou.

Největší výhodou těchto materiálů je možnost kontroly velikosti a tvaru pórů a jejich propojení, které je rozhodující pro vrůstání kostních buněk. Rychlost vstřebávání je možné regulovat chemickým složením materiálu. [5] [29]

Mechanickou pevnost a tvrdost lze zvýšit slinováním. V závislosti na teplotě slinování TCP, poměru Ca a P a vlhkosti atmosféry dochází k fázovým přeměnám. Slinováním při teplotách 800-900 °C v suchém prostředí dochází k zhušťování a tvorbě β-TCP. Při navýšení teploty na 1125 °C se začíná tvořit α-TCP, který se při překročení teploty 1300 °C rozkládá na difosforečnan-oxidu vápenatého Ca4(PO4)2O neboli tetrakalcium fosfát (TTCP). [5] [29]

Přestože nízkoteplotní β-TCP a vysokoteplotní α-TCP mají stejné chemické složení, mají rozdílnou krystalovou strukturu, hustotu a rozpustnost. α-TCP má větší rozpustnost než β-TCP. Další rozdíly se nachází například v možnosti stabilizace fází: křemíkové ionty stabilizují α -TCP, ionty magnezia stabilizují β -TCP. [6]

3.2.2 CaP fáze

Na obrázku č. 7 je zobrazen rovnovážný fázový diagram CaP, který zobrazuje existenci CaP fází v závislosti na poměru Ca/P a teplotě. Jednotlivé fáze se liší svojí hustotou, hodnotou Více fázový fosforečnan vápenatý, který je směsí β-TCP pH a aplikovatelností. a hydroxyapatitu se nachází v čerchované oblasti. [30]



Obrázek 7 - CaP fázový diagram [VIII]

3.2.3 Cementy

Kalcium-fosfátové cementy lze definovat jako směs jednoho nebo více kalciumfosfátových prášků, která je po smíchání s kapalinou schopná vytvářet pastu, tuhnout a přeměnit se v pevnou složku. V místě defektu se tak může za fyziologických podmínek tvořit podpůrný scaffold pro regeneraci tkáně. Jejich velkou výhodou je schopnost formování *in situ* při tělesné teplotě a možnost injektování těchto past *in vivo* při minimální potřebě invazivního zákroku. []

První kostní pasta byla v ortopedii použita již v roce 1958 a byla na bázi polymethylmetakrylátu (PMMA). PMMA má sice několik zajímavých vlastností, mezi ně patří dobré mechanické vlastnosti, krátká doba tuhnutí a lehká zpracovatelnost, ale není bioresorbovatelný, ani osteogenní. Proto byly v 80 letech 20. století vyvinuty cementy na bázi kalcium-fosfátu, které překonaly nedostatky polymerních kostních past. Kalcium-fosfátové kostní cementy (dále jen CPC) vykazují bioresorbovatelnost, bioaktivitu, molekulovou inkorporaci a tvrdnutí možné již při 37 °C. Nevýhody, jsou především nízká tuhost a hodnoty mechanické pevnosti a malá odolnost proti dynamickému zatěžování.[31] [6]

Modul pružnosti CPC se pohybuje kolem 180 MPa, což je hodnota velmi podobná reálné kosti. Oproti jiným fixačním materiálům je tak napětí v okolní tkáni sníženo a riziko fraktury v přilehlých místech je nižší. CPC jsou vysoce osteokonduktivní a regenerace kostní tkáně tak probíhá bez velkých obtíž. Tvorbou nové kosti se postupně zvyšuje pevnost v tlaku. Problémové může být zatěžování ve smyku, při kterém CPC náhrada neposkytuje dostatečnou tuhost.

Využívání CPC pro implantaci do kostních defektů přináší několik specifických požadavků. Jedním z těchto požadavků je, že doba tuhnutí cementu musí být dostatečně dlouhá na to, aby poskytla chirurgovi dostatečný čas pro provedení implantace. Zároveň však musí tuhnout dostatečně rychle, aby nedocházelo k zbytečnému prodlužování operace a vzniku trhlin v důsledku změny napětí v průběhu tuhnutí. Většina CPC cementů v primárním složení tuhne

15 až 22 minut, což je pro některé aplikace příliš dlouhá doba. Přidáním přírodních fosfátů je možné dobu tuhnutí zkrátit až na 5 min. [30]

Kalcium-fosfátové cementy lze rozdělit podle typu výsledného produktu. Obě skupiny produktů vznikají smícháním kalcium-fosfátového prášku s tekutou fází, což vede k rozpuštění původního fosfátu a precipitaci krystalů. První skupinou jsou apatitové cementy, u kterých vznikají krystaly HA nebo krystaly hydroxyapatitu s nedostatkem vápníku (CDHA). Druhou skupinou jsou brushitové cementy, u nichž precipitují krystaly dihydrátu hydrogenfosforečnanu vápenatého (DCPD). Růstem a precipitací krystalů dochází k vytvrzení.

Velký vliv na to, jakou bude mít finální produkt formu, má velikost zrn prášku a též poměr kapalné fáze a prášku při přípravě pasty. Regulací tohoto poměru lze ovlivnit čas vytvrzení, mechanické vlastnosti, vstřikovatelnost, povrchovou morfologii a porozitu, která má významný vliv na resorbovatelnost, tuhosta bioaktivitu. Menší částice disponují větším měrným povrchem, což zvyšuje reakční kinetiku a krystaly se formují spíše do jehlicovitého tvaru. Větší částice mají tendenci formovat ploché krystaly. [6]

3.2.3.1 Vstřikovatelné CPC

Běžné transplantace kostí vyžadují celkem rozsáhlé operace, které sebou často přinášejí rizika a dlouhé doby hojení. Použití vstřikovatelných CPC se osvědčilo jako mnohem šetrnější metoda. Problém se však objevuje v separaci tekuté a tuhé složky při injektáži. Separování fází působí mnoho problémů, jako například: Snižuje se tím viskozita a pevnost pasty. Separace fází může vést k iniciaci zánětlivých reakcí, vzniku embolie nebo srážení krve. Motivací výzkumné činnosti je tak optimalizace tokových vlastností CPC past přidáním viskózního pojiva např. kyseliny hyaluronové, chitosanu, želatiny, methylcelulózy za účelem zvýšení viskozity.

Byly provedeny výzkumy vstřikovatelných CPC na zvířecích kostních defektech, kdy byly do místa poškození implantovány CPC s 50 % kopolymer kyseliny mléčné a glykolové, želatiny nebo poly(trimethylen carbonátu) PTMC. Výsledky ukázaly, že vzorek CPC/GEL nevedl

ke zlepšení, ostatní modifikace však vykazovaly výrazné zlepšení již ve 4. týdnu a celkově kratší dobu hojení. Další studie se zabývala lokálním podáváním bifosfonátu (léčiva pro onemocnění kostí, především osteoporózy) prostřednictvím vstřikovatelných CPC do osteoporotické zlomeniny. Cement kombinovaný s bifosfonátem měl příznivý vliv na obsah i mikrostrukturní vlastnosti nové kostní tkáně.

Také pro léčbu kompresních osteoporotických zlomenin páteře, kdy je do postiženého obratle zaveden balónek pro vytvoření dutiny a následně se dutina vyplnění cementem, byl místo obvyklého PMMA cementu využit CPC. Ten prokázal dobrou integraci bez radiologických známek rozkladu kostní tkáně nebo odumírání části kosti, pouze v malém množství případů se kost demineralizovala. [31]

3.2.3.2 Ready-to-use a tvarovatelné CPC pasty

Ready-to-use cementy fungují na dvou principech. Prvním je uchování složek cementu v bezvodé hydrofilní nebo hydrofobní kapalině, po vstříknutí této pasty do defektu dojde k jejímu vytvrzení. Negativem je injektované množství cizorodé kapaliny, která může způsobovat nežádoucí reakce organismu. Druhým přístupem je dispergace reaktivních CaP prášku ve vodném roztoku.

Granulované kostní náhrady mají výhodu dobré zpracovatelnosti a snadné manipulace. CaP granule se používají v kombinaci s polymerní matricí, která se po implantaci enzymatickým štěpením odstraní z těla. Prostřednictvím polymerní matrice se částice CaP rozptýlí do celého objemu defektu a zajistí soudržnost, dokud se porucha nezacelí. Může ji tvořit fibrin, kolagen, hyalurogen, celulóza nebo alginát.[32]

3.3 Kalcium-fosfátové kompozity

Za účelem zlepšení a optimalizace vlastností se kalcium-fosfáty kombinují s organickými i anorganickými materiály. Důvodů je mnoho, například zlepšení mechanických vlastností, kontrola biodegradace a bioaktivity, posílení zapouzdření léčiv a iniciace růstových faktorů.

Jak už bylo zmíněno, CaP scaffoldy disponují nedostačujícími mechanickými vlastnostmi. K porušení dochází v důsledku šíření trhlin iniciovaných existencí mikrotrhlin nebo makropórů. Snížení křehkosti materiálu a posílení mechanické integrity lze provést vnitřní nebo vnější modifikací. Vnitřní modifikace znamená úpravu pórovitosti, složení, nebo mikrostruktury. Vnější modifikací jsou ovlivněny vlastnosti použitím síťovacího činidla nebo hydrogelu pro zkvalitnění procesu tuhnutí nebo využití zpevňovacích vláken. [6]

3.3.1 Modifikace materiálu

Jakou bude mít scaffold finální pevnost ovlivňuje (jak už bylo zmíněno výše) porozita, složení a velikost krystalů materiálu. Zvýšení mechanické pevnosti je možné omezením množství a velikosti mezikrystalových dutin. Toho lze získat využitím distribuce více-rozměrových částic, čímž se sníží rozsah mikroporozity. Úpravou stavby a rozmístění pórů ve struktuře lze ovlivnit kinetiku biodegradace scaffoldu. Podle výzkumů mají póry obdélníkového, oválného nebo trojúhelníkového tvaru pozitivní vliv na migraci buněk a tvorbu cév.

Kombinace CaP keramiky s polymery, začlenění vláken do struktury nebo duální systém tuhnutí slibuje zlepšení mechanické pevnosti a snížení křehkosti.

Duálním systémem tuhnutí je označen proces, kdy je do kapalné fáze přidán reaktivní monomer a zároveň iniciátor do anorganické složky cementu, kterou je možné zesíťovat. Během tuhnutí tak dochází k současným reakcím gelace a rozpouštění, čímž vzniká porézní cement vyztužený matricí na bázi hydrogelu. Tímto lze dosáhnout zvýšené pevnosti a tuhosti při stabilních reologických vlastnostech.

Aplikace vláken do Ca-P keramiky je velice přínosnou metodou v rámci snahy o zvyšování tvrdosti a pevnosti. Vlákna v matrici vytvářejí můstky, které zvyšují pevnost v tahu, ohybu a lomovou houževnatost. Mechanické vlastnosti jsou závislé na interakci a procesu degradace jednotlivých komponent, dále na typu, velikosti, množství a orientaci vláken. Zatímco vlákna z nevstřebávajícího se materiálu poskytují stabilní dlouhodobou oporu, biodegradabilní vlákna zajišťují vyztužení pouze v omezené době. Po degradaci vláken se v keramické matrici tvoří makro-porézní struktura, která má pozitivní vliv na propojení vznikající kosti a implantátu.

