

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta strojní – Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bioinspirované mechanické vlastnosti kostního implantátu

Autor: **Bc. Simona Dolejšová**

Vedoucí práce: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Studijní program: Aplikované vědy ve strojním inženýrství

Specializace: Biomechanika

Praha 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Dolejšová** Jméno: **Simona** Osobní číslo: **473499**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Aplikované vědy ve strojním inženýrství**
Specializace: **Biomechanika**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Bioinspirované mechanické vlastnosti kostního implantátu

Název diplomové práce anglicky:

Bioinspired mechanical properties of bone implant

Pokyny pro vypracování:

1. Kritická rešerše (klíčová slova: nanomechanical properties, intraosseous implant, transcuteaneous implant, bioinspired implant, 3D printing)
2. Příprava a provedení nanoindentačního experimentu
3. Vyhodnocení experimentálních dat a interpretace výsledků.

Seznam doporučené literatury:

1. C. J. Pendegrass, A. E. Goodship, J. S. Price, G. W. Blunn, Nature's answer to breaching the skin barrier: an innovative development for amputees, J. Anat. 209 (2006) 59-67.
2. W. C. Oliver, G. M. Pharr, An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, J. Mater. Res. 7 (1992)1564–1583.
3. L. F. Velasquez-Garcia, a Y. Kombluth, Biomedical Applications of Metal 3D Printing, Annu. Rev. Biomed. Eng. 23 (2021) 307-338.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Josef Šepitka, Ph.D. FS, ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **20.04.2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **14.08.2022**

Platnost zadání diplomové práce: _____

Ing. Josef Šepitka, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomantka bere na vědomí, že je povinna vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

Datum převzetí zadání

Podpis studentky

Anotační list

Jméno autora: Bc. Simona Dolejšová

Název DP: Bioinspirované mechanické vlastnosti kostního implantátu
Anglický název: Bioinspired mechanical properties of bone implant

Rok: 2022
Ústav/odbor: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky/odbor biomechaniky

Studijní program: Aplikované vědy ve strojním inženýrství
Specializace: Biomechanika
Vedoucí: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Bibliografické údaje:

počet stran:	80
počet obrázků:	56
počet tabulek:	6
počet příloh:	2

Klíčová slova: nanomechanické vlastnosti, intraoseální implantát, transkutánní implantát, bioinspirovaný implantát, 3D tisk
Keywords: nanomechanical properties, intraosseous implant, transcutaneous implant, bioinspired implant, 3D printing

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá vývojem těsného biologického rozhraní mezi lidskou kůží a transkutánním kostním implantátem. Těsnící rozhraní mezi kůží a implantátem by snížilo výskyt infekcí u pacientů po amputaci s oseointegrovanou protézou a zlepšilo kvalitu jejich života. Rešeršní část obsahuje anatomii kosti a kůže, přehled oseointegrovaných amputačních protéz, popis nanoindentace a metod aditivní výroby a popis nedestruktivní zobrazovací metody mikropočítačové tomografie. Experimentální část obsahuje nanoindentační měření, skenování metodou mikropočítačové tomografie a jejich vyhodnocení.

Abstract:

This thesis deals with the development of a tight biological interface between human skin and a transcutaneous bone implant. A sealing interface between the skin and the implant would reduce the incidence of infections in amputees with an osseointegrated prosthesis and improve their quality of life. The research part contains the anatomy of bone and skin, an overview of osseointegrated amputation prostheses, a description of nanoindentation and additive manufacturing methods and a description of a non-destructive imaging method microcomputer tomography. The experimental part includes nanoindentation measurements, scanning with the microcomputer tomography method and their evaluation.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací zpracovala samostatně s využitím podkladů uvedených v seznamu použité literatury. Souhlasím, že výsledky práce mohou být dále využity dle uvážení vedoucího této práce Ing. Josefa Šepitky, Ph.D. jako jejího spoluautora. Souhlasím také s případnou publikací výsledků diplomové práce nebo její podstatné části, pokud budu uvedena jako její spoluautor.

V Praze dne

.....

podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Josefu Šepitkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, poskytnutý čas a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Danielovi Kytýřovi, Ph.D. a Ing. Petru Koudelkovi, Ph.D. za přípravu, provedení a zpracování skenování vzorku pomocí mikropočítačové tomografie, jejich ochotu a poskytnutý čas.

Obsah

Seznam použitých symbolů	8
Seznam použitých zkratek	8
1 Úvod.....	10
2 Rešeršní studie.....	11
2.1 Anatomie.....	11
2.1.1 Anatomie kosti.....	12
2.1.2 Anatomie kůže	13
2.2 Oseointegrované amputační protézy	16
2.2.1 OPRA	18
2.2.2 ILP.....	20
2.2.3 OPL.....	21
2.2.4 POP.....	23
2.2.5 Kompresní zařízení.....	23
2.2.6 ITAP	25
2.3 Intraoseální transkutánní amputační protéza (ITAP).....	27
2.4 Sumarizace oseointegrovaných amputačních protéz	38
2.5 Nanoindentace	41
2.6 Mechanické vlastnosti.....	44
2.7 Aditivní výroba	46
2.7.1 Přehled technologií aditivní výroby	46
2.7.2 Aditivní výroba implantátů	52
2.8 Mikropočítačová tomografie (Micro-CT)	55
3 Cíle práce	57
4 Experiment.....	58
4.1 Nanoindentace	58
4.1.1 Příprava vzorku	58
4.1.2 Nanoindentační experiment	59
4.1.3 Analýza dat.....	60
4.2 Micro-CT.....	60
4.2.1 Příprava vzorku	60
4.2.2 Nastavení experimentu.....	61
4.2.3 Analýza dat.....	61

5	Výsledky	62
5.1	Nanoindentace	62
5.2	Micro-CT	65
6	Diskuse	69
7	Závěr	72
	Seznam použité literatury	73
	Seznam obrázků	77
	Seznam tabulek	80
	Seznam příloh	80

Seznam použitých symbolů

A	$[m^2]$	kontaktní plocha
a	$[m]$	kontaktní poloměr
C_i	$[-]$	konstanty
E	$[Pa]$	Youngův modul
E_r	$[Pa]$	redukovaný modul pružnosti
H	$[Pa]$	tvrdost
h	$[m]$	indentační hloubka
h_c	$[m]$	kontaktní hloubka
h_f	$[m]$	hloubka vtisku po odlehčení indentoru
h_s	$[m]$	posunutí povrchu po obvodu kontaktu
h_{max}	$[m]$	hloubka při maximálním zatížení
P	$[N]$	zatížení indentoru
P_{max}	$[N]$	maximální zatížení indentoru
S	$[N \cdot m^{-1}]$	kontaktní tuhost
t	$[s]$	čas
ϵ	$[-]$	geometrická konstanta
ϑ	$[-]$	Poissonovo číslo
σ		směrodatná odchylka

Seznam použitých zkratk

BJ	Technologie tryskání pojiva (Binder Jetting)
CAD	Počítačem podporované navrhování (Computer Aided Design)
CBAM	Composite Based Additive Manufacturing
CFF	Composite Filament Fabrication
CPJ	ColorJet Printing
CT	Počítačová tomografie
DED	Technologie přímé energetické depozice (Directed Energy Deposition)
DK	Dolní končetina
DLC	Povlak na bázi uhlíku (Diamond like Carbon)
DLP	Digital Light Processing
DMLS	Direct Metal Laser Sintering
DOD	Drop On Demand
EBM	Electron Beam Melting

EBAM	Electron Beam Additive Manufacturing
FDM	Fused Deposition Modeling
FFF	Fused Filament Fabrication
HA	Hydroxyapatit
HAFn	Hydroxyapatit s adsorbovaným fibronektinem
HK	Horní končetina
ILP	Integrální protéza nohy
ITAP	Intraoseální transkutánní amputační protéza
LENS	Laser Engineered Net Shaping
LOM	Laminated Object Manufacturing
ME	Technologie extruze materiálu (Material Extrusion)
MJ	Technologie tryskání materiálu (Material Jetting)
MJF	Multi Jet Fusion
NPJ	NanoParticle Jetting
OPL	Oseointegrovaná protetická končetina
OPRA	Oseointegrovaná protéza pro rehabilitaci amputovaných
PBF	Technologie slinování prášků (Powder Bed Fusion)
POP	Perkutánní oseointegrovaná protéza
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SIFn	Fibronektinem silanizovaná titanová slitina Ti6Al4V
SL	Technologie laminace (Sheet Lamination)
SLA	Stereolitografie
SLM	Selective Laser Melting
SLS	Selective Laser Sintering
STL	Standard triangle language
UAM	Ultrasonic Additive Manufacturing
VP	Technologie fotopolymerizace (Vat Photopolymerization)

1 Úvod

Současným uznávaným standardem pro rehabilitaci a mobilitu po amputaci je amputační protéza připevněná k pahýlu pomocí objímky, avšak s rozhraním pahýl-objímka je spojena řada problémů. Patří mezi ně nerovnoměrné rozložení tlaku na rozhraní pahýl-objímka vedoucí k otlakům a infekce v důsledku otěru kůže nebo v důsledku nepřírozeného mikrobiálního prostředí. U pacientů s amputací na dolní končetině přenáší pahýl váhu pacienta přes objímku a zbytek protézy na zem. Zatímco chodidlo je vysoce specializovanou strukturou, která rozvádí síly vznikající při lokomoci na kostru, pahýl vzniklý amputací je tvořen srostlými měkkými tkáněmi, které nejsou pro přenos sil uzpůsobeny. V důsledku toho jsou tkáně pahýlu vystaveny silám, které se normálně přenášejí na kosterní systém, což může vést k otěru tkáně, nekróze a infekci. Kromě toho jsou často nutné úpravy designu objímky v důsledku změn a remodelace měkkých tkání, například když pacient po amputaci ztrácí nebo přibírá na váze. Až tři čtvrtiny pacientů podstupujících amputaci dolní končetiny mají kožní vředy, problémy s usazením protézy kvůli kolísání velikosti pahýlu nebo trpí nesnesitelným pocením. Přibližně 7 % pacientů po amputaci utrpělo zlomeninu ve zbytkové končetině a většina z nich uvedla, že jim chybí sebedůvěra v mobilitě. [1-3]

