



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV ROZLOŽENÍ MAKRO KANÁLKŮ NA MECHANICKOU STABILITU KOSTNÍCH NÁHRAD PŘI APLIKACI NEPŘÍMÉHO 3D TISKU

IMPACT OF MACRO CHANNELS ON MECHANICAL STABILITY OF BONE SCAFFOLDS DURING INDIRECT
3D PRINTING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Vojníková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1415/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Michaela Vojníková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. David Salamon, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv rozložení makro kanálků na mechanickou stabilitu kostních náhrad při aplikaci nepřímého 3D tisku

Zadání bakalářské práce:

Zjistit vliv rozložení makro kanálků na mechanickou stabilitu kostních náhrad připravených z hydroxyapatitu metodou nepřímého 3D tisku nejlépe v kombinaci s metodou freeze–casting.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Michaela Vojníková
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Porézne materiály sú momentálne veľkým objektom záujmu tkanivového inžinierstva. Poskytujú unikátne vlastnosti, ako je bioaktivita, biodegradabilita, osteokonduktivita a vaskularizácia. Veľký potenciál v medicínskych aplikáciách vykazujú najmä keramické porézne systavy. Kritickým problémom pri poréznych scaffoldoch sú zlé mechanické vlastnosti, a preto sa momentálne využívajú len pri nízko zaťažovaných miestach.

Táto práca sa zaoberá prípravou scaffoldov z hydroxyapatitu, pomocou metódy freeze-casting, kde bola aplikovaná nepriama 3D tlač s cieľom dosiahnuť otvorené kanáliky s veľkosťou nad 200 μm . Porovnáva mechanické vlastnosti scaffoldov s rôznou vnútornou štruktúrou a sleduje, aký vplyv má implementácia rôznych typov mriežok na výslednú stabilitu.

Boli pripravené scaffoldy s rôznym usporiadaním makro kanálikov vo vnútornej štruktúre, ale mali rovnaké rozmery. 3D mriežka bola implementovaná pred mrazením do formy a táto mriežka bola spekaním odstránená, kde vo výslednom scaffolde ostal len systém kanálikov o rozmeroch najmenej 540-600 μm .

Experimentálne bolo zistené, že typ 3D mriežky má vplyv na výslednú mechanickú stabilitu scaffoldu. Pootočenie tejto mriežky nemá významný vplyv na výsledok, len napomáha k praskaniu v smere závitnice.

Kombinácia týchto metód vykazuje veľmi dobrú kontrolovateľnosť s riadenými makro kanálikmi vo výslednom scaffolde, a preto je vhodná pre prípravu kostných náhrad s rôznou štruktúrou.

ABSTRACT

Porous materials are currently subject to the great interest of tissue engineering. They provide unique properties such as bioactivity, biodegradability, osteoconductivity, and vascularization. Particularly, ceramic porous systems show appreciable potential in medical applications. However, there is a crucial problem with the porous scaffold on account of their bad mechanic properties and therefore they are presently used only at low-load locations.

This thesis focuses on the preparation of the scaffolds made of hydroxyapatite by using the freeze-casting method where the indirect 3D printing was applied to get open channels with the size over 200 μm . It also compares the mechanical properties of the scaffolds with different internal structures and monitors how the implementation of different types of grids affects the resulting stability.

The scaffolds were prepared with a different arrangement of macro-channel in the internal structure, but they had equal dimensions as common property. The 3D grid was implemented before freezing into the mold and afterward the grid was eliminated by sintering, leaving only a channel system with the size 540-600 μm in the final scaffold.

The influence of the type of the 3D grid on the resulting mechanical stability of the scaffold was determined. Rotation of this grid does not have a significant effect on the result, while it only helps with cracking in the direction of the helix.

The combination of these methods reports very good controllability with directed macro-channels in the resulting scaffold and therefore it is suitable for the preparation of the bone-implants with different structures.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Hydroxyapatit, freeze-casting, nepriama 3D tlač, kostné náhrady

KEY WORDS

Hydroxyapatite, freeze-casting, indirect 3D printing, bone implant

VOJNÍKOVÁ, Michaela. *Vliv rozložení makro kanálek na mechanickou stabilitu kostních náhrad při aplikaci nepřímého 3D tisku* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-20]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113595>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce David Salamon.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu „Vplyv rozloženia makro kanálikov na mechanickú stabilitu kostných náhrad pri aplikácii nepriamej 3D tlače“ vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT,

.....
Michaela Vojníková.

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce, pánovi doc. Ing. Davidovi Salamonovi, Ph.D., za odbornú pomoc a usmernenie pri písaní bakalárskej práce, za cenné rady, informácie a v neposlednom rade za ochotu. Taktiež by som rada poďakovala pánovi Ing. Jakubovi Rolečkovi a pani Bc. Lucii Pejchalovej za ústretový prístup a pomoc pri riešení praktickej časti mojej bakalárskej práce.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1.	Kostné tkanivo.....	8
2.2.	Scaffold	11
2.3.	Metódy prípravy poréznych materiálov	14
2.4.	Metóda Freeze-casting	17
2.5.	Mechanické vlastnosti keramických materiálov	21
2.6.	Porézne kostné náhrady založené na hydroxyapatite	25
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1.	Chemikálie a použité prístroje.....	26
3.2.	Proces tvorby scaffoldu	26
3.3.	Suspenzie hydroxyapatitu	27
3.4.	Mriežky	28
3.5.	Proces Freeze-casting	29
3.6.	Lyofilizácia.....	31
3.7.	Spekanie	31
3.8.	Meranie hustoty a porozity	31
3.9.	Mechanické testy	32
4.	VÝSLEDKY	33
4.1.	Termická stabilita polymérov	33
4.2.	Popis výsledných scaffoldov	34
4.3.	Charakterizácia makro a mikroštruktúry	35
4.4.	Meranie hustoty a porozity	37
4.5.	Mechanické vlastnosti	38
5.	DISKUSIA	40
6.	ZÁVER.....	42
7.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	43
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	49

1. ÚVOD

Kosť je tvrdé spojivové tkanivo, ktoré tvorí základ opory nielen ľudského organizmu, ale aj ostatných stavovcov. Pri rôznych zlomeninách, genetických poruchách alebo pri závažných ochoreniach, pri ktorých dochádza k úbytku kostného tkaniva, kosť stráca svoju podstatnú funkciu a svoju hlavnú rolu už nemôže vykonávať. V niektorých prípadoch je nutné kostné tkanivo odstrániť a nahradiť ho implantátom. V modernej dobe tkanivového inžinierstva je snaha, aby sme napomohli novému rastu kosti a aby v ľudskom tele nebol umelý implantát.

Najčastejším prístupom v tkanivovom inžinierstve pre náhradu poškodeného tkaniva je autológna metóda. Autológna metóda využíva vlastné kostné tkanivo jedinca pre náhradu defektného tkaniva. Táto metóda má ale veľa nedostatkov, spôsobuje nové poškodenia v inej časti tela, pacient je nútený podstúpiť väčšie množstvo operácií, častokrát umiestnené tkanivo nevyhovuje novému miestu. Možným prístupom je zavedenie umelého, neprirodzeného implantátu. Alternatívou tejto metódy je regenerácia poškodeného tkaniva pomocou vlastných buniek danej časti kosti. Táto metóda predchádza prípadným zápalom v okolí umelého implantátu, obmedzuje dlhodobé podráždenie organizmu a tiež zvyšuje celkový komfort pacienta [1].

Langer a Vacanti publikovali ako vhodný spôsob kostnej náhrady biologicky odbúrateľný trojrozmerný scaffold, ktorý má v ideálnom prípade vysokú pórovitosť, prepojené siete pórov a tieto póry majú ideálnu veľkosť, ktoré napomôžu proliferácii buniek a vaskularizácii. Ako prvé sa využívali techniky, ktoré pozostávali z lepenia vlákien, odlievania a neskôr sa začali používať techniky, ktoré využívajú 3D tlač (rapídne prototypovanie a pod.). Techniky využívajúce 3D tlač umožňujú riadenú kontrolu veľkosti pórov, implantát je možné prispôbiť presne problematickému miestu [2, 3].

Pri rapídnom prototypovaní sa ako vhodný kandidát osvedčil hydroxyapatit, ktorý tvorí hlavnú zložku kostí. Hydroxyapatit je vysoko biokompatibilný a bioaktívny materiál. Hydroxyapatit sa ďalej začal využívať aj pri iných technikách pre spôsob výroby scaffoldu, napríklad pri nepriamej 3D tlači [4].

Nepriama 3D tlač kombinuje vlastnosti rapídneho prototypovania s vytváraním lamiel pomocou mrazenia. Táto metóda odstraňuje závažný nedostatok priamej 3D tlače, a to mechanickú stabilitu. Nepriama 3D tlač kombinuje štruktúry vyrobené aditívnou technikou s obetnou šablónou. Táto metóda umožňuje vyrobenie scaffoldu s presne preddefinovaným tvarom a s presne zadanou sieťou pórov a ich veľkosťou. Je to kombinácia mrazenia s prchavou polymérnou maticou [4].

Tento typ metódy nie je ako jediný typ takejto prípravy scaffoldu. Han a spol. využívali polyuretánovú penu impregnovanú suspenziou oxidu hlinitého, ktorá bola následne zmrazená a Alba a spol. využili 3D vytlačené ABS šablóny na zavedenie pórov do zmrazených chitozán - alginátových skeletov [5, 6].

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Kostné tkanivo

Hlavnou funkciou kostného tkaniva (*textus osseus*) je vytváranie skeletu celého živého organizmu. Taktiež plní hlavne funkciu opornú, ochrannú a zásobnú. Keďže je to dynamické tkanivo, tak prestavbou vnútornej štruktúry reaguje na rast a zaťaženie. Je jedným z najtvrdších tkanív v ľudskom tele, a preto je odolné voči ťahu a tlaku. Regeneračná schopnosť kosti je veľmi dobrá.

Kostné tkanivo sa skladá z dvoch základných zložiek, a to z buniek kostného tkaniva a medzibunkovej hmoty [7].

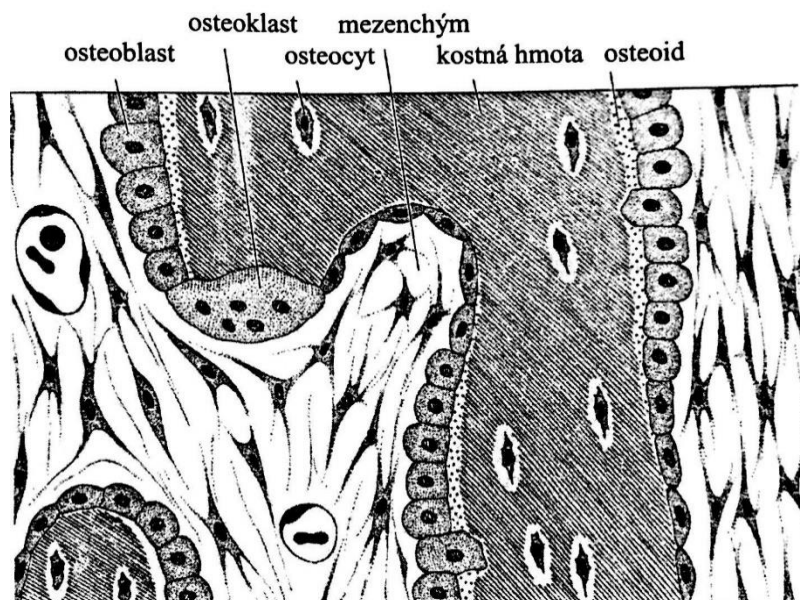
V základnej hmote môžeme pozorovať tri základné druhy buniek – osteoblasty, osteocyty a osteoklasty [7].

Osteoblasty sa nachádzajú na povrchu novo vytvárajúcej sa kosti, pričom sa označujú aj ako nezrelé kostné bunky. Ich základnou funkciou je tvorba kolagénu, glykoproteínov a proteoglykánov [7].

Osteocyty vznikajú dozretím osteoblastov, často sú tiež nazývané ako vlastné bunky. Na povrchu sa nachádzajú výbežky, vďaka ktorým tieto bunky komunikujú.

Osteoklasty sú obrovské mnohoadrové bunky považované za modifikované makrofágy. Môžu obsahovať viac ako 5 jadier. Tento druh buniek sa podieľa na likvidácii odpadu, ktorý vzniká pri resorpcii kosti [8].

Kostné bunky sú usporiadané v lamelách rôzne. V jednej lamele sú bunky usporiadané pravotočivo, v druhej lamele ľavotočivo [8].



Obrázok 1: Kostné bunky [7]

Medzibunková hmota je tvorená z organickej, amorfnej a medzibunkovej hmoty. Hlavnou zložkou organickej hmoty je kolagén typu I, ktorý vytvára vlákna. Amorfná hmota je tvorená najmä glykoproteínmi (osteokalcín, sialoproteín). Hlavnú rolu zohrávajú glykoproteíny pri kalcifikácii kostnej hmoty, keďže viažu vápnik. Medzibunková hmota je tvorená minerálnymi

soľami, fosforom a vápnikom, ktoré tvoria kryštáliky hydroxyapatitu, nekryštalický fosforečnan vápenatý. Ďalšími zložkami je draslík, horčík a sodík. Hydroxyapatit sa javí ako súbor doštičiek uložených pozdĺž kolagénovej hmoty. Okolo týchto kryštálikov sa nachádza vrstva vody a iónov, ktorá poskytuje hydratačné a komunikačné funkcie [8, 9].

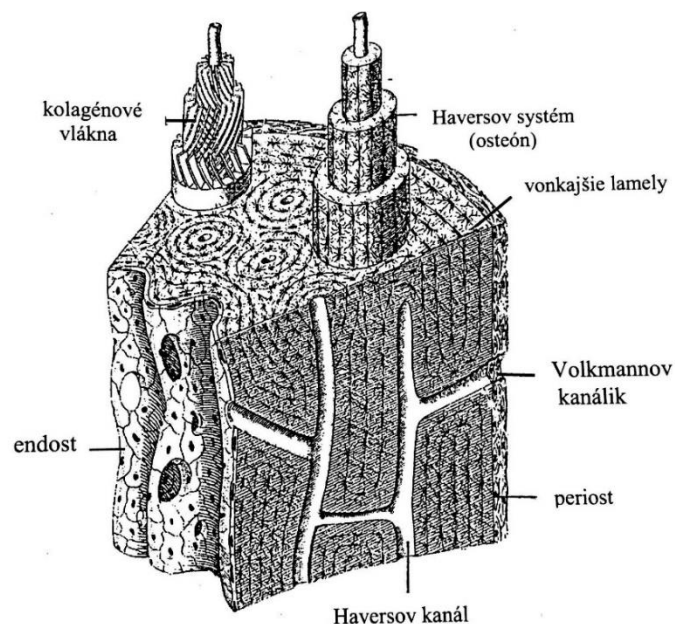
Kosť je tvorená organickou a minerálnou zložkou. Organická zložka je v zastúpení 30 %, pričom najviac je tvorená kolagénom typu I, ako to je aj v medzibunkovej hmote. Kolagén je zastúpený v 95 % z organickej zložky. Minerálna zložka (70 %) je najviac tvorená hydroxyapatitom, ktorý tvorí 98 % organickej zložky. Ďalšími prvkami minerálnej zložky sú horčík, vápnik, draslík, fluoridy a chloridy [7].

2.1.1. Typy kostného tkaniva

V organizme živočíchov sa kostné tkanivo vyskytuje v dvoch typoch: vláknité a lamelárne.

Vláknité kostné tkanivo sa vyskytuje v dospelom organizme len pri úponoch šliach svalov alebo pri hojení zlomenín, či už reparačných procesoch. Za normálnych okolností sa vyskytuje len v embryonálnom vývoji a neskôr je nahradené lamelárnym kostným tkanivom.

Lamelárne kostné tkanivo je najrozšírenejšie kostné tkanivo u dospelého jedinca. Je zložené z kostných buniek a medzibunkovej hmoty s množstvom kolagénových vlákien. Telo dlhých rúrovitých kostí, plochých a krátkych kostí je tvorené z kompaktného kostného tkaniva. Konce kostí (epifýza) sú tvorené špongióznym kostným tkanivom. Špongiózne kostné tkanivo dostalo názov špongiózne, pretože je tvorené lamelami, ktoré pripomínajú špongiu. Lamely sa kvôli častým požiadavkám organizmu neustále prestavujú. Kompaktné kostné tkanivo sa nachádza na povrchu dlhých kostí (diafýza). Tento typ kostného tkaniva je zložený z vonkajších plášťových lamiel, ktoré sú uložené v niektorých vrstvách a z vnútorných plášťových lamiel, ktoré sú usporiadané koncentricky. Tento súbor lamiel sa nazýva Haversov systém alebo osteón. Pozostáva z 5 až 20 lamiel, ktoré sú do seba zasunuté. Medzi jednotlivými lamelami prechádza kanálik, v ktorom sa nachádzajú krvné cievy (výživa kostných buniek) a nervy [7].



Obrázok 2: Schéma kompaktného kostného tkaniva [7]

2.1.2. Osifikácia

Osifikácia je vznik kostného tkaniva. Tento vznik prebieha v dvoch etapách. V prvej etape, embryonálnej, kosť vzniká. Kostné tkanivo vzniká rozmnožovaním mezenchýmových buniek, pričom vzniká blastém – nediferencovaný model kostí. V priebehu vývoja sa blastém modifikuje procesmi na chrupku alebo kosť. V druhej etape, po narodení jedinca, kosť rastie, mení sa a prispôsobuje sa prostrediu [7].

Podľa spôsobu vzniku kostného tkaniva rozoznávame dva typy osifikácie. Dezmozogénnu – z väziva, chondrogénnu – z chrupky [7].

Dezmogénnou osifikáciou vznikajú len niektoré ploché kosti (lebka, čeľusť, kľúčna kosť). Je to menej častý typ. Základom je tvorba kostného blastému pomocou mazených buniek. Tieto bunky produkujú hmotu osteoid. Neskôr dochádza ku kalcifikácii, pričom dochádza k usadzovaniu kryštálikov hydroxyapatitu na povrch kolagénových vlákien. Postupne sa ukladajú osteoblasty, až kým vznikne celá kosť. Vzniká vonkajšia a vnútorná lamela, medzi ktorými sa nachádza špongiózne tkanivo [7].

Chondrogénna osifikácia je najčastejší typ vzniku kostného tkaniva. Vzniká osifikáciou hyalínnej chrupky. Počas tohto typu osifikácia prebiehajú dva typy: perichondrálna a enchondrálna, ktoré prebiehajú súčasne [7].

Perichondrálna osifikácia prebieha na povrchu chrupky a dáva základ budúcej kosti. V prvom štádiu vzniká kostný prstenec, ktorý je základom pre diafýzu. V druhej časti kostná manžeta diafýzy rastie smerom do stredu a tak vzniká epifýza [7].