Ke zpevnění materiálu dochází přemostěním vláken přes vznikající trhlinu a zabránění její šíření. Vlákna v matrici prodlužují proces šíření trhliny tak, že na vznik nového povrchu je potřeba více energie. Přítomnost vláken posiluje lomovou odolnost kompozitního materiálu díky zvýšené odolnosti proti smykovému napětí. [6]

3.3.2 Kalcium-fosfátové cementy v kombinaci s bioaktivním sklem

Výzkum zaměřený na optimalizaci vlastností kostních cementů se v posledních letech věnoval mimo jiné analýze účinku bioaktivního skla v kombinaci s CaP. Bioaktivní sklo (BG) podporuje růst kostní tkáně díky své schopnosti chemicky se vázat na reálnou kost tvořením hydroxid-karbonátové apatitové (HCA) vrstvy a navíc uvolňovat do prostředí důležité bioaktivní ionty jako je Si, Ca a P. Z rozsáhlých studií bylo zjištěno, že lze získat kostní cement s vhodnými vlastnostmi pro injektáž, i přes odlišné mechanické vlastnosti a odlišnou dobu tuhnutí jednotlivých složek. Dále je přidáním bioaktivního skla podpořena rychlost degradace injektovaného materiálu a ionty uvolněné z BG posilují angiogenezi (tvorbu nových cév) a diferenciaci buněk. Tyto dva procesy jsou však silně závislé na složení bioaktivního skla. BG o složení řadící se do oblasti A v diagramu (obrázek č. 8) je bioaktivní a je schopné se vázat na kostní tkáň. BG o složení z oblasti B vykazuje minimální nebo žádnou interakci s biologickým prostředím, sklo netvoří vazbu s kostí a je obklopeno vazivovou tkání. Vysoko reaktivní BG o složení z oblasti C jsou též problematická, neboť nárazové uvolnění iontů nadměrně zvýší pH okolního prostředí, rychle se rozpouští a mizí v rámci 10 až 30 dnů od implantace. Složení z oblasti D netvoří sklo. BG z oblasti E má nejvyšší bioaktivitu, složení odpovídá Bioglass® 45S5 (složení viz, kapitola 5). [1]



Obrázek 8 - Diagram základního složení BG a schopnosti vázat se na kost [IX]

Pro vstřikovatelné kostní cementy je rozhodující doba zpracovatelnosti pasty a doba jejího tuhnutí proto, aby výplň defektu proběhla v optimálním čase a nedošlo k nechtěnému úniku vstřikované hmoty mimo místo defektu kosti. Čas tuhnutí CPC pasty je silně ovlivněn přidáním částic BG, což je způsobeno rozdílnou dobou tuhnutí jednotlivých složek a dále rozdílným podílem tekuté a pevné fáze. Maximální časový úsek pro tuhnutí uvedený v některý odborný publikacích je 15 minut. Tato doba je pro implantaci hmoty do defektní kosti pro lékaře dostačující. Studie vlivu prášku BG v CPC na kinetiku tuhnutí jsou rozporuplné, většina uvádí, že přidáním BG do CPC se zkracuje doba tuhnutí výsledné hmoty. Některé výsledky však přišly s opačným efektem, kdy se přidáním 30w% BG doba tuhnutí CPC pasty prodloužila dvojnásobně, díky pokrytí částic cementového prášku polymerní vrstvou po přidání

polyethylenglykolu nebo alginátu do kapalné fáze. Doba tuhnutí je tedy závislá na vstupních parametrech, jako je počáteční typ prášku BG i CaP, poměr prášku a kapalné složky, vlastnosti přísadových polymerů. Dále velikost částic práškové fáze a metoda syntézy jsou rozhodující pro mechanismus tuhnutí konečného produktu.

Z hodnocení závislosti doby tuhnutí CPC na jejich pevnosti je jasné, že čím bude doba tuhnutí delší, tím bude pevnost cementu nižší. Avšak přidáním BG lze docílit opačného efektu. Prodloužená doba tuhnutí je totiž stále v přijatelné hodnotě a koheze komponent je dostatečně silná na to, aby se jednotlivé složky nemohly při reakcích tuhnutí od sebe oddělit. Integrací BG do CPC se vytváří pevná homogenní mikrostruktura a mechanické vlastnosti cementu se zlepšují. [1] [33]

4 β-TCP

Vysokoteplotní fáze β-TCP se obvykle získává tepelnou přeměnou amorfního fosforečnanu vápenatého nebo hydroxyapatitu s nedostatkem vápníku (CDHA) při teplotách 650 až 750 °C. Při teplotě 1125 °C dochází k fázové přeměně a vzniká fáze α-TCP. Teplota 1470 °C je spodní hranicí pro fázovou přeměnu na α'-TCP.

β-TCP fáze krystalizuje v klencové soustavě. Strukturní elementární buňka se skládá z 63 atomů vápníku a 42 skupin PO₄. Strukturou β-TCP jsou dvě opakující se rovinné domény, jedna má poměr Ca/P roven 1,429 a druhá 1,571. [34]

β-TCP se stal důležitým biokeramickým materiálem používaným pro náhrady kostních štěpů. Jeho význam tkví v biokompatibilitě, bioaktivitě, schopnosti osteokondukce a osteoindukce. Na oseokonduktivních materiálech ulpívají osteoblasty, které jsou odpovědné za syntézu a vylučování organickýh složek kostní matrice, včetně kolagenu a jiných proteinů, které následně tvoří kostní tkáň. Osteoindukční látky dokážou stimulovat regeneraci kosti v místech, kde se kost přirozeně netvoří. K tomuto procesu dochází diferenciací kmenových buněk, které se nacházejí v blízkosti osteoindukčního materiálu, na osteoblasty, tedy kosti-tvorné buňky. V kombinaci s buněčnou resorpcí přispívají tyto vlastnosti k plné regeneraci poruch kostních tkání. Podle pokusů na zvířecích modelech bylo zjištěno, že β-TCP poskytuje podstatně vyšší kostní regeneraci nežli titanový či nanostrukturovaný uhlíkový implantát. Dokonce se předpokládá, že jeho pozitivní účinek na hojení je vyšší než u pacientů s implantovaným autograftem (štěp, který pochází ze stejného pacienta). Pro optimalizaci vlastností, jako je porozita, tuhost, nebo stav povrchu, bylo β-TCP modifikováno například aplikací iontových složek a posílením růstových faktorů. [28] [34] [35]

Běžnými případy použití β-TCP jsou opravy defektů houbovité kosti, vyplnění mezer po chirurgickém zákroku, kdy je kost odřezána kvůli deformaci, úpravě délky nebo geometrie kosti, nebo výplně dutin v dásni pro umístění zubních implantátů. [34]

Z materiálů používaných pro kostní implantáty se největší pozornost věnuje kalcium fosfátové keramice, zejména HA, β-TCP a jejich směsím. Důvodem je obdobné složení minerálů tvořících kosti v lidském těle. Kostní náhrady z HA se vyrábějí technikami vyžadující zvýšené teploty. Proto má syntetický HA více krystalickou strukturu nežli minerální složka kosti a stává se nevstřebatelnou. Transplantovaná část kosti tak není schopna plnit svoji biologickou a biochemickou funkci v plném rozsahu. Stabilní a špatně degradabilní krystalická struktura může způsobovat deformace nebo dokonce zlomeniny v okolí implantovaného materiálu. β-TCP je z tohoto pohledu příhodnější, neboť je dobře vstřebatelný a je snadno nahrazován novou tkání. Rozpustnost je podobná jako u kostního minerálu. Podle studií byl syntetický štěp z čistého β-TCP nahrazen reálnou kostí ve zvířecím i lidském těle v období 6 až 12 měsíců po implantaci. [28] [34]

4.1 Syntéza β-TCP

β-TCP lze syntetizovat třemi metodami: reakcí v pevné stavu, dále tepelnou transformací nebo přímým vysrážením/precipitací.

4.1.1 Reakce v pevném stavu

Metoda syntézy reakce v pevném stavu zahrnuje reakci fáze bohaté na vápník (může se jednat o hydroxid vápenatý Ca(OH)₂, hydroxyapaptit HA nebo uhličitan vápenatý CaCO₃) a fáze bohaté na fosfáty např. dihydrogenfosforečnan vápenatý Ca(H₂PO)₂, dihydrát dihydrogen fosforečnan vápenatý CaHPO4·2H2O, difosforečnan vápenatý Ca2P2O7, fosforečnan amonný (NH₄)₃PO₄. Obě složky musí být dostatečně promíchány, aby nevznikaly nehomogenní fáze jako například HA v oblasti bohaté na Ca nebo β-fosforečnan vápenatý v oblasti bohaté na fosfát.

Příkladem výroby β-TCP syntézou v tuhé stavu je reakce CaCO₃ a CaHPO₄·2H₂O:

 $CaCO_3 + 2 CaHPO_4 \rightarrow CaCO_3 + Ca_2P_2O_7 + H_2O \rightarrow \beta - Ca_3(PO_4)_2 + CO_2 + H_2O_3 + CO_2 +$

4.1.2 Tepelná konverze

Druhou používanou metodou výroby β-TCP je tepelná transformace amorfního fosforečnanu vápenatého (ACP) nebo hydroxyapatitu s nedostatkem vápníku (CDHA). Pro vodné vysrážení se obvykle používá dusičnan vápenatý Ca(NO₃)₂, hydroxid vápenatý Ca(OH)₂, kvselina fosforečná H₃PO₄ nebo fosforečnan amonný (NH₄)₂(HPO₄). Příkladem reakce je CDHA s Ca(NO₃)₂, kde se pro udržení konstantního pH přidává amoniak.

 $9 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6 (\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4) + 6 \text{ NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH} + 18 (\text{NH}_4)(\text{NO}_3)_2$

Následnou tepelnou transformaci ve finální produkt při teplotách 650 až 750 ° probíhá dle:

Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅OH
$$\rightarrow$$
 3 β -Ca₃(PO₄)₂ + H₂O

Produkt získaný tepelnou přeměnou je homogennější, nežli je možné získat reakcí v pevném stavu. Nevýhodou této metody je aglomerace částic β-TCP v důsledku vysokých teplot.

4.1.3 Přímé vysrážení

Třetí metoda spočívá ve vysrážení β-TCP v organickém médiu. Mezi používaná média patří ethylenglykol, methanol, tetrahydrofuran a ethylpropionát. Bylo prokázáno, že β-TCP lze získat autoklávováním amorfního fosforečnanu vápenatého s α-TCP. Fázově čistého β-TCP lze však dosáhnout nejlépe kombinací organické syntézy a autoklávování. Velikost částic syntetizovaných touto metodou je v nanometrech. U β-TCP syntetizovaného v ethylenglykolu lze pozorovat vodíkem substituované molekuly, kde jsou vápenaté atomy částečně nahrazeny atomy vodíku a molární poměr Ca/P odpovídá 1,443. [34]

5 **Bioaktivní sklo**

Bioaktivní skla byla poprvé vyvinuta profesorem Larrym Henchem v roce 1969. Hench vytvořil systém o složení 24,4 mol.% Na₂O, 26,9 mol.% CaO, 46,1 mol.% SiO₂ a 2,6 mol.% P₂O₅ podobný ternárnímu eutektiku diagramu Na₂O-CaO-SiO₂ s vysokým podílem vápníku, u nějž byla pozorována tvorba velmi silné vazby s kostí, kterou nebylo možné odstranit bez poškození kosti. Toto složení bylo označeno jako biosklo 45S5, později Floridskou univerzitou opatřeno ochrannou známkou Bioglass®. [36]

Bioskla představují skupinu reaktivních materiálů, které jsou schopny se vázat na mineralizovanou kostní tkáň ve fyziologickém prostředí. Hench svým zkoumáním došel k závěru, že tento skelný materiál má při implantaci do defektního místa kosti schopnost vytvářet na povrchu vrstvu HCA, který je anorganickou složkou lidské kosti. Díky tomu se vytvoří silné rozhraní mezi implantovaným materiálem a reálnou kostí. V průběhu času v těle bioaktivní sklo degraduje, což vede k uvolňování terapeuticky účinných iontů a regeneraci kosti namísto jejího nahrazení, čímž se obnovuje její původní stav a funkce. [37] [38] [39]

Tvorba HCA vrstvy na implantovaném bioaktivním skle probíhá v několika fázích. Nejdříve dochází k výměně kationtů $Ca^{2+} a Na^{2+} s$ protony z roztoku. Přitom dochází ke zvýšení pH a tvorbě silanolových SiOH skupin na povrchu viz obrázek č. 9. Následně se silikátová síť v důsledku hydrolýzy vazeb rozpadá podle Si-O-Si + H₂O \rightarrow 2 SiOH, čímž dochází k nárůstu koncentrace silanolu. V kroku 3 je znázorněn vznik Si-O-Si vazeb, které vznikají kondenzací skupin OH. Reakce na povrchu vedou k vytvoření vrstvy hydratovaného křemičitého gelu.

V další fázi dochází k migraci $Ca^{2+} a PO_4^{3-}$ vrstvou SiO₂, na které se vytváří amorfní vrstva fosforečnanu vápenatého (ACP) viz. krok 4. V následujícím kroku ACP vrstva krystalizuje v hydroxid-karbonátovou apatitovou vrstvu (HCA) a dochází k absorbci OH⁻, CO₃² nebo F⁻ aniontů z roztoku. [40]



Obrázek 9 - Tvorba HCA vrstvy [X]

Bioaktivní skla jsou široce využívána v oblasti biomedicíny. Jejich první aplikace byly v oblasti chirurgie středního ucha, kde bylo bioaktivní sklo aplikováno jako náhrada malých kostí ve formě tuhých částí.

Bioaktivní sklo má amorfní charakter. Struktura je tvořena síťotvornými látkami (nejčastějšími to jsou oxid křemičitý SiO₂, oxid fosforečný P₂O₅ a oxid boritý B₂O₅), dále síťotvornými modifikátory, které se vážou na nevazebné atomy kyslíku a meziprodukty ve formě oxidů.

Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti bioskel lze ve velké míře ovlivňovat jejich chemickým složením. Velkou roli v jejich chování hrají též morfologické charakteristiky, hlavními jsou pórovitost a velikost částic.