Jedním ze způsobů, jak překonat tyto problémy, je použití oseointegrované transkutánní amputační protézy – amputační protéza ukotvená v kosti jejíž distální část proniká kůží a umožňuje připojení protetické končetiny. Tato metoda přenáší váhu pacienta z kostry přímo na protézu a obchází roli měkkých tkání v nosném pahýlu. Mezi další výhody přímého kosterního připevnění protézy končetiny patří zlepšený rozsah pohybu, pohodlí při sezení, schopnost chůze, zlepšené povědomí prostřednictvím oseopercepce a snížený energetický výdej. Jedním z potenciálních rizik oseointegrace je periprotetická zlomenina, která může vést k dalšímu poškození nebo proximální amputaci. Při použití oseointegrované protézy dochází k narušení kůže, což je hlavní bariéra těla před infekcí, proto jsou transkutánní protézy běžně ohroženy chronickou infekcí na rozhraní kůže-implantát. Bohužel drtivá většina pacientů po amputaci na celém světě má cukrovku a dalo by se očekávat zvýšené riziko infekce. [2-4]

Tato diplomová práce je inspirovaná vývojem oseointegrovaných amputačních protéz a věnuje se vývoji těsného biologického rozhraní mezi lidskou kůží a kovovým kostním implantátem, pro které dosud nebylo objeveno spolehlivé řešení. Těsnící rozhraní mezi kůží a implantátem by snížilo výskyt infekcí u pacientů po amputaci s oseointegrovanou protézou a zlepšilo kvalitu jejich života. Cílem této diplomové práce je provést a vyhodnotit nanoindentační experiment na vzorku daňčího paroží. Paroží daňka je přirozeným analogem transkutánního „zařízení“ odolávajícího infekci, a proto může být považován za biomimetický model těsného transkutánního rozhraní oseointegrované amputační protézy [2].

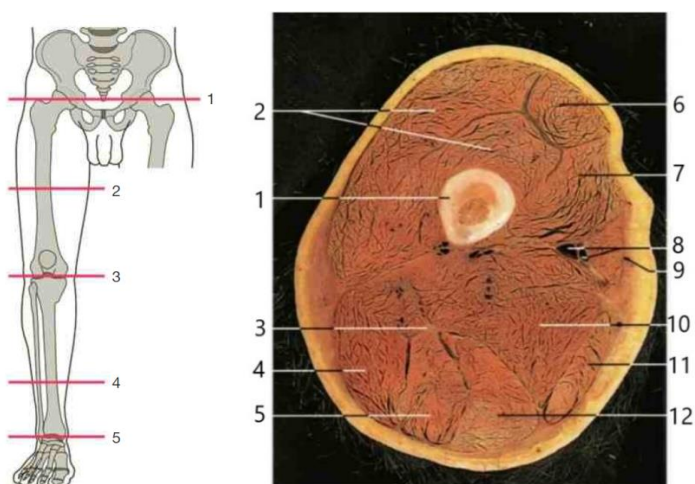
2 Rešeršní studie

2.1 Anatomie

Kostru lidského těla lze rozdělit na osovou kostru a apendikulární (končetinovou) kostru (Tab. 1) [5]. V příčném řezu končetinou se nalézá kost a měkké tkáně (svaly, kůže), jak ukazuje transverzální řez pravým stehnem na Obr. 1.

Tab. 1: Rozdělení kostry lidského těla a terminologie. Převzato z [5].

			Český název	Latinský název
Osová kostra			Lebka	<i>Cranium</i>
			Páteř	<i>Columna vertebralis</i>
			Žebra	<i>Costae</i>
			Hrudní kost	<i>Sternum</i>
Apendikulární kostra	Kostra horní končetiny (HK)	Pletenec HK	Lopatka	<i>Scapula</i>
			Klíční kost	<i>Clavicula</i>
		Kosti volné HK	Pažní kost	<i>Humerus</i>
			Loketní kost	<i>Ulna</i>
			Vřetenní kost	<i>Radius</i>
			Kosti ruky	<i>Ossa manus</i>
	Kostra dolní končetiny (DK)	Pletenec DK	Pánevní kost	<i>Os coxae</i>
			Kosti volné DK	Stehenní kost
		Češka		<i>Patella</i>
		Holenní kost		<i>Tibia</i>
		Lýtková kost		<i>Fibula</i>
		Kosti nohy		<i>Ossa pedis</i>

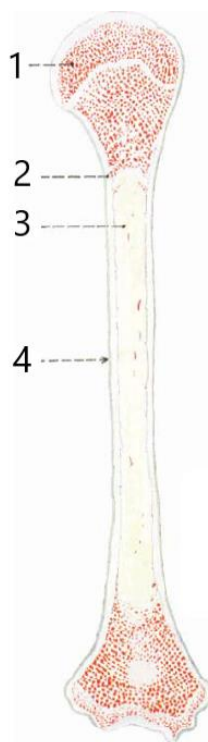


Obr. 1: Transverzální řez středem pravého stehna (řez 2; pohled zespodu). 1 – *Femur*, 2 – *M. vastus intermedius*, *M. vastus lateralis*, 3 – *Nervus ischiadicus*, 4 – *M. biceps femoris*, 5 – *M. semitendinosus*, 6 – *M. rectus femoris*, 7 – *M. vastus medialis*, 8 – *Arteria femoralis*, *Vena femoralis*, 9 – *M. sartorius*, 10 – *M. adductor*, 11 – *M. gracilis*, 12 – *M. semimembranosus*.

Převzato z [6].

2.1.1 Anatomie kosti

Kosti jsou tvořeny kostní tkání dvou hlavních forem. Těmi jsou kompaktní kostní tkáň (*substantia compacta*), která tvoří povrchovou vrstvu pod okosticí, a trámčitá kostní tkáň (*substantia spongiosa*), která vytváří trabekulární systém v nitru kostí. Kostní dřev vyplňuje dřevnou dutinu (*cavitas medullaris*) v tělech dlouhých kostí a dále všechny prostory mezi trámečky spongiosy. Okostice (periost, *periosteum*) je vazivový obal kosti, který kryje vnější povrch kosti všude, s výjimkou míst, kde je kost spojena se svalem nebo s kloubním pouzdem, a mimo kloubních konců pokrytých chrupavkou (Obr. 2). [5, 7]

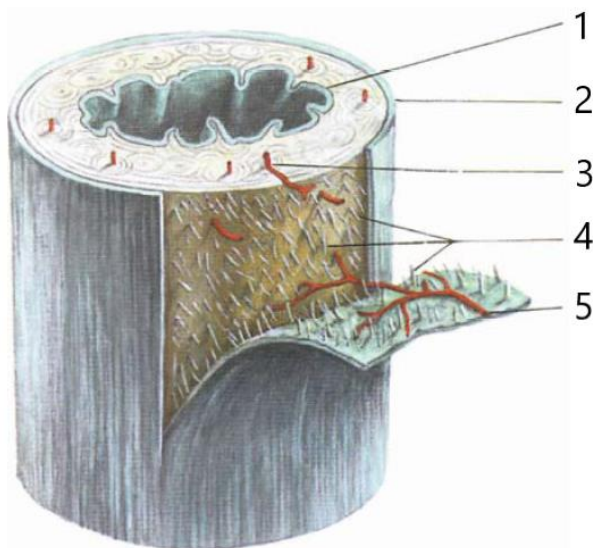


Obr. 2: Podíl kompaktní a spongiosní kostní tkáně u dlouhých kostí. 1 – spongiosní kost, 2 – kompaktní kost, 3 – dřevná dutina, 4 – periost. Převzato z [7].

Kostní tkáň je pojivová tkáň, specializovaná pro podpůrnou a ochrannou funkci. Stejně jako ostatní pojivové tkáně se i kost skládá z buněk a z mezibuněčné hmoty. Mezibuněčná hmota kosti (kostní základní hmota, matrix) obsahuje mimo organické složky (kolagenní vlákna a amorfni hmota) také minerální (anorganickou) složku, která dodává kosti tvrdost a pevnost při zachování určité pružnosti. Buňky, jejichž činností vzniká matrix, se nazývají osteoblasty. Osteocyty jsou buňky obklopené mezibuněčnou hmotou, kterou již nadále netvoří, podílejí se však na regulaci hladiny vápníku v těle. Osteoklasty jsou buňky zodpovědné za odbourávání kostní hmoty. Buňky jsou uloženy v dutinkách (lakunách) základní hmoty. [5, 7]

Kostní tkáň tvoří buď nepravidelně uspořádaná kolagenní vlákna, nebo je upravena do vrstev (lamel). Podle toho se rozlišuje kost vláknitá (fibrilární), a kost vrstevnatá (lamelární). Vláknitá kost se u člověka vyskytuje během vývoje kostí, v dospělosti je zachována pouze ve stěně kostěného labyrintu vnitřního ucha, v okolí lebečních švů a v místech kostních drsnatin při úponech svalů a vazů, všude jinde má kost u člověka typickou lamelární stavbu. Osteon (Haversův systém) je základní stavební jednotkou lamelární kosti,

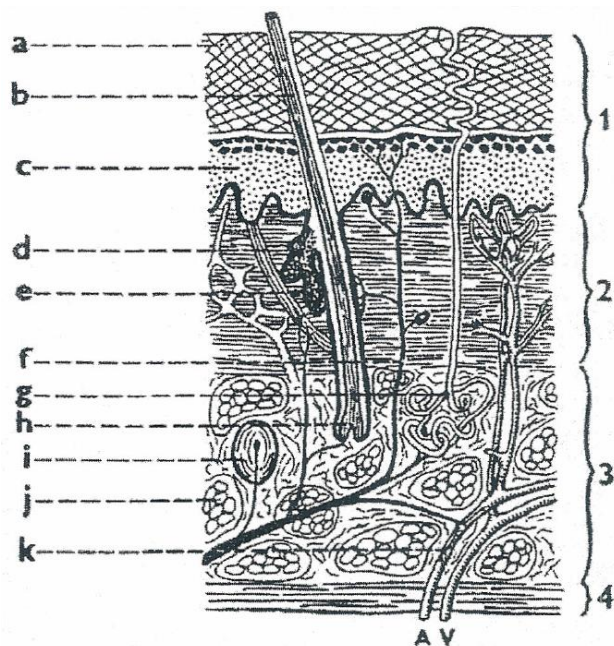
má tvar dlouhého válce a je tvořen souborem soustředných lamel uspořádaných kolem centrálního (Haversova) kanálu, ve kterém probíhají cévy a nervy. Periost proniká kolagenními vlákny do kosti, tyto vlákna se nazývají Sharpeyova vlákna a periost je jimi fixován ke kosti. Volkmannovy kanálky přivádějí cévy a nervy z okostice k Haversovým kanálům. Na vnitřní ploše kosti, mezi kostní tkání a kostní dřeví, je vazivová vrstvička podobná periostu, nazývaná endost (*endosteum*), která pokrývá také trámečky kostní spongiosy (Obr. 3). [5, 7]



Obr. 3: Schématický model těla dlouhé kosti. 1 – endost, 2 – periost, 3 – céva z periostu procházející Volkmannovým kanálkem do cév Haversových systémů, 4 – Sharpeyova vlákna, 5 – cévy v periostu. Převzato z [7].