Enchondrálna osifikácia prebieha vo vnútri chrupky, kde prechádza smerom k budúcim epifýzám. V matrix sa postupne ukladá vápnik a vytvorí vápenatú chrupku. Krvné cievy smerom od okostice nesú nové kmeňové bunky kostnej drene. Smerom od diafýzy vzniká epifýza s dreňovou dutinou. Medzi epifýzou a diafýzou sa nachádza platnička, ktorá ich navzájom k sebe pripája. Táto platnička je zložená z chrupky, ktorá sa postupne kompenzuje kostným tkanivom. Pri ukončení tejto kompenzácie je rast kosti zastavený [7].

2.1.3. Faktory ovplyvňujúce rast a život kostí

Celkový rast kostí končí v období adolescencie, keď sa vytvorí z vnútornej strany dreňovej dutiny lamelárna vrstva, ktorá sa prikladá na nové kostné tkanivo. Tento vznik ovplyvňujú rôzne hormóny, ako je aj rastový hormón hypofýzy, štítnej žľazy a pohlavné hormóny. Veľmi dôležitú funkciu pri raste kostí zohrávajú vitamíny A a D, dostatok vápnika a fosforu [9].

Keďže je kostné tkanivo dynamickým tkanivom, tak sa neustále prestavuje aj po ukončení rastu a prispôsobuje vonkajším podmienkam prestavbou. Prestavba kostného tkaniva môže byť ovplyvnená nedostatčným prívodom živín do Haversových systémov, alebo to môže byť spôsobené rôznymi biochemickými alebo endokrinnými podnetmi. Za normálnych podmienok by sa na mieste odumretého tkaniva malo vytvoriť nové kostné tkanivo [7].

Dôležitým faktorom rastu kostí je dostatočný obsah dvoch najzákladnejších prvkov pre rast a život – vápnik a fosfor [11, 13].

Vápnik je jeden z najdôležitejších extracelulárnych iónov. Tvorí okolo 1,5 % celkovej telesnej hmotnosti a práve 99 % tejto hmotnosti je zastúpených práve ako anorganická zložka kostí.

Fosfor je v tele zastúpený najmä vo forme fosfátov. V kostiach je v pomere s vápnikom zastúpený 1:2. Práve v kostiach je zastúpený v pomere 80-85 % z celkového množstva v organizme. Fosfor je spolu s vápnikom dôležitou súčasťou kalciofosfátového metabolizmu.

Vápnik je transportovaný do tela dvoma spôsobmi: transcelulárne a paracelulárne. Ak je vápnik transportovaný aktívnym spôsobom, čiže proti koncentračnému spádu na úkor energie na strane bezolaterálnej membrány, tak sa jedná o transcelulárny transport. Ak je vápnik transportovaný priamo z črevných lumien, tak sa jedná o paracelulárny transport. Vápnik je v obličkách filtrovaný len v iónovej podobe. Spätná resorpcia prebieha v oblasti proximálneho kanálíka. Henlého slučka resorbuje vápnik transcelulárne a paracelulárne. Celú túto cestu resorpcie stimuluje parathormón a kalcitonín [11, 13].

Homeostázu vápnika udržujú osteoklasty. Osteoklasty kosť resorbujú, a tým zvyšujú koncentráciu vápnika. Pri oprave alebo novotvorbe kostnej hmoty sa znižuje koncentrácia kalcia [11, 13].

Ako bolo spomenuté, tak vápnik je regulovaný vďaka parathormónu (PTH) a kalcitonínu. PTH je peptidový hormón prístitných teliesok, kalcitonín je peptidový hormón štítnej žľazy. Na regulácii vápnika sa taktiež podieľa vitamín D, ktorý je lipofilný hormón. Vitamín D je prijímaný do tela UV žiarením pomocou kože. PTH účinkuje v troch častiach tela. V kostiach, kde uvoľňuje vápnik a fosfor, v obličkách, kde zvyšuje spätnú resorbciu vápnika a fosforu a v čreve, kde pôsobí nepriamo. Kalcitonín pôsobí v rovnakých častiach, no opačne. V kosti zadržuje vápnik a fosfor, v obličkách znižuje spätnú resorbciu. Vitamín D v kostiach udržiava transport vápnika a v čreve zvyšuje resorbciu vápnika a fosforu [12].

2.1.4. Ochorenia kostí

Medzi najčastejšie typy ochorenia kostí patrí osteoporóza a rakovina kostí. V oboch prípadoch sa stretávame s úbytkom kostnej hmoty. Tieto ochorenia sú vrodené, spôsobené genetickou mutáciou, metabolickou disfunkciou alebo vonkajšími faktormi.

Osteoporóza postihuje najmä ženy dvakrát viac ako mužov. Toto ochorenie je spôsobené nedostatkom kalcia, či vitamínu D. Je doprevádzaná zvýšením imunoreaktívneho parathormónu, čím sa znižuje resorpcia vápnika v čreve s poklesom vitamínu D. Osteoporóza zvyšuje riziko zlomenín hlavne kostí, ktoré obsahujú spongiózne kostné tkanivo, keďže pri tomto ochorení prevažuje resorpcia nad tvorbou kostí, čo má za následok zlomeniny predlaktia, stavcov a krčku stehennej kosti [15].

Osteosarkóm alebo rakovina kostí postihuje najmä chlapcov do veku 20 rokov. Zvýšený rast a delenie osteoblastov zvyšuje riziko osteosarkómu. Preto toto ochorenie postihuje všetky kosti, no najčastejšie kosť stehennú, ramennú a holennú. Príčinou tohto ochorenia sú genetické predispozície na chromozóme 13q14, alebo účinkom iných ochorení, ako je napríklad vystavenie sa rádioaktívnemu žiareniu (Stronciu-90) z jadrového reaktoru [14].

2.2. Scaffold

Scaffolds sú určené pre náhradu poškodeného alebo chorého tkaniva. V ideálnom prípade ide o scaffold pre regeneráciu tkaniva s vlastnosťami podobným ako má prírodné tkanivo. Scaffold by mal byť navrhnutý tak, aby miesto poškodenia bolo nerozlíšiteľné od okolitého tkaniva. Na dosiahnutie tejto vlastnosti musí scaffold spĺňať niekoľko podmienok. Základnými

podmienkami sú pórovitosť, povrch a topografia musia byť vhodné pre adhéziu, proliferáciu a diferenciáciu buniek a taktiež materiál musí mať vhodnú hierarchickú architektúru na riadenie regenerácie buniek a musí sa degradovať, aby sa zabránilo ďalšej operácii. Napriek vysokej pórovitosti musí byť materiál dostatočne pevný a musí nahrádzať prirodzené tkanivo do uzdravenia oslabenej časti. Ľudské tkanivo je príliš rozmanité, a preto je veľmi ťažké nájsť materiál, ktorý presne vyhovuje organizmu svojimi mechanickými vlastnosťami a architektúrou [2].

2.2.1. Dôvody využívania scaffoldov

U mladších ľudí majú kosti vysokú regeneračnú schopnosť, to znamená, že väčšina zlomenín sa veľmi dobre vylieči. Napriek tomu veľké kostné defekty, ako je rakovina, závažné fraktúry, nemajú šablónu pre regeneráciu tkaniva a preto vyžadujú chirurgický zákrok. V súčasnej dobe sa ako štandardné ošetrenie využíva postup nazývaný autotransplantácia alebo spinálna fúzia. Autotransplantácia, tiež nazývaná autológna metóda, je postup, kde sa využíva ľahko dostupné zdravé kostné tkanivo na transplantáciu chorého miesta. Autológny štep sa najčastejšie odoberá z bedrovej kosti, hlavice holennej kosti, z hornej alebo dolnej časti stehennej kosti. Spinálna difúzia využíva transplantáciu kostných šteпов od darcov. Obe metódy spôsobujú zhoršenú regeneráciu zdravého tkaniva. Implantát z biomateriálu ideálne stabilizuje defekt a navyše umožňuje rast kostí [16].

2.2.2. Typy využívaných materiálov

Zdravé funkčné tkanivo sa skladá z niekoľkých rôznych zložiek, organických aj anorganických. Z organickej zložky prevažuje kolagén typu 1, rôzne glykoproteíny, proteoglykány. Z anorganickej zložky je hojne zastúpený hydroxyapatit, ktorý má za následok pevnosť voči tlaku [7].

Časom sa biologicky inertné materiály zamieňajú za biomateriály, ktoré interagujú s tkanivom. Podporujú osteoindukčnosť (diferenciáciu buniek), osteokondukčnosť (rast kostí) a osseointegráciu (integráciu do okolitej kosti). Vo všeobecnosti sa ako biomateriál najviac využíva bioaktívna keramika, bioaktívne sklá a biologické alebo syntetické polyméry [18].

Z anorganických materiálov, ktoré sú podobné zloženiu anorganickej zložky kosti, sa najmä využívajú fosforečnan trivápenatý, hydroxyapatit a bioaktívne sklá. Bioaktívne sklá majú výhodu v tom, že pri ponorení do biologickej tekutiny produkujú hydroxykarbonátovú apatitovú vrstvu a dodávajú kremík do kostí [17, 20].

Pre najväčšiu podobnosť scaffoldu s kosťou sa využívajú kompozity zložené aj z anorganickej aj z organickej zložky, napríklad kombinácia hydroxyapatitu a PLA [19].

2.2.3. Porézny materiál

Porézne materiály sa obvykle chápu ako materiály s porozitou vyššou ako 30 %. Vzhľadom na zvláštnu štruktúru a jedinečné vlastnosti je porézna keramika využívaná v širokom spektre odvetví, ako v stavebnom inžinierstve, tak aj v tkanivovom inžinierstve a to najmä pre vybudovanie porézneho scaffoldu pre regeneráciu kostného tkaniva. Jednotlivé vlastnosti sa dajú kombinovať, tým pádom je možné pre konkrétnu aplikáciu špecificky ovplyvňovať výslednú mikroštruktúru a vlastnosti. Medzi najzákladnejšie vlastnosti poréznej keramiky patrí

nízka hustota, nízka tepelná vodivosť, vysoká tepelná odolnosť, vysoká priepustnosť pre plyny a kvapaliny. Rozlišujeme dva typy poréznych materiálov: peny a voštiny (honeycombs). Peny majú guľovité alebo rovnobežné póry a majú izotropné vlastnosti. Honeycombs sa skladajú z prizmatických pórov, ktoré majú anizotropné vlastnosti. Honeycombs sa využívajú pri aplikáciách, kde je potrebná celková vysoká pórovitosť. Ak majú honeycombs presný tvar rovnobežných šesťuholníkov, tak sú omnoho účinnejšie ako peny, keďže sa takto dosiahne vysoká mechanická stabilita medzi tkanivom a integrovaným scaffoldom [22].

Pomocou metódy freeze-casting vieme vyrobiť ideálny scaffold, ktorý je porézne podobný kostnému tkanivu. Je to ideálna metóda, keďže týmto spôsobom vieme v procese meniť všetky triedy materiálov – polyméry, keramiku a kovy [19].

Potenciálny porézny materiál sa musí skladať z troch hlavných zložiek – keramický prášok (hydroxyapatit, Al_2O_3 , ZrO_2), rozpúšťadlo (voda, kamfén, terc-butylalkohol), prídavky (pre zaistenie viskozity, stability) [19].

2.2.4. Keramický prášok

Najdôležitejšou zložkou biomateriálu je keramický prášok. Ten je zastúpený v 10 - 50 objemových % celej suspenzie. Použitie nižšej hodnoty je nevhodné pre problematickú mechanickú integritu konečnej konštrukcie, napríklad by vznikli tenké keramické steny. Použitie vyšších objemových percent by mohlo viesť k nízkemu rastu rozpúšťadlových kryštálov, ktoré sa využívajú v procese freeze-casting. Medzi najviac používané keramické prášky patrí hydroxyapatit, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý a iné [21, 23].

Hydroxyapatit (HA) je jednou z hlavných zložiek tvrdých tkanív kostí a zubov. V biomateriáloch sa využíva najmä vďaka svojej biokompatibilite, bioaktivite, nízkej rozpustnosti vo vode a non-biodegradabilite. V medicíne sa využíva vo forme kostných alebo zubných náhrad. Keďže sa jedná o krehkú látku, tak sa ako implantát využíva len pri veľmi málo zaťažovaných kostiach (kosti vnútorného ucha). V kombinácii s inými polymérnymi materiálmi (kolagén) vieme tieto vlastnosti meniť tak, aby HA mohol byť využívaný aj pre viac zaťažované kosti [24].

Jeho sumárny vzorec je $Ca_5(PO_4)_3(OH)$. Vo voľnej prírode sa vyskytuje v bielej, žltej a zelenej forme minerálu a patrí do skupiny apatitov. Prášok je biely. HA je dostupný v rôznych formách, ako je prášok, granule, doštičky [25].

Najčastejšou metódou prípravy HA je pomocou „mokrej cesty“, pomocou sol-gel alebo hydrotermálnych metód. Tieto metódy majú príliš veľa nevýhod, napríklad dlhá doba reakcie, rôzny tvar častíc a je potrebné kontrolovať veľké množstvo parametrov. Ďalšia možná cesta pri príprave hydroxyapatitu je mikrovlnnou - hydrotermálnou syntézou. Táto metóda prebieha v troch krokoch: syntéza v mikrovlnnej trúbe, filtrácia a premytie prášku a sušenie [24].

Oxid hlinitý (Al_2O_3) je biela kryštalická látka, ktorá sa v prírode nachádza ako veľmi tvrdý nerast korund (Mohsova stupnica 9) alebo v jeho odrodách, ako je aj rubín. Vo vode je táto látka nerozpustná, no bobtná za vzniku $Al(OH)_3$. Má amfoternú povahu, pôsobením kyselín sa rozpúšťa za vzniku hlinitých solí a pôsobením zásad tvorí hlinitany. Má vysokú teplotu topenia a varu [25].

Oxid hlinitý kryštalizuje v rôznych bezvodých a hydratovaných modifikáciách. Najbežnejšou modifikáciou je α trigonálna – korund, β hexagonálna a kubická. Ako hydratovaná forma kryštalizuje ako monohydrát – ortorombicky a trihydrát – monocyklicky.

Vyrába sa z bauxitových rúd. Bauxit je tvorený zo všetkých hydratovaných foriem oxidu hlinitého a nečistôt. Nečistôt sa zbavujeme Bayerovým procesom, v ktorom dochádza k dehydratácii až na hydroxid. Následne sa zmes ochladzuje, čím sa posúva rovnováha v prospech tvorby hydroxidu hlinitého. Pevný podiel sa oddelí a kalcinuje, čím dôjde k vzniku oxidu hlinitého [27].

Oxid hlinitý má široké uplatnenie. Využíva sa kvôli svojej tvrdosti ako náhrada veľmi drahých diamantov, prídavok zubných pást a tiež ako materiál pre výrobu umelých bedrových kĺbov [27].

Oxid zirkoničitý (ZrO_2) je biela kryštalická látka s vysokou teplotou topenia a varu. V prírode sa vyskytuje vzácne ako minerál baggeleyit. Pri izbovej teplote sa nachádza v jednodkľonnej kryštálovej štruktúre, zahrievaním na vysoké teploty prechádza na tetragonálnu štruktúru a vyšším zahriatím na kubickú. Má relatívne vysokú pevnosť vďaka kubickej štruktúre. Často sa oxid zirkoničitý stabilizuje prímiesou oxidu yttritého Y_2O_3 , ktorý stabilizuje jeho kubickú štruktúru alebo tetragonálnu, podľa zastúpenia Y_2O_3 v zmesi [25].

Vyrába sa z dostupného minerálu zirkónu ($ZrSiO_4$). Proces výroby spočíva v desilikatizácii zirkónu pri vysokej teplote so zmesou CaO/MgO , kde dochádza k odstráneniu kremičitanovej zložky, následným zahrievaním pri ešte vyššej teplote, kde dochádza k rozkladu na oxid [26].

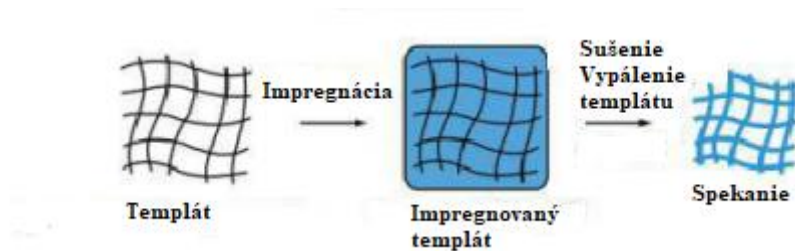
Oxid zirkoničitý má rovnako široké uplatnenie ako oxid hlinitý. Používa sa ako žiaruvzdorný materiál, s prímiesou CaO alebo MgO sa využíva ako elektrolyt. V medicíne sa využíva ako keramický kompozit, vďaka svojej pevnosti a odolnosti voči opotrebovaniu. Používa sa pri príprave zubných implantátov, keďže sa neštiepi a dá sa zafarbovať a je využívaný ako materiál pre výrobu bedrových kĺbov [26, 27].

2.3. Metódy prípravy poréznych materiálov

Podľa potrieb pacienta a voľby materiálu je potrebné zvoliť vhodnú metódu pre prípravu biomateriálu. Náš požadovaný biomateriál musí mať adekvátne vlastnosti, no najdôležitejšia je porozita.

2.3.1. Replikačná metóda

Táto metóda je považovaná za prvú metódu, ktorá sa používa na vyrábanie makroporóznej keramiky. Pri polymérnom replikovom prístupe je vysokoporézny polymér namáčaný najskôr do keramiky, pre naplnenie vnútorných pórov keramikou. Následne sa suspenzia necháva zaschnúť. Táto metóda je veľmi flexibilná a môže sa využívať akýkoľvek keramický materiál dispergovaný do suspenzie. Replikačná metóda má aj svoje nedostatky. Nesprávnym teplotným gradientom schnutia a spekania môže dôjsť k vytvoreniu prasklín, ktoré nevykazujú dostatočné mechanické vlastnosti. Pri tejto metóde je možné vytvoriť póry len od veľkosti 200 μm , aby bolo možné matricu dobre zmáčať. Potom nasleduje sušenie a vypálenie matrice pri teplote od 300 $^{\circ}C$ a spekanie. Vypaľovanie musí byť uskutočnené pomalou rýchlosťou, aby sa zabránilo vytváraniu nedostatkov v keramickej štruktúre. Matricou je väčšinou polymér (polyuretán, polyvinylchlorid, polystyrén) alebo prírodný polymér (celulóza, latex) [29, 30].



Obrázok 3: Replikačná metóda [29]

2.3.2. Solid free-form fabrication (SFF)

Metóda SFF, tiež nazývaná rapídne prototypovanie, vytvára trojrozmernú 3D architektúru s kontrolovateľnými štruktúrami na základe dvojitého 2D tvaru pomocou počítačovej podpory v CAD programe. Základom je teda vyrobenie 3D keramického materiálu bez použitia formy. Metódu SFF využívajú stereolitografia (SL), modelovanie fúzaných depozitov (FDM), selektívne laserové spekanie (SLS) a 3D tlač (3DP). Vďaka týmto metódam je možné vyrobiť zložitý implantát s rôznym tvarom presne s požiadavkami pacienta [31].