Výroba bioaktivních skel zahrnuje dvě metody. První je běžný tavný postup s následným ochlazením, který se používá pro většinu komerčních bioskel jako je 45S5. Základní oxidy se společně taví při vysokých teplotách kolem 1300 °C v platinové nádobě a následně se kalí do vody. Druhou metodou je metoda sol-gel, což je syntetický proces přeměny koloidní suspenze na gel. Výhodami sol-gel metody je nižší teplota oproti tavné technice a také dobrá tvarovatelnost výsledných produktů na prášky, povlaky, vlákna, 3D scaffoldy atd. Skla vytvořená sol-gel syntézou mají oproti taveným sklům tendenci tvořit přirozenou nanoporozitu, která zvyšuje buněčnou odezvu. Tavená skla jsou spíše nízko-porézní, kompaktní s vyšší tuhostí [41] [42]

5.1 Metoda sol-gel

Počátek zkoumání metody sol-gel sahá do poloviny 19. století, kdy vědci Ebelman a Graham pozorovali hydrolýzu tetraethyl ortosilikátu (TEOS, Si(OC₂H₅)₄) v kyselém prostředí vedoucí ke vzniku sklu podobnému SiO2.

Sol-gel metoda představuje techniku zpracování keramických materiálů, kterou lze obecně charakterizovat třemi postupnými kroky: příprava roztoku, gelace a odstranění rozpouštědla. Sol-gel syntézou je možné získat řadu materiálů vyznačujících se zejména různými nanoa mikrostrukturami, které jsou následně zpracovávány na vlákna, povlaky nebo filmy. Výhodou této metody je možnost získání vysoce homogenního a chemicky čistého materiálu bez nutnosti vysokých teplot. [14]

Proces sol-gel lze obecně definovat jako tvorbu oxidové sítě polykondenzačními reakcemi a molekulárního prekurzoru v kapalině. Sol je charakterizován jako stabilní disperze koloidních částic nebo polymerů v rozpouštědle o velikosti částic 1 až 100 nm. Částice mohou být v krystalickém nebo amorfním stavu, neshlukují se, ani nesedimentují. Gel je složen z trojrozměrné souvislé sítě obsahující submikrometrické póry a polymerní řetězce mikrometrických délek obklopené kapalnou fázi. V případě koloidního gelu se tato síť vytváří shlukováním koloidních částic. Obecně spolu částice solu interagují Van der Waalsovými silami nebo vodíkovými vazbami. Gelové systémy, které se používají pro syntézu materiálů kovalentních mají povahu vazeb a tvorba gelu je nevratná.

Touto metodou je možné připravit materiály různých tvarů a struktur, například vlákna, filmy, prášky nebo materiál s pórovitou morfologií.

Vysušením gelu vzniká podle podmínek procesu xerogel nebo aerogel. Po odpaření rozpouštědla při sušení na vzduchu nebo v nízkoteplotní sušárně dochází ke smrštění působením kapilárních sil, čímž se zbortí gelová síť a vzniká pevnější porézní xerogel. Při superkritickém sušení se gelová síť zachovává a vzniká struktura s velmi nízkou hustotou a velkými póry, tzv. aerogel.

Na obrázku č. 10 je znázorněno schéma kroků sol-gel syntézy a produkty které jsou výsledkem různých parametrů procesu. [43]

Katedra materiálu a strojírenské metalurgie





Obrázek 10 - Produkty sol-gelové syntézy [XI]

5.2 Příprava sol-gel bioskla

V oblasti biomedicíny se sol-gel syntéza prokázala jako velmi výhodná metoda pro výrobu bioskla s nanoporézní strukturou příznivě ovlivňující bioaktivitu a buněčnou odezvu. [14]

Sol-gelová bioskla se nejčastěji vyrábějí postupem hydrolýzy a polykondenzace alkoxidových prekurzorů s následným stárnutím a sušením v atmosféře okolního prostředí.

Tento proces sestává z několika fází:

- 1. Činidla jsou homogenizována mícháním za vzniku silných kovalentních vazeb mezi jednotlivými prvky. Polykondenzace a hydrolýza probíhá současně. Proces probíhá za pokojové teploty.
- 2. Gelace, při které vzniká trojrozměrná souvislá síť. Při gelaci dochází ke zvyšování viskozity.
- 3. Fáze stárnutí během polykondenzace se snižuje pórovitost a dochází ke zhutnění matrice. Tato fáze je riziková z důvodu možnosti vzniku trhlin.
- 4. Při sušení se odstraní kapalná fáze, dochází ke smršťování a možnému praskání.
- 5. K dehydrataci a chemické stabilizaci dochází odstraněním silanových vazeb.
- 6. Tepelné zpracování vede k zhutnění gelu, snížení pórovitosti při teplotě kolem 600 °C. [14]
Jako síťotvorná činidla se pro silikátové gely nejčastěji používají tetrafunkční alkoxidy. Obecný vzorec těchto činidel je Si(OR)_n, kde R představuje alkylovou skupinu. Příkladem je tetraethyl orthosilikát Si(OC₂H₅) (TEOS), který je využívaný prekurzor ze skupiny silikátů, který reaguje s vodou a vytváří roztok obsahující nanočástice. Tato reakce může probíhat za kyselých i zásaditých podmínek. Druhým příkladem je tetramethylorthosilikát (Si(OCH₃)₄) (TMOS). [14] [42]

Hydrolýza a polykondenzace probíhají při sol-gelové syntéze souběžně podle následujících reakcí:

Hydrolýza: $\equiv Si - OH + H_2O \leftrightarrow \equiv Si - OH + ROH$ (OR skupina nahrazena OH skupinou)

Kondenzace s eliminací alkoholu: $\equiv Si - OR + OH - Si \equiv \leftrightarrow \equiv Si - O - Si \equiv + ROH$ Kondenzace s eliminací vody: $\equiv Si - OH + OH - Si \equiv \leftrightarrow \equiv Si - O - Si \equiv + H_2O$,

(kondenzace vede ke vzniku siloxanových vazeb a vody nebo alkoholu)

Podle pH jsou definovány podmínky kyselé nebo zásadité reakce. Úkolem působení katalyzátorů je snížit aktivační energii pro rychlejší vývoj hydrolýzy a polykondenzační reakce. Při pH hodnotě nižší než 2,5 probíhá kyselá katalýza. Snížením pH je možné podpořit hydrolýzu. V silně kyselých podmínkách probíhá hydrolýza rychleji nežli kondenzace. Proto se mezopóry uspořádávají do hexagonálních struktur. pH větší než 2,5 indukuje zásaditou katalýzu a podporuje kondenzační reakci. Při neutrálních a zásaditých podmínkách se tvoří gelové struktury bez mezopórů. Rychlost reakce u hydrolýzy TEOSu podle výzkumu přímo souvisí s koncentrací a silou použité kyseliny nebo zásady. Teplota a použitá rozpouštědla v tomto případě nemají tak velký vliv na kinetiku reakce. Jako katalyzátory hydrolýzy i kondenzace se používají minerální kyseliny nebo amoniak. Kondenzační reakci podporují navíc hydroxidy alkalických kovů a fluoridové anionty. Rychlost gelace je závislá na volbě katalyzátoru. [14]

5.2.1 Vlastnosti bioskel vyrobených metodou sol-gel

Struktura materiálů na bázi silikátů vytvořených metodou sol-gel je ve většině případů mezoporézní (velikost pórů mezoporézního materiálu se klasifikuje jako 2 až 50 nm). Průměrná velikost pórů se pohybuje mezi 10 až 20 nm. Aplikací povrchově aktivní látky je možné získat i menší mezopóry. Povrchově aktivní látky se často přidávají při syntéze bioaktivních skel, především kvůli vylepšení systému podávání léčiv.

Pro optimální bioaktivní činnost, je důležité, aby skla obsahovala v povrchové vrstvě skupinu Si-OH nebo R-OH, ty zajišťují nukleační místa HA nebo HCA, a dále Ca²⁺ a fosfátové ionty. Sol-gel syntéza nabízí možnost upravit povrchové vlastnosti navázáním funkčních skupin na povrch materiálu díky vysoké hustotě exponovaných silanolových skupin. Obecně platí, že vyšší specifický povrch vyvolává vyšší reaktivitu, a tedy i bioaktivitu skla.

Porézní struktura je spojena s nedostatečnými mechanickými vlastnostmi. Výzkum biomateriálů se snaží o definování parametrů, které by v tomto ohledu přinesly pozitivní zlepšení. Jedním z poznatků je, že vyšší obsah vody při syntéze vede k tvorbě nižší hustoty výsledného porézního skla. Hodnota pH také ovlivňuje proces smršťování při sušení. Vyšší pH vykazuje menší míru smrštění a tím snižuje riziko praskání monolitů. Podstatný účinek na mechanické vlastnosti mají také přísady. Bioaktivní skla s přísadou titanu nebo manganu mají vyšší tvrdost, pevnost v ohybu a lomovou houževnatost. Zinek zvyšuje tuhost, čímž zlepšuje mechanické i tepelné vlastnosti. [14]

6 Návrh experimentální části

Motivací experimentální části diplomové práce je studium podmínek zpracování β-TCP prášku jako výchozího prekurzoru pro přípravu kalcium-fosfátových past. Práce si dává za cíl popsat vliv jednotlivých složek na podmínky přípravy β-TCP pasty. Experiment je zaměřen na parametrizaci pasty na základě modifikace kyselinou fosforečnou a křemičitaném sodným. Záměrem je ověřit možnosti využití práškového bioskla, jako vhodného plniva, připraveného metodou sol-gel a upraveného do práškové formy.

Cílem je:

- Charakterizovat vstupní suroviny a popsat přípravu bioaktivního skla.
- Připravit β-TCP pastu splňující parametry kalcium-fosfátové pasty jako vhodného prekurzoru pro další modifikaci.
- Popsat tokové vlastnosti a vstřikovatelnost past s ohledem na přítomnost povrchově aktivní látky.
- Popsat zpracovatelnost kompozitní pěny, která vznikne vyztužením β-TCP pasty práškovým biosklem.
- Charakterizovat reologické vlastnosti vyztužených past s ohledem na dynamickou viskozitu a časově-závislé tokové vlastnosti.
- Vizualizovat připravené kompozitní pasty digitální světelnou a elektronovou mikroskopií.
- Popsat chemické a fázové složení využívaných složek a výsledných produktů.

7 Experiment

Pro experimentální část diplomové práce bylo vytvořeno celkem 12 vzorků kalciumfosfátových past z toho 6 vzorků jako kyselý systém s H₃PO₄, a 6 jako zásaditý systém s Na₂SiO₃. 3 vzorky kyselého systému a 3 vzorky zásaditého systému byly naplněny práškovým bioaktivním sklem, které bylo vytvořeno metodou sol-gel.

Příprava spočívala v nalezení ideálního poměru surovin kalcium-fosfátové pasty, tak aby struktura odpovídala požadavkům na vstřikovací schopnost a zároveň měla po napěnění hmoty povrchově aktivní látkou silně porézní strukturu. Vstřikovatelnost byla testována naplněním injekční stříkačky a následným vytlačením hmoty. Bylo zapotřebí, aby vytlačení bylo plynulé, hmota se nerozstřikovala a vytvářela celistvou linku.

Jako ideální poměr vody a prášku β -TCP pro kalcium-fosfátovou pastu byl pro kyselý systém určen poměr H₂O: β -TCP roven 2:1 a pro zásaditý systém H₂O: β -TCP roven 1,6:1. V zásaditém systému je poměr kapalné a práškové složky menší, protože se zde přidává Na₂SiO₃, který způsobuje zředění hmoty.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny všechny vzorky, jejich složení a označení, které bude nadále používáno. Postup experimentální části diplomové práce je znázorněn ve schématu na obrázku č. 11.