2.1.2 Anatomie kůže

Kůže (*cutis*) je rozsáhlý plošný orgán tvořící vnější povrch lidského těla a skládá se z pokožky, škůry a podkoží (Obr. 4). Zahrnuje také kožní deriváty (chlupy, nehty a žlázy). Kůže lidského těla zajišťuje ochranu před vnějším prostředím, termoregulaci (pomocí činnosti potních žláz a pomocí změn průtoku krve ve svém cévním řečišti), látkovou výměnu, a to tím, že se účastní dýchání (u savců sice malým, ale fyziologicky nezanedbatelným podílem) a také má vylučovací schopnost (potní a mazové žlázy). Mezi další funkce kůže patří vstřebávání (léčiva), imunita (kůže obsahuje imunokompetentní buňky), metabolismus (vlivem UV záření se v kůži z prekursoru (ergosterol) vytváří vitamin D), vyjadřování emocí a psychických stavů (kůže obličeje ovládaná mimickými svaly). [5, 8, 9]



Obr. 4: Stavba kůže (řez). 1 – pokožka, 2 – škára, 3 – podkoží, 4 – podkožní fascie. a – zrohovatělá vrstva pokožky, b – vlas, chlup, c – germinativní vrstva pokožky, d – svalové snopce napřimovače chlupu, e – mazová žláza, f – kožní receptory, g – potní žláza, h – vlasová cibulka, i – kožní receptor (hmat), j – tukový lalůček, k – cévní zásobení kůže (A, V – tepny a žíly). Převzato z [9].

Pokožka (*epidermis*) je povrchová vrstva kůže tvořená vrstevnatým dlaždicovým rohovějícím epitelem. Nejsvrchnější vrstva pokožky je složena z plně zrohovatělých buněk, jsou to bezjaderné keratinocyty (nazývané korneocyty), tato zrohovatělá vrstva pokožky je nositelem bariérové funkce kůže. Keratinocyty jsou postupně posouvány k povrchu, ztrácejí jádra a vodu, a nakonec se odlučují (odlupování kůže). Buňky ve zrohovatělé vrstvě pokožky obsahují i bílkovinu (keratin, specifický produkt keratinocytů), která je těžko rozpustná ve vodě, proto je kůže pro vodu prakticky nepropustná. Mimo základních buněk – keratinocytů – obsahuje kůže v různém stádiu jejich vývoje i další buňky: melanocyty (tvoří melanin, který slouží k ochraně jader keratinocytů před UV zářením), Langerhansovy buňky (imunokompetentní buňky, které mají původ v kostní dřeni a zprostředkovávají prezentaci antigenu lymfocytům) a Merkelovy buňky (tvoří receptory hmatu). [5, 8, 9]

Škára (*dermis, corium*) je vazivovou částí kůže. Ve škáře probíhají krevní i mízní cévy a nervy, jsou zde uloženy vlasové kořeny, potní a mazové žlázy. V dermis je také hladké svalstvo a je bohatě cévně zásobená (zásobárna krve). Škára vybíhá proti pokožce v papily, v nichž jsou nervová zakončení (receptory), která umožňují vnímání bolesti, tepla, chladu a hmatových vjemů. [8, 9]

Podkožní vazivo (*tela subcutanea*) spojuje dermis s povrchovou fascií nebo s periostem. Je složeno převážně z tukové tkáně, jejíž tloušťka kolísá (nejsilnější na břiše, hýždích a stehnech). [5, 8]

Vazivo je typ pojivové tkáně skládající se z buněk a z mezibuněčné hmoty. Mezibuněčnou hmotu tvoří složka amorfni a složka vláknitá (fibrilární), jež je tvořena kolagenními, elastickými a retikulárními vlákny (fibrilami). Buňky ve vazivu lze rozdělit na buňky fixní (trvale ve vazivu usedlé – fibroblasty a fibrocyty, retikulární buňky, pigmentové buňky a tukové buňky) a na buňky bloudivé (makrofágy, žírné buňky, plazmatické buňky a

krvní elementy). Fibroblasty jsou schopny vytvářet amorfni i fibrilární složky mezibuněčné hmoty. Fibroblast, který přestal tvořit mezibuněčnou hmotu a setrvává v klidu, stavebně zapojen do vaziva, se nazývá fibrocyt. Fibrocyty se mohou opět aktivovat ve fibroblasty. [7]

Jednotlivé druhy vaziva se navzájem liší poměrem množství buněk, mezibuněčné hmoty a fibril a převažujícími druhy fibril a buněk. Vazivo kolagenní, ve kterém převažují kolagenní vlákna, je nejrozšířenější typ vaziva. Podle uspořádání se rozlišuje řídké vazivo (fibrilární) a tuhé vazivo (fibrózní). Mezibuněčná hmota řídkého vaziva se skládá z amorfni hmoty a z fibril, které jsou méně četné a nebývají orientovány do určitých směrů. Vedle kolagenních fibril jsou zastoupeny i fibrily elastické a retikulární. Podkoží je tvořeno řídkým vazivem obklopeným drobnými tukovými lalůčky. Tuhé vazivo kolagenní má převahu tlustých kolagenních fibril nad buňkami, vedle fibril kolagenních obsahuje i fibrily elastické. Tuhé vazivo se vyskytuje jednak jako tuhé vazivo neuspořádané, s vlákny propletenými plstovitě (např. ve škáře kůže), jednak jako tuhé vazivo uspořádané (vazy, šlachy). [7]

2.2 Oseointegrované amputační protézy

Oseointegrační chirurgie apendikulární kostry pro rekonstrukci amputovaných končetin je definována jako postup, při kterém je kovový implantát přímo ukotven ke zbytkové kosti, která je poté pomocí transkutánního konektoru přes malý otvor v kůži připevněna k protetické končetině. Tato technika si postupně získala větší uznání během téměř 30 let od prvního chirurgického zákroku s oseointegrací, který byl proveden ve Švédsku 15. května 1990. Toho dne pacient, který o deset let dříve prodělal oboustranné traumatické transfemorální amputace, měl první fázi titanového implantátu ukotvenou ve stehenní kosti. Tato technologie implantátů byla založena na práci Per-Ingvara Brånemarka, který jako první objevil, že se králičí kost pevně spojila s titanovými implantáty, což ho vedlo k vytvoření termínu „oseointegrace“ a použití titanu pro lidské zubní implantáty. Brånemark se tak stal průkopníkem v používání transkutánních protéz v zubní implantologii již v 60. letech 20. století. Technologie zubních implantátů prokázala úspěšné výsledky se šroubovými fixačními zařízeními kvůli malé velikosti kosti, vysoké vaskularitě dásně, výrazné podpoře okolních zubů, která minimalizuje torzní síly, které mohou vést k časnému uvolnění, navíc zubní implantáty jsou převážně zatěžovány axiální kompresní silou. Kloubní náhrada prokázala úspěch s lisovanými implantáty, které poskytují vysokou integrační plochu a podstatnou poréznost a spoléhají na maximální kontakt s geometrickými rysy implantátu pro zajištění rotační stability. Principy oseointegrace u amputovaných jsou srovnatelnější s principy artroplastiky než s principy stomatologie. Pro jasnost bude zbytek této práce používat termín „oseointegrace“, aby se konkrétně odkazovalo na přímé ukotvení kovového implantátu do kosti v apendikulární kostře jako prostředek k rekonstrukci amputovaných končetin nebo prstů. [1, 3]

Oseointegrační operace pomocí titanových implantátů přímo připojených ke kosti byly od začátku úspěšné. Počáteční snahy o zacementování transkutánních implantátů do kosti, provedené Dr. Vertem Mooneym a dalšími chirurgy v Rancho Los Amigos National Rehabilitation Center v Los Angeles v roce 1977, vedly k jednotnému uvolnění a infekci vyžadující včasné odstranění, stejně jako jiné dřívější experimenty. Brånemarkova technika je místo toho schopna dosáhnout pevného spojení mezi kostí a titanovým implantátem a předběžné výsledky byly tak povzbudivé, že se klinické studie brzy rozšířily na pacienty, kteří podstoupili amputaci horní končetiny. [3]

Cílem dalších studií bylo vyvinout oseointegrovanou transkutánní amputační protézu jako úspěšnou alternativu k současně standardně používaným amputačním protézám (rozhraní pahýl – objímka). [3]

Transkutánní implantáty lze považovat za cizí tělesa pronikající kůží a vykazují řadu předvídatelných způsobů selhání. Patří mezi ně marsupilizace (srůstání epitelu a tvorba kapes), avulze (mechanicky vyvolané selhání) a infekce. Marsupilizace je jev pozorovaný kolem transkutánních implantátů v důsledku migrace epiteliálních buněk, která způsobuje zmenšování kolem překážky pronikající kůží, aby se obnovila kontinuita ve vrstvách kůže. Srůstání (růst epitelu podél implantátu směrem ke kosti) tak nastává jako přímý důsledek normální reakce hojení ran k regeneraci ochranné bariérové funkce kůže. U transkutánních implantátů má srůstání epitelu obvykle za následek selhání implantátu v důsledku infekce. [1, 2]