V procese SL je najprv tekutý fotopolymér ožiarený ultrafialovým žiarením (UV), čím je fotopolymér vytvrdený. V tomto procese dosiahneme požadovanú 3D štruktúru. Mikrostereolitografia bola neskôr vyvinutá na základe SL a prináša väčšiu precíznosť na mikro úrovni. Pre túto metódu existuje len veľmi málo biomateriálov, ktoré vykazujú tvrdenie pri absorpcii lúčov. Tieto kladné vlastnosti vykazujú najmä materiály s aditívami ako je polypropylén fumarát, želatína a 1,3-propylén [31].

FDM je metóda, ktorá aplikuje metódu extrúzie taveniny na výrobu scaffoldu, pričom sa využíva termoplastický polymér vrstvený po vrstve. Najväčšou výhodou FDM metódy je to, že nevyžaduje toxické rozpúšťadlo a ponúka flexibilitu pri manipulácii s materiálom [31, 32].

SLS je metóda, ktorá tiež využíva laser, no na báze napr. oxidu uhličitého. Interakciou lúča s práškom spôsobuje, že povrch sa v kontakte s lúčom deformuje a spája. SLS môže vytvoriť zložité štruktúry, ako je napríklad zložitý anatomicky tvarovaný scaffold s rôznou veľkosťou pórov. Ako materiál vhodný pre túto metódu sa môže využívať široké spektrum materiálov, no nízke spektrum biomateriálov, keďže táto metóda prebieha len pri veľmi vysokých teplotách [31].

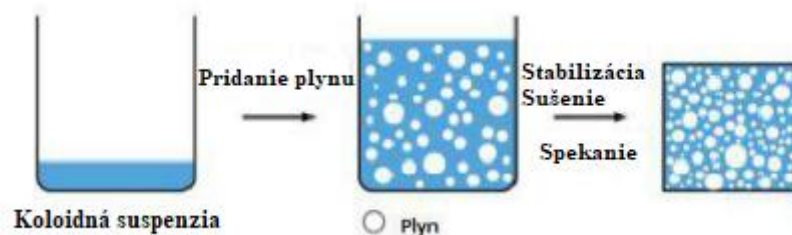
3DP metóda využíva injekčnú tlač pre spracovanie práškového materiálu na aplikáciu kostného scaffoldu. V podstate 3DP je tiež proces, ktorý vrství vlákna vrstvu za vrstvou, v ktorom je predefinovaný 2D vzor cieľovej štruktúry. Po usušení sa scaffold vytiahne a odstráni sa nenaviazaný prášok. Táto metóda je veľmi univerzálna a ako náplň do tlačiarne sa môžu využívať skoro všetky polyméry a biopolyméry. Jedinou nevýhodou je odstránenie nenaviazaného prášku [31, 33].

2.3.3. Metóda priameho penenia (in situ)

In situ metóda, alebo metóda priameho penenia, je založená na tom, že do keramickej suspenzie je vložená plynná fáza. Porozita sa pohybuje v rozmedzí 45-95 % a závisí na množstve plynu. Ako nadúvadlo sa používa prášok napr. CaCO_3 , ktorý sa pri zahrievaní rozkladá, prchavá kvapalina s nízkou teplotou varu alebo plyn, ktorý je vytvorený chemickými

reakciami in situ. Tiež sa na túto metódu využívajú rôzne polyméry, ako sú polyuretánové peny. Spočiatku majú bubliny guľovitý tvar, no v čase rastú ako mnohostenné bunky [29, 30].

Táto metóda má veľkú výhodu v tom, že dokážeme vyrábať uzavreté aj otvorené makropóry s širokou škálou veľkosti pórov (od 10 μm do niekoľko mm). Tiež scaffoldy pripravené touto metódou vykazujú väčšiu pevnosť na základe vyššej hustoty, čím sa aj znižuje pravdepodobnosť defektu. Nevýhodou tejto metódy je neschopnosť ovládania veľkosti buniek, čo vedie k nežiadúcej anizotropii. Metóda nie je vhodná pre väčší rozmer vzorky, keďže pri spekaní dochádza k popraskaniu bublín [29, 30].



Obrázok 4: Metóda in situ [29]

2.3.4. Metóda porotvornej látky

Pri tejto metóde sa vytvára kompozit zložený z dvoch fáz, suspenzie a obetovanej fázy. Vhodným príkladom je keramický roztok a porotvorná prísada (polymér, škrob, grafit). Kompozit je zahrievaný na teplotu degradácie rozptýlenej fázy a následne je materiál vypálený, pričom spaliny sa rozptyľujú do okolia. Týmto procesom vznikne porézny materiál s pórmí v miestach, kde sa nachádzala porotvorná prísada, napr. polymér [29].

Veľkou výhodou tejto metódy je, že suspenzie môžeme odlievať do akýchkoľvek foriem, a preto nenastávajú problémy s penením. Veľkosť pórov sa pohybuje v rozmedzí 1-700 μm a podľa obsahu porotvornej prísady vieme pripraviť materiál s porozitou v rozmedzí 20-90 % [29].

2.3.5. Metóda „Paste Extrusion“

Metóda Paste Extrusion je jednou z tradičných metód pre výrobu voštín. V tejto metóde sa používa pasta, ktorá obsahuje keramický prášok, polymérne alebo minerálne spojivo a mazivo. Pasta je najprv predpripravená miešaním s vysokým strihom. Po mechanickej extrúzii je keramický polotovár podrobený klasickému keramickému procesu, ako je vysušovanie, odstraňovanie spojiva, spekanie.

Hlavnou výhodou tejto metódy je najmä získanie voštinovej štruktúry. Zmes je následne pretláčaná cez kanály o presne definovanej veľkosti a tvare, čiže tým pádom môžeme získavať aj rôzne tvary, nie len voštinové (kruhové, štvorcové, trojuholníkové). Problém tejto techniky spočíva v enviromentálnych problémoch a v procese výroby veľkého množstva polymérov pre túto techniku [35].

2.4. Metóda Freeze-casting

Freeze-casting je jednou z metód, ktorá sa využíva k tvorbe poréznych materiálov. Tento proces získal svoju popularitu najmä preto, lebo sa jedná o priamy fyzikálny proces využívajúci benígne biokompatibilné rozpúšťadlá, ako je aj voda. Ďalším dôležitým dôvodom je schopnosť ovládať štruktúru pórov, ako je celková pórovitosť, priemer a využívanie pôsobenia van der Waalsových síl pre udržanie zelených teliesok pokope. Súčasný výskum sa zameriava hlavne na proces mrazu, pričom vychádza z oblasti smerového tuhnutia materiálov. Veľký potenciál nachádzajú zmrazené materiály aj v aplikáciách, kde sa nevyžaduje pórovitosť. Biomateriál s pórmí sa vyplní druhou fázou, ktorá môže byť napríklad kov a tak vznikajú rôzne kovové kompozity [4].

Freeze-casting je veľmi komplexný proces, pretože sa pri ňom dá ovládať niekoľko parametrov. Najľahšie ovládateľný parameter je zloženie suspenzie. Povaha suspenzie sa mení podľa použitého rozpúšťadla, spojiva, viskozity pH a podobne. Ako druhý parameter sa dajú nastaviť podmienky mrazenia, a to konkrétne teplota, rýchlosť ochladzovania [36].

Komplexne proces freeze-casting pozostáva z niekoľkých krokov – mrazenie, sublimácia rozpúšťadla a následne spekanie pre konsolidáciu stien vedúcich k vytvoreniu poréznej štruktúry, ktorá je replikou kryštálov rozpúšťadla, čiže vody. Suspenzia má mať vhodné sedimentačné vlastnosti a musí mať veľmi vhodne dispergovaný keramický prášok medzi kvapalným rozpúšťadlom, preto sa často používa disperzant. Takto pripravená suspenzia sa vleje do formy, ktorá je zvyčajne vyrobená z polytetrafluoroetylénu (PTFE) a utesená medeným dnom [4].

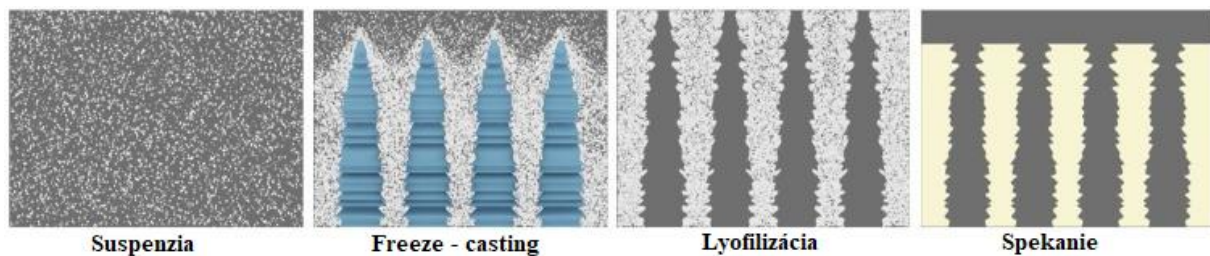
2.4.1. Vymrazovanie

Možným prístupom k vytváraniu bioaktívnych materiálov je vytváranie lamelárnej štruktúry pomocou ľadových kryštálov. Tento proces sa dá účinne prispôbovať a obmieňať vďaka meneniu rôznych faktorov, ktoré hrajú rolu v tomto procese – zmena zloženia použitej suspenzie, zmena viskozity, zmena pH a pod. [37].

Keď sa keramická suspenzia mrazí, tak rastúce kryštály rozpúšťadla vytláčajú častice keramického prášku a vytvárajú lamelárnu štruktúru orientovanú v priamom paralelnom smere rastu kryštálu. Väčšina experimentov opísaných v literatúre používa jednosmerné zmrazovanie, to znamená, že horná časť formy ostáva otvorená. Pre vysoko koncentrované suspenzie počas zmrazovania nastáva kritická interakcia medzi časticami. Malá časť častíc je zachytená v ľadových kryštáloch a to vedie k vytvoreniu dendrít medzi susediacimi stenami. Pre zmrazenie vzorky je chladenie regulované počas mrazenia v rozmedzí od 0,1 °C/min do 10 °C/min. Akonáhle je teplota studeného prstenca nižšia ako teplota tuhnutia suspenzie, tak sa vytvorí mraziaca predná strana, ktorá je definovaná ako rozhranie medzi fázou tuhhou a kvapalnou a začne sa pohybovať cez vzorku. Štruktúru vzorky a jej mechanické vlastnosti určuje rýchlosť zmrazovania aj samotná forma, v ktorej proces vykonávame. Tiež štruktúru určuje použité rozpúšťadlo. Voda tuhne do anizotropných šesťuholníkových ľadových kryštálov. Rýchlosť rastu kryštálov kolmo je stokrát väčšia ako rýchlosť rastu vodorovne. Výsledkom je, že kryštály rastú v smere zmrazovania a ak je rýchlosť rastu dostatočne veľká, tak je možné pripraviť scaffold s mostíkmi medzi lamelami. Tieto mostíky sú často žiadúce,

pretože výrazne spevňujú zmrazený materiál. Mostíky môžeme dostať aj vďaka prídavku aditív (sacharóza) [37].

Vzniknuté kryštály rozpúšťadla sa nechajú sublimovať vo vákuu v procese lyofilizácie [35].



Obrázok 5: Schéma procesu freeze-casting [35]

2.4.2. Lyofilizácia

Táto metóda spočíva v sušení vlhkých materiálov. Používa sa nielen v oblasti keramiky, teda sušenia vlhkého keramického materiálu, ale napríklad aj v potravinárskom priemysle, farmaceutickom (príprava medikamentov, napr. suchých injekcií) a pod. Celý proces spočíva v sublimácii zamrznutej vody pri nízkej teplote a tlaku, pričom nedochádza k priamemu prechodu vody z kvapalného do plynného skupenstva. V mnoho prípadoch dochádza pri priamom prechode k poškodeniu štruktúry, avšak vďaka sublimácii zanecháva odparené rozpúšťadlo póry o zhodnom tvare a veľkosti s kryštálom použitého rozpúšťadla [35].

Proces lyofilizácie pozostáva z viacerých krokov. Do lyofilizátora vstupuje vzorka, ktorá je zmrazená od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. V procese primárneho sušenia je tlak vzduchu znížený na niekoľko stoviek pascalov a následne je do systému dodaná potrebná teplota pre sublimáciu vody. Takto sublimuje viac ako 95 % vody, celý proces sa pohybuje od niekoľko hodín až po niekoľko dní. Vzniknutá vodná para desublimuje na chladičoch. V niektorých prípadoch je nevyhnutné použiť aj sekundárne sušenie, kedy sa dosahuje vysoko suchý stav. Týmto sušením sa odstráni aj nezmrznuté molekuly vody [37].

2.4.3. Rozpúšťadlo

Druhou veľmi dôležitou zložkou po keramickom prášku je rozpúšťadlo. Medzi tri hlavné rozpúšťadlá patrí voda, kamfén a terc-butylalkohol. Každý typ rozpúšťadla vykazuje iný typ pórovitosti, teda vo všeobecnosti rozdielne rozpúšťadlá vykazujú vznik rozdielnej mikroštruktúry [21].

Najviac používaným rozpúšťadlom je voda, aby sa obmedzila chemická toxicita počas celého procesu. Použitím vody ako rozpúšťadla dostaneme lamelárny tvar v dôsledku vertikálneho rastu kryštálov ľadu v procese freeze-casting [37].

Kanfén ponúka dendritickú pórovitosť. Jeho teplota tuhnutia sa pohybuje v rozmedzí $44\text{--}48\text{ }^{\circ}\text{C}$ a preto je tiež obľúbeným rozpúšťadlom. Jeho prchavosť sa vie potlačiť, no potlačenie môže viesť k zabráneniu homogénnej poréznej štruktúry. Terc-butyl alkohol dáva prizmatický tvar pórov [38].

Tabuľka 1: Fyzikálne vlastnosti najviac využívaných rozpúšťadiel [39]

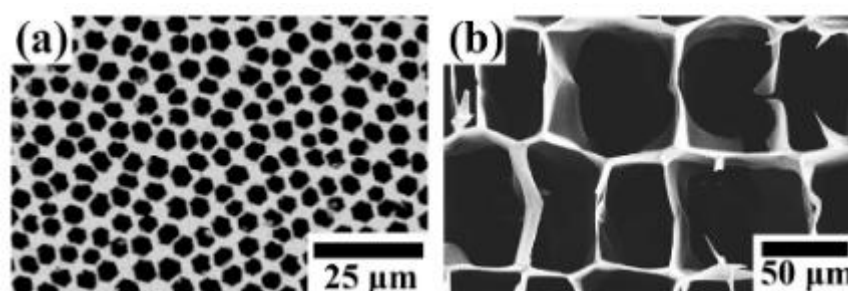
Rozpúšťadlo	Hustota (g·cm ⁻³)	Bod varu (°C)	Bod tuhnutia (°C)	Povrchové napätie (mN·m ⁻¹)
Voda	1,0	100	0,0	73,1
Kamfén	0,8	150	44,9	-
Terc-butyl alkohol	0,8	82,5	25,3	20,7

2.4.4. Aditíva

Aditíva sa pridávajú z rôznych dôvodov. Môžu sa pridávať pre vylepšenie vlastností – zaistenie stability suspenzie, viskozity, zabráneniu usadzovaniu keramických častíc a aby sa zabezpečila dostatočná mechanická pevnosť. Pridávané látky môžu byť v suspenzii tiež používané ako štruktúrne činidlo [21].

Kryoprotektanty sú látky, ktoré znižujú teplotu homogénnej nukleácie, čiže posúvajú bod tuhnutia vody. Zvyšujú rekrystalizačnú teplotu a znižujú množstvo voľnej vody. Medzi kryoprotektanty zaradujeme glycerol a sacharózu. Glycerol tvorí vodíkové mostíky a tým znižuje veľkosť ľadových kryštálov, znižuje objemovú rozťažnosť vody a upravuje jej priebeh mrazenia [25].

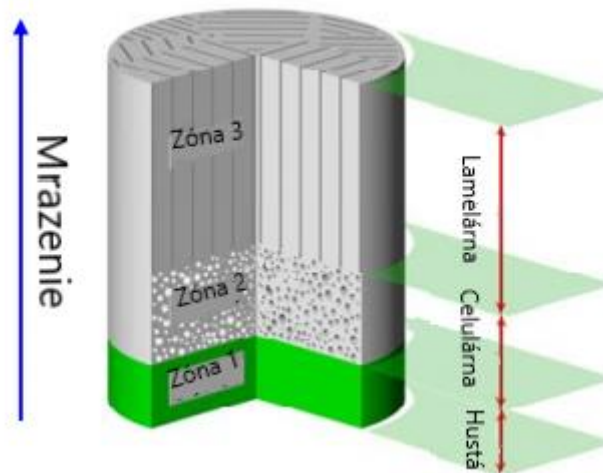
Štruktúrne aditíva upravujú tvar a veľkosť pórov. Vďaka týmto aditívam môžeme meniť celkovú štruktúru pórov. Pomocou sacharózy vznikajú medzilamelárne mostíky a podporuje vznik lamelárnej štruktúry s mikroskopickou drsnosťou, prídavkom kyseliny citrónovej sa mení lamelárna štruktúra na celulárnu. Želatína alebo agar vedie k prechodu z plochej 2D štruktúry na sieťovanú 3D štruktúru. Zirkónium-acetátový komplex dáva štruktúru honeycomb a prídavkom peroxidu vodíka o rôznej objemovej koncentrácii dochádza k prepojeniu sférických a lamelárnych pórov. Prídavkom chloridu sodného pozorujeme vznik ostrého povrchu s lamelami [15, 28].



Obrázok 6: Tvar pórov s pridaním rôznych aditív. Honeycomb pri a) s prídavkom zirkónium-acetátového komplexu, b) s prídavkom 5 hm.% želatíny [15]

Výsledná štruktúra po procese freeze – casting môže byť rozdelená do troch zón – hustá, celulárna a lamelárna. Každá z tejto zóny ma rozdielnu morfológiu. Hustá, čiže najbližšia časť k medenej platničke, chladiacemu prstencu, má najnižšiu pórovitosť voči druhým zónam. Celulárna mikroštruktúra nasleduje po hustej a ďalej nasleduje lamelárna. V prvej zóne dochádza k rýchlej tvorbe prvých kryštálov, pretože suspenzia je ešte v nestabilnom stave. V druhej zóne sa rast kryštálov spomaľuje, a preto sú kryštály schopné odsúvať keramickú

suspenziu. Kryštály v tejto zóne rastú v dvoch smeroch – mrznutia (z-kryštály) a v radiálnom (r-kryštály). Z termodynamického hľadiska je výhodné, ak kryštály rastú v jednom smere mrazenia, a preto sa r – kryštály často zmenia na z – kryštály alebo úplne prestanú rásť. V tretej zóne je viditeľná lamelárna štruktúra [36].