Obrázek 11 - Experimentální schéma

7.1 Vstupní suroviny pro výrobu kalcium-fosfátové pasty

β-TCP

Vlastnosti β-TCP jsou detailně popsány v kapitole č. 4. Pro tento experiment byl použit β-TCP prášek s označením: 1.02143.1000 Calcium phospahte dried EMPROVE® ESSENTIAL, Ph. Eur., BP, E 341 (iii)

H₃PO₄

Kyselina fosforečná je bezbarvá kapalina nebo průhledná krystalická pevná látka. Ve formě čiré pevné látky je její teplota tání 42.35 °C. Hustota je 1,835 g/cm³. V případě kapaliny se většinou jedná o 85% roztok. H₃PO₄ je pro kovy korozivní a pro tkáně žíravá. Používá se mimo jiné pro výrobu zubních cementů. [44]

Na₂SiO₃

Křemičitan sodný neboli vodní sklo je bílá práškovitá či vločkovitá pevná látka. Silně dráždí oči a sliznice, může být toxický. [45]

Dle studie vlivu koncentrace křemičitanu sodného na fyzikálně-chemické vlastnosti duálně tuhnoucích kostních apatitových cementů zvětšující koncentrace Na2SiO3 se doba tuhnutí výrazně snižuje v důsledku polymerace roztoku za vzniku gelu. [46]

Triton X-100

Triton X-100 je derivát poly(ethylenglykolu), je to neiontová povrchově aktivní látka pro obnovu membránových složek za mírných nedenaturačních podmínek., která má hydrofilní polyethylenoxidovou skupinu a uhlovodíkovou lipofilní nebo hydrofobní skupinu. Používá se v průmyslových a domácích čistících prostředcích. Dále je složkou primárních emulgačních směsí, které se používají při výrobě emulzních polymerů, stabilizátorů a emulgátorů zemědělských emulzních koncentrátů a smáčivých prášků. [47]

7.2 Vstupní suroviny pro výrobu sol-gel bioaktivního skla

Polyethylenglykol (PEO)

Polyethylenglykol se skládá z více monomerních jednotek ethylenglykolu, které podléhají katalýze. Používá ve farmaceutickém průmyslu. PEG je hydrofilní a proto se využívá v kosmetických přípravcích jako povrchově aktivní látka, dále na emulgátory, čisticí prostředky, zvlhčovače. [48]

Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Ca(NO₃)₂·4H₂O)

Dusičnan vápenatý anorganická bezbarvá sůl, vzniká reakcí mezi kyselinou dusičnou a vápencem. Používá se v hnojivech, výbušninách a pyrotechnice. [49]

Tetraethylorthosilikát (TEOS)

TEOS je bezbarvá transparentní látka, ester kyseliny ortokřemičité, používá se k výrobě malty a cementu a k síťování silikonových polymerů. [50]

Isopropoxid titaničitý (TIPT)

TIPT je titaničitý alkoxid, bílá až světle žlutá kapalina. Používá se pro tepelně odolné povrchové úpravy barev, laků a plastů nebo k zesíťování silikonových a epoxidových lepidel. Dále se využívá při výrobě oxidu titaničitého. [51]

H₃PO₄

Viz. kapitola 7.1

7.3 Postup přípravy kalcium-fosfátové pasty

- 1. Nejdříve byly naváženy všechny vstupní suroviny.
- 2. Pomocí homogenizátoru byla dispergována pevná fáze v tekuté a byla vytvořena pasta.
- 3. Následně bylo upraveno pH systému přidáním H₃PO₄ nebo Na₂SiO₃, vzorek byl dispergován.
- 4. Do 6 vzorků bylo vsypáno práškového BG za stálé dispergace. (Postup přípravy BG je uveden v následující kapitole.)
- 5. Několik vzorků bylo následně modifikováno povrchově aktivní látkou Triton X-100.

Konkrétní receptura viz tabulka č. 2.

Hodnota pH kyselého systému bylo 4, zásaditý systém měl hodnotu pH 9.

Pro přípravu kalcium-fosfátové pasty byl použit dispergátor (nebo též homogenizátor) IKA Ultre-Turrax T25 digital, který slouží k homogenizaci, emulgaci, dispergaci nebo mletí při přípravě vzorků různých materiálů pro laboratorní zkoumání. Pomocí dispergátoru je možné upravit konzistenci a získat jednotné složení dispergované hmoty rozptýlením pevných částic v kapalině rotací a vibrací mlecích těles.

7.4 Postup přípravy bioaktivního skla metodou sol-gel

- 1. Do jedné kádinky bylo nalito 60 g H₂O, přisypány 2 g PEO a 7,8 g (Ca(NO₃)₂·4H₂O). Roztok byl míchán po dobu 30 minut pomocí magnetické míchačky.
- 2. Do druhé kádinky bylo odměřeno 28,3g TEOS a 2,6 g TIPT. Roztok byl míchán 30 minut.
- 3. Následně byly obě kádinky slity a roztok byl míchán dalších 30 minut.
- 4. Dále bylo do roztoku pipetováno 13,1 g H₃PO₄. Gelující roztok byl míchán po dobu 15 minut.
- 5. Celý roztok byl rozlit do 2 vzorkovnic a uzavřen víčkem.
- 6. Roztok geloval v uzavřené vzorkovnici po dobu 7 dní. Po 3. dnu byl ze vzorkovnice odlit vznikající roztok alkoxidů a nahrazen malým množstvím vody.
- 7. Poté byl vzorek sušen v sušárně po dobu 2 dní při 80 °C.
- 8. Následně byl gel promýván ve vodě po dobu 3 dní.
- 9. Dále byl gel vypálen v peci při teplotě 850 °C, čímž vznikl křehké materiál.
- 10. Poté bylo vypálené bioaktivní sklo v hmoždíři rozdrceno na prášek.

Postup přípravy bioskla metodou sol-gel je znázorněn ve schématu na obrázku č. 12.



Obrázek 12 - Schéma přípravy bioskla metodou sol-gel

Č.	Vzorek	Složení	Označení
1	Výchozí stav kyselého* systému	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄	K_VS
2	Kyselý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄ , 0,25 g Triton X-100	K_0,25TRX
3	Kyselý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄ , 0,5 g Triton X-100	K_0,5TRX
4	Výchozí stav kyselého systému modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄ , 10 g BG	K_VS_BG
5	Kyselý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄ , 0,25 g Triton X-100, 10 g BG	K_0,25TRX_BG
6	Kyselý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g H ₃ PO ₄ , 0,5 g Triton X-100, 10 g BG	K_0,5TRX_BG
7	Výchozí stav zásaditého** systému	50 g H ₂ O, 30 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃	Z_VS
8	Zásaditý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky	50 g H ₂ O, 30 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃ , 0,25 g Triton X-100	Z_0,25TRX
9	Zásaditý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky	50 g H ₂ O, 30 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃ , 0,5 g Triton X-100	Z_0,5TRX
10	Výchozí stav kyselého systému modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 25 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃ , 10 g BG	Z_VS_BG
11	Zásaditý systém s 0,25 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 30 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃ , 0,25 g Triton X-100, 10 g BG	Z_0,25TRX_BG
12	Zásaditý systém s 0,5 g povrchově aktivní látky modifikovaný BG	50 g H ₂ O, 30 g βTCP, 2,5 g Na ₂ SiO ₃ , 0,5 g Triton X-100, 10 g BG	Z_0,5TRX_BG

rků

* pH 4, ** pH 9

8 Výsledky analýz

8.1 Termomechanická analýza BG

Pomocí termomechanické analýzy (TMA) je možné měřit rozměrové změny materiálu při zatížení jako funkci teploty nebo času v kontrolované atmosféře. TMA lze použít pro sledování roztažnosti vzorku v závislosti na teplotě, definování bodu skelného přechodu, tání, přechody v pevné fázi, nebo rozklad fází. Dále pro stanovení teploty měknutí lze sledovat penetraci jehly do vzorku, stanovení krystalického podílu při krystalizaci. Lze stanovit objemovou a lineární roztažnost, viskozitu tuhých látek, změnu viskoelastických vlastností materiálu nebo modul pružnosti.

Testování probíhá tak, že se vzorek nejdříve umístí do ochranného obalu, aby nedocházelo k slepování vzorku. Vzorek se vloží do temperační komory, ve které je udržován přesně definovaný teplotní profil díky senzorům a termočlánku. Pro měření je vhodné použít vzorky čtvercového nebo válcového tvaru s rovným povrchem. Následně na vzorek začne působit malé zatížení 0,1 až 5 g. Zatížení může být statické, kdy se jeho velikost s časem nemění, nebo dynamické, při kterém se zatížení s časem periodicky nebo neperiodicky mění. Rychlost ohřevu je velmi malá, za hodinu se komora ohřeje pouze o několik stupňů. [52]

Byla provedena termomechanická analýza vzorku bioaktivního skla vytvořeného metodou sol-gel na stroji TMA 450 od společnosti TA Instrument.

Analýza byla provedena v měřící cele v teplotním intervalu 25-1000°C v režimu zahřívání 10°/min.(vzduch 60mL/min.) se statickou přítlačnou silou F = 0,2N. Z výsledků je patrné, že počáteční sušení vzorku na 105°C (do konst. hmotnosti) vedlo k dobré rozměrové stabilitě v intervalu do 150°C. Nad teplotou 200°C dochází k postupnému smršťování vzorku vlivem rozkladu organických látek a rozkladu zbytkových produktů sol-gel syntézy. Tepelné děje nad 250°C odpovídají probíhajícímu komplexnímu rozkladu ethylenových skupin z prekurzorů TEOS a TIPT [53], po němž následuje rozklad PEG [54].

Modifikace struktury 5 mol% TiO₂ (TIPT) vedlo k optimalizaci rozměrové stability v intervalu do 700°C. [55]

Při teplotě 850 °C je dosaženo smrštění cca. 12 % a nastává zlom v rychlosti změny rozměrové stability. Nad touto teplotu dochází k výrazné densifikaci tj. k počátku viskózního toku vzorku. Nad touto teplotou nastává sintrování vzorku spojené se smrštěním a kolapsem porézní mikrostruktury, jak je patrné z obrázku č. 13. Z TMA analýzy vyplývá, že při 1000 °C dosahuje celkové smrštění 40 %. Analýza byla provedena na dvou vzorcích o stejném chemickém složení při stejném průběhu měření. Na základě výsledků byl definován kalcinační režim 850 °C s náběhem 10 °C/min.



Obrázek 13 - Diagram termomechanické analýzy BG

8.2 Rtuťová intruzní porozimetrie BG

Rtuťová intruzní porozimetrie (MIP) slouží pro analýzu pórovitosti. Pomocí ní lze získat informace o velikosti a objemu pórů v materiálu. Tento postup využívá vnikání rtuti do porézního materiálu vlivem vzrůstajícího tlaku. Metoda využívá nízké smáčivosti rtuti. Vzorek se umístí do nádoby, do které je pomocí tlaku vltačována rtuť. Větší póry se zaplňují při nižší tlaku jako první, menší póry se zaplňují se vzrůstajícím tlakem. V každém bodě tlaku je zaznamenáván objem rtuti vniklé do vzorku a následně je pomocí Washburnerovi rovnice úroveň tlaku přiřazena k velikosti póru. [56]

Byla provedena analýza distribuce pórů bioaktivního skla vytvořeného metodou sol-gel vypáleného při teplotě 850 °C. Pro tuto analýzu byl využit rtuťový intruzní porozimer AutoPore IV 9510 od firmy Micromeritics Instrument Corporation. Před analýzou byly vzorky odplyněny ve vakuové peci při 110 °C po dobu 16 hodin. Poté byly vzorky naváženy do penetrometru (3 ml) a byla provedena analýza při nízkém a vysokém tlaku (tlaky od 0,0007 MPa do 414 MPa). Byla hodnocena oblast zahrnující póry o velikosti 3 nm-100 μm.



Obrázek 14 - Graf velikosti pórů BG

Výstupem analýzy je kumulativní křivka (obrázek č. 14), která udává distribuci a rozměr přítomných pórů. Z analýzy rtuťové porozimetrie vzorku bioaktivního skla bylo zjištěno, že struktura obsahuje škálu velikostí pórů. Je zde prokázána makroporozita, dominuje výskyt pórů velikosti 2 až 20 µm viz obrázek č. 14. Porozita materiálu tvoří 51,5 % a průměrná velikost pórů v sub-mikronovém regionu vychází 194 nm.

8.3 Rentgenová difrakce BG

Rentgenová difrakce nebo též krystalografie (XRD – X-Ray diffraction) je analytická nedestruktivní metoda, která se používá k hodnocení krystalinity, orientace krystalů, velikosti krystalů, mřížkového napětí, krystalové struktury a chemického složení. Metodou XRD lze analyzovat široké množství materiálů od prášků přes tenké vrstvy po nanomateriály.

Rentgenové záření produkované zdrojem dopadá na vzorek. Dochází k difrakci a rentgenové paprsky jsou rozptylovány elektrony atomů ve vzorku. Protože jsou vlnové délky rentgenového záření (RTG) podobně velké jako meziatomový rozměr krystalické látky, dopadající RTG záření se ohýbá ve specifických směrech. Pro identifikaci fází se měří difrakční úhly a intenzita difraktovaných paprsků a následně se porovnává výsledný difrakční obrazec s referenční databází difrakčních dat. Výstupem analýzy je difraktogram, který znázorňuje polohu detektoru (vodorovná osa) a intenzitu difraktovaného záření (svislá osa). [57]

Byla provedena rentgenová difrakce bioaktivního skla vytvořeného metodou sol-gel a vypáleného při 850 °C.



Obrázek 15 - Difraktogram BG po kalcinaci na 850 °C

Výsledky XRD analýzy prokázaly dominantní podíl krystalických křemičito-vápenofosforečných (SiO2, γ-Ca2P2O7, β-CaP2O6) a titaničitých fází.