Pozoruhodným jevem, který zlepšuje zkušenost pacienta s oseointegrovanou amputační protézou, je oseopercepce. Oseopercepce je pocit vznikající při mechanické stimulaci protézy ukotvené v kosti, je přenášen mechanoreceptory pravděpodobně umístěnými ve svalech, kloubech, kůži a dalších tkáních sousedících s kostí, které vedou do centrálního nervového systému, aby způsobily pasivní uvědomění si vlastní senzomotorické polohy a funkce. Clemente a kol. [10] zkoumali roli hmatu i sluchu v oseopercepci, vibrační podnět byl dodán přímo do kosti pomocí transkutánní komponenty (kůží pronikající část implantátu). Ukázalo se, že se na oseopercepci podílí nejen hmat, ale i sluch. Je zřejmé, že oseointegrované protézy umožňují lepší detekci vibrací ve srovnání s protézami pahýl-objímka. Tento zlepšený pocit může být částečně způsoben inervací v nově integrované kosti. [3, 10]

Byla vyvinuta celá řada oseointegrovaných transkutánních implantačních systémů pro připojení amputačních protéz končetin, avšak pro účely této rešerše bylo vybráno šest systémů tak, aby mohly být prozkoumány různé metody používané pro oseointegraci a transkutánní rozhraní. Vybrané oseointegrované amputační protézy jsou porovnány v Tab. 2 a jsou jednotlivě diskutovány níže.

Tab. 2: Srovnání oseointegrovaných implantačních systémů pro připojení amputačních protéz končetin. Převzato z [3, 4].

	OPRA	ILP	OPL	Kompresní zařízení	POP	ITAP
Materiál	Ti6Al4V	CoCrMo	Ti6Al4V	Ti6Al4V	Ti6Al4V	Ti6Al4V
Retence	Pomocí závitu	Lisování	Lisování	Transverzální čepy/axiální komprese	Lisování	Lisování
Anatomická vhodnost	Dlouhé kosti, prsty	Dlouhé kosti	Dlouhé kosti, pánev	Femur, humerus	Femur	Femur, humerus
Rozhraní kost-implantát	Leptané laserem	„Spongiosa metal“	Plazmový nástřik Ti	Porézní povlak hydroxyapatitu/axiální komprese	Porézní povlak Ti	Hydroxyapatit
Rozhraní kůže-implantát	Leštěné	Leštěné	Leštěné	Porézní povrch Ti/Leštěné	Leštěné	Hydroxyapatit
Chirurgické fáze	1 nebo 2	2	1 nebo 2	1 nebo 2	2	1
Celková doba zotavení (měsíce)	3-18*	2,5-4,5	4,5	Nespecifikováno	Nespecifikováno	Nespecifikováno

*12–18 měsíců u transfemorálních a transtibiálních amputací, 10–12 měsíců u transhumerálních amputací, 9 měsíců u transradiálních amputací a 3 měsíce u amputací palce

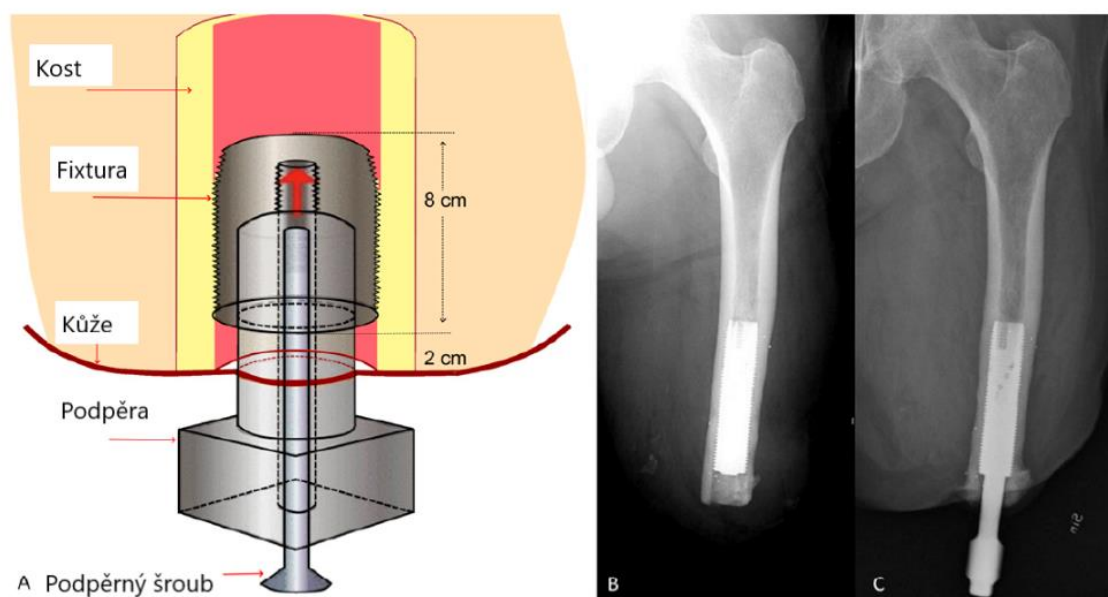
Očekává se, že celosvětový zájem o oseointegrované amputační protézy u pacientů po amputaci v nadcházejících letech výrazně vzroste. Dále bude v této práci zaměřena pozornost především na oseointegraci dolních končetin (transfemorální a transtibiální),

protože představuje drtivou většinu současných a budoucích chirurgických oseointegračních zákroků po celém světě. [3]

2.2.1 OPRA

Oseointegrované protézy pro rehabilitaci amputovaných (OPRA, Integrum AB, Mölndal, Sweden) se vyvinuly z prvního oseointegračního chirurgického zákroku provedeného v roce 1990 pod vedením Rickarda Brånemarka. OPRA byla implantována především pacientům s transfemorálními amputacemi, s menším počtem amputací transhumerálních, transradiálních, prstů nebo palce a transtibiálních amputací. [3]

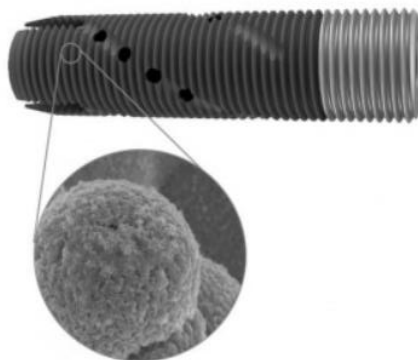
OPRA je nejstarší existující oseointegrační implantát a byl vyvíjen více než 3 desetiletí s nepřetržitým klinickým používáním, výzkumem a vývojem. Ze všech oseointegračních technik má OPRA nejdelší dostupné údaje o sledování pacienta. OPRA se skládá ze tří komponent: (1) plně implantovatelná komponenta s vnějším závitem, válcovitá, známá jako „fixtura“, kde dochází k oseointegraci, (2) transkutánní komponenta zvaná „podpěra“, která je zalisována do distálního konce fixtury, proniká kůží pomocí vytvořené stomie (kruhový kožní otvor) a její distální část slouží k připevnění protézy končetiny a (3) „podpěrný šroub“ (Obr. 5A). Takový závitový implantát se původně používal u dentálních implantátů. Zatížení se přenáší z protézy na podpěru, poté z podpěry na fixturu a nakonec z fixtury na kost. Implantace se běžně provádí ve dvou samostatných operacích s odstupem 6 měsíců, ale lze ji také provést v jedné operaci u pacientů, kteří mají přijatelnou kvalitu a poddajnost kosti (Obr. 5B a 5C). [3, 4, 11]



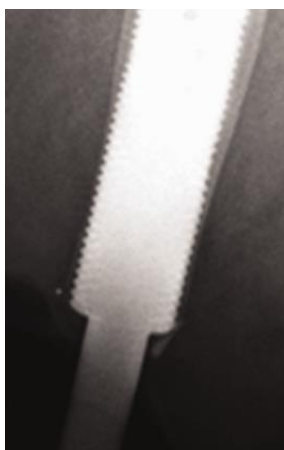
Obr. 5: A – Schéma OPRA. B – Rentgenový snímek během 1. fáze implantace. C – Rentgenový snímek po umístění podpěry (2. fáze implantace). Převzato z [3].

Implantační systém OPRA prošel od svého zavedení několika konstrukčními změnami. Materiál byl změněn z komerčně čistého titanu na pevnější lékařskou titanovou slitinu Ti6Al4V. Byla přidána laserem indukovaná nanoporézní struktura povrchu vnější části fixtury nazvaná BioHelix™ (Obr. 6) pro zlepšení oseointegrace. Kromě konstrukčních změn byla upravena i chirurgická technika pro amputace dolních končetin tak, že

implantovaná fixtura má být zapuštěná 20 mm do kosti, aby se vyřešil problém distální kostní resorpce, která byla někdy pozorována, když byla fixtura umístěna v rovině s distálním koncem kosti (Obr. 7) a ke snížení rizika infekce na rozhraní kost-fixtura. [4]



Obr. 6: Fixtura systému OPRA. Vnější povrch v tmavě šedé oblasti je upraven pro zvýšení oseointegrace. Detailní pohled ukazuje nanostrukturu povrchové úpravy BioHelix™. Převzato z [4].



Obr. 7: Ztenčení kompaktní kosti v distálních zónách. Převzato z [11].