Obrázok 7: Výsledná štruktúra valčeka po freeze – castingu [36]

Existencia výslednej štruktúry znázornená na obrázku (Obrázok 7) je spôsobená fyzikálnymi vlastnosťami mrazenia. Sekvencia ľadovej štruktúry je vo všeobecnosti známa a zahŕňa postupný vývoj kryštálu, pretože keramické častice vyvolávajú v rôznej výške rôzne podchladenie [22].

Výsledná štruktúra je ovplyvnená rôznymi faktormi. Ak suspenzia nemá dostatočne malé častice, tak jej častice bránia vzniku kryštálu, tým pádom veľmi koncentrované suspenzie bránia vzniku pórov, tým pádom znižujú porozitu. Štruktúra je ďalej ovplyvňovaná rôznymi fyzikálnymi vlastnosťami, ako je rýchlosť chladenia a podobne [41].

Štruktúra sa dá aj ovplyvniť nepriamo, a to použitím nepriamej 3D tlače.

2.4.5. Nepriama 3D tlač

Nepriama 3D tlač je všestranná technika na výrobu zložených keramických dielov, ktoré sú založené na keramickej surovine. Táto technológia je výnimočná pre tvorbu trojrozmerných bunkových štruktúr. Pre tvorbu bunkovej štruktúry boli využívané metódy najmä ako replikačná metóda a metóda priameho penenia. Tieto metódy sú obmedzené na tvar šablóny. Nepriama 3D tlač nie je obmedzená na tvar šablóny a je veľmi flexibilná. Pomocou programu si vieme vytlačiť šablónu o definovanej veľkosti pórov, orientácii a tvaru pórov, či periodicite [31].

Pod nepriamou tlačou môžeme chápať tlačenie už nami používaného prášku v kombinácii so spojivom, alebo vytlačenie šablóny zlozenej z polyméru (PLA), následne zaliatou keramicou suspenziou. Šablóna – mriežka je v procese lyofilizácie vypálená pôsobením vysokej teploty. V druhom prípade ostane v scaffolde systém kanálikov s pórmi o definovanej veľkosti, ktorú mala šablóna po spekaní. Kanáliky oproti kanálikom bez aplikácie 3D mriežky (lamely) majú väčšie rozmery, mikrometrové rozmery a sú viditeľné voľným okom. Tento typ

kanálikov sa nazýva makro kanáliky. Táto technika umožňuje užívateľovi riadiť vonkajšiu aj vnútornú morfológiu finálneho produktu [34].

Potrebou pre ujetie scaffoldu je vaskularizácia. Pomocou makro kanálikov je väčšia pravdepodobnosť prerastania ciev, difúzie živín, proliferácie buniek a rast nových kostných tkanív. Pre stimuláciu rastu krvných ciev scaffoldom sa využívajú rastové faktory, ktoré podporujú vývoj a dozrievanie krvných ciev alebo osteogennú diferenciáciu prekursorov osteocytov. Ako rastové faktory sa využívajú najmä Vaskulárny endotelový rastový faktor a kostný morfogenetický proteín [34].

2.5. Mechanické vlastnosti keramických materiálov

V posledných rokoch majú keramické materiály omnoho viac využití, ako bolo v minulosti, vďaka nízkej hustote, ale vysokej pevnosti. Napriek týmto výhodám má keramika aj nevýhody. Základnou nevýhodou je krehkosť, a preto sa kladie dôraz na pochopenie mechanických vlastností a zároveň na vylepšenie týchto vlastností – zlepšenie pevnosti, húževnatosti a odolnosti voči poškodeniu.

Keramické materiály majú veľmi zaujímavé vlastnosti: sú chemicky inertné, väčšinou žiaruvzdorné materiály, majú nízku tepelnú a elektrickú vodivosť a sú krehké. Hlavne posledná vlastnosť hrá dôležitú úlohu v sledovaní správania sa materiálu, keďže táto vlastnosť predstavuje limity vo využívaní keramických materiálov. Krehkosť závisí najmä od štruktúry keramiky. Oxidy majú široké mechanické rozpätie, sú krehké ako sklo, ale pevné ako tehla. Mechanické vlastnosti závisia od usporiadania atómov, od síl, ktoré pôsobia medzi atómami a vo výslednej štruktúre na pórovitosti. Napriek tomu, že lomová húževnatosť keramiky sa stále postupne zlepšuje, stále nevieme plasticky deformovať tieto materiály [44, 49].

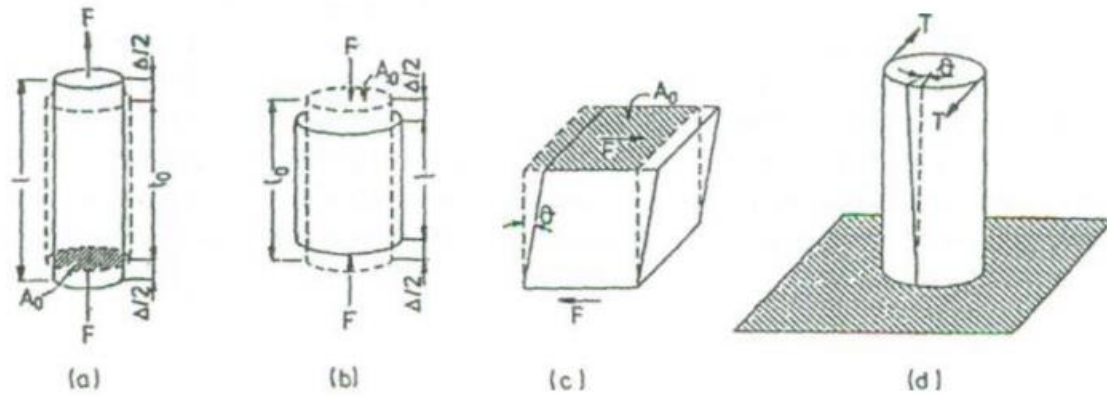
Mechanickými vlastnosťami je vo všeobecnosti myslené správanie materiálu za pôsobenia vonkajších síl. Medzi základné mechanické vlastnosti patrí pružnosť, pevnosť, plasticita a ďalej sú z týchto vlastností odvodené iné, ako je aj tvrdosť.

Z týchto skutočností vyplýva, že na pevnosť keramiky nemá vplyv len chemické zloženie, ale aj spôsob spracovania a mikroštruktúra. Pevnosť v ohybe je väčšinou zvyšovaná vysokým keramickým obsahom, no zároveň takto stúpa aj hustota [44].

2.5.1. Skúšky mechanických vlastností

Skúšky mechanických vlastností keramických materiálov slúžia najmä k schopnosti reprodukcie a porovnávaniu keramických materiálov. Tieto skúšky musia prebiehať za rovnakých podmienok, ktoré sú jednotné a presne definované. Skúšky sa rozdeľujú podľa rôznych kritérií:

- podľa spôsobu zaťažovania – ťahom, tlakom, ohybom, krutom a strihom,
- podľa stavu napätia,
- podľa časového priebehu záťažovej sily – statické skúšky (statické zaťaženie a jeho pomalé zmeny), dynamické skúšky (rýchle zmeny s vysokým stupňom deformácie),
- podľa fyzikálnych podmienok – skúšky pri rôznych teplotách [3, 47].



Obrázok 8: Rôzne spôsoby zaťaženia - a) ťahom, b) tlakom, c) strihom, d) krutom [3]

Skúška ťahom

Cieľom tohto typu skúšky je zistiť pevnosť a plastické vlastnosti materiálu, pričom sa postupne zaťažuje vzorka. Vzorka musí mať normovaný tvar a rozmer, pričom sa postupne naťahuje, väčšinou pomocou hydraulického merania a hodnoty sú zaznamenávané extenzometrom. Z výsledku sú potom vyhodnotené parametre – medza klzu, medza pevnosti, ťažnosť a kontrakcia. Táto skúška sa u keramických materiálov používa len veľmi málo, pretože sú problémy pri uchytení vzorky v priebehu skúšky [47].

Medza klzu je napätie, pri ktorom dochádza k prvým trvalým deformáciám vzorky. Väčšinou sa jedná o málo výrazný prechod, ktorý je plynulý a je definovaný napätím.

Medza pevnosti v ťahu predstavuje napätie odpovedajúce najväčšiemu zaťaženiu vzorky.

Ťažnosť je charakteristikou v ťahu a je definovaná ako trvalé predĺženie meranej dĺžky po pretrhnutí tyče. Je vyjadrovaná v percentách [47].

Kontrakcia je najväčšia zmena prierečného prierezu vzorky po pretrhnutí, tiež sa vyjadruje v percentách [47].

Okrem charakteristík pevností a plastických vlastností je možné získať aj iné charakteristiky, napr. húževnatosť. Húževnatosť je odolnosť materiálu proti krehkému lomu. Krehký lom je významným činiteľom porušenia, pretože len pri malej spotrebe energie sa šíri veľkou rýchlosťou. Krehký lom môže byť spôsobený mnohými faktormi, ako je nízka teplota, hrúbka, výskyt väd a podobne [47].

Skúška húževnatosti

Pomocou testu podľa Charpyho je zisťovaná rázová húževnatosť materiálu. Je meraná pomocou množstva absorbovanej energie pri prerezaní skúšobného telesa. Pri skúške je hodnotený závislosť množstva energie nutnej k prerazeniu vzorky na teplote. Výstupom tohto testu je tranzitná krivka.

Prechod od húževnatého do krehkého stavu prebieha v širokom intervale teplôt, v tranzitnej oblasti [45].

Lomová húževnatosť je v keramických materiáloch nízka vzhľadom na to, že majú kovalentné iónové väzby. Lomová húževnatosť je definovaná ako odolnosť materiálu voči rastu trhlín [3, 45].

Skúška tvrdosti keramiky

Tvrdosť je jednou z najdôležitejších vlastností keramiky. Je definovaná ako odpor materiálu proti vniku cudzieho telesa. Tieto skúšky sú veľmi populárne pre jednoduchosť a rýchlosť testu, a tiež je možné využívať aj malé vzorky. Nie je jednoznačne definovaná ako fyzikálna veličina, pretože je závislá na skúšobných podmienkach [45].

Tvrdosť keramických materiálov je prevažne vysoká, v Mohsovej stupnici tvrdosti je keramika zahrnutá medzi najtvrdšími materiálmi – silikáty (stupeň 5-7), oxidy (stupeň 8-9) a neoxidy (stupeň 9-9,5). Diamant má tvrdosť 10, čo je najtvrdší materiál. Vysoká tvrdosť je spôsobená nízkou pohyblivosťou dislokácií [45].

Brinellova skúška tvrdosti funguje na princípe vtlačovania guličky karbidu do vzorky a zaťaženie pôsobí v rozmedzí 9,81-19240 N. Tvrdosť je vyjadrený ako pomer zaťaženia na ploche vtlačku, ktorý je zistený geometrickou podobnosťou pri rôznych priemeroch guľôčky.

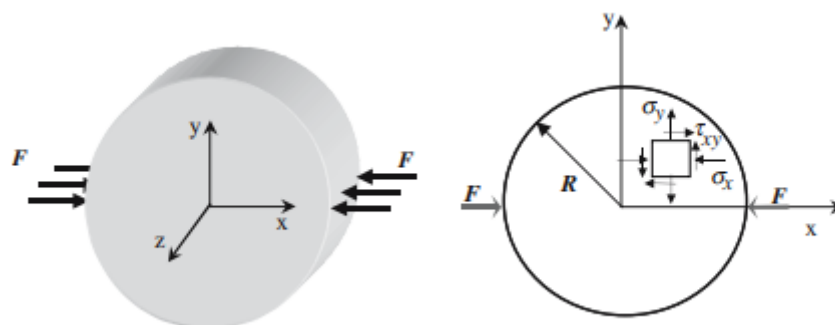
Vickersova skúška tvrdosti je založená na podobnom princípe, ale s tým rozdielom, že sa využíva štvorboký ihlan o vrcholovom uhle 136° . K stanoveniu tvrdosti sa premeriavajú uhlopriečky vtlačku. Táto metóda je najpresnejšia, ale vyžaduje kvalitne predpripravený povrch vzorky [47].

Skúška pevnosti v tlaku

Táto skúška na rozdiel od skúšky pevnosti v ťahu neštuduje odolávanie vzorky pri trhaní, ale je študované správanie sa vzorky pri kompresii, čiže odolávanie vzorky pri tlačení dvoch síl proti sebe. Táto skúška je preto veľmi populárna pri sledovaní mechanických vlastností najmä keramických materiálov. Niektoré materiály sa pri tejto skúške lámú, iné sa nezvratne deformujú. Kompresia je stav, keď sa materiál stláča a skracuje [47, 48].

Na atomárnej úrovni sa pri kompresii deje to, že atómy sú vystavené pôsobeniu síl medzi sebou a majú tendenciu nájsť vyrovnaný stav, čiže rovnovážnu vzdialenosť medzi jednotlivými atómami. Sily vznikajú v celom materiáli a sú protikladné k silám spôsobených tlakom [47].

Často využívanou skúškou pevnosti v tlaku je *Brazílsky test*. Tento test spočíva v tom, že medzi dve hliníkové platničky je vložený valec, ktorý je pripevnený k čeľustiam stroja. V ose x je kladené zaťaženie (Obrázok 9) [49].



Obrázok 9: Princíp Brazílskeho testu [49]

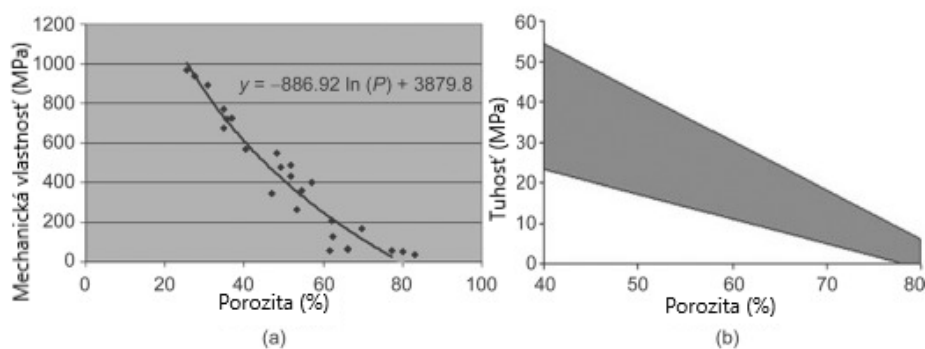
Veľkosť zrna musí byť najmenej desaťkrát menšia, ako je veľkosť celej vzorky. Test prebieha tak, že sa konštantnou rýchlosťou kladie záťaž, až kým nenastane porucha vzorky. Veľkosť zaťaženia pre Youngov modul - pevnosť v ťahu závisí od veľkosti kontaktného uhla. Za predpokladu, že súčet vertikálnych posunov kotúča a čeľuste je kvadratickou funkciou horizontálnej súradnice y , tak kontaktný tlak je výsledkom poloeliptického rozdelenia pozdĺž horizontálneho smeru. Pri tomto prípade sa jedná o ideálny stav, inak kontaktný tlak je ovplyvnený rozložením tlakov (kvadratické, rovnomerné, eliptické, atď.), avšak výsledná sila je identická ako v ideálnom prípade [46].

2.5.2. Mechanické vlastnosti v závislosti na vnútornej štruktúre

Bunky dokážu s vysokou citlivosťou detekovať mechanické vlastnosti a podľa týchto vlastností sa aj správajú. Ak je adhézy substrát tuhý a nedeformovateľný, tak bunky nie sú schopné sa reorganizovať a dodávať signály. Ak je materiál príliš kompatibilný, tak neumožňuje kotvenie buniek v dôsledku neschopnosti odolávať silám pôsobiacich na scaffold [31].

Kosť v ľudskom tele je častokrát zaťažovaná vonkajšími podmienkami, a preto musí odolávať nárazom, tlakom a ohybom. Experimentálne bolo dokázané, že zdravá kosť v ľudskom tele má pevnosť v ťahu v rozmedzí od 78,8 MPa do 151 MPa v pozdĺžnom smere a 51 MPa do 56 MPa v priečnom smere. Vďaka elasticite je kosť schopná odolávať nárazom. V pozdĺžnom smere je model pružnosti od 17 GPa do 20 GPa a v priečnom smere 6 GPa až 13 GPa. Mechanické vlastnosti kostí sú spôsobené najmä prítomnosťou organickej matrice s minerálnymi kryštálmi hydroxyapatitu [43].

Pri sledovaní správania sa scaffoldu je dôležité dbať na závislosť medzi mechanickými vlastnosťami a pórovitosťou. Podľa získaných experimentálnych vlastností skupinou Jia An a spol. na grafe (Obrázok 10) a) bolo dokázané, že so zvyšujúcou porozitou sa znižuje mechanická odolnosť v tlaku a výsledný scaffold je nestabilný. Na grafe b) je znázornený rozsah použiteľnosti (sivá oblasť) [53].



Obrázok 10: Grafy závislosti mechanických vlastností (pevnosť v tlaku) PCL (polykaprolaktón) na porozite podľa štúdia Jia An a spol. [53]

2.6. Porézne kostné náhrady založené na hydroxyapatite

Hydroxyapatit sa v posledných rokoch stáva objektom záujmu rôznych výskumov zameraných na výrobu kostného tkaniva, vďaka jeho vlastnostiam ako je biokompatibilita a bioaktivita. Je dokázané, že ideálna kostná náhrada má mať minimálnu veľkosť pórov aspoň 200 μm pre správny rast kostného tkaniva. Pri snahe dosiahnuť čo najvyššiu pórovitosť, dochádza k poklesu mechanických vlastností [50].

K výrobe vysoko poréznych náhrad sa najviac využívajú metódy ako SFF a najmä 3DP, alebo inak nazývaná rapídne prototypovanie. Tieto metódy sú unikátne v tom, že využívajú 3D tlač keramickej suspenzie a dokážu vytvoriť náhrady o riadenej veľkosti mikro a makroštruktúry s vysokým stupňom reprodukovateľnosti a homogenity. Tieto metódy avšak vykazujú aj veľa nedostatkov a to najmä v architektonickej kontrole vybraného materiálu.

Dobre využívanou alternatívou pre vytváranie kostných náhrad je kombinácia tvorby kryštálov pomocou freeze – castingu s nepriamym 3D maticou (mriežkou). Táto metóda bola využívaná Han a spol., kde využívali prchavú polymérnu maticu (polyuretánová pena) s oxidom hlinitým [10, 53].

Porézne scaffoldy sa môžu získavať taktiež replikou ľadových kryštálov, pomocou zmrazovania freeze – casting, ktoré sa následne sublimujú a spekajú. Častice suspenzie sa v priebehu rastu kryštálov hromadia blízko seba, čím sa vytvárajú viacvrstvé keramické štruktúry. Tieto myšlienky a experimenty boli publikované Fukasawom a spol. a aj Laurie a spol. a pod. Vďaka tejto metóde sme schopní využívať široké spektrum keramických práškov od nano- až po mikro- rozmery častíc [9, 12, 13].

Nasledujúce časti tejto práce budú zamerané najmä na spojenie nepriamej 3D tlače s mrazením pomocou freeze-casting metódy.