Z difraktogramu na obrázku č. 15 je zřejmé, že zvýšený podíl TiO2 (5 mol%) v receptuře sol-gel bioskla vedl k tvorbě difosforečnanu titaničitého TiP₂O₇ (TPO) a titanátu vápenatého CaTiO₃ (CTO). Teplota krystalizace CTO je výrazně nižší než v případě tavení práškových prekurzorů. V případě sol-gel systémů dochází obvykle ke krystalizaci v širokém rozmezí (dle čistoty výchozích roztoků) od 500-1000 °C. Přítomnost TiO₂, ve formě TIPT, ve výchozím gelu vedla také k částečné fázové separaci a tvorbě samostatné krystalické fáze TiO₂. [58] [59] [60]

8.4 Prvková analýza BG

Energiově-disperzní analýza charakteristického rentgenového záření (EDS – Energy Dispersive Spectroscopy) je nedestruktivní technika sloužící k stanovení lokálního chemického složení vzorku. EDS funguje na principu detekce charakteristického RTG záření, které vzniká interakcí elektronového svazku s povrchem vzorku, kdy je elektron vyražen z vnitřní slupky elektronového obalu atomu a nahrazen jiným elektronem z vyšší hladiny. Energie, která byla uvolněna je vyzářena v podobě fotonů, které udávají EDS spektrum, díky němuž lze určit obsažené prvky a jejich množství.

Pro EDS se používají pevnolátkové křemíkové detektory, na kterých po dopadu fotonů vznikají elektron-pozitronové páry. Zesílením těchto pulzů je možné získat EDS spektrum.

EDS není příliš vhodná pro stanovení prvků s koncentrací menší než 1 % a dále prvků s atomovým číslem menším než 11. Pórovitý materiál může mít také horší vliv na správnost výsledků. [61] [62]

EDS analýza byla provedena na vzorku bioaktivního skla, vytvořeném metodou sol-gel a vypáleném při 850 °C pomocí elektronového mikroskopu. Analýza potvrdila přítomnost křemíku, titanu, fosforu a vápníku viz obrázek č. 16. Chemická analýza prvků byla provedena na 4 místech zkoumaného vzorku. Procentuální zastoupení prvků v jednotlivých zkoumaných místech je uvedeno v tabulce č. 3.

Spektrum	Si [hm. %]	Ti [hm. %]	P [hm. %]	Ca [hm. %]
Spektrum 1	59,1	23,9	17,0	0,0
Spektrum 2	58,6	24,3	16,8	0,2
Spektrum 3	49,9	30,1	19,8	0,3
Spektrum 4	72,9	13,9	13,2	0,0

Tabulka 3 - Procentuální zastoupení prvků BG z EDS analýzy

Na obrázku č. 16 lze pozorovat rozložení prvků a jejich intenzitu. Čím je množství obsaženého prvku větší, tím je barva na snímku (pro Si červená, pro Ti fialová, pro P zelená, pro Ca růžová) výraznější.





Pro oblast, která je zaznamenána na snímcích z obrázku č. 16 byla provedena také plošná prvková analýza. Výsledky této analýzy jsou zaznamenány v tabulce č. 4 a grafu na obrázku č. 17.

	Tabulka 4	- Plošná	prvková	analýza	BG
--	-----------	----------	---------	---------	----

	Si [hm. %]	Ti [hm. %]	P [hm. %]	Ca [hm. %]
Plošná EDS	68,6	18,5	12,8	0,1



Obrázek 17 - EDX plošná prvková analýza BG

Chemické složení sol-gel skla bylo potvrzeno pomocí Vlnově disperzní rentgenové fluorescence (WDXRF). Vzorek byl připraven ve formě pelety z kalcinovaného prášku. Výsledek měření potvrdil přítomnost specifických oxidů, viz tabulka č. 5.

Teoretická kompozice (mol.%)			Naměřená kompozice (mol.%)				
SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	TiO ₂	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	TiO ₂
65,0	20,0	10,0	5,0	64,3	18,2	11,9	5,6

Tabulka 5 - WDXRF sol-gel bioskla

8.5 Hodnocení morfologie BG pomocí SEM

Morfologie kalcinovaného skla byla pozorována pomocí elektronového mikroskopu a bylo pořízeno několik snímků s různě velkým zvětšením viz. obrázek č. 19. SEM snímky prokázaly přítomnost nepravidelné povrchové morfologie tvořené shluky natavených křemičit-vápeno-fosforečných částic. Částice mají kulovitý tvar. Kompaktní struktura je tvořena částečně natavenou amorfní matricí a nehomogenními semi/krystalickými částicemi. Mikrostruktura je porézní s prokázanými makropóry.



Obrázek 18 - Morfologie BG (SEM)

8.6 Analýza distribuce velikosti částic práškového BG

Pro analýzu částic práškového bioskla byl proveden Statický rozptyl světla (SLS) pomocí analyzátoru distribuce velikosti částic s laserovým rozptylem Partica LA-960. Laserová difrakce je měřicí technologie sloužící k analyzování distribuce velikosti částic rozptýlených v kapalině nebo ve vzduchu. Malé množství vzorku se umístí do zásobníku. Vzorek je dále tryskou pomocí stlačeného vzduchu veden do vzorkovací komory, kde je plně rozptýlen. Optické uspořádání se skládá z diodových laserů a detektorových polí. Paprsek procházející disperzí částic se rozptyluje pod různými úhly a v různé intenzitě v závislosti na velikosti částic. Velké částice rozptylují světlo pod menším úhlem, malé částice rozptylují paprsek do velkých úhlů. Software shromažďuje data o superpozici rozptýleného světla z detektorové soustavy a porovnává je s kalibračními křivkami a teoretickými modely distribuce částic. Částice jsou brány jako ideálně sférické. Výstupem laserové difrakce je histogram distribuce velikosti částic, průměrná velikost částic, rozsah velikosti částic atd. [63]



Obrázek 19 - Analyzátor distribuce velikosti částic

Touto analýzou byl zjištěn medián velikosti částic prášku BG, který odpovídá rozměru **19 µm.** Na obrázku č. 21 je zobrazen histogram distribuce velikosti částic měřeného vzorku. Vodorovná osa udává průměr částic v µm, osa svislá udává kumulativní četnost v procentech. Z analýzy bylo dále zjištěno, že 10 % částic mají menší rozměr než 7 µm a 90 % částic je menších než 133 µm.



Obrázek 20 - SLS histogram prášku BG

8.7 Analýza distribuce velikosti částic prášku β-TCP

Pro analýzu distribuce velikosti částic prášku β-TCP byla využita stejná metoda a stejný přístroj jako v předchozím případě. Medián velikosti částic je **9 μm**. Rozměr 10 % částic je menší než 5 μm a 90 % částic má rozměr menší než 116 μm. Na obrázku č. 22 je zobrazen příslušný histogram.



Obrázek 21 - SLS histogram prášku β-TCP

8.8 Hodnocení vstřikovací schopnosti past

Možnost vstřikování kalcium fosfátových past byla hodnocena bezprostředně po přípravě jednotlivých receptur. Pro toto hodnocení byla použita injekční stříkačka s hrdlem o průměru 3 mm. Pomocí mechanické síly vyvinuté na píst byla vytvořena linie každé z umíchaných past.

Podle předchozího zkoumání ideálního poměru surovin byly všechny pasty podle očekávání jednoduše vytlačitelné bez nutnosti vyvinout větší sílu na píst stříkačky. Při injektáži se neporušila vytvořená porézní struktura ani nedošlo k nežádoucímu fázovému oddělení složek. Vytvořená linie z kalcium-fosfátových past si udržela neporušenou porézní strukturu i po vyschnutí. Odpařením přebytečné vody se hmota mírně smrštila a došlo k lehkému příčnému praskání stříkačkou vytlačené linie viz obr. č. 23.



Obrázek 22 - Smrštění a příčné lámání při vysychání kalcium-fosfátové pasty (vlevo právě umíchaná pasta, vpravo vyschlá pasta)

Na obrázku č. 24 a č. 25 je zachycena struktura past kyselého a zásaditého systému po vytlačení hmoty injekční stříkačkou. Je zde patrné, že pasta upravená povrchově aktivní látkou obsahuje výrazně větší množství bublin oproti výchozímu stavu, struktura připomíná pěnu. Navíc je zřetelné z rozdílu mezi vzorky s 0,25 g a 0,5 g Tritonu-X100, že porozita (množství bublin) roste s množstvím povrchově aktivní látky. Větší množství Tritonu je však podle předchozího zkoumání poměru vstupních surovin nežádoucí, kvůli přílišné tvorbě bublin, která způsobuje rozstřikování pasty při injektáži.

Přidáním BG pasta zhoustla. BG bylo do pasty přidáno před povrchově aktivní látkou z důvodu zachování porézní struktury, kterou Triton vytvoří. V opačném pořadí by byly plynové bubliny rozrušeny a struktura by neodpovídala požadavkům.

Rozdíl struktury mezi kyselým a zásaditým systémem při pozorováním pouhým okem není velký. U zásaditého vzorku Z_0,25TRX se na rozdíl od kyselého K_0,25TRX linka tvořila jednodušeji, je více spojitá, bez větších hrudek, kyselý vzorek se více rozstřikoval a je více porézní.

Při porovnání výchozích stavů past (K_VS a Z_VS) s pastami o stejném složení modifikovanými 10 g BG (K_VS_BG a Z_VS_BG) lze konstatovat, že částice BG dělají hmotu hustější, pro vytlačení stříkačkou je zapotřebí větší síly a hmota tvoří větší hrudky.





K_VS_BG

K_0,25TRX_BG



Obrázek 23 - Analýza vstřikovatelnosti CPC past, kyselé systémy



Z_VS_BG

Z_0,25TRX_BG

Z_0,5TRX_BG

Obrázek 24 - Analýza vstřikovatelnosti CPC past, zásadité systémy

8.9 Dynamická viskozita

Pro měření dynamické viskozity byl použit reometr ARES G2 od firmy TA Instruments.

Základem reologie je zkoumání materiálu vystaveného kombinaci napětí, deformace a smyku. Reometr je přístroj sloužící k měření toku a deformace, vznikající působením síly na vzorek, a měření výsledného napětí nebo deformace umožňující stanovit viskozitu. Pomocí reometru je možné sledovat kinetiku tuhnutí materiálu, dále určit vlastnosti ne-newtonovských kapalin, zředění ve smyku, tixotropní vlastnosti nebo mez kluzu.

Při měření reometrem lze nastavit potřebné zatížení a rychlost deformace, možnosti zahrnují rotaci disku nebo válců, tahové zatížení, oscilaci. Během aplikace zatížení je monitorována odezva materiálu v reálném čase, měří se např. úhlová rychlost, moment síly, deformace materiálu. Výstupem reologického měření jsou reologické křivky určující reologické parametry jako je modul elasticity, viskozita. [64]

Na všech vytvořených vzorkách kalcium-fosfátových past byla měřena dynamická viskozita. Pro měření byla na reometru nastavena procedura Flow. Výstupem měření je závislost viskozity η na smykové rychlosti γ . Výsledné křivky jsou uvedené v následujících grafech.

V prvním grafu na obr. č. 26 jsou uvedeny křivky dynamické viskozity vzorků kyselých systémů. Modrá linka patří výchozímu stavu bez modifikací (**K_VS**). Růžově je značen výchozí stav modifikovaný 10 g BG (**K_VS_BG**). Systému modifikovanému povrchově aktivní látkou je přiřazena zelená barva (**K_0,25TRX**). Červená křivka patří stavu modifikovanému povrchově aktivní látkou a BG (**K_0,25TRX_BG**).

Lze konstatovat, že přidáním povrchově aktivní látky Triton X-100 se snižuje viskozita hmoty. Při smykové rychlosti 100 s⁻¹ dosahuje viskozita vzorku výchozího stavu **1,8694 Pa·s**. Viskozita vzorku obsahujícího 0,25 g Tritonu má při stejné smykové rychlosti hodnotu **0,1757 Pa·s**. Stejně tak přidáním BG se viskozita mírně snižuje. Hodnota viskozity výchozího stavu modifikovaného BG při smykové rychlosti 100 s⁻¹ je **0,9115 Pa·s**. U vzorků modifikovaných BG je možné pozorovat krátké počáteční navýšení viskozity (větší než u vzorků bez BG), které je dáno reorganizací částic v důsledku vnášení smykové deformace do materiálu. Po překonání odporu se viskozita snižuje. U křivek vzorků bez povrchově aktivní látky dochází ke snížení viskozity déle, až při smykové rychlosti kolem 80 s⁻¹, oproti výchozím stavům.



Obrázek 25 - Graf dynamické viskozity pro kyselé systémy

Závislost viskozity a smykové rychlosti pro zásadité systémy je uveden v obr. č. 27. Rozdělení barev křivek je shodné jako u předchozího grafu.

Vzorky zásaditého systému vykazují při měření reologie stejné trendy jako předchozí kyselé systémy, a tudíž potvrzují hypotézy. Povrchově aktivní látka snižuje viskozitu kalcium fosfátové pasty, stejně jako modifikace biosklem. Vzorky modifikované práškovým BG vykazují počáteční krátkodobé navýšení viskozity z důvodu uspořádávání a přeskupování částic pod vlivem vnášené deformace.