Transkutánní součástí systému OPRA je podpěra, která má hladký leštěný povrch pro minimalizaci kontaktu a tření na rozhraní kůže-implantát. Vnější závit fixtury systému OPRA je leptaný laserem, aby se podpořilo prorůstání kosti do povrchu fixtury a tím se zvýšila pevnost na rozhraní kost-implantát. [3, 4]

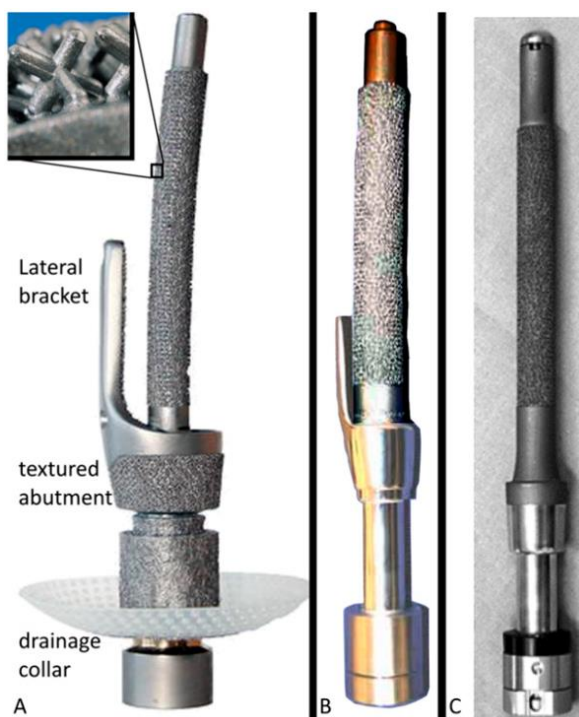
Protože selhání fixtury vyžaduje velký chirurgický zákrok, byl systém navržen tak, aby zajistil frakturu podpěry a podpěrného šroubu před frakturou fixtury nebo kosti, pokud by byl systém vystaven nadměrné zátěži, protože tyto komponenty se vyměňují snadněji než fixtura. Kromě toho jsou systémy dolních končetin a transhumerální systémy chráněny bezpečnostním zařízením, které je připevněno mezi distální konec podpěry a protézu končetiny. Bezpečnostní zařízení automaticky uvolní spojení s vnější protézou, pokud je vystaveno nadměrnému zatížení, a tak chrání systém implantátu před vystavením silám způsobujícím poruchy. [4]

Byly hlášeny revize podpěry a podpěrného šroubu [4], ale v dostupné literatuře nebylo publikováno žádné měření míry mechanického selhání. Pitkin (2013) napsal, že riziko infekce kůže zůstává pro systém OPRA nevyřešeným problémem [11].

Implantační systém OPRA byl vylepšen na transhumerální úrovni. Oseointegrované rozhraní umožnilo připojení protézy paže ke kosti, nervům a svalům pacienta. Tento neuroprotetický systém umožňuje pacientům obsluhovat protetickou paži v každodenním životě a přijímat sensorickou zpětnou vazbu prostřednictvím přímé nervové stimulace. [4]

2.2.2 ILP

Integrální protéza nohy (ILP, Orthodynamics GmbH, Lübeck, Germany) se vyvinula z implantátu Endo-Exo (ESKA Orthopedic Handels, Lübeck, Germany) pro dvoustupňovou implantaci. ILP implantační systém byl navržen pro pacienty s transfemorální amputací, ale byla popsána i tibiální a humerální implantace. Implantát má dřík ze slitiny kobaltu, chromu a molybdenu, je mírně zakřivený, aby se zabránilo rotaci v intramedulární dutině a aby se přizpůsobil normálnímu zakřivení femuru. Od svého zavedení prošel systém několika konstrukčními změnami. Jak intramedulární část implantátu, tak subdermální část byly zpočátku pokryty makroporézním povrchem o tloušťce 1,5 mm, známým jako „Spongiosa Metal“ (trojrozměrná mřížková struktura, detailní pohled Obr. 8A). Implantát měl také držák, který se ovinul kolem kortikální kosti distálně (Obr. 8A a 8B). Protože bylo zjištěno, že držák a makroporézní povrch směrem k měkké tkáni způsobují komplikace, byly u dalších provedení odstraněny (Obr. 8B a 8C). Poslední design, přejmenovaný na ILP (Obr. 8C), byl představen v Německu v roce 2009 a následně v Nizozemsku v roce 2009 a v Austrálii v roce 2010. Mechanická selhání intramedulárního implantátu byla hlášena ve všech třech zemích. [3, 4]



Obr. 8: Protéza Endo-Exo (Obr. 3A a 3B, převzato z [3]) a ILP (Obr. 3C, převzato z [4]).

V systému ILP sestává transkutánní rozhraní z dvoukružového adaptéru a u některých provedení také z distálního konce implantátu. Transkutánní povrch implantátu ILP je hladce leštěný a má keramický povlak z oxynitridu titanu a niobu, jehož cílem je minimalizovat adhezi měkkých tkání na transkutánním rozhraní a podporovat hladké

klouzáni měkkých tkání, zatímco na rozhraní kost-implantát má systém ILP makroporézní povrch „Spongiosa Metal“. [3, 4]

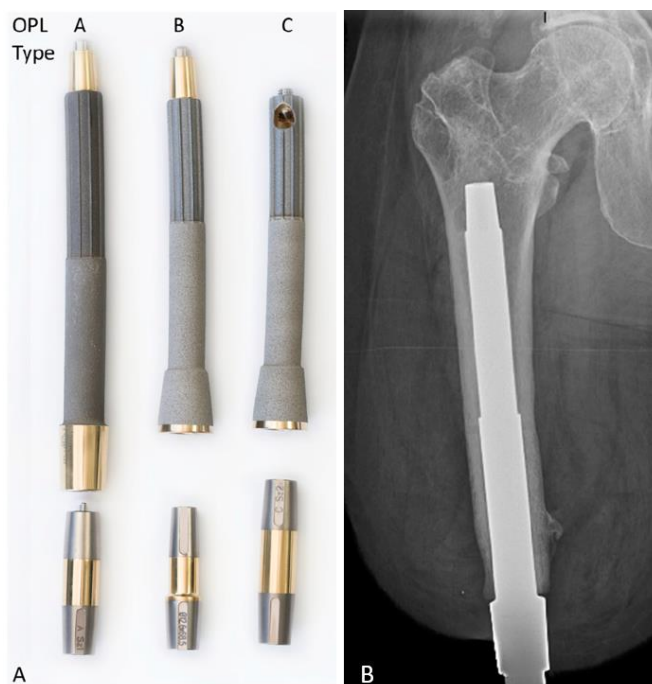
Těžiště komplikací u všech transkutánních oseointegrovaných protetických systémů leží v oblasti stomie, tedy tam, kde protéza proniká kůží, a je tedy z velké části zodpovědná za funkčnost protézy a tím i spokojenost pacienta. Přesto se ukázalo, že je riziko vzestupných infekcí nízké. V retrospektivní 6leté analýze pacientů s transfemorální ILP bylo nalezeno pouze 9 % revizí stomie. To může být způsobeno bakteriální kolonizací stomie. Testy stěru ukázaly, že stomický kanál a otvor jsou okamžitě kolonizovány bakteriemi, z nichž některé mají dokonce ochranný charakter. Mikroflóra vykazovala zajímavou dynamiku, ale během 12 měsíců se přizpůsobila kožnímu prostředí okolní kůže. Dynamické změny stomie ve fázi hojení a tvořící se neoslizniční membrána jsou zranitelnou fází, která vyžaduje pečlivou lékařskou kontrolu. Stejně tak na straně pacienta jsou pokyny k hygienickým opatřením, výuka základů péče o stomie a rozpoznání známek zánětu důležitými opatřeními ke kontrole komplikací. [12]

2.2.3 OPL

Oseointegrovaná protetická končetina (OPL, Permedica s.p.a., Milan, Italy) se vyvinula ze zkušeností s ILP. OPL byla navržena pro jednostupňovou implantaci Al Muderisem, který začal OPL navrhovat v roce 2010 a komerčně se stala dostupnou v roce 2014. Od vývoje jednostupňového protokolu v roce 2014 mají téměř všichni pacienti místo dvoustupňového chirurgického výkonu jednostupňový chirurgický zákrok, po kterém následuje standardizovaný rehabilitační protokol. [3, 4]

Změny od posledního designu implantátu ILP k designu implantátu OPL zahrnují změnu materiálu ze slitiny kobaltu, chromu a molybdenu na titanovou slitinu Ti6Al4V, zavedení podélných drážek na intramedulární části implantátu proximálně, které zajišťují počáteční rotační stabilitu a změnu z makroporézního povrchu „Spongiosa Metal“ na plazmou nastříkaný hrubý titanový povlak distálně, kde je žádoucí oseointegrace. [4]

OPL byl zaveden v Austrálii v roce 2013 a v Nizozemsku v roce 2015. Systém se používá pro úrovně transfemorální nebo transtibiální amputace. Tento implantační systém má tři provedení (Obr. 9). Typ A a typ B má proximální adaptér, který v případě potřeby připojí artroplastický nástavec. Typ C je nejvhodnější pro krátké femorální zbytkové kosti. Proximálně je vyvrtán pod úhlem 135° otvor k přijetí šroubu krčku femuru, který lze profylakticky použít k prevenci zlomenin krčku femuru. [3, 4]



Obr. 9: A – Fotografie OPL, existují tři provedení. B – Rentgenový snímek OPL typu A u pacienta, který podstoupil amputaci femuru. Převzato z [3].