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Chemikálie a použité prístroje

3.1.1. Chemikálie

- Hydroxyapatit (Sigma – Aldrich, Nemecko)
- Sacharóza
- Polyvinylalkohol (Sigma – Aldrich, Nemecko)
- Dolapix CE 64 (Zschimmer & Schwarz Group, Nemecko)
- 2-oktanol (Fluka chemistry, Švajčiarsko)

3.1.2. Prístroje

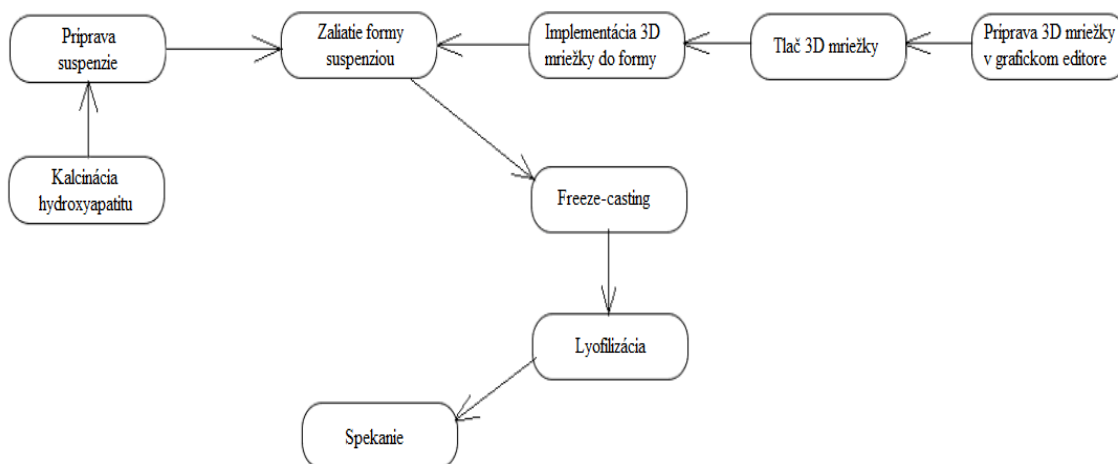
- Chladiaca doska Medite
- Lyofilizátor (vlastný prototyp)
- Vysokoteplotná pec Clasic HT1200M
- Stereolupa Zeiss Stemi 508
- Elektronový mikroskop FIB/SEM Tescan Lyra 3
- 3D tlačiareň Felix 3.1

3.1.3. Softvér

Návrh mriežky bol uskutočnený pomocou bezplatného programu Blender, čo je grafický editor pre tvorbu 3D návrhov. Tento program je bezplatne dostupný: <https://www.blender.org/download/>.

3.2. Proces tvorby scaffoldu

Proces tvorby scaffoldu pomocou mrazenia je napriek svojej zložitosti jednoduchý a lacný spôsob v praxi. Pomocou tohto procesu sme schopní vytvoriť scaffold o nami definovaných rozmeroch, štruktúre a vlastnostiach.



Obrázok 11: Pribeh procesu vytvorenia scaffoldu

3.3. Suspenzia hydroxyapatitu

Ako pevná fáza sa môže využívať široké spektrum keramických práškov, polymérnych materiálov a aj kovových materiálov. Bol použitý 15% roztok hydroxyapatitu, ktorý bol zložený z vodného roztoku PVA, Dolapixu, oktanolu, sacharózy a samotného hydroxyapatitu.

Ako základ suspenzie a zároveň ako spojivo sa využíva vodný roztok PVA. Disperzant suspenzie je Dolapix. Bolo overené, že pre suspenziu hydroxyapatitu je vhodné využívať práve Dolapix. Niektoré štúdie využívajú ako disperzant Darvan C-N. Na začiatku experimentu bol využívaný aj Darvan C-N. Ďalšou zložkou je oktanol, ktorý napomáha eliminovať bublinky a sacharóza, ktorá podporuje vznik lamiel s lepšími mechanickými vlastnosťami a taktiež napomáha k vzniku medzilamelárných mostíkov. Hlavnou zložkou je hydroxyapatit, ktorý je hlavnou zložkou kostí, preto je to látka biodegradabilná a telu neškodná. Hydroxyapatit sa pred prípravou suspenzie musí podrobiť kalcinácii. Pri tomto procese je hydroxyapatit zbavený uhličitanov, ktoré sa nachádzajú v komerčných práškoch a tiež napomáha k zhrubnutiu častíc, ktoré sú výhodné k vzniku medzigranulárných priestorov. Proces kalcinácie sa uskutočňuje pri teplote 800 °C po dobu jednej hodiny.

3.3.1. Príprava suspenzie

Prvým krokom pre prípravu suspenzie bola príprava základu pre suspenziu, čiže príprava vodného roztoku PVA. Kryštálky PVA boli navážené o hmotnosti 9,61 g a boli prevedené do 1000 cm³ deionizovanej vody. Roztok bol vložený do vodnej lázne, bolo zapnuté miešanie a bol zahrievaný na 97 °C do rozpustenia posledného kryštálku PVA. Roztok bol ponechaný na schladenie pri laboratórnej teplote.

Bola využívaná 15% suspenzia hydroxyapatitu, a preto boli potrebné hmotnosti prispôbené nášmu percentuálnemu zloženiu. Hmotnosti sú zapísané v tabuľke (Tabuľka 2). Na spodok plastovej nádoby boli umiestnené guľičky ZrO₂ alebo Al₂O₃, ktoré slúžili pre kontinuálne premiešanie suspenzie. Do plastovej nádoby bolo namerané potrebné množstvo vodného roztoku PVA. Do roztoku bolo pridané zodpovedajúce množstvo sacharózy, ktoré bolo kvantitatívne prevedené do roztoku PVA a roztok bol premiešaný. Potom bolo do roztoku dané potrebné množstvo Dolapixu a oktanolu. Pri priebežnom miešaní bol postupne pridávaný hydroxyapatit. Takto pripravená suspenzia bola uzavretá a ponechaná na miešacích valcoch po dobu 24 hodín.

Tabuľka 2: Zloženie suspenzie hydroxyapatitu S15

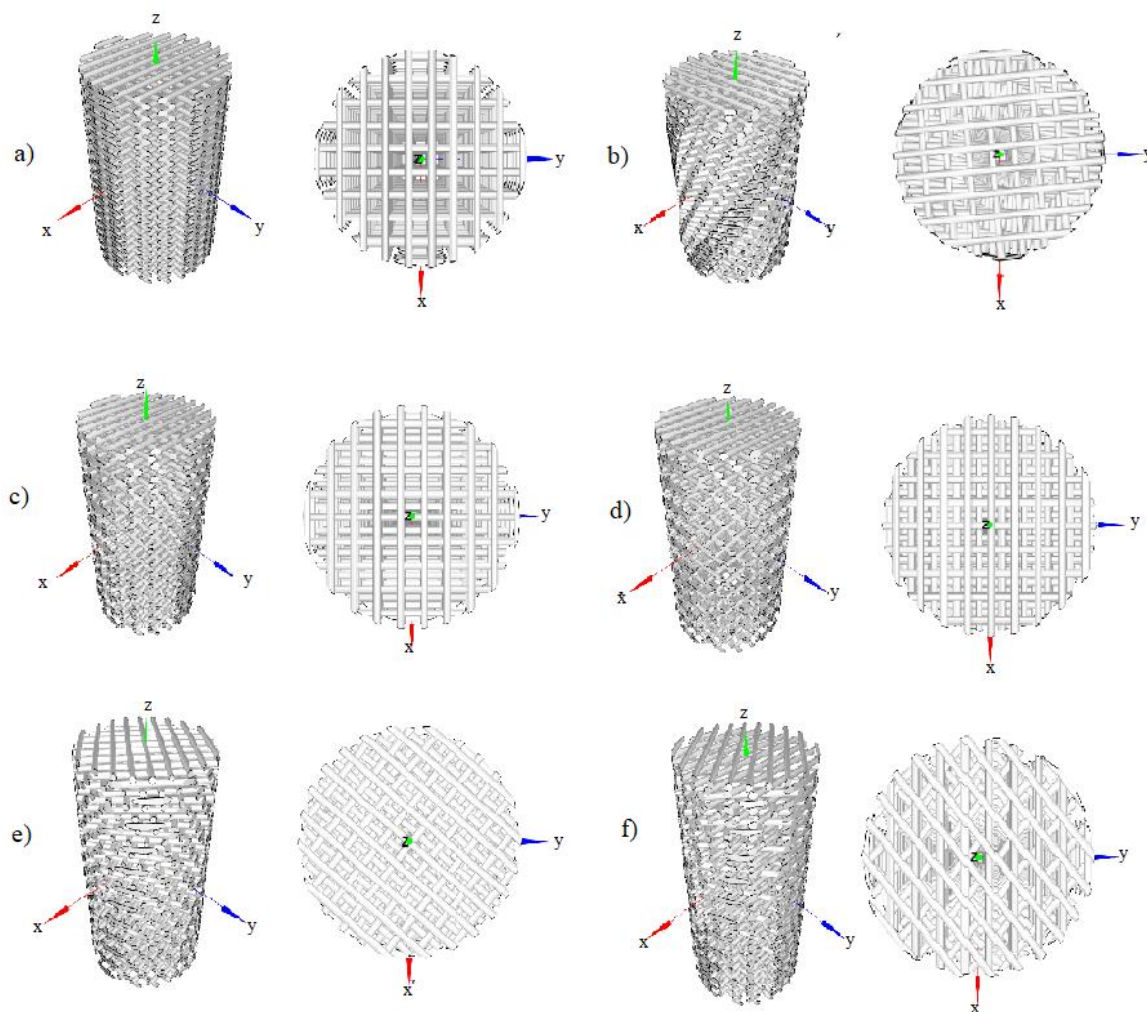
Chemikálie	Hmotnosť (g)	Obj. percentá (%)
Hydroxyapatit	30,0	15,1
Polyvinylalkohol	1,1	1,1
Voda	51,5	80,7
Sacharóza	2,6	-
Dolapix	2,0	2,8
Oktanol	0,8	-

3.4. Mriežky

3.4.1. Grafická príprava mriežky pre 3D tlač

V grafickom programe Blender bola navrhnutá jedna primárna mriežka a tri ďalšie typy mriežok. Tieto mriežky boli ďalej modifikované rôznym otáčaním. Základom všetkých mriežok bol rovnaký vonkajší objem, čiže rovnaké rozmery. Rozmery boli navrhnuté tak, aby mriežka sedela do formy pre freeze-casting, čiže mala tvar valca. Po rôznych modifikáciách v programe Blender nebolo možné vyrobiť všetky mriežky s rovnakou výškou, preto sa aj líšia výsledné objemy. Tabuľka 3 zaznamenáva rozmery a objemy jednotlivých 3D mriežok. Objem bol vypočítaný pomocou grafického programu, do ktorého boli vložené vstupné údaje.

Ako základ pre pozorovanie bola zvolená obyčajná mriežka, ktorá bola otočená o 5° (V15). Bolo predpokladané, že táto mriežka sa nebude líšiť od primárnej mriežky V1. Boli navrhnuté mriežky, kde sa vrstvy striedali len v jednom smere (V3), kde sa vrstvy striedali v oboch smeroch (V4) a kde boli stočené základne doprava a doľava o 5° (V5). Mriežka V4 bola ďalej pootočená o uhol 5° - V45. Obrázok 12 znázorňuje graficky pripravené mriežky.



Obrázok 12: a) primárna mriežka so známymi vlastnosťami. Dodatočne navrhnuté mriežky: b) pootočená primárna mriežka o 5° (V15); c) mriežka V3; d) mriežka V4; e) pootočená mriežka V4 o 5° (V45); f) mriežka V5

Tabuľka 3: Rozmery jednotlivých použitých mriežok

Mriežka	a (cm)	b (cm)	c (cm)	V (cm ³)
V1	2,47	2,47	3,60	4,25
V3	2,47	2,47	3,60	4,27
V4	2,47	2,47	3,69	4,39
V5	2,47	2,47	3,67	4,36
V15	2,47	2,47	3,60	4,26
V45	2,47	2,47	3,69	4,39

3.4.2. Tlač mriežky

Trojrozmerná tlačiareň alebo 3D tlačiareň je zariadenie, ktoré dokáže pomocou 3D dát v digitálnej forme vytlačiť 3D objekt. Tento typ tlače je spôsob výroby predmetu, kedy sa postupným nanášaním a spájaním materiálu vytvorí požadovaný predmet.

Pomocou 3D tlačiarne boli vytlačené mriežky o danom objeme. Ako náplň do tlačiarne sa využíva vo všeobecnosti vlákno z kyseliny polymliečnej (PLA). PLA je polymér, ktorý je 100% rozložiteľný a jeho teplota tavenia v 3D tlačiarňi je v rozmedzí 195-225 °C. Predpokladá sa, že PLA je degradovaná hydrolýzou v organizme a vzniknuté oligoméry sú ďalej metabolizované bunkami. Vzniknutý výrobok z PLA nie je veľmi pružný, ale je pevný, pričom sa odporúča využívať na výrobky pre málo namáhané diely [58].

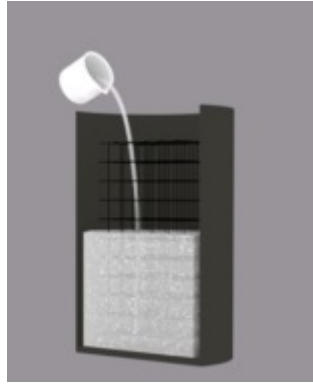
Na začiatku experimentu bolo využívané vlákno z čistej PLA. Neskôr bolo využívané vlákno s prídavkom uhlíkového vlákna a vlákno s prídavkom sadze. Jednotlivé vlákna sa líšili termickou stabilitou a pri nami zvolenom teplotnom režime sa tieto vlákna chovali rozdielne, čo je rozoberané v ďalšej kapitole. Z pozorovaní termických vlastností PLA s rôznymi prídavkami bolo vybrané pre ďalšie pokusy vlákno, ktoré vykazovalo najlepšie vlastnosti – čistá PLA.



Obrázok 13: Tlač mriežky [4]

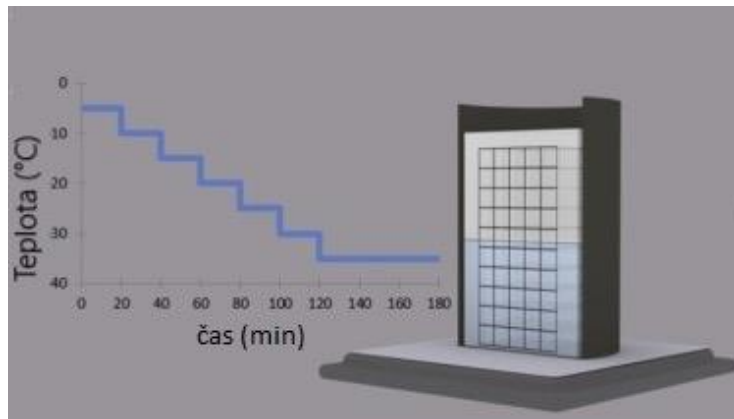
3.5. Proces Freeze-casting

Pred začatím procesu freeze-casting bolo nutné suspenziu odvdzušniť v exsikátore. Počas odvdzušňovania bola zapnutá chladiaca doska, ktorá bola nastavená na -5 °C a na chladiacu dosku boli položené pripravené formy, v ktorých bola zasunutá 3D mriežka, a tie sa nachladili, aby nedošlo pred mrazením k teplotnému šoku suspenzie. Po odvdzušení bola suspenzia naliata do foriem a bol spustený program, kde bol nastavený teplotný gradient mrazenia.



Obrázok 14: Ukážka zalievania formy s implementovanými 3D makro kanálkami [4]

Teplotný gradient je nastavený tak, aby sa každých 20 minút znížila teplota o 5 °C. Táto rýchlosť umožňuje tvorbu kontrolovaných lamiel v celom objeme vzorky s vloženou 3D mriežkou. Vzorky boli ponechané po dobu najmenej pol hodiny pri teplote -35 °C, aby došlo k dokonalému premrznutiu. Proces mrazenia trvá približne 2 a pol hodiny.



Obrázok 15: Graf teplotného gradientu [4]

Po premrznutí celej suspenzie bola forma rozobratá, vzniknuté valčeky boli vybrané z formy a ponechané na premrazenie v mrazničke na nachladenej kovovej doske. Takto pripravené valčeky boli následne podrobené procesu lyofilizácie. Lyofilizácia prebiehala po dobu 16 hodín.

3.5.1. Forma

Forma bola navrhnutá v grafickom programe o presných rozmeroch. Ako materiál pre tlač formy bola využitá kyselina polymliečna. Vnútorý priemer formy bol 24,4 mm s výškou 45,5 mm. V strede formy sa nachádza medený valček, ktorý zaisťuje dokonalejšie vedenie tepla medzi keramikou suspenziou a chladiacou doskou. PLA, ktorá tvorí obal má zlú tepelnú vodivosť, a preto podporuje mrazenie len v kolmom smere na medený valček. Po zložení formy bola do stredu vložená mriežka z 3D tlačiarne.

3.6. Lyofilizácia

Lyofilizácia nasleduje po procese zmrazovania. Lyofilizácia je proces, pri ktorom dochádza k sublimácii ľadových kryštálov.

Po dokonalom premrznutí bol scaffold umiestnený do lyofilizátora, čiže do vákuovej komory pri tlaku 10 Pa po dobu 24 hodín s postupným zvyšovaním teploty až na 30 °C. Tento zvolený program bol primeraný, pretože zabraňuje poškodeniu lamelárnej štruktúry v scaffolde po rozpúšťaní ľadu, a tiež napomáha k dosiahnutiu teploty prechodu cukrového skla. Po skončení tohto procesu bol získaný scaffold s implantovanou 3D PLA mriežkou, ktorá bola odstránená v procese spekania spolu so zabudovanou vodou.

3.7. Spekanie

Spekanie je druh tepelného procesu, pri ktorom sa prášok zhutní, ako dôsledok fyzikálnych procesov. Prášok má väčší merný povrch, a tým aj väčšiu povrchovú energiu. Prebytok tejto energie je hnacou silou celého procesu spekania, pretože má tendenciu znižovať povrchovú energiu. Výsledkom je zhutnenie a úbytok pórovitosti.

Spekanie je posledný proces prípravy valčekov. Proces nasleduje po lyofilizácii. Valčeky, z ktorých boli odstránené ľadové kryštály boli položené na Al₂O₃ misku a boli vložené do vysokoteplotnej pece, kde boli ponechané procesu spekania podľa nastaveného teplotného programu.

Rýchlosť ohrevu bola nastavená na 5 °C/min až na 600 °C, potom bola teplota zvyšovaná o 10 °C/min na teplotu 1200 °C, s výdržou 2 hodiny a následne boli vzorky schladzované rýchlosťou 10 °C/min až do 700 °C. Táto rýchlosť chladenia bola vhodná z toho dôvodu, že bolo zabránené teplotnému šoku a praskaniu.

V procese spekania je mriežka zo sústavy makro kanálikov úplne odstránená, je odstránená aj prebytočná voda, a preto je výsledný scaffold zmrštený oproti pôvodnému. Scaffold je najmä zmrštený z dôvodu zhutňovania. Výsledné valčeky boli ďalej prenechané ďalším experimentom.