Obrázek 26 - Graf dynamické viskozity pro zásadité systémy

Další graf závislosti viskozity na smykové rychlosti byl vytvořen pro porovnání kyselého a zásaditého systému – obrázek č. 28. Pro porovnání byly zvoleny vzorky s povrchově aktivní látkou

a modifikované práškovým biosklem. Z výsledků vyplývá, že viskozita zásaditého systému, tedy vzorku **Z_0,25TRX_BG**, je při smykové rychlosti 100 s⁻¹ o 0,685 vyšší než u vzorku kyselého systému **K_0,25TRX_BG**. K uspořádání částic způsobující krátkodobý nárůst viskozity dochází u kyselého systému při nižší hodnotě smykové rychlosti o 30 s⁻¹.



Obrázek 27 - Graf dynamické viskozity, porovnání kyselého a zásaditého systému

8.10 Kinetika tuhnutí

Pro měření kinetiky tuhnutí byl použit reometr ARES G2, procedura oscilace. Čas oscilace byl nastaven na 20000 s a úhlová rychlost 10 rad/s, měření probíhalo při pokojové teplotě. Po dobu měření byl zaznamenáván průběh elastického a ztrátového modulu.

Komplexní modul pružnosti viskoelastických materiálů je složen ze dvou složek – elastického modulu G', charakterizující pevnostní vlastnosti materiálu, a ztrátového modulu G', charakterizující tlumící vlastnosti materiálu. Elastický modul představuje energii uloženou v elastické struktuře zkoumaného materiálu. Ztrátový modul představuje viskózní část a množství energie rozptýlené v materiálu.

Pokud elastický modul převyšuje nad ztrátový modul, hovoříme převážně o pružném materiálu a fázový posun mezi napětím a deformací je menší než 45°. Pokud převyšuje modul ztrátový nad elastickým, jedná se o materiál spíše viskózní. [65] [66]

Časová oscilace se běžně používá ke stanovení tuhnutí více-složkových systémů, např. tuhnutí termosetů. Jak vytvrzovací reakce postupuje, oba moduly se protínají v bodě gelace, za kterým se G' stává větším než G" a materiál tvrdne.

Na obrázku č. 29 je zachycen průběh měření kinetiky tuhnutí vzorků výchozích stavů kyselého (**K_VS**) i zásaditého systému (**Z_VS**). Elastický modul G' kyselého systému je znázorněn tmavě modrou barvou, ztrátový modul je tmavě zelenou barvou. Světle modrou barvu má křivka elastického modulu zásaditého systému, světle zelenou má křivka ztrátového modulu zásaditého systému.

U systémů je zřetelný rozdíl jak v modulu pružnosti, tak v době do utuhnutí pasty. U zásaditého systému přesahuje až do nejvyšší hodnoty modulu pružnosti (**0,2709 MPa**) ztrátový modul nad elastickým modulem, jedná se tedy o viskoelastickou pastu s převládajícími viskózními vlastnostmi. Propad modulu pružnost znázorňuje odtržení materiálu od patek reometru, což je zapříčiněno vyschnutím měřené pasty. Tento stav může nastat skokově, nebo v určitém intervalu. Doba utuhnutí tedy není přesně definovatelná, ale lze uvést rozmezí času, ve kterém došlo k úplnému vyschnutí pasty. Zásaditá kalcium-fosfátová pasta utuhla mezi **140 a 150 minutou** oscilace.

U kyselého systému lze pozorovat, že v první fázi převažuje ztrátová složka, ale cca 40 minut před vyschnutím pasty začíná převažovat složka elastická. Celková doba tuhnutí tohoto vzorku byla 135 až 140 minut, nejvyšší naměřená hodnota modulu pružnosti byla 1,1128 MPa.



Obrázek 28 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů

Na obrázku č. 30 lze jako v předchozím případě porovnat kyselý a zásaditý systém, v tomto případě jsou oba **systémy modifikovány práškovým biosklem**. Barvy křivek jsou přiřazeny stejně jako v předchozím obrázku.

Po vmíchání práškového BG do kalcium-fosfátové pasty se v obou případech zvýšil modul pružnosti hmoty a zkrátil se čas tuhnutí. U kyselého systému (**K_VS_BG**) nejvyšší hodnota elastického modulu G[•] vzrostla na **1,6823 MPa** a doba do utuhnutí vzorku se zkrátila na **98 minut**.

Nejvyšší hodnota elastického modulu zásaditého vzorku naplněného BG (**BG_VS_50_30_2,5Na2SiO3**) vzrostla o 0,8629 MPa na **1,1232 MPa** a čas, kdy byl materiál tuhý, se zkrátil na cca **105 minut**.

Z poznatků vyplývá, že modifikace pasty 10 gramy práškového bioaktivního skla zkrátila čas tuhnutí pasty o cca 30 % a dále byl navýšen komplexní modul pružnosti pasty o ~ 1 MPa, u obou systémů.



Obrázek 29 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů modifikovaných BG

Na obrázku č. 31 je zachycen průběh elastického a ztrátového modulu pružnosti při oscilaci vzorků modifikovaných 0,5 gramy povrchově aktivní látkou Tritonem X-100. Barvy křivek jsou přiděleny ve stejném smyslu jako v předchozích dvou obrázcích.

V tomto případě je zajímavé, že nedošlo ke skokovému propadu modulu pružnosti odtržením pasty od oscilujících patek reometru. Dalším zajímavým poznatkem, u těchto povrchově aktivní látkou modifikovaných past je, že zde nedochází k překřížení linií elastického a ztrátového modulu, jejichž hodnota je nižší v porovnání s výchozími stavy. Napěněná pasta se tedy chová viskózně.

Zajímavým výsledkem je, že u vzorků výchozích stavů a výchozích stavů modifikovaných biosklem je pozorovatelný rozdíl v době tuhnutí v závislosti na pH, kdy kyselý systém utuhl

rychleji nežli zásaditý. U vzorků modifikovaných povrchově aktivní látkou dochází k opačnému efektu.



Obrázek 30 – Graf kinetiky tuhnutí, oscilace výchozích stavů modifikovaných povrchově aktivní látkou

Následující tabulka č. 6 uvádí pro lepší přehlednost doby tuhnutí a maximální elastický a ztrátový modul všech naměřených vzorků.

SYSTÉM	PŘIBLIŽNÁ DOBA TUHNUTÍ	Gʻ _{max} [MPa]	G"max [MPa]	
K_VS	137 min	1,1128	0,8417	
K_0,25TRX	80 min	0,1060	0,0491	
K_0,5TRX	106 min	1,1505	0,0738	
K_VS_BG	98 min	1,6823	1,0562	

Tabulka 6	· Kinetika	tuhnutí,	čas	tuhnutí
-----------	------------	----------	-----	---------

K_0,25TRX_BG	76 min	0,2757	0,1733
K_0,5TRX_BG	78 min	0,1175	0,0471
Z_VS	148 min	0,2603	0,2709
Z_0,25TRX	77 min	0,0432	0,0168
Z_0,5TRX	70 min	0,0819	0,0408
Z_VS_BG	105 min	1,1232	0,7340
Z_0,25TRX_BG	65 min	0,3879	0,3203
Z_0,5TRX_BG	67 min	0,2182	0,0949

8.11 Mikrostruktura a mineralogické složení

Pro hodnocení mikrostruktury byl použit elektronový mikroskop a byly na něm pořízený snímky povrchové morfologie lomů vzorků kalcium-fosfátových past o různém zvětšení. Byly vybrány vzorky výchozích stavů, dále vzorky výchozích stavů modifikovaných práškovým BG a vzorky modifikované práškovým BG i povrchově aktivní látkou. Vzorky byly pozorovány po úplném vysušení.

Následně byla provedena RTG difrakce pro dva vzorky výchozích stavů, jejímž prostřednictvím byly identifikovány krystalické fáze. Výsledný difraktogram je zobrazen na obrázku č. 39.

Na obrázku č. 32 je snímek lomové plochy po rozlomení vzorku kyselého výchozího stavu **K_VS** o zvětšení 500x (vlevo) a 1000x (vpravo). Na snímcích lze pozorovat podlouhlé jehlicovité krystaly o délce cca 20 μ m (žlutá šipka). Z XRD analýzy byly zjištěny 3 krystalické fáze (obrázek č. 39). Jako první **brushit** (dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého (CaHPO₄·2H₂O, DCPD) s monoklinickou krystalovou soustavou, obsažený v přibližném množství **87** %. Brushit krystalizuje v prostředí s pH nižší než 6,9 a tvoří deskovité nebo jehlicovité krystaly. Po porovnání s literaturou byly jehlicovité krystaly na snímcích ztotožněny s krystaly brushitu. Jako druhá krystalická fáze byl identifikován **hydroxyapatit** ([Ca₅(PO₄)₃(OH), HA] s hexagonální mřížou v odhadovaném množství 4 %. Třetí identifikovanou fází je **monetit** (hydrogenfosforečnan vápenatý [CaHPO₄], DCPA), což je bezvodá forma brushitu, který vzniká transformací brushitu při překročení teploty 80 °C. Krystalizuje v triklinické krystalové soustavě, krystaly mají vločkovitý charakter a jeho odhadované množství je 9 %. [67] [68] [69] [70]



Obrázek 31 - SEM K_VS, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x

Obrázek č. 33 zachycuje morfologii kyselého vzorku modifikovaného biosklem **K_VS_BG** o zvětšení 500x a 1000x, jsou zde viditelné inkorporované částice bioaktivního skla o rozměru 10 až 100 μ m (žlutá šipka).



Obrázek 32 - SEM K_VS_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x

Na obrázku č. 34 je snímek vzorku kyselého systému modifikovaného biosklem a napěněného povrchově aktivní látkou Triton X-100 **K_0,5TRX_BG**. Struktura je oproti vzorkům bez povrchově aktivní látky výrazně více porézní. Jsou zde pozorovatelné jak sférické částice BG (žlutá šipka), tak podlouhlé krystaly HA. Na jedné z částic tohoto vzorku byla provedena **bodová EDS** analýza, která potvrdila, že se skutečně jedná o částici BG viz obrázek č. 35. Chemická analýza potvrdila přítomnost vápníku, křemíku, fosforu a titanu. Zvýšený podíl vápníku je způsoben obalením částice kalciu-fosfátovou pastou a vysoký podíl uhlíku je dán použitím vodivé uhlíkové pásky při měření.



Obrázek 33 - SEM K_0,5TRX BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x



Obrázek 34 - SEM K_0,5TRX_BG a EDS analýza částice BG, zvětšení 500x

Dále byl nafocen výchozí stav zásaditého systému **Z_VS** se zvětšením 500x a 1000x – obrázek č. 36. Ze snímků je zřetelný rozdíl v morfologii kyselého a zásaditého systému. Kyselý systém má členitější morfologii, je více porézní a lze zde lépe pozorovat jednotlivé částice. Povrch zásaditého vzorku je více hladký, kompaktní, rozlišit jednotlivé částice je obtížnější.

Pro vzorek Z_VS byla provedena XRD analýza. Výsledný difraktogram kyselého i zásaditého systému je uveden na obrázku č. 39. Červenou barvou je zobrazen vzorek K_VS, černou barvou je zobrazen vzorek Z_VS.

Z analýzy zásaditého vzorku Z_VS byla zjištěna přítomnost dvou krystalických fází – hydroxyapatitu a monetitu v odhadovaném poměru 2:3. Krystaly DCPA mají vločkovitý

charakter. V zásaditém prostředí krystalizuje HA v méně protáhlé částice oproti kyselému prostředí, kde tvoří částice v tyčinkovitém či jehlicovitém tvaru. pH prostředí ovlivňuje rychlost nukleace a růstu krystalů. Vyšší stupeň krystalinity je pozorován u vzorků s nižší hodnotou pH. [71] [72]



Obrázek 35 - SEM Z_VS, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x

Na obrázku č. 37 je vyfocena morfologie zásaditého vzorku modifikovaného biosklem Z_VZ_BG. Na snímcích lze pozorovat **částice BG** (žlutá šipka) o velikosti cca 50 μm.



Obrázek 36 - SEM Z_VS_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x

Poslední obrázek č. 38 zobrazuje zásaditý systém modifikovaný biosklem a napěněný povrchově aktivní látkou Triton X-100 **Z_0,5TRX_BG**. Na snímcích jsou zachyceny makropóry (modrá šipka) a částice BG (žlutá šipka), které jsou hůře pozorovatelné kvůli matrici, která je více homogenní a kompaktní než u kyselého systému. Struktura tohoto vzorku je více porézní oproti předchozím dvěma vzorkům.



Obrázek 37 - SEM Z_0,5TRX_BG, zvětšení vlevo 500x, zvětšení vpravo 1000x



Obrázek 38 - XRD vzorků K_VS a Z_VS

9 Diskuse výsledků

Při přípravě experimentu byl hledán ideální poměr tekuté a práškové složky kalciumfosfátové pasty. Pro kyselý systém byl určen poměr H₂O: β -TCP 2:1, pro zásaditý 1,6:1.

Jako první byly provedeny analýzy bioaktivního skla, které bylo syntetizováno metodou sol-gel.