Rozložení makroporézního povrchového povlaku ILP podporovalo distální kostní resorpci v důsledku tzv. stress shielding efektu. Implantát OPL zahrnuje moderní konstrukční prvky jak v geometrii, tak v charakteristikách povrchu, které byly speciálně zavedeny pro zvýšení dlouhodobé stability a minimalizaci nežádoucích účinků stress shielding efektu. Intramedulární dřík má plazmou nastříkaný hrubý titanový povlak pro podporu oseointegrace, který je rozložen tak, aby podporoval ztlustění distální kompaktní kosti. Proximální konec dříku má hladký povrch s několika podélnými ostrými drážkami (výška 1 mm), které poskytují počáteční rotační stabilitu proříznutím kompaktní kosti během implantace. Distální polovina dříku je potažena plazmou nastříkaným titanem pro podporu fixace implantátu prorůstáním kosti do povrchu implantátu, stejně jako límec pro zajištění počáteční axiální stability. [13]

Stejně jako u implantačního systému ILP sestává i u systému OPL transkutánní rozhraní z dvoukružového adaptéru a u některých provedení také z distálního konce implantátu. Na rozhraní kůže-implantát je povrch systému OPL hladce leštěn a keramicky povlakován oxynitridem titanu a niobu, jehož cílem je minimalizovat adhezi měkkých tkání na transkutánním rozhraní a podporovat hladké klouzání měkkých tkání. [3, 4]

Studie Al Muderise a kol. [13] je retrospektivní analýzou klinických dat 22 pacientů, kteří dostali implantát OPL pro transfemorální amputaci v období od prosince 2013 do listopadu 2014. Závažné nežádoucí účinky po oseointegrované rekonstrukci s použitím implantátu OPL byly vzácné. Během průměrné doby sledování (14 měsíců) se vyskytlo 15 případů lehké infekce u 12 pacientů, všechny případy infekcí reagovaly uzdravením na perorální nebo intravenózní podání antibiotik. Během doby sledování nebyly zaznamenány žádné případy revizní operace, zlomeniny nebo selhání implantátu. Krátkodobé klinické výsledky ukázaly významné zlepšení pooperační kvality života a funkce, což bylo spojeno s nízkým rizikem závažných nežádoucích účinků. Ačkoli jsou k potvrzení těchto zjištění

zapotřebí další důkazy, implantát OPL má potenciál být široce využíván jako vylepšený oseointegrační systém pro rekonstrukci amputovaných končetin. [13]

2.2.4 POP

Perkutánní oseointegrovaná protéza (POP, DJO Global, Austin, USA) byla vyvinuta v Salt Lake City, USA a je stále ve fázi vývoje (Obr. 10). POP je vyrobena z titanové slitiny, zachovává si společné rysy s dříkem endoprotézy kyčelního kloubu s plazmou nastříkaným povlakem. Oseointegrace nastává na několika centimetrech dříku distálně, zbytek proximální části implantátu slouží pouze pro zarovnání v kosti. Cílem této omezené integrace je vyhnout se stress shielding efektu. POP a Kompresní zařízení jsou novější systémy a chirurgická technika nebo rehabilitační pokyny dosud nebyly zveřejněny. [3, 4]



Obr. 10: Fotografie POP. Převzato z [3].

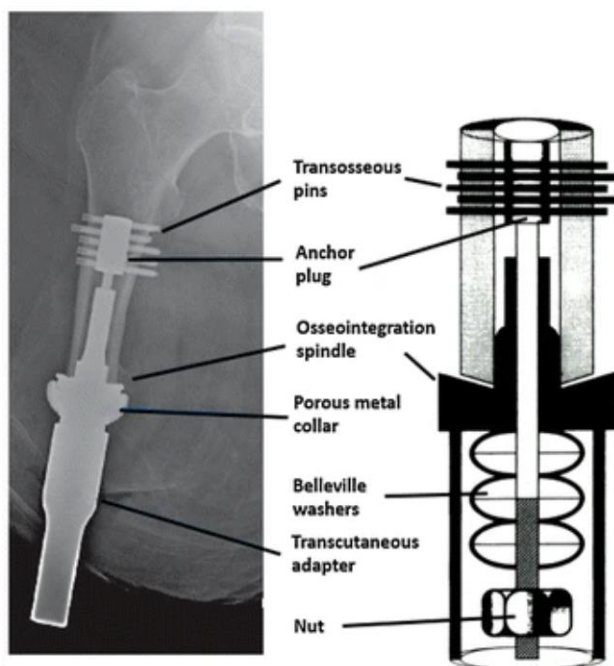
Distální oblast dříku POP je včetně límce na rozhraní s distálním koncem kosti pokryta porézní vrstvou čistého titanu. Na transkutánním rozhraní systému POP je nanesen hladký oxid niobu s cílem inhibovat adhezi kůže k implantátu. [3, 4]

Systém POP je v současné době hodnocen v rané studii proveditelnosti u 10 subjektů s transfemorální amputací. Pokusům na lidech předcházely studie na zvířatech, avšak implantační systém použitý při pokusech na zvířatech se značně liší od návrhu lidského systému. [4]

2.2.5 Kompresní zařízení

Kompresní zařízení bylo původně navrženo jako endoprotetický systém pro rekonstrukci končetin u pacientů s kostními nádory společností Zimmer Biomet (Zimmer Biomet, Warsaw, USA), pro kterou se stále používá, a od té doby byl upraven tak, aby se stal transkutánním implantačním systémem (Obr. 11). Intramedulární část implantátu je připevněna ke kosti příčnými kolíky, úzký dřík se stěn dřeňové dutiny jen minimálně dotýká. Porézně potažený límec určený k podpoře oseointegrace je umístěn na distálním rozhraní amputované kosti. Konstrukce s příčnými kolíky umožňuje zařízení se šroubem a maticí

přenášet sílu z pružinového systému Belleville (řada naskládaných podložek) přímo na konec zbytkové kosti, což má za následek tlakovou sílu na rozhraní kost-límec, pro kterou byl produkt pojmenován. K implantaci Kompresního zařízení je možné použít jednostupňové i dvoustupňové chirurgické operace. [3, 4]



Obr. 11: Rentgenový snímek kompresního zařízení se schematickým znázorněním, ukazujícím pružinový systém. Převzato z [4].

Kompresní zařízení spoléhá na skutečnost, že kost pod zátěží sílí (kost je živý orgán a tkáň, která reaguje na mechanickou zátěž biologickým způsobem podle Wolffova zákona). Kompresní zařízení je navrženo tak, aby zpevnilo zbytkovou kost tím, že způsobí kostní hypertrofii v důsledku tlakové síly na rozhraní kost-límec. [14, 15]

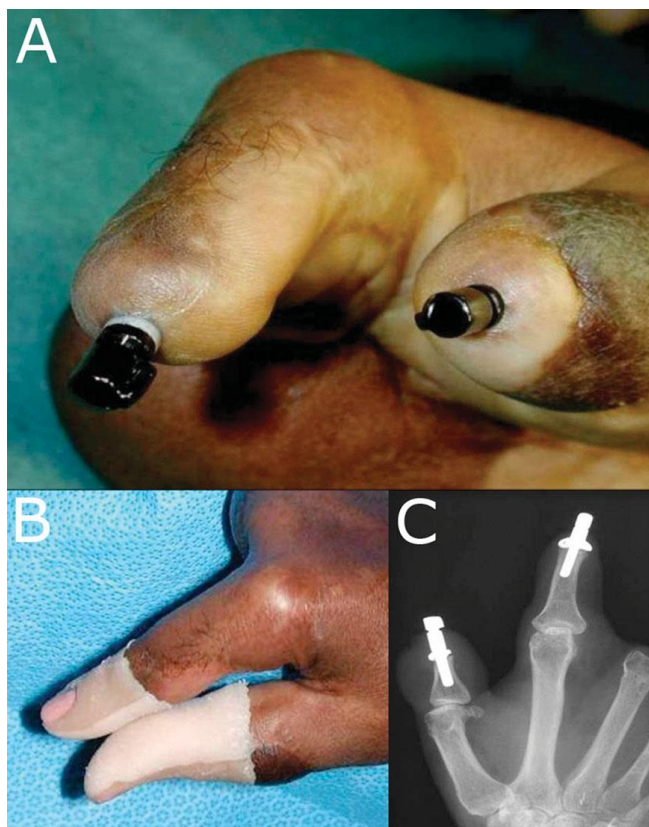
Kompresní zařízení využívá porézní hydroxyapatitový povlak límce v kombinaci s tlakovou silou 1,8-3,6 kN přes rozhraní kost-límec implantátu. Axiální tlakové síly až do 3,6 kN na rozhraní kost-límec se ukázaly být nejen bezpečné, ale také napomáhající oseointegraci. Porézní subdermální povrch z titanu distálně od kosti podporuje integraci měkkých tkání a poskytuje implantátu těsnění měkkých tkání. Transkutánní rozhraní kompresního zařízení se vyznačuje hladkým povrchem s nízkým třením. [3, 4, 15]

McGough a kol. [15] vyhodnocovali stav u 11 lidských subjektů po dobu pěti let. Byly hlášeny dvě periprotetické zlomeniny způsobené pádem, ale nebyly zaznamenány žádné infekce a nebyly pozorovány žádné případy uvolnění součástí. Robustní bariéra měkkých tkání zcela utěsnila transkutánní rozhraní, což možná vysvětluje nepřítomnost infekcí. Protože pacienti s transfemorální amputací v podstatě nezatěžují distální část zbytkové kosti, je osteoporóza zbytkové kosti běžná. Důsledkem obnovení pohybové funkce zbytkové kosti a vyvolání hypertrofie vlivem kompresního zařízení by mohla být eliminace osteoporózy z nečinnosti a eliminace stress shielding efektu. [15]

2.2.6 ITAP

Intraoseální transkutánní amputační protéza (ITAP, Stanmore Implants Worldwide, Watford, United Kingdom) je zařízení, které bylo vyvíjené ve Spojeném království podle biomimetického modelu – hlavním cílem bylo replikovat rozhraní kůže-implantát, které je vidět u zvířecích paroží, což je biologický příklad tvrdé tkáně vyčnívající přes kůži a zároveň odolávající infekci. ITAP byla navržena pro dosažení oseokutánní integrace. Oseokutánní integrace se liší od oseointegrace, protože cílem je vytvořit stabilní rozhraní mezi implantátem, kostí i měkkými tkáněmi. Podobně jako ostatní implantační systémy, s výjimkou ILP, je implantát vyroben z titanové slitiny Ti6Al4V. Aby byla ITAP úspěšná musí podporovat kostní i dermální integraci. [3, 4, 16]

ITAP (Obr. 12) má na intramedulární distální části implantátu povlak z hydroxyapatitu (HA) pro podporu prorůstání kosti do povrchu implantátu. Transkutánní rozhraní je stabilizováno subdermální perforovanou přírubou s HA povlakem, což umožňuje prorůstání měkkých tkání a přišití ztenčené kůže k přírubě, aby se minimalizoval relativní pohyb. Distálně od porézní příruby je čep pro připevnění vnější protézy potažen povlakem DLC (Diamond like Carbon) s nízkým třením, který snižuje ulpívání bakterií. Přestože pokusy na zvířatech byly slibné, pokusy na lidech vedly k problémům s rozpadem rozhraní hydroxyapatitu, což vedlo k selhání implantátu a infekci. [3, 4, 16]

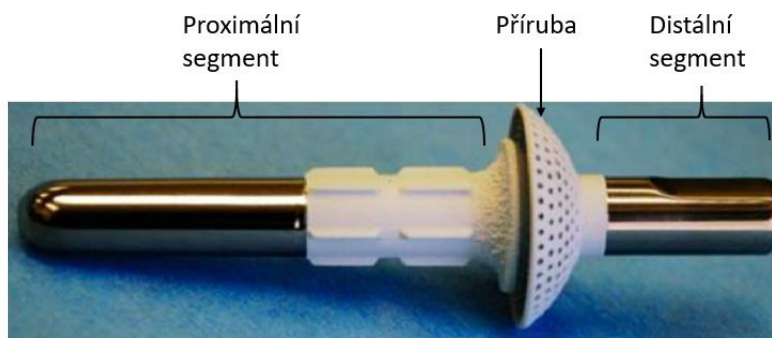


Obr. 12: Aplikace ITAP v lidském palci a ukazováčku. Fotografie (A) a (B) demonstrují vzhled in vivo s exoprotézou a bez ní. (C) je dorzopalmární rentgenový snímek ruky téhož pacienta ukazující intraoseální dřík a subdermální přírubu zařízení ITAP in situ. Převzato z [17].