3.8. Meranie hustoty a porozity

Hustota a porozita sú dôležité parametre, ktoré charakterizujú scaffoldy. Predpoklad je, že čím má scaffold väčšiu porozitu, tak tým má horšie mechanické vlastnosti.

Hustota je veličina, ktorá vyjadruje hmotnosť látky v jednotkovom objeme. Výsledný scaffold má tvar valca, preto pre výpočet objemu bol využitý vzťah (1).

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{m}{\pi \cdot r^2 \cdot h} \quad (1)$$

Pričom ρ je hustota vyjadrená v g·cm⁻³, m je hmotnosť scaffoldu a V je vypočítaný objem. Objem bol vypočítaný podľa vzťahu pre objem valca, kde r je polomer podstavy a h je výška valca.

Zo známych hodnôt hustoty nášho scaffoldu a teoretickej hodnoty hustoty hydroxyapatitu je možné vypočítať porozitu pomocou vzťahu (2).

$$P = \left(1 - \frac{\rho_S}{\rho_{HAP}}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Vo vzťahu je pomer vypočítanej hustoty scaffoldu ρ_s k teoretickej hustote hydroxyapatitu ρ_{HAP} , ktorá má hodnotu $3,08 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Hodnoty hustoty a porozity boli zaznamenávané len pomocou empirického výpočtu, neboli využívané presnejšie metódy, ako je napríklad Archimedova metóda. Vypočítané hodnoty boli neskôr porovnávané a vďaka nim bola určená predpokladaná stabilita scaffoldov z výpočtu porozity.

3.9. Mechanické testy

Z možných typov mechanických testov bolo zvolené meranie pevnosti v tlaku. Pevnosť v tlaku je jednou z najvýznamnejších vlastností pre zisťovanie kvality kostnej náhrady. Kostná náhrada musí byť predpripravená tak, aby mohla odolávať záťaži, ktorá je kladená na kosť z vonkajšieho prostredia.

Vzorka na kompresné testy musí mať tvar kocky alebo valca, preto všetky vzorky boli pred meraním vytvorené v tvare valca. Pevnosť scaffoldu je teda veľkosť napätia, ktoré bolo potrebné pre dosiahnutie porušenia celistvosti vzorky. Pre skúšku je potrebný väčší počet vzoriek, v tomto prípade bolo využitých 10 vzoriek pre každý typ implementovanej mriežky. Scaffoldy sú potom upravené na rovnakú výšku. Tento súbor vzoriek sa potom štatisticky vyhodnocuje.

Z kompresných testov bola získaná sila, ktorá je potrebná pre porušenie štruktúry vzorky. Z tejto sily bola vypočítaná kompresná sila, takže samotný tlak, v megapascaloch podľa vzťahu (3).

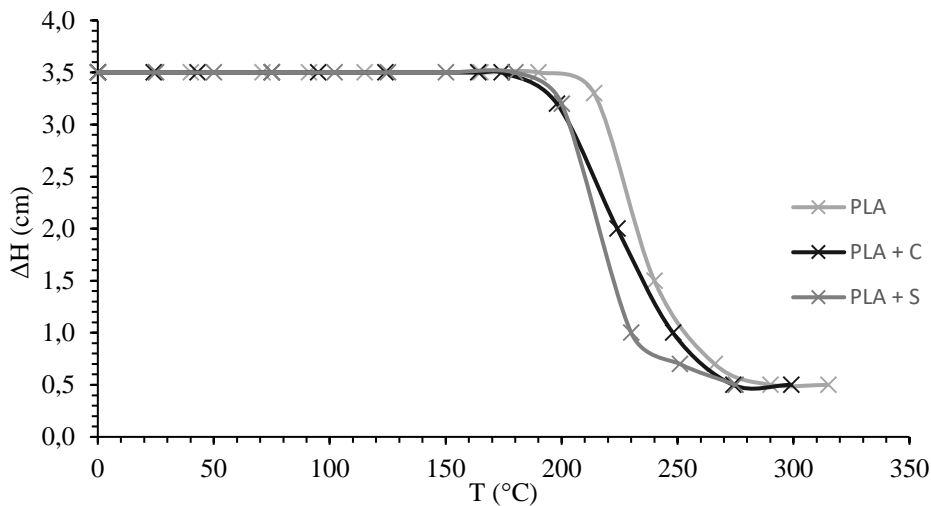
$$p = \frac{P}{\pi \cdot r^2} \quad (3)$$

Kompresná sila p je vyjadrená v Pascaloch, maximálna sila, ktorá pôsobila na telese P je vyjadrená v Newtonoch, r označuje polomer telesa.

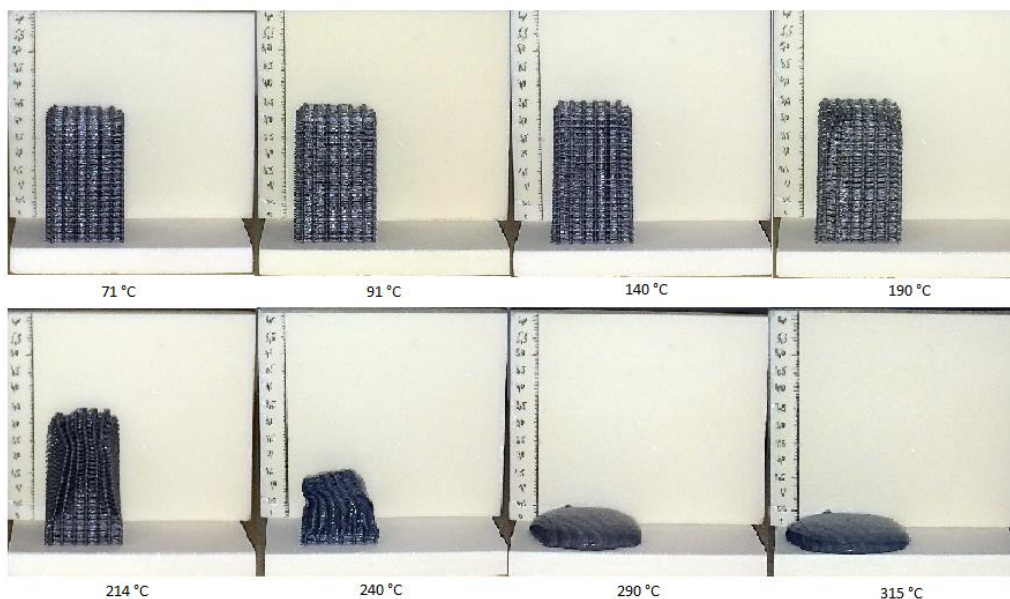
4. VÝSLEDKY

4.1. Termická stabilita polymérov

Pred začiatkom merania bolo nutné zvoliť správnu náplň do 3D tlačiarne tak, aby bola degradabilná vysokou teplotou a pri odstránení teploty neporušila výslednú štruktúru. Boli vykonané experimenty, kde sa sledovalo tavenie kyseliny mliečnej v čistej forme a s rôznymi prídavkami. Z grafu (Obrázok 16) vyplýva, že najodolnejšia je práve čistá forma kyseliny polymliečnej, tzv. strieborná PLA. Kyselina polymliečna s prídavkom uhlíkového vlákna (PLA + C) a s prídavkom sadzí (PLA + S) vykazuje menšiu termickú stabilitu, a to konkrétne pre PLA + S je bod topenia pri 275 °C a pre PLA + C je 299 °C. Najodolnejšie je vlákno PLA, kde je bod topenia 315 °C. Pri ďalších pokusoch bolo dokázané, že najstabilnejší scaffold vzniká práve použitím PLA.

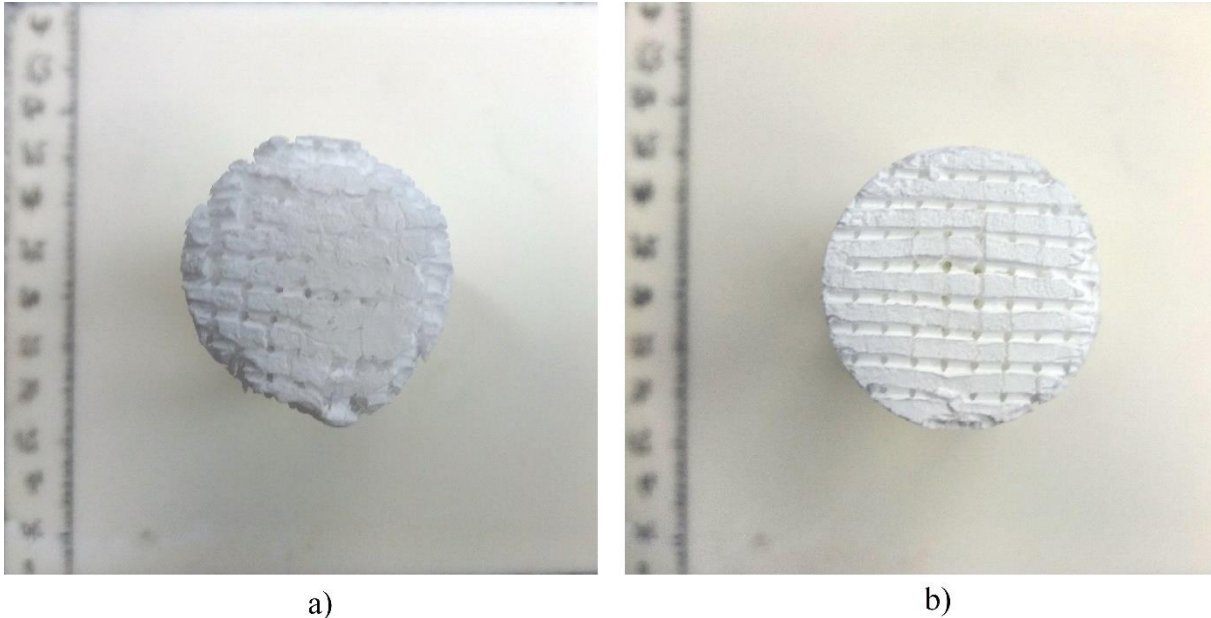


Obrázok 16: Termická stability polymérov (závislosť zmeny výšky na teplote)



Obrázok 17: Tavenie PLA pri teplotnom programe 5 °C/min po teplotu 1200 °C

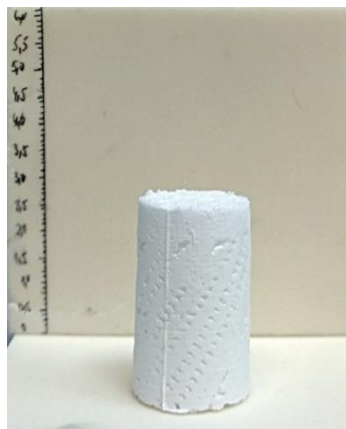
Ako bolo vyššie spomínané scaffold z HA s použitím PLA s rôznymi prídavkami vykazuje inú výslednú stabilitu ako čisté PLA. Obrázok 18 zobrazuje pohľad zospodu výslednej štruktúry po spekaní. Pri štruktúre a) bolo použité vlákno PLA s prídavkom uhlíka, pri štruktúre b) bolo využívané vlákno len z PLA. Je viditeľné, že spodná časť scaffoldu, kde bolo používané vlákno s prídavkom, je omnoho viac krehká, pri dotyku sa scaffold rozpadával. Scaffold s použitým čistým PLA je pevný, a preto bol využitý pre všetky nasledujúce merania.



Obrázok 18: Pohľad na scaffold zospodu: a) mriežka z PLA + C, b) mriežka PLA

4.2. Popis výsledných scaffoldov

Výsledný tvar všetkých scaffoldov bol valcovitý. Scaffoldy majú pred spekaním priemer podobný, ako je priemer formy, do ktorej sa odlievajú, a to je približne 24 mm. Bola snaha, aby každý scaffold bol pripravený zaliatím do rovnakej výšky, čiže výšky formy, čo bolo 45 mm. Po spekaní, keď sa odstránila všetka prebytočná voda sa scaffoldy zmrštili, zmenšili svoje rozmery. Priemerná výška scaffoldu sa pohybovala okolo $33,58 \pm 0,01$ mm a šírka okolo $18,540 \pm 0,004$ mm. Priemerná hmotnosť výsledných scaffoldov bola $7,6 \pm 0,5$ g. Priemery boli vypočítané zo všetkých uskutočnených 100 meraní.



Obrázok 19: Výsledný scaffold

4.3. Charakterizácia makro a mikroštruktúry

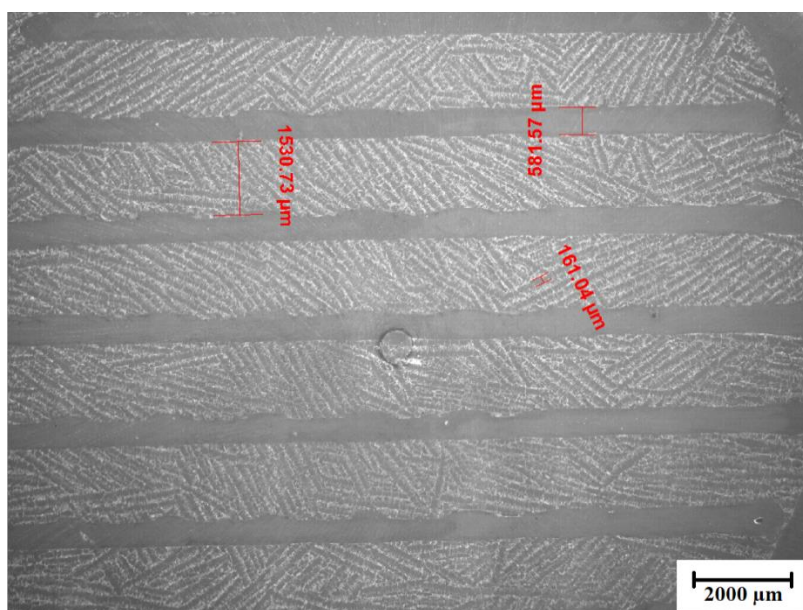
Makroštruktúra vzniká po implementácii mriežky a jej následnom spekaní. Mikroštruktúra je lamelárna štruktúra, kde sa sleduje distribúcia lamiel a medzilamelárne mostíky. Vzniká ako pozostatok po vzniknutých kryštáloch ľadu.

Pre sledovanie makro a mikroštruktúry bolo zvolené pozorovanie pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) a pomocou stereolupy. Vďaka SEM bolo možné pozorovať okrem vzniknutej mikroštruktúry aj mikropóry, čiže medzigranulárnu porozitu. Pozorovanie pomocou stereolupy bolo zamerané na sledovanie najmä makroštruktúry. Pre každý typ scaffoldu boli namerané hodnoty medzilamelárnych vzdialeností a veľkosti makro kanálikov. Priemerné hodnoty sú zapísané v tabuľke (Tabuľka 4). Tieto merania boli zistené pomocou softvéru AxioVision pre stereolupu.

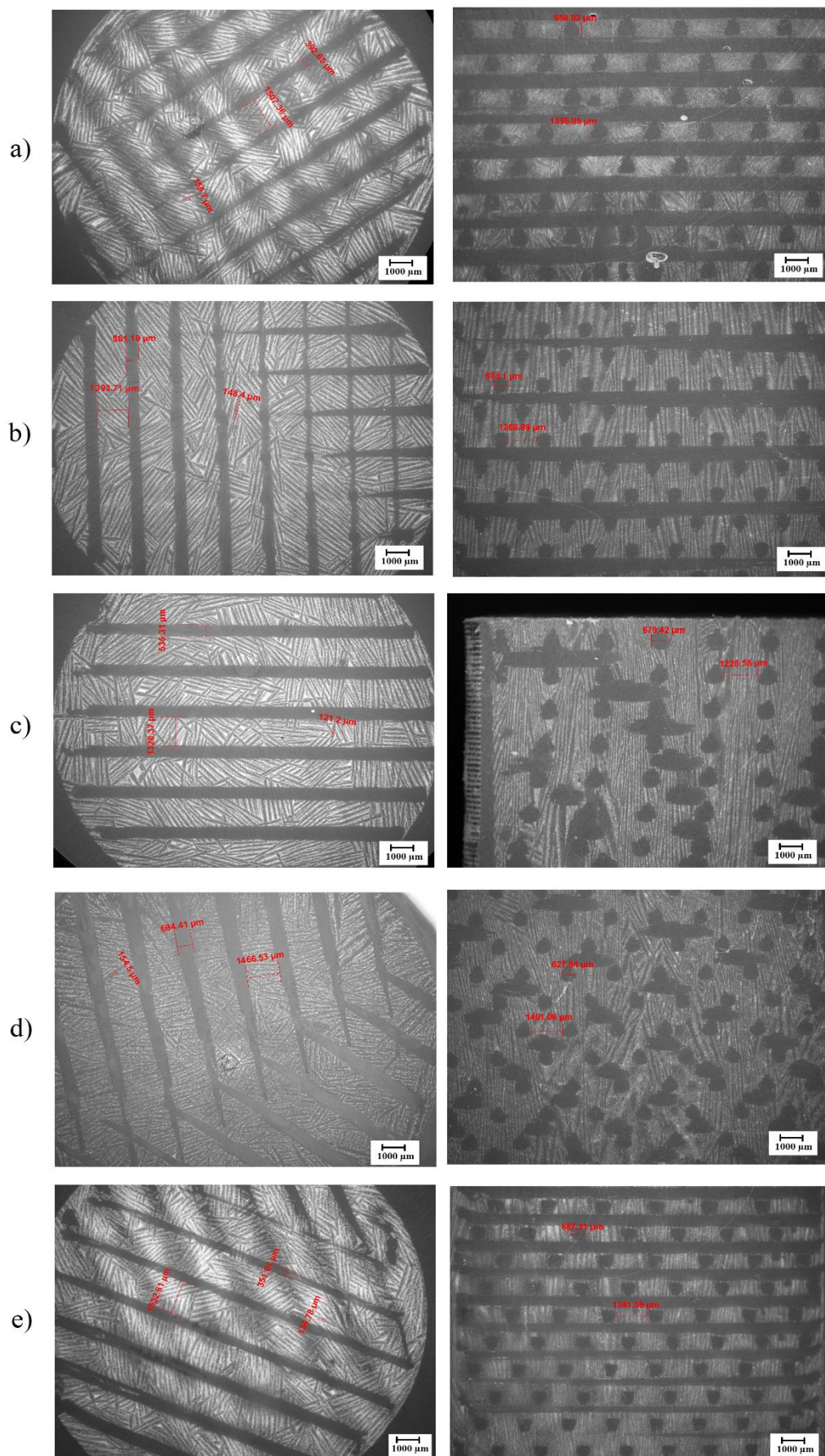
Tabuľka 4: Priemerné veľkosti vzniknutých lamelárnych priestorov/makro kanálikov

	V1	V3	V4	V5	V15	V45
Veľkosť lamely (μm)	155,7 ± 23,5	141,4 ± 22,3	137,1 ± 21,6	130,8 ± 21,4	118,1 ± 14,9	130,1 ± 15,2
Veľkosť makro kanáliku (μm)	586,4 ± 38,5	559,9 ± 37,3	588,4 ± 30,5	540,2 ± 52,8	581,7 ± 48,6	597,9 ± 54,3

Na nasledujúcom obrázku (Obrázok 20) je možné pozorovať systém vzniknutých makro kanálikov a lamelárnych priestorov. Snímky sú zostrojené v rovnakom zväčšení (0,65x). Je možné pozorovať aj rozdielnosť výsledných štruktúr, ako je otočenie mriežok alebo posun jednotlivých vrstiev.