Krystalinita sol-gel skla byla zkoumána využitím **RTG difrakce**. Výsledky RTG analýzy prokázaly dominantní podíl krystalických křemičito-vápeno-fosforečných a titaničitých fází. Tento vývoj je dán postupnou krystalizací specifických fází v průběhu kalcinačního režimu, který byl zvolen na základě výsledků **TMA**. Tepelné zpracování bylo zvoleno s teplotou výpalu na **850°C**, 10°C/min, za laboratorních podmínek.

EDS analýza, jako součást elektronové mikroskopie, byla provedena na vzorku vypáleného sol-gel skla a potvrdila přítomnost prvků křemíku, fosforu, vápníku a titanu. SEM snímky prokázaly přítomnost nepravidelné povrchové morfologie tvořené shluky natavených křemičit-vápeno-fosforečných částic. Kompaktní struktura je tvořena amorfní matricí a nehomogenními semi/krystalickými částicemi. Kalcinační teplota 850°C vedla k částečnému natavení amorfní matrice a krystalizaci různých polykrystalických fází, viz RTG měření. Chemické složení sol-gel skla bylo potvrzeno pomocí **WDXRF**.

Výsledná mikrostruktura sol-gel skla je dále definována prokázanou makroporozitou s dominantním výskytem pórů mezi 2 až 20 µm vycházející z analýzy **MIP**. Průměrná velikost pórů se v sub-mikronovém regionu pohybuje okolo **194 nm** a celková porozita odpovídá hodnotě **51 %**.

Jako další byla provedena **SLS** analýza pro stanovení distribuce velikosti částic prášku β -TCP a prášku BG. Z histogramu byl zjištěn medián velikosti částic β -TCP, který odpovídá **19 µm**, u prášku BG je medián velikosti **9 µm**.

Následovaly analýzy připravených kalcium-fosfátových past.

Pro hodnocení vstřikovací schopnosti kalciu-fosfátové pasty byla použita injekční stříkačka s hrdlem i průměru 3 mm. Při injektáži nedocházelo k oddělení složek u žádné z past-Vytlačená linie má souvislou neporušenou porézní strukturu. Po vyschnutí pasty dochází, v důsledku odpaření volné vody, k postupnému smrštění. Vzorky napěněné povrchově aktivní látkou obsahují větší množství bublin (vznikají póry ~ 100 μ m). Množství bublin roste s množstvím obsahu povrchově aktivní látky. Po přidání práškového BG hmota houstne a vstřikovatelnost se zhoršuje, pro injektáž je potřeba větší síly, hmota tvoří hrudky.

V literatuře je uvedeno, že přidáním práškového bioskla do kalcium-fosfátových past se vstřikovatelnost hmoty zlepšuje [1]. Toto pozorování je však závislé na množství a velikosti částic přidaného prášku. V případě experimentu této diplomové práce bylo přidáno 10 hmot. %.

Na reometru byla měřena **dynamická viskozita** všech vzorků kalcium-fosfátových past. Byla měřena závislost viskozity na smykové rychlosti. Z výsledných křivek dynamické viskozity lze vyčíst, že **přidáním povrchově aktivní látky se viskozita hmoty snižuje**, stejně tak **modifikací práškovým biosklem hodnota viskozity klesá**. U vzorků s BG je pozorovatelný krátkodobý nárůst viskozity z důvodu počáteční reorganizace částic s ohledem na zvyšující se hodnotu smykové deformace. Následně byla na stejném přístroji měřena kinetika tuhnutí využitím procedury oscilace s úhlovou rychlostí 10 rad/s. Byl porovnáván elastický a ztrátový modul pružnosti kyselého a zásaditého systému. U výchozího stavu zásaditého systému převládají viskózní vlastnosti, u kyselého systému převažuje elastická složka. Zásaditá pasta tuhla po cca 148 minutách, kyselá již po 137 minutách oscilace. Po vmíchání 10 hm. % práškového BG byla doba tuhnutí u všech vzorků zkrácena o cca 30 % času a komplexní modul pružnosti byl navýšen o ~ 1 MPa. Tyto poznatky platí pro kyselé i zásadité systémy.

Některé studie ukazují, že přidání bioskla do CPC pasty dobu tuhnutí prodlužuje, [73] některé studie přinesly opačnou informaci. [74] Rozdílné výsledky vycházejí z odlišné kompozice výsledného produktu. CPC zkoumané v těchto studiích obsahují další složky, kromě bioskla, které mají vliv na proces tuhnutí. V případě tohoto experimentu mělo na zkrácenou dobu tuhnutí vliv pouze plnivo BG a modifikace povrchově aktivní látkou.

Posledním hodnocením je **hodnocení morfologie** kalcium-fosfátových past s využitím elektronového mikroskopu. Pro hodnocení krystalinity byla provedena RTG difrakce na vzorcích K_VS a Z_VS. Ze snímků lze pozorovat rozdíl mezi kyselými a zásaditými systémy.

Vzorky obsahující H₃PO₄ mají členitější morfologii, struktura je více porézní, jednotlivé částice jsou lépe definované. Je zde možné pozorovat jehlicovité krystaly, které byly pomocí **RTG difrakce** a po porovnání s literaturou identifikovány jako krystaly **DCPD**. DCPD je zde zastoupen v odhadovaném množství 86 %. DCPD krystalizuje v prostředí s pH menší než 6,9 [67], což je hodnota odpovídající kyselému systému K VS (pH 4). Velikost krystalů je kolem 20 μm. Dále zde byly XRD analýzou nalezeny krystalické fáze HA a DCPA. Krystaly DCPA v tomto případě vznikly transformací z DCPD při vysoušení vzorků při teplotě nad 80 °C. Zásadité vzorky mají hladší povrch, jednotlivé částice lze obtížně rozlišit. Vznikají zde krystalické fáze DCPA (40 %) a HA (60 %). HA v zásaditém prostředí formuje méně protáhlé krystaly nežli v kyselém, krystaly DCPA mají vločkový charakter. Dle studie [72] je krystalizace HA ovlivněna pH prostředí, kdy stupeň krystalinity stoupá se snižující se hodnotou pH. Stejný jev byl pozorován v případě tohoto experimentu. Rozdílná krystalinita kyselého a zásaditého systému je znatelná ze snímků SEM a potvrzena XRD analýzou (obrázek č. 38). Vzorky napěněné povrchově aktivní látkou jsou dle očekávání více porézní, členitější s prokázanou přítomností makropórů. Na snímcích SEM lze pozorovat integrované částice BG v matrici o velikosti cca 50 µm.

10 Závěr

Teoretická část této diplomové práce představuje biomateriály v kontextu charakterizace a využití materiálů v oblasti tkáňového inženýrství. Byly zde definovány požadované vlastnosti kostních scaffoldů, které jsou nezbytné pro efektivní regeneraci kostní tkáně. Dále byly představeny kostní cementy, kalcium-fosfátové kompozity a bioaktivní sklo.

Hlavní motivací experimentální části diplomové práce bylo rozšíření poznatků v oblasti přípravy kalcium-fosfátových past a studium podmínek zpracování β -TCP prášku jako výchozího prekurzoru pro přípravu těchto anorganických částicových kompozitů.

Záměrem bylo ověřit účinky modifikace práškovým biosklem na vlastnosti pasty s ohledem na přítomnost povrchově aktivní látky.

V experimentální části práce byl nejdříve nastíněn plán experimentu a byly popsány vstupní suroviny. Následně byl v krocích přiblížen postup přípravy bioaktivního skla metodou sol-gel a kalcium-fosfátové pasty. Bylo vytvořeno celkem 12 receptur kalcium-fosfátových past, 6 kyselých systémů, 6 zásaditých systémů, modifikovaných práškovým biosklem a povrchově aktivní látkou Triton X-100.

Termická analýza TMA poskytla data o rozměrové stabilitě sol-gel systému. Na základě těchto měření byl zvolen vhodný kalcinační režim a práškové biosklo bylo úspěšně připraveno s definovanou vnitřní porozitou.

Detailní charakterizace bioaktivního skla poskytla komplexní informace o chemickofyzikálních vlastnostech práškové složky BG. Takto připravené práškové BG představuje perspektivní bioaktivní mikro-plnivo do kalcium-fosfátovách past.

Po umíchání kalcium-fosfátových past byla u každé hodnocena vstřikovatelnost a porozita. Následně byla měřena dynamická viskozita a kinetika tuhnutí. Těmito analýzami bylo zjištěno, že modifikace CPC pasty 10 hm.% BG zkracuje dobu tuhnutí pasty o cca 30 % času a snižuje její viskozitu.

Došlo k úspěšnému potvrzení předpokladu, že povrchově aktivní látka v množství 0,25 až 0,5 g generuje vnitřní porozitu pasty. Na viskozitu a proces tuhnutí má povrchově aktivní látka stejný efekt jako přidané BG, viskozitu snižuje a prodlužuje tuhnutí pasty. Pasty vykazují chování pseudoplastických kapalin.

Vizualizace povrchu kalcium-fosfátových past pomocí SEM potvrdila tvorbu krystalických fází DCPD, HA a DCPA, přítomnost inkorporovaných částic BG a přítomnost makropórů. Bylo potvrzeno, že pH prostředí ovlivňuje krystalovou strukturu výsledné pasty a řídí růst krystalů o různé velikosti a geometrii. Tento vývoj byl potvrzen výsledky RTG difrakce.

Na základě experimentálně-analytické činnosti lze konstatovat, že mikro-kompozitní anorganické pasty představují zajímavou alternativu vůči standardním kalcium-fosfátovým systémům. Je zřejmé, že kombinací bioaktivních složek lze efektivně řídit viskozitu, mikrostrukturu a vnitřní porozitu kalcium fosfátových kompozitů.

Seznam použitých zdrojů

[1] ÖZNUR, Demir-Oğuz a Aldo R. BOCCACCINI. Injectable bone cements: What benefits the combination of calcium phosphates and bioactive glasses could bring? In: Science Direct [online]. 2022 [cit. 2024-03-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2022.04.007

[2] DEBERRY, Hilary. In: Biomaterials Engineering. Orange Apple, 2012, s. 4. ISBN 978-81-323-2721-9.

[3] WONG, Joyce Y., Joseph D. BRONZINO a Donald R. PETERSON. Biomsterials: principles und practices. CPC Press, 2013. ISBN 978-1-4398-7419-6.

[4] DAVIS, J.R. Overview of biomaterials and their use in medical devices. In: Handbook of metrials for medical devices. ASM International, 2003, s. 1. ISBN 0-87170-790-X.

[5] RATNER, Buddy, Allan HOFFMAN, Frederick SCHOEN a Jack LEMONS. In: Biomaterials science: An itroduction to materials in medicine. 3. Elsevier, 2013, s. 30-31,133, 1191. ISBN 978-0-12-374626-9.

[6] TAVONI, Marta a Massimiliano DAPPORTO. Bioactive Calcium Phosphate-Based Composites for Bone Regeneration. MDPI.com [online]. 2021 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.3390/jcs5090227

[7] LUKÁŠ, David. Nanovlákna, teorie, technologie a použití. In: Academia, 2023. ISBN 978-80-200-3400-7.

[8] LEE, Seunghun a . Scaffolds for bone-tissue engineering. Science Direct [online]. 2022 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003

[9] BREULS, Roel, Timothy JIYA a Theo SMIT. Scaffold Stiffness Influences Cell Behavior: Opportunities for Skeletal Tissue Engineering. National Library of Medicine [online]. 2008 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.2174/1874325000802010103

[10] Kortikální kost a její význam pro pevnost skeletu. Pro Lékaře.cz [online]. 2015 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/kortikalni-kost-a-jeji-vyznam-pro-pevnost-skeletu-17/kortikalni_kost_a_jeji_vyznam_pro_pevnost_skeletu-13

[11] WU, Ronghuan, Yifan LI a Miaoda SHEN. Bone tissue regeneration: The role of finely tuned pore architecture of bioactive scaffolds before clinical translation. Science Direct [online].2020 [cit.2023-12-07]. Dostupné z:doi:https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.003

[12] DESHMUKH, Kalim, Tomáš KOVÁŘÍK, Tomáš KŘENEK, Denitsa DOCHEVA, Theresia STICH a Josef POLA. Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Advances* [online]. 2020 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1039/D0RA04287K

[13] WANG, Xuesong, Ziyan NIE a Jia CHANG. Multiple channels with interconnected pores in a bioceramic scaffold promote bone tissue formation. Nature.com [online]. 2021 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: https://www.nature.com/articles/s41598-021-00024-z

[14] BAINO, Francisco a Elisa FIUME. Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications. In: *International Journal of Applied Ceramic Technology* [online]. Wiley, 2018, s. 841-849 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/ijac.12873
[15] GINEBRA, M.P. a E.B. MONTUFAR. 10 - Injectable biomedical foams for bone regeneration. Science Direct [online]. 2014 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1533/9780857097033.2.281

[16] BENTZ, Dale P. a Chiara F. FERRARIS. Influence of particle size distributions on yield stress and viscosity of cement-fly ash pastes. Science Direct [online]. 2010 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cemconres.2011.11.006

[17] FARRAR, D.F. Rheological properties of PMMA bone cements during curing. Science Direct [online]. 2021 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00047-3

[18] Viskozita. In: Labicom [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/Viskozita-definice.pdf

[19] HOLUBOVÁ, Renata. Základy reologie a reometrie kapalin. In: . Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.