ITAP bude věnována následující samostatná kapitola, sloužící k prozkoumání způsobů, jakými bylo u ITAP vyvíjeno transkutánní rozhraní založené na dermální integraci k dosažení biologického těsnění mezi lidskou kůží a implantátem.

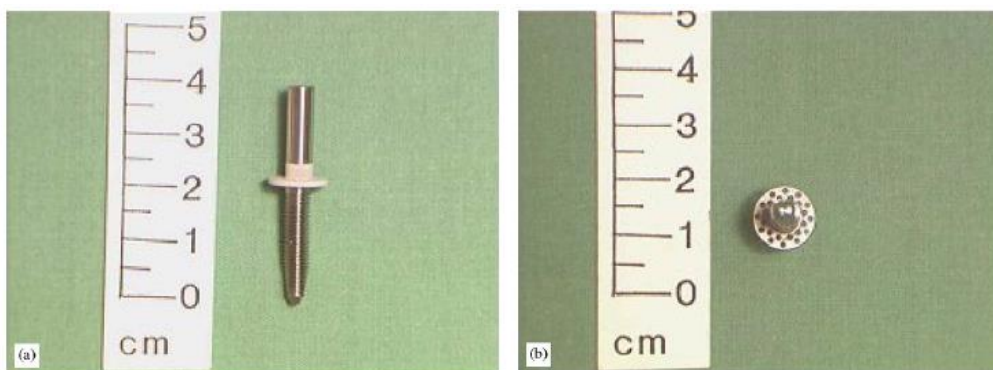
2.3 Intraoseální transkutánní amputační protéza (ITAP)

ITAP má dvě biologické funkce: podporovat kostní a dermální integraci na rozhraní končetiny a implantátu, čímž se dosáhne trvalého biologického těsnění a mechanickou funkci spojení končetiny s exoprotézou. ITAP je vyroben jako jedna integrovaná jednotka a skládá se ze 3 segmentů. Každý segment má specializované biologické a/nebo mechanické vlastnosti, aby splnil své požadované funkce (Obr. 13). Proximální segment plní funkci intraoseálního dříku, distální segment slouží pro připojení exoprotézy k implantátu, mezi nimi je umístěna porézní příruba sloužící k prorůstání měkkých tkání a přichycení kůže. [4, 17]



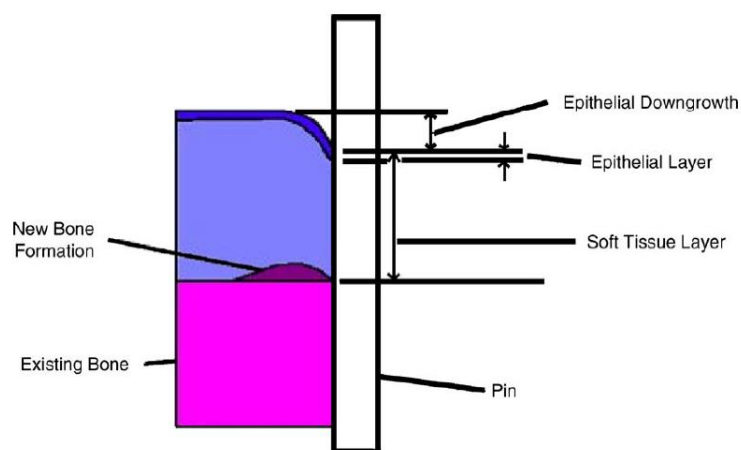
Obr. 13: Ukázka designu ITAP. Převzato z [3] a upraveno.

Pendegrass a kol. [1] si kladli za cíl určit optimální biomateriály a design implantátu potřebný k tomu, aby se ITAP stala funkční klinickou alternativou k amputačním protézám pahýl-objímka. Byly testovány dva návrhy implantátů (rovné a přírubové) ze slitiny titanu Ti6Al4V. Strojově dokončené rovné kolíky (s předepsanými drsnostmi povrchů) byly použity jako základní prvky. Byly testovány rovné pískované implantáty (otryskání pískem z oxidu hlinitého), implantáty s hydroxyapatitovým (HA) povrchem (plazmou nastříkaný povlak tloušťky 70 μm) a drážkované implantáty. Drážkované a opískované implantáty byly také testovány s 2–4 μm povlakem DLC – povlak na bázi uhlíku (potah s nízkou povrchovou energií používaný k zabránění adheze bakterií). Dále byly testovány rovné porézní titanové implantáty, které byly vyrobeny plazmovým nástřikem strojově dokončených implantátů se 70–100 μm silnou porézní titanovou vrstvou a byly kombinovány s HA nebo DLC. Všechny povlaky byly aplikovány na oblast implantátu v kontaktu s kožními vrstvami dermis a epidermis, kromě povlaku DLC, který byl omezen na část implantátu, která nebyla v kontaktu s kůží. Příruba byla začleněna do designu rovného implantátu, aby se zvětšila povrchová plocha pro adhezi měkkých tkání a zabránilo se růstu epitelu podél implantátu směrem ke kosti. Perforovaná příruba byla umístěna bezprostředně pod epiteliální vrstvou in situ, do příruby byly vyvrtány otvory, aby se dále zvětšila plocha pro připojení měkkých tkání. Přírubové implantáty byly testovány s přírubou povlakovanou HA (tloušťka povlaku 70 μm) a s hladkou přírubou (Obr. 14). [1]



Obr. 14: Obrázky znázorňující vzhled konstrukce implantátu s přírubou povlakovanou HA (a) a z půdorysu, zobrazující provedení s hladkou přírubou (b). Převzato z [1].

Implantáty byly chirurgicky implantovány do tibií skeletálně dospělých koz (plemeno Sarnaan). Kvantitativní analýza byla provedena měřením růstu epitelu směrem ke kosti (mm), % přichycení epitelu a % přichycení dermálních měkkých tkání (Obr. 15). [1]



Obr. 15: Schematické znázornění hodnot zaznamenaných pro kvantitativní hodnocení dermální integrace. Převzato z [1].

HA povlak (používán také pro podporu oseointegrace) rovných implantátů zlepšil integraci subepiteliální tkáně. Ukázalo se, že DLC je stejně biokompatibilní jako komerčně čistý titan a významně snižuje bakteriální kolonizaci a tvorbu biofilmu in vivo, nicméně DLC byl aplikován na implantát tak, že přiléhal k měkkým tkáním epidermis a dermis, čímž se snižuje jejich připojení (snižuje adhezi fibroblastů). Kolem implantátů strojově dokončených a hrubě opískovaných se epidermis nikdy nedotýkala povrchu implantátu a končila v dermis. Kolem rýhovaných implantátů byly pozorovány fibrinózní exsudáty a krevní sraženiny, které podporovaly tvorbu zánětlivých buněk. Přichycení subepiteliální vrstvy bylo sporadické a bylo obecně pozorováno na vrcholech rýh a chybělo v prohlubních. Ve všech případech epidermis končila v dermis, daleko od povrchu implantátu. Porézní a rýhované biomateriály mají potenciál podporovat prorůstání měkkých tkání, přičemž velikost pórů a rýh je pro jejich úspěch rozhodující (předpokládá se, že tam, kde měly póry dostatečnou velikost, bylo zjevné vrůstání tkáně). Tato studie prokázala, že pokud je dosaženo přichycení dermální a nikoli epiteliální vrstvy, je inhibováno srůstání epitelu směrem ke kosti. Rozhraní mezi dermis a přírubovými implantáty musí být takové, které utěsní rozhraní pomocí připojení dermálních buněk. Pokud by nebyly připojeny dermální

buňky, epiteliální buňky by nadále migrovaly mezi dermis a povrchem implantátu. Příruba, která byla umístěna pod epitelem, poskytla zvětšenou povrchovou plochu pro připojení dermální tkáně, snížila relativní pohyb na rozhraní a zpomalila srůstání epitelu směrem ke kosti. [1]

Zub je přirozeným analogem transkutánního implantátu a má subepiteliální tkáň pevně připojené k omezení relativního mezifázového pohybu mezi dásní a povrchem zubu. Předpokládá se, že eliminace relativního mezifázového pohybu mezi měkkými tkáněmi a implantátem je nezbytným předpokladem pro ITAP. [1]

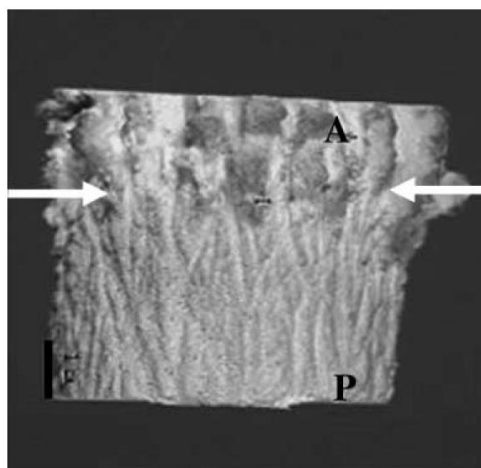
DLC (Diamond like Carbon) je název pro širokou škálu modifikací povlaků na bázi uhlíku. Pomocí různých poměrů složek a přidáváním dalších prvků, jako jsou kovy (titan, stříbro) nebo nekovové prvky (křemík, kyslík, fluor nebo jiné), se může měnit tak, aby poskytoval řadu různých vlastností podle požadavků aplikace. Povlaky DLC vynikají vysokou tvrdostí, nízkým koeficientem tření, odolností proti opotřebení a chemickou inertností, také jsou biokompatibilní a hemokompatibilní. Tyto vlastnosti a jejich kombinace jsou významné pro různé technické aplikace. Pro své vlastnosti jsou DLC povlaky využívány v různých biomedicínských aplikacích, mezi ně patří arteriální stenty, vodící dráty, jehly pro oční chirurgii, které používají povlaky DLC, protože zachovávají ostrost jehly a vyžadují menší tlak k pronikání do tkáně oka, kontaktní čočky byly používány s povlaky DLC kvůli jejich schopnosti zamezit tvorbě biofilmu, ortopedické aplikace a další. [18, 19]

Pendegrass a kol. [2] využili jelení parohy jako biomimetický model pro vývoj nového designu ITAP. Poznatky ze studie morfologie jeleního paroží byly použity k vývoji amputační protetiky, která napodobuje jejich strukturu a vytváří těsné rozhraní mezi implantátem a měkkými tkáněmi.