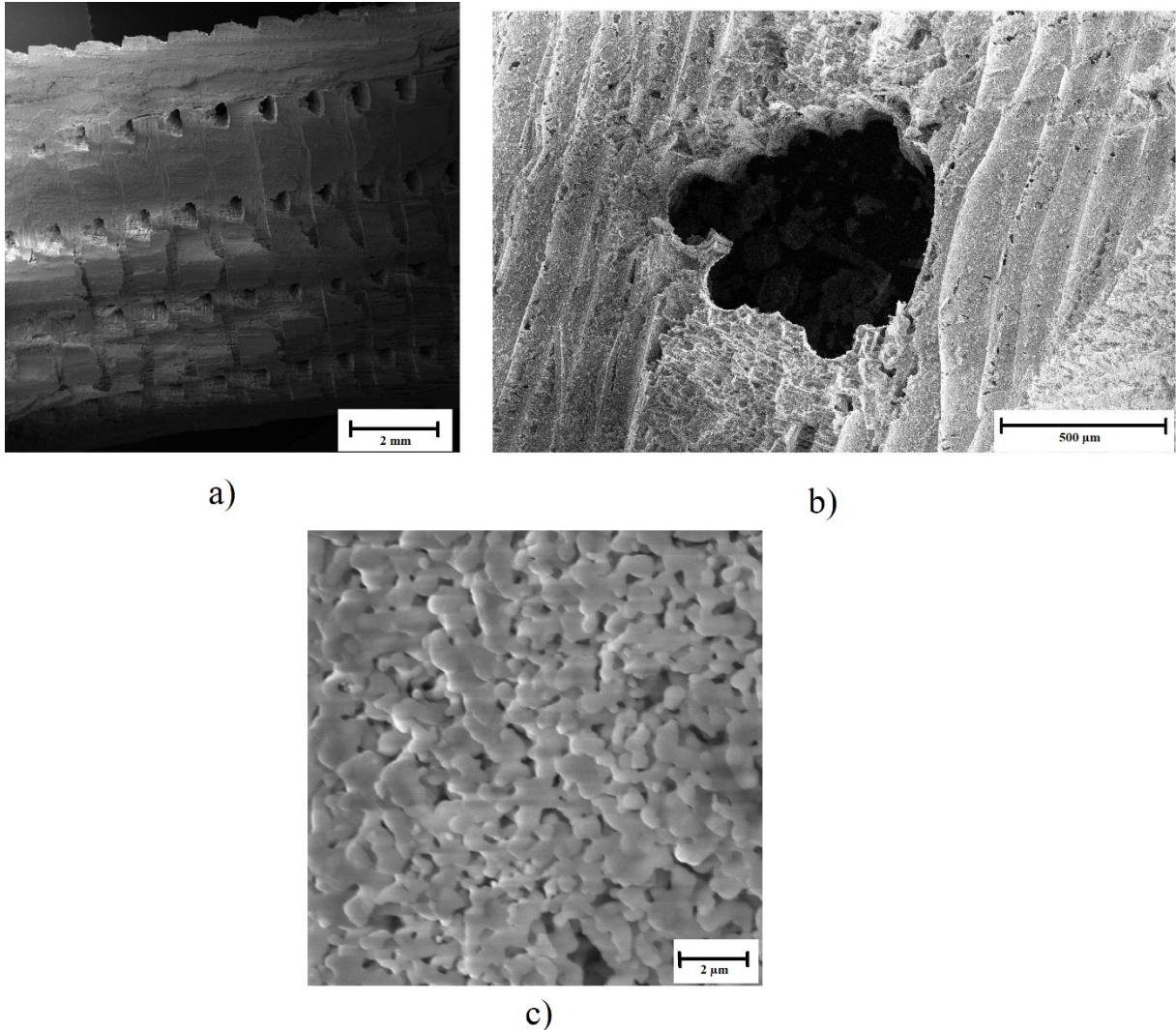


Obrázok 20: Horizontálny pohľad zo stereolupy na scaffold s implementovanou V1 mriežkou



Obrázok 21: Scaffoldy s modifikovanou mriežkou: a) V3, b) V4, c) V15, d) V45, e) V5

Na nasledujúcich obrázkoch je možné vidieť pohľad na vzniknuté kanáliky, ktoré sú pozostatkom mriežky pomocou SEM. Je možné pozorovať, ako sa dajú vytvoriť makro kanáliky pomocou nepriamej 3D tlače a taktiež je možné vidieť, vytvorenie prirodzených mikropórov.



Obrázok 22: Snímky zosťojené pomocou SEM: a) pohľad na systém makro kanálikov, b) makro kanálik, c) vzniknuté mikropóry

4.4. Meranie hustoty a porozity

Meranie hustoty je prekurzorom pre vypočítanie celkovej porozity výsledného scaffoldu. Ako bolo spomínané, bolo cieľom pripraviť scaffoldy s implementovaným systémom makro kanálikov pomocou nepriamej 3D tlače, pričom mriežky pre vytvorenie makro kanálikov mali približne rovnaké hodnoty objemu, líšili sa len tvarom.

Scaffoldy po spekaní boli zmerané a zvážené. Z týchto údajov bola vypočítaná hustota a následne porozita (Tabuľka 5). Tabuľka bola zostavená z priemerných hodnôt pre každý typ mriežky. Bolo predpokladané, že hustoty a porozity by sa mali líšiť, podľa rozdieloch v objeme.

Tabuľka 5: Vypočítané hodnoty hustôt a porozít

	V1	V3	V4	V5	V15	V45	Teoretická hustota
Hustota ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	0,84 $\pm 0,01$	0,87 $\pm 0,02$	0,77 $\pm 0,01$	0,92 $\pm 0,05$	0,87 $\pm 0,03$	0,87 $\pm 0,03$	3,08
Porozita (%)	72,8 $\pm 0,5$	71,5 $\pm 0,7$	75,1 $\pm 0,4$	70,8 $\pm 2,4$	71,7 $\pm 0,9$	72,2 $\pm 0,9$	

4.5. Mechanické vlastnosti

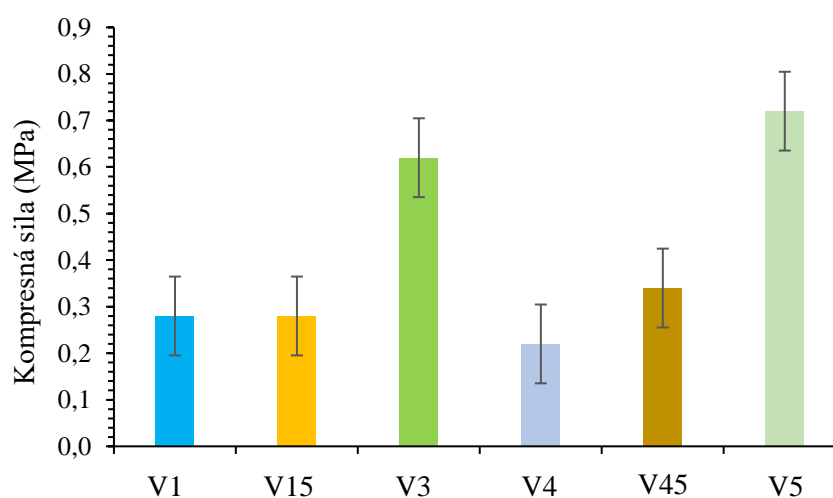
Pevnosť v tlaku bola zisťovaná na vzorkách V1, V15, V3, V4, V45 a V5. Všetky využité telesá boli odmerané, zvážené, bola vypočítaná ich hustota a porozita (Tabuľka 5).

Pre zistenie maximálnej sily P boli vzorky rozdrvené v lise. Vydelením získanej sily prierezom telesa bola získaná pevnosť v tlaku p . Tabuľka 6 v zaznamenáva výsledné priemerné hodnoty.

Tabuľka 6: Priemerné namerané hodnoty kompresných testov

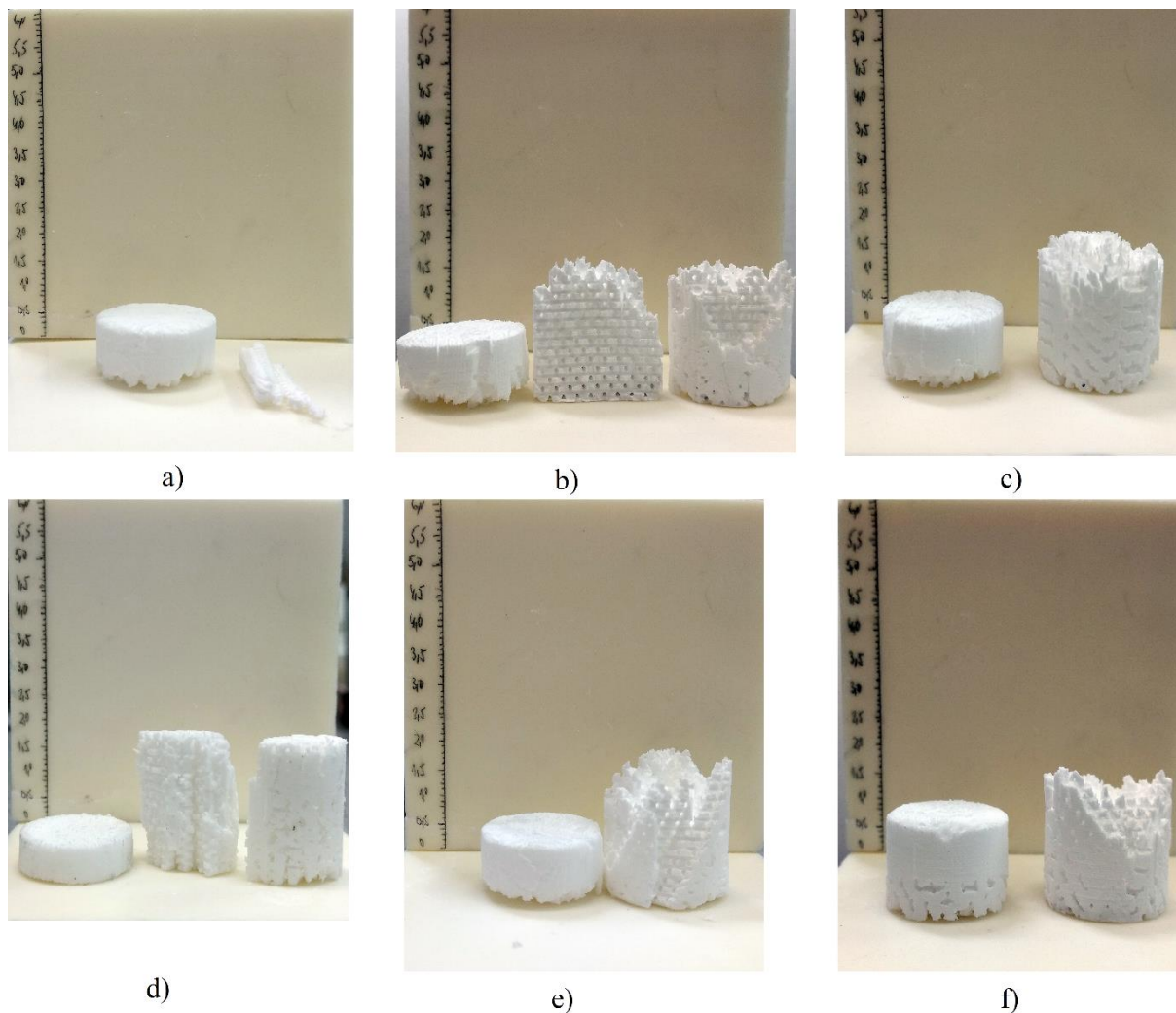
	Výška (cm)	Porozita (%)	Max. sila (N)	Komp. sila (MPa)
V1	18,55	72,8 \pm 0,5	59,8	0,28 \pm 0,09
V15	18,31	71,7 \pm 0,9	73,1	0,28 \pm 0,07
V3	18,16	71,5 \pm 0,7	161,3	0,6 \pm 0,2
V4	18,63	75,1 \pm 0,4	61,1	0,22 \pm 0,04
V45	18,60	72,2 \pm 0,9	91,9	0,34 \pm 0,08
V5	18,50	70,8 \pm 2,4	191,7	0,7 \pm 0,4

Jednotlivé merania boli zobrazené v nasledujúcom grafe (Obrázok 23).



Obrázok 23: Porovnanie pevnosti v tlaku

Na nasledujúcom obrázku (Obrázok 24) je možné pozorovať, aký majú vplyv jednotlivé štruktúry na praskanie scaffoldu.



Obrázok 24: Výsledne štruktúry po aplikácii tlaku na scaffold: a) V1, b) V3, c) V4, d) V5, e) V15, f) V45

5. DISKUSIA

Počas posledných rokov rastie záujem o využívanie biokeramiky ako náhrady najmä kostného tkaniva. Má zaujímavé vlastnosti, vďaka ktorým je biokeramika schopná vytvoriť väzbu s živým tkanivom a poskytne oporu pre bunkový rast a výživu. V ostatných obdobiach sa kladie veľký dôraz na využívanie hydroxyapatitu ako náhrady kostného tkaniva, vďaka jeho biokompatibilite a najmä kvôli tomu, že je najviac zastúpenou zložkou skoro každej kosti. Napriek týmto unikátnym vlastnostiam je využívanie týchto náhrad ešte v obmedzenej miere a potrvá dlhší čas, pokiaľ sa začnú využívať. Kritickým problémom je najmä krehkosť scaffoldu.

Ako sľubnou metódou pre vhodnú kombináciu výroby keramického scaffoldu sa javí kombinácia freeze-castingu s aplikovanou 3D mriežkou, pomocou nepriamej 3D metódy. Táto kombinácia bola zavedená najmä preto, aby bola podporená osteokondukcia. Bunky pre svoj rast, podľa literatúry, potrebujú póry o rozmeroch najmenej 200 μm [50].

Pomocou nepriamej 3D tlače boli vyrobené scaffoldy s veľkým rozmerom makro kanálikov. Mriežka bola pred mrazením vsunutá do formy a v procese spekania bola zo scaffoldu odstránená. Podarilo sa vyrobiť makro kanáliky v rozmeroch 540-600 μm , pričom veľkosť lamiel bola v rozmedzí 118-156 μm . Tabuľka 4 uvádza tieto údaje. Bolo teda potvrdené, že touto kombináciou sme schopní vyrobiť makro kanáliky, ktorých rozmery napomôžu podporiť osteokondukciu.

Metódou freeze-casting sme schopní vyrobiť scaffoldy o veľmi vysokej porozite [15]. Aplikáciou nepriamej 3D tlače túto porozitu ešte zvýšime a konečná porozita bola okolo 70 % (Tabuľka 5).

Pred začatím výroby scaffoldu bolo nutné vybrať vhodnú náplň do 3D tlačiarne, keďže je k dispozícii viacero druhov náplne – PLA so sadzami, PLA v kombinácii s uhlíkovým vláknom a čistá PLA. Bola vytlačená mriežka s danou náplňou a bola podrobená spekaniu pri rovnakom teplotnom programe, ako sa využívalo pre spekanie scaffoldu. Najvyššiu odolnosť voči teplote vykazovala čistá PLA – 315 °C, výrobcom je uvedená teplota tlače 180-220 °C, pri ktorej je možné čistú PLA tvarovať. V článku Muraria a spol. bolo poukázané, že PLA mení svoju tepelnú stabilitu nielen s prídavkami, ale aj podľa toho o aký typ izoméru ide. PLA s nízkym obsahom D-izomérov vykazuje najvyššiu stabilitu [54]. Jav, kedy čistá PLA má najlepší vplyv na scaffold bol pozorovaný aj pri samotnej aplikácii (Obrázok 18). PLA vytekala a horela v spodnej časti scaffoldu a to malo za následok málo pevnú spodnú časť scaffoldu, čo tiež prispievalo k zlej mechanickej stabilite. Mriežka z PLA mala rôzny typ konštrukcie, ale jednotlivé vlákna mali oválny tvar, čo môžeme pozorovať aj pomocou Stereolupy (Obrázok 21). Pod podrobným pohľadom zo SEM je viditeľné, že tieto vlákna neudržia nami definovaný tvar po spekaní v mikro rozmeroch (Obrázok 22).

Vyrobené scaffoldy sa zdajú byť ako výbornou alternatívnou pre kostné náhrady, avšak najväčšie obmedzenia majú v mechanických vlastnostiach. Špongiózne kostné tkanivo, ktoré má relatívnu pórovitosť 90 % má tlakovú pevnosť v rozsahu 0,2-4,0 MPa [55]. Nami vyrobené scaffoldy sa pohybujú v tomto rozmedzí, avšak celková porozita je nižšia ako porozita špongiózneho kostného tkaniva. Najlepšiu kompresnú silu vykazoval scaffold s aplikovanou mriežkou typu V5. Tento typ mriežky bol vyrobený tak, aby prvá vrstva bola posunutá doprava a druhá vrstva bola posunutá doľava o práve 5 stupňov. Tento scaffold mal najnižšiu porozitu,

pretože toto štruktúrovanie malo za následok vznik mriežky, kde bol v strede priestor pre vznik valca, čo malo pravdepodobne za následok vyššiu stabilitu celého scaffoldu a podporil tak odolnosť voči tlaku a zníženie porozity. Ďalším veľmi odolným scaffoldom bol scaffold s aplikovanou mriežkou V3. Tento typ mriežky mal striedanie vrstiev len v každej druhej vrstve. Bola vytvorená sieť makro kanálikov, medzi ktorými boli pravidelné kvádriky. Tento scaffold praskol horizontálne v polovici a vertikálne taktiež v polovici. Avšak aj tento typ scaffoldu mal nižšiu porozitu. V1 a V15 scaffoldy vydržali rovnakú záťaž. V15 je len modifikáciou V1 mriežky. Scaffold s aplikovanou V1 mriežkou je obyčajná pravouhlá mriežka, ktorá má na sebe naukladané vrstvy. Mriežka V15 je tá istá mriežka, ale otáča sa pravidelne o 5 stupňov. Výsledná porozita týchto dvoch scaffoldov bola takmer rovnaká. V kompresných testoch praskal scaffold postupne stočene po uhloch a tak isto praskal aj scaffold s V45 mriežkou (Obrázok 21). Z tohto môžeme usúdiť, že ak je mriežka stočená o nejaký uhol, tak to dopomôže tomu, aby prasknutie bolo postupné, nie naraz v určitom bode a to môže dopomôcť k stabilite. V4 scaffold bol najmenej odolným v kompresných testoch. Tento typ scaffoldu mal najvyššiu porozitu a to malo za následok najnižšiu stabilitu.