[20] CHANGSHENG, Liu a Shao HUIFANG. Rheological properties of concentrated aqueous injectable calcium phosphate cement slurry. Science Direct [online]. 2006 [cit. 2024-03-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.043

[21] ŞAHIN, Erdem a Dilhan M. KALYON. The rheological behavior of a fast-setting calcium phosphate bone cement and its dependence on deformation conditions. Science Direct [online]. 2017, 254 [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2017.05.017

[22] NARAYAN, Roger J. Ceramic Materials. In: ASM handbook volume 23: Materials for Medical Devices. ASM International, 2012, s. 269. ISBN 978-1-61503-827-5.

[23] HAMMEL, E.C. Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review. Science Direct [online]. 2014 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2014.06.095

[24] EOM, Jung-Hye, Raju SANTOSH a Kim YOUNG-WOOK. Processing and properties of macroporous silicon carbide ceramics: A review. Science Direct [online]. 2018 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jascer.2013.07.003

[25] LU, Jingyi a Yu HUIJUN. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review [online]. RSC Advances, 2018 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1039/c7ra1127889e

[26] JEONG, J., J.H. KIM a J.H. SHIM. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration [online]. Biomater Res, 2019 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-018-0149-3

[27] DEBNÁROVÁ, Simona. Solventní příprava fosforečnanů vápenatých a jejich charakterizace. 2016. Bakalářská práce. Masarykova univerzista.

[28] HOROWITZ, ROBERT A., ZIV MAZOR a CHRISTIAN FOITZIK. B-tricalcium phosphate as bone substitute material:properties and clinical applications. JOURNAL of OSSEOINTEGRATION [online]. 2010 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: https://www.journalofosseointegration.eu/jo/article/view/65/61

[29] NARAYAN, Roger. Porous Bioceramics. In: Biomedical Materials. Springer, 2009, s. 32-35. ISBN 978-0-387-84871-6.

[30] ELIAZ, Noam a Noah METOKI. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications [online]. 2017 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ma10040334

[31] XU, Hockin HK, Ping WANG a Lin WANG. Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties [online]. 2017 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1038/boneres.2017.56

[32] HABRAKEN, Wouter, Pamela HABIBOVIC, Matthias EPPLE a Marc BOHNER. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? Science Direct [online]. 2015 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2015.10.008

[33] EL-HAMID, H K Abd a Mohammad M FARAG. Regulation of the antibiotic elution profile from tricalcium phosphate bone cement by addition of bioactive glass [online]. 2024, National Library of Medicine [cit. 2024-03-28]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-024-53319-2

[34] BOHNER, Marc a B. G. SANTONI. B-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. Science Direct [online]. 2020 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.06.022

[35] LU, Haiping, Yinghong ZHOU a Yaping MA. Current Application of Beta-Tricalcium Phosphate in Bone Repair and Its Mechanism to Regulate Osteogenesis. Frontiers [online]. 2021 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.3389/fmats.2021.698915

[36] MORAVEC, Zdeněk. Sol-gelové metody. Z-moravec [online]. 2012 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: http://z-moravec.net/chemie/sol-gel-metody/

[37] SUBRAMANI, Karthikeyan, Waqar AHMED a James K. HARTSFIELD. Chapter 15 - Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry. In: Nanobiomaterials in Clinical Dentistry. 2013. ISBN 978-1-4557-3127-5.

[38] NHÂT, Trần Tấn, Hoa Thi BUI a Xuan Vuong BUI. Sol-Gel Method for Bioactive Glass Synthesis. Research Gate [online]. 2021 [cit. 2023-12-08]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/351122171_SolGel_Method_for_Bioactive_Glass_ Synthesis

[39] BRAUER, Delia S. Bioactive Glasses—Structure and Properties. Wiley [online]. 2015 [cit. 2023-12-08]. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201405310

[40] YU, Yang a Zoltán BACSIK. Contrasting In Vitro Apatite Growth from Bioactive Glass Surfaces with that of Spontaneous Precipitation. MDPI [online]. 2018 [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: doi:10.3390/ma11091690

[41] ZHENG, Kai a Aldo BOCCACCINI. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. Elsevier [online]. 2017 [cit. 2023-12-08]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2017.03.008

[42] JONES, Julian R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Science Direct [online]. 2012 [cit. 2023-12-08]. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2012.08.023

[43] Sol-Gel methods. In: Uio.no [online]. [cit. 2023-12-08]. Dostupné z: https://www.uio.no/studier/emner/matnat/kjemi/KJM5100/h06/undervisningsmateriale/10KJ M5100_2006_sol_gel_d.pd

[44] Phosphoric Acid. National Library of Medicine [online]. [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phosphoric-Acid

[45] Sodium silicate. National Library of Medicine [online]. [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-silicate

[46] LAKRAT, Mohammed a El Miloud MEJDOUBI. Effect of sodium silicate concentration on the physico-chemical properties of dual-setting bone-like apatite cements. Science Direct [online]. 2021, 254 [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: doi:mtcomm.2022.103421

[47] Triton® X-100. Mpbio [online]. [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: https://www.mpbio.com/us/tritonr-x-100

[48] Polyethylene Glycol. In: DABAJA, Amani a Ali DABAJA. National Library of Medicine [online]. 2023 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557652/

[49] Calcium nitrate. In: National Library of Medicine [online]. [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-nitrate

[50] Tetraethyl orthosilicate. In: Acs.org [online]. 2020 [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/t/tetraethyl-orthosilicate.html

[51] Titanium(IV) isopropoxide. In: National Library of Medicine [online]. [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Titanium_IV_-isopropoxide

[52] TERMICKÉ ANALÝZY. In: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně [online]. [cit. 2024-04-09]. Dostupné z: https://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_06.pdf

[53] RIBEIRO, Thiago a Omar De LIMA. Sol-gel as methodology to obtain bioactive materials. SciELO Brazil [online]. 2014 [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: doi:10.1590/0001-37652014106012

[54] CATUARO, M. Investigation of bioactivity, biocompatibility and thermal behavior of solgel silica glass containing a high PEG percentage. Science Direct [online]. 2015 [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.11.077

[55] KOVÁŘÍK, Tomáš, Petr BĚLSKÝ, Tomáš KŘENEK, Kalim DESHMUKH, Jana FOREJTOVÁ, Jaroslav KADLEC a Michal POLA. Sol-gel derived silicate-phosphate glass SiO2–P2O5–CaO–TiO2: The effect of titanium isopropoxide on porosity and thermomechanical stability. Science Direct [online]. 2024 [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2024.113138

[56] Mercury Intrusion Porosimetry. Particletechlabs [online]. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: https://particletechlabs.com/analytical-testing/mercury-intrusion-porosimetry/

[57] Analýza XRD (rentgenová difrakce). In: Eurolab Laboratory Services [online]. [cit. 2024-04-09]. Dostupné z: https://www.laboratuar.com/cs/testler/emc-emi-testleri/xrd-(x-isini-kirinimi)-analizleri/

[58] AHMED, I., M. LEWIS a I. OLSEN. Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5–CaO–Na2O glass system. In: Scie [online]. 2003 [cit. 2024-05-14]. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00546-5

[59] DUNN, Bruce a Jefrey ZINK. Sol–Gel Chemistry and Materials. *ACS Publication* [online]. 2007 [cit. 2024-05-14]. Dostupné z: doi:10.1021/ar700178b

[60] DALILAH JOHARI, Nur a Zulkifli Mohd ROSLI. Comparison on the TiO2 crystalline phases deposited via dip and spin coating using green sol–gel route. In: Science Direct [online]. 2018 [cit. 2024-05-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmrt.2019.04.018

[61] Energiově disperzní spektrometrie (EDS). In: *Matca* [online]. [cit. 2024-04-09]. Dostupné z: https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/eds/

[62] Analýza lokálního prvkového složení. In: *Anamet* [online]. [cit. 2024-04-09]. Dostupné z: https://www.anamet.cz/lokalni-prvkove-slozeni/

[63] Laserová difrakce. Microtrac particle characterization [online]. [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: https://www.microtrac.cz/cz/produkty/analyza-velikosti-a-tvaru-castic/laserova-difrakce/

[64] ARES G2. TA Instruments [online]. [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: https://www.tainstruments.com/ares-g2/?gclid=EAIaIQobChMIgY_Yh-fD8QIVFeN3Ch32agIvEAAYASAAEgL2NPD_BwE

[65] Viskoelasticita materiálů. In: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Ústav fyziky a materiálového inženýrství [online]. [cit. 2024-04-15]. Dostupné z: https://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_06.pdf

[66] FRANCK, A. Viscoelasticity and dynamic mechanical testing. Tainstruments.com[online].[cit.2024-04-16].Dostupnéhttps://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN004_Viscoelasticity_and_DMA.pdf

[67] ABBONA a CHRISTENSSON. Crystal habit and growth conditions of brushite, CaHPO4 · 2H2O. Science Direct [online]. 2002 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.1016/0022-0248(93)90183-W

[68] OLIVEIRA, Aline P. a Mariana MOTISUKE. A Comparative Study between β -TCP Prepared by Solid State Reaction and by Aqueous Solution Precipitation: Application in Cements. Research Gate [online]. 2007 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.355

[69] ISSA, Khalil a Abdulaziz ALANAZI. Brushite: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications. In: Crystallization and Applications [online]. 2021 [cit. 2024-05-20]. ISBN 978-1-83969-318-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.102007

[70] IDOWU, Bernadine a Giuseppe CAMA. In vitro osteoinductive potential of porous monetite for bone tissue engineering. Research Gate [online]. 2014 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.1177/2041731414536572

[71] KOJU, Naresh a Prabaha SIKDER. Smart Injectable Self-Setting Monetite Based Bioceramics for Orthopedic Applications. MDPI [online]. 2018 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.3390/ma11071258

[72] RUFFINI, Andrea a Simone SPRIO. Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite via Controlled Hydrothermal Route. Research Gate [online]. 2019 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.85091

[73] RENNO a NEJADNIK. Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: Material characterization and in vitro degradation[†]. Wiley online library [online]. 2013 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34531 [74] SADIASA, Alexander a Swapan Kumar SARKAR. Bioactive glass incorporation in calcium phosphate cement-based injectable bone substitute for improved in vitro biocompatibility and in vivo bone regeneration. Sage Journals [online]. 2013 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: doi:10.1177/0885328213478256

Obrázky

[I] UNGAI-SALÁNKI, Rita a Beatrix PETER. A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force. Science Direct [online]. 2019 [cit. 2024-04-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2019.05.005

[II] SHARMA, Ankur, Kalpesh VAGHASIYA a Rahul Kumar VERMA. Inhalable microspheres with hierarchical pore size for tuning the release of biotherapeutics in lungs. Science Direct [online]. 2016 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2016.08.009

[III] ZHAO, Tiancong, Ahmed ELZATAHRY a Xiaomin LI. Single-micelle-directed synthesis of mesoporous materials. Nature Reviews Materials [online]. 2019 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: doi:10.1038/s41578-019-0144-x

[IV] WANG, Xuesong, Ziyan NIE a Jia CHANG. Multiple channels with interconnected pores in a bioceramic scaffold promote bone tissue formation. Nature.com [online]. 2021 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: https://www.nature.com/articles/s41598-021-00024-z

[V] STICH, Theresia a Francisca ALAGBOSO. Implant-bone-interface: Reviewing the impact of titanium surface modifications on osteogenic processes in vitro and in vivo. In: National Library of Medicine [online]. 2022 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8780039/

[VI] QuicksetTM Calcium Phosphate Cement. In: Arthrex [online]. [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: https://www.arthrex.com/orthobiologics/arthrex-quickset

[VII] HAMMEL, E.C. Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review. Science Direct [online]. 2014 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2014.06.095

[VIII] ELIAZ, Noam a Noah METOKI. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications [online]. 2017 [cit. 2023-12-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ma10040334

[IX] ÖZNUR, Demir-Oğuz a Aldo R. BOCCACCINI. Injectable bone cements: What benefits the combination of calcium phosphates and bioactive glasses could bring? In: Science Direct [online]. 2022 [cit. 2024-03-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2022.04.007

[X] YU, Yang a Zoltán BACSIK. Contrasting In Vitro Apatite Growth from Bioactive Glass Surfaces with that of Spontaneous Precipitation. MDPI [online]. 2018 [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: doi:10.3390/ma11091690

[XI] Sol-Gel Technology Scheme. In: Commons.wikimedia [online]. 2013 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Sol-Gel_Technology_Scheme.png