Výsledky kompresných testov poukázali, že pravdepodobne na celkovú stabilitu výsledných scaffoldov majú vplyv rôzne typy mriežok, ale zároveň ju ovplyvňuje aj výsledná porozita. Tento jav bol aj dokázaný štúdiou Jia An a spol., ktorý tento jav popísal [53]. Aplikácia uhlov v mriežkach môže dopomôcť k celkovej odolnosti, pretože napomáha k praskaniu postupne v stočenom smere. Toto môže byť ovplyvnené aj tepelnou deformáciou mriežky (Obrázok 17), ktorá je u rôznych typov mriežok rôzna.

Aplikácia nepriamej tlače v kombinácii s freeze-castingom umožňuje prípravu dobre definovaného scaffoldu s prepojenou sieťou makro kanálikov. Táto metóda nie je jediným typom pre prípravu takejto kostnej náhrady. Lepšiu mechanickú stabilitu vykazujú vzorky pripravené napríklad pomocou SFF, avšak obecné sa dosiahne nižšia porozita [4]. Ako cesta k zlepšeniu mechanických vlastností sa javí optimalizácia teplotného režimu v procese spekania, kedy dochádza k zhutňovaniu častíc [59].

6. ZÁVER

Analýza termickej stability používaná pre tlač ukázala, že najvýhodnejším plnivom do 3D tlačiarne je čistá PLA. Vykazuje najvyššiu tepelnú odolnosť. Deformácia mriežky v priebehu spekania má pravdepodobne tiež za následok nižšiu mechanickú stabilitu scaffoldu, keďže deformácii podlieha najprv vrch mriežky a spodok je najodolnejší. Spodok scaffoldu môže byť narušený vytekaním mriežky a následným zhorením v tomto mieste.

Scaffoldy sa podarilo pripraviť metódou freeze-casting s aplikovanou 3D mriežkou vo viacerých priestorových kombináciách. Typ 3D mriežky vplýva na výslednú mechanickú stabilitu scaffoldu, ale pootočenie mriežky o nejaký uhol nemá významný vplyv na stabilitu.

Boli pripravené mikroštruktúry s porozitou 70-75 % a veľkosťou makrokanálikov od 540 až do 600 μm . Veľkosť medzilamelárnych priestorov sa pohybovala v rozmedzí 110–160 μm . Tým pádom aplikácia rôznych typov 3D mriežky pravdepodobne ovplyvňuje typ ľadového kryštálu, a teda vzniknutý medzilamelárny priestor.

Porovnanie mechanických vlastností rôznych typov scaffoldov ukázalo významné rozdiely. Najlepší výsledok dosiahol scaffold s mriežkou V5, kde vrstvy vytvorili zvláštne prepojenú sieť so stredovým valcom. Tento typ scaffoldu dosiahol v mechanických testoch odolnosť 0,7 MPa. Najhorší výsledok dosiahol scaffold s aplikovanou V4 mriežkou. Tento typ scaffoldu mal odolnosť v tlaku 0,2 MPa.

K zlepšeniu mechanických vlastností je nutná aj optimalizácia teplotného režimu v procese spekania. Nami zvoleným programom neboli dosiahnuté vysoké hodnoty porozity, ako by bolo možné dosiahnuť iným režimom.

7. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] SHERMAN, Seth L., Emil THYSSEN a Clayton W. NUELLE, 2017. Osteochondral Autologous Transplantation. *Clinics in Sports Medicine*. **36**(3), 489-500. DOI: 10.1016/j.csm.2017.02.006. ISSN 02785919. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027859191730008X>
- [2] LANGER, R a J. VACANTI, 1993. Tissue engineering. *Science*. **260**(5110), 920-926. DOI: 10.1126/science.8493529. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.8493529>
- [3] PTÁČEK, Luděk, c2003. *Nauka o materiálu I. 2.*, opr. a rozš. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM. ISBN 80-720-4283-1.
- [4] ROLEČEK, J., L. PEJCHALOVÁ, F.J. MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, P. MIRANDA GONZÁLEZ a D. SALAMON, 2019. Bioceramic scaffolds fabrication: Indirect 3D printing combined with ice-templating vs. robocasting. *Journal of the European Ceramic Society*. **39**(4), 1595-1602. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2018.12.006. ISSN 09552219. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221918307246>
- [5] HAN, Jiecai, Luyang HU, Yumin ZHANG, Yufeng ZHOU, Sandra VAN VLIERBERGHE a Peter DUBRUEL, 2009. Fabrication of Ceramics with Complex Porous Structures by the Impregnate-Freeze-Casting Process: Opening Up Unprecedented Opportunities in Scaffold Design and Applications. *Journal of the American Ceramic Society*. **92**(9), 2165-2167. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.03168.x. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2009.03168.x>
- [6] ALBA, Brandon, Pooja SWAMI, Neil TANNA a Daniel GRANDE, 2018. Using 3-Dimensional Printing to Construct Chitosan Alginate Scaffolds for Nasal Alar Cartilage Tissue Engineering. *Journal of the American College of Surgeons*. **227**(4), 489-500. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2018.07.458. ISSN 10727515. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751518309086>
- [7] CIGÁNKOVÁ, Viera, 2011. *Veterinárna histológia I. 1*. Košice: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach. ISBN 978-80-8077-239-0.
- [8] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY, 1997. *Základy histologie*. Jinočany. ISBN 80-857-8737-7.
- [9] PENIDO, Maria Goretti M. G. a Uri S. ALON, 2012. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric Nephrology*. **27**(11), 2039-2048. DOI: 10.1007/s00467-012-2175-z. ISSN 0931-041X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-012-2175-z>
- [10] FUKASAWA, Jun-Ichi, Kaoru TSUJII, Yumin ZHANG, Yufeng ZHOU, Sandra VAN VLIERBERGHE a Peter DUBRUEL, 1988. Higher-order structure formation of ultrafine boehmite particles in sols, gels, and dried materials: Opening Up Unprecedented Opportunities in Scaffold Design and Applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. **125**(1), 155-161. DOI: 10.1016/0021-9797(88)90064-1. ISSN 00219797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021979788900641>
- [11] WILHELM, Zdeněk, 2007. *Co je dobré vědět o vápníku*. Praktická Lákáren, 3(4), 184-189

- [12] SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS, 2004. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada. ISBN 80-247-0630-X.
- [13] KLENER, Pavel, c2006. *Vnitřní lékařství*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-726-2430-X.
- [14] DHALIWAL, J, Sumathi V.P. a Grimer R.J., 2009. Radiation-induced periosteal osteosarcoma. *Grand Rounds*. **2010**(10), 13-18. DOI: 10.1102/1470-5206.2010.0003.
- [15] WEGST, U. G. K., M. SCHECTER, A. E. DONIUS a P. M. HUNGER, 2010. Biomaterials by freeze casting. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. **368**(1917), 2099-2121. DOI: 10.1098/rsta.2010.0014. ISSN 1364-503X. Dostupné také z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2010.0014>
- [16] BODEN, Scott D., James KANG, Harvinder SANDHU a John G. HELLER, 2002. Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 to Achieve Posterolateral Lumbar Spine Fusion in Humans. *Spine*. **27**(23), 2662-2673. DOI: 10.1097/00007632-200212010-00005. ISSN 0362-2436. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007632-200212010-00005>
- [17] HENCH, L. L., Third-Generation Biomedical Materials. *Science*. **295**(5557), 1014-1017. DOI: 10.1126/science.1067404. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1067404>
- [18] JELL, G. a M. M. STEVENS, 2006. Gene activation by bioactive glasses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **17**(11), 997-1002. DOI: 10.1007/s10856-006-0435-9. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-006-0435-9>
- [19] STEVENS, Molly M., 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. **11**(5), 18-25. DOI: 10.1016/S1369-7021(08)70086-5. ISSN 13697021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702108700865>
- [20] LI, Wenle, Kathy LU, John Y. WALZ a G. FRANKS, 2013. Effects of Solids Loading on Sintering and Properties of Freeze-Cast Kaolinite-Silica Porous Composites. *Journal of the American Ceramic Society*. **96**(6), 1763-1771. DOI: 10.1111/jace.12355. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jace.12355>
- [21] GAUDILLERE, Cyril a José Manuel SERRA, 2016. Freeze-casting: Fabrication of highly porous and hierarchical ceramic supports for energy applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. **55**(2), 45-54. DOI: 10.1016/j.bsecv.2016.02.002. ISSN 03663175. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0366317516000212>
- [22] HUNT, J.D., Xuân Nam PHẠM a B. ULLRICH, 2013. Pattern formation in solidification: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Materials Science and Technology*. 2000, **15**(1), 9-14. DOI: 10.1179/026708399773002755. ISSN 0267-0836. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/026708399773002755>
- [23] SADAT-SHOJAI, M., 2010. Hydroxyapatite: Inorganic Nanoparticles of Bone (Properties, Applications, and Preparation Methodologies). *Iranian Students Book Agency (ISBA)*. Dostupné také z: <https://doi.org/10.13140/rg.2.1.4691.2249>.

- [24] WOPENKA, Brigitte a Jill D. PASTERIS, 2005. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C*. **25**(2), 131-143. DOI: 10.1016/j.msec.2005.01.008. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493105000135>
- [25] VOHLÍDAL, Jiří a Karel ŠTULÍK, 1999. *Chemické a analytické tabulky*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9855-5.
- [26] CARTER, C. Barry. a M. Grant. NORTON. *Ceramic materials: science and engineering*. New York, 2007. ISBN 03-874-6270-8.
- [27] SOFIE, S.W. a F. DOGAN, 2001. Freeze Casting of Aqueous Alumina Slurries with Glycerol. *Journal of the American Ceramic Society*. **84**(7), s. 1459-1464. ISSN 00027820.
- [28] KOH, Young-Hag, Eun-Jung LEE, Byung-Ho YOON, Ju-Ha SONG, Hyoun-Ee KIM a Hae-Won KIM, 2006. Effect of Polystyrene Addition on Freeze Casting of Ceramic/Camphene Slurry for Ultra-High Porosity Ceramics with Aligned Pore Channels. *Journal of the American Ceramic Society*. **89**(12), 3646-3653. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01311.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01311.x>
- [29] LEE, Jin Woo, Jong Young KIM a Dong-Woo CHO, 2010. Solid Free-form Fabrication Technology and Its Application to Bone Tissue Engineering. *International Journal of Stem Cells*. **3**(2), 85-95. DOI: 10.15283/ijsc.2010.3.2.85. ISSN 2005-3606. Dostupné také z: <http://www.ijstemcell.com/journal/DOIx.php?id=10.15283/ijsc.2010.3.2.85>
- [30] CHIM, H., D.W. HUTMACHER, A.M. CHOU, A.L. OLIVEIRA, R.L. REIS, T.C. LIM a J.-T. SCHANTZ, 2006. A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering: A Review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. **35**(10), 928-934. DOI: 10.1016/j.ijom.2006.03.024. ISSN 09015027. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502706001615>
- [31] YEONG, Wai-Yee, Chee-Kai CHUA, Kah-Fai LEONG, Margam CHANDRASEKARAN, R.L. REIS, T.C. LIM a J.-T. SCHANTZ, 2004. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology*. **22**(12), 643-652. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.10.004. ISSN 01677799. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779904002926>
- [32] FRANKS, Felix, 1998. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **45**(3), 221-229. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6).
- [33] DEVILLE, Sylvain, 2013. Ice-templating, freeze casting: Beyond materials processing. *Journal of Materials Research*. **28**(17), 2202-2219. DOI: <https://doi.org/10.1557/jmr.2013.105>.
- [34] STUMPF, Martin, Nahum TRAVITZKY, Peter GREIL a Tobias FEY, 2018. Sol-gel infiltration of complex cellular indirect 3D printed alumina. *Journal of the European Ceramic Society*. **38**(10), 3603-3609. DOI: doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.04.023.
- [35] ROLEČEK, J., D. SALAMON a Z. CHLUP, 2017. Mechanical properties of hybrid composites prepared by ice-templating of alumina. *Journal of the European Ceramic*

- Society*. **37**(14), 4279-4286. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2017.04.007. ISSN 09552219. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221917302406>
- [36] ANEZIRIS, C.G., W. SCHÄRFL a B. ULLRICH, 2007. Microstructure evaluation of Al₂O₃ ceramics with Mg-PSZ- and TiO₂-additions. *Journal of the European Ceramic Society*. **27**(10), 3191-3199. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.01.006. ISSN 09552219. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221907000106>
- [37] COLOMBO, P., MORENO, Rodrigo, VAßEN, Robert, IONESCU, Emanuel, RIEDEL, Ralf. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics: A Review. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2006, **364**(1838), s. 109-124.
- [38] STUDART, Andre R., Urs T. GONZENBACH, Elena TERVOORT a Ludwig J. GAUCKLER, 2006. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society*. **89**(6), 1771-1789. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>
- [39] KURAPOVA, O.Yu. et al., Cryochemical methods for manufacturing nanosized ceramics and ceramic precursor powders with low agglomeration degree: A review. *Reviews on advanced materials science*. 2012. Vol. 32, issue 2, p. 112-132.
- [40] SCOTTI, Kristen L. a David C. DUNAND, 2018. Freeze casting – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, FreezeCasting.net. *Progress in Materials Science*. **94**, 243-305. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2018.01.001. ISSN 00796425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007964251830001X>
- [41] WEGST, U. G. K., M. SCHECTER, A. E. DONIUS a P. M. HUNGER, 2010. Biomaterials by freeze casting. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. **368**(1917), 2099-2121. DOI: 10.1098/rsta.2010.0014. ISSN 1364-503X. Dostupné také z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2010.0014>
- [42] YAN, Yufei, Hao CHEN, Hongbo ZHANG, et al., 2019. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials*. **190-191**, 97-110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.033. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961218307555>
- [43] DONNEYS, Alexis, Noah S. NELSON, Erin E. PAGE, Sagar S. DESHPANDE, Peter A. FELICE, Catherine N. TCHANQUE-FOSSUO, Joshua P. SPIEGEL a Steven R. BUCHMAN, 2015. Targeting angiogenesis as a therapeutic means to reinforce osteocyte survival and prevent nonunions in the aftermath of radiotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. **37**(9), 1261-1267. DOI: 10.1002/hed.23744. ISSN 10433074. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.23744>
- [44] ATHANASIOU, K. A., C.-F. ZHU, D. R. LANCTOT, C. M. AGRAWAL a X. WANG, 2000. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. *Tissue Engineering*. **6**(4), 361-381. DOI: 10.1089/107632700418083. ISSN 1076-3279. Dostupné také z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632700418083>

- [45] DAVIDGE, R. W., 1969. Mechanical properties of ceramic materials. *Contemporary Physics*. **10**(2), 105-124. DOI: 10.1080/00107516908220103. ISSN 0010-7514. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00107516908220103>
- [46] POKLUDA, Jaroslav, František KROUPA a Ladislav OBDRŽÁLEK, 1994. *Mechanické vlastnosti a struktura pevných látek: (kovy, keramika, plasty)*. Brno: PC-DIR. ISBN 80-214-0575-9.
- [47] YU, Junhong, Xinchun SHANG a Peifei WU, 2019. Influence of pressure distribution and friction on determining mechanical properties in the Brazilian test: Theory and experiment. *International Journal of Solids and Structures*. **161**(3-4), 11-22. DOI: 10.1016/j.ijsolstr.2018.11.002. ISSN 00207683. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020768318304335>
- [48] MÍŠEK, Bohumil, František KROUPA a Ladislav OBDRŽÁLEK, 1993. *Polymery, keramika, kompozity: (kovy, keramika, plasty)*. Brno: Vysoké učení technické. ISBN 80-214-0521-X.
- [49] PROVETI, José Rafael Capua a Gérard MICHOT, 2006. The Brazilian test: a tool for measuring the toughness of a material and its brittle to ductile transition. *International Journal of Fracture*. **139**(3-4), 455-460. DOI: 10.1007/s10704-006-0067-6. ISSN 0376-9429. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10704-006-0067-6>
- [50] CLEGG, W. J., K. KENDALL, N. McN. ALFORD, T. W. BUTTON a J. D. BIRCHALL, 1990. A simple way to make tough ceramics. *Nature*. **347**(6292), 455-457. DOI: 10.1038/347455a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/347455a0>
- [51] MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, Francisco, Antonia PAJARES a Pedro MIRANDA, 2017. Effect of the drying process on the compressive strength and cell proliferation of hydroxyapatite-derived scaffolds. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. **14**(6), 1101-1106. DOI: 10.1111/ijac.12755. ISSN 1546542X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijac.12755>
- [52] FAWCETT, Don W., William BLOOM a Elio RAVIOLA, c1994. *A Textbook of Histology*. 12th ed. New York. ISBN 978-0412046919.
- [53] AN, Jia, Joanne Ee Mei TEOH, Ratima SUNTORNNOND a Chee Kai CHUA, 2015. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering*. **1**(2), 261-268. DOI: 10.15302/J-ENG-2015061. ISSN 20958099. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095809916300716>
- [54] MURARIU, Marius a Philippe DUBOIS, 2016. PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **107**, 17-46. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.003. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16301028>
- [55] CHEN, Qizhi Z., Ian D. THOMPSON a Aldo R. BOCCACCINI, 2006. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. **27**(11), 2414-2425. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205010422>
- [56] SHERMAN, Seth L., Emil THYSSEN a Clayton W. NUELLE, 2017. Osteochondral Autologous Transplantation. *Clinics in Sports Medicine*. **36**(3), 489-500. DOI:

- 10.1016/j.csm.2017.02.006. ISSN 02785919. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027859191730008X>
- [57] ALBA, Brandon, Pooja SWAMI, Neil TANNA a Daniel GRANDE, 2018. Using 3-Dimensional Printing to Construct Chitosan Alginate Scaffolds for Nasal Alar Cartilage Tissue Engineering. *Journal of the American College of Surgeons*. **227**(4), 489-500. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2018.07.458. ISSN 10727515. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751518309086>
- [58] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA, 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. **72**(2), 244-251. DOI: 10.1007/s00253-006-0488-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0488-1>
- [59] XIE, Liang, Dongxu YAO, Yongfeng XIA, Jinwei YIN, Hanqin LIANG, Kaihui ZUO a Yuping ZENG, 2019. High porosity Ca- α -SiAlON ceramics with rod-like grains fabricated by freeze casting and pressureless sintering. *Journal of the European Ceramic Society*. **39**(6), 2036-2041. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2019.01.027. ISSN 09552219. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221919300391>

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3DP	3D tlač
CAD	počítačom podporovaný systém
FDM	modelovanie fúzových depozitov
HA	hydroxyapatit
PLA	kyseliny polymliečna
PVA	polyvinylalkohol
PTH	parathormón
SEM	skénovacia elektrónová mikroskopia
SFF	solid free-form fabrication
SL	stereolitografia
SLS	selektívne laserové spekanie
UV	ultrafialové žiarenie