Lidské tělo se vyvinulo tak, aby udržovalo homeostázu prostřednictvím kůže a sliznic, které oddělují vnitřní prostředí od vnějších patogenů. Jen málo struktur přirozeně proniká do těchto „obalů“ a zuby jsou jedinou výjimkou u lidí. Pokusy prolomit tyto bariéry, vyvinout amputační protézy pronikající kůží, ukotvené v kosti, mohou vést k invazi mikroorganismů a následné infekci, která může ohrozit život jedince. Existuje jen několik fascinujících příkladů, kdy je integrace jiných druhů přerušena bez takových strašných následků a jelení paroh je jedním z takových případů. [2]

Parohy jsou struktury, které rostou z kostěných pediklů vycházejících z čelních kostí lebky samců většiny členů čeledi jelenovitých. Parohy jsou přirozenou obdobou transkutánních implantátů, protože úspěšně překonávají problémy spojené s pronikáním kožní bariérou, i když transkutánní rozhraní u jeleního paroží existuje jen přechodně. [2]

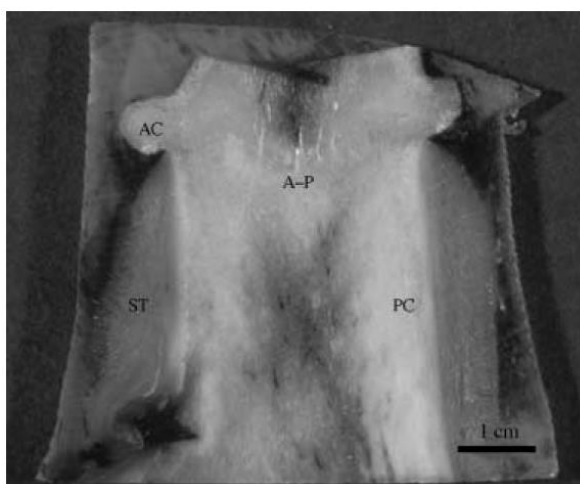
Během růstu jsou parohy pokryty měkkou chlupatou kůží (samet) opatřenou bohatou zásobou cév. Důkazy ukazují, že růst paroží je úzce spojen s hladinami cirkulujícího testosteronu. Jakmile jsou parohy plně dospělé, hladina androgenu stoupá a samet se „prolévá“ a ztrácí. To ponechává vnější paroží holé během období páření, a právě v tomto období existuje transkutánní rozhraní mezi kůží a spojením paroží a pediklu (Obr. 16). Pro účely studie [2] bylo toto období označováno jako „transkutánní fáze“. Parohy jsou v období říje extrémně zatěžovány, a přesto zůstává bariéra kůže – kost neporušená. [2]



Obr. 16: Vzorek paroh – pedikl (transkutánní fáze) po maceraci prokazující výrazný rozdíl v morfologii na rozhraní mezi paroží (A) a pediklovou (P) kostí. Bílé šipky vymezují polohu připojení epiteliální vrstvy. Měřítko = 1 cm. Převzato z [2].

Pedikl je podkožní živá kost, která se stává zjevnou kolem začátku puberty a vyrůstá z buněk čelní kosti lebky jelena. Kost pediklu prochází kontinuální remodelací během cyklu parohu. Během transkutánní fáze však dermální tkáň přilnou k pediklu s dostatečnou silou, aby se zabránilo infekci, marsupilizaci a konečnému selhání rozhraní měkké a tvrdé tkáně. Příroda vyvinula biologické mechanismy k ochraně před bakteriální infekcí prostřednictvím mechanické stabilizace rozhraní. Jako přirozená struktura představují parohy analog pro vývoj transkutánních implantátů pro muskuloskeletální systém. [2]

Vzorky paroží jelena obecného byly získány během transkutánního cyklu paroží a byly podrobeny histologickým testům. Ze vzorků byly vyříznuty podélné řezy (Obr. 17). [2]

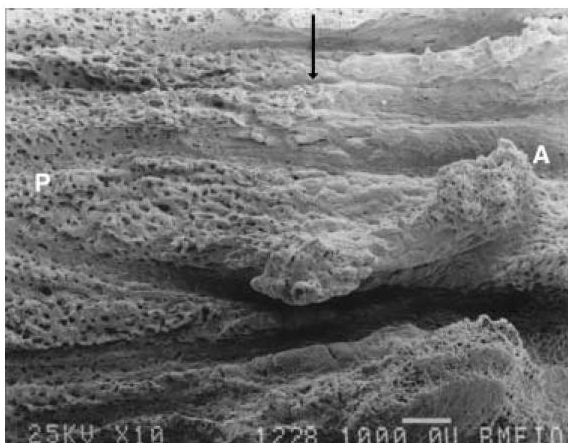


Obr. 17: Podélný řez vzorkem paroh-pedikl s měkkými tkáněmi (ST) připojenými na rozhraní paroh-pedikl (A–P) bezprostředně pod korunkou parohu (AC). Měkké tkáně vykazují kontinuální spojení s pedikulární kostí (PC). Měřítko = 1 cm. Převzato z [2].

U všech vzorků bylo pozorováno souvislé těsné rozhraní mezi měkkými tkáněmi a pedikulární kostí. Byla pozorována četná silná Sharpeyova vlákna orientovaná kolmo k povrchu pediklu, vycházející z pórů pediklu a pokrývající rozhraní dermální měkké tkáně a pediklu. Tato vlákna vytvořila těsné rozhraní mezi pediklovou kostí a subepiteliálními

dermálními tkáněmi. Epiteliální vrstva se propojila s pediklovou kostí bez známek prorůstání do spodní dermální tkáně. [2]

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) bylo pozorováno, že během transkutánní fáze parožního cyklu se paroží a pediklová kost významně liší, pokud jde o morfologii, frekvenci pórů a velikost (Obr. 18). Zjistilo se, že povrch pediklu je vysoce porézní, s výrazně větším počtem pórů ve srovnání s parohem. Pedikl měl výrazně větší póry ve srovnání s parohem. Průměrný průměr pórů byl $217.22 \pm 19.07 \mu\text{m}$ pro povrch pediklu a $40.14 \pm 3.17 \mu\text{m}$ pro povrch parohu. [2]



Obr. 18: SEM mikrofotografie rozhraní paroží (A) a pediklu (P), prokazující jasnou hranici mezi morfologií v linii připojení epitelu (šipka). Pedikl (P) má vyšší frekvenci větších pórů ve srovnání s parohem (A). Zvětšení obrazu $\times 10$. Převzato z [2].

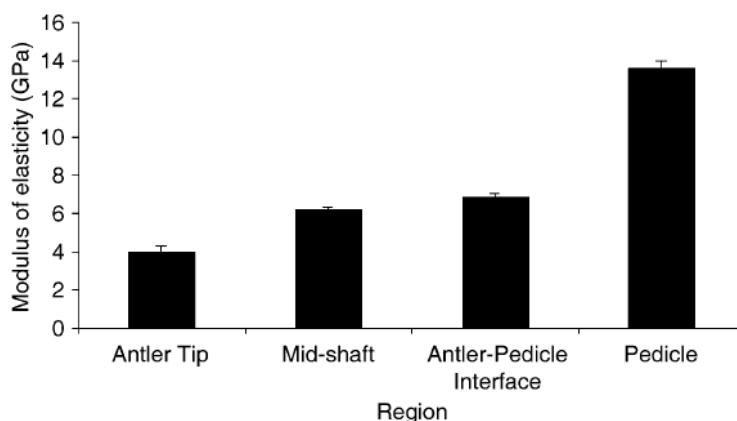
Modul pružnosti vzorků jeleního paroží byl měřen na čtyřbodovém ohýbacím stole (Obr. 19). Vzorky kortikální kosti ve tvaru kvádrů ($32 \times 2 \times 2 \text{ mm}$) byly vyříznuty rovnoběžně s podélnou osou parohu z hrotů paroží, středních dřívků paroží, rozhraní paroh-pedikl a pediklů. Vzorky byly řezány a leštěny, aby se získal hladký povrch. Vzorky byly udržovány vlhké během testování přímým postřikem vodou a byly zatíženy až do porušení. [2]



Obr. 19: Obdélníkový nosník ($32 \times 2 \times 2 \text{ mm}$) testovaný na čtyřbodovém ohýbacím stole na zkušební stroji Hounsfield. Převzato z [2].

Modul pružnosti vzorků se ve vzestupném pořadí významně zvýšil u vzorků odebraných z následujících oblastí: hrot parohu, střední dřív, rozhraní paroh-pedikl a

pedikl, což ukazuje postupné tuhnutí od hrotu parohu směrem k oblasti pediklu (Obr. 20). [2]



Obr. 20: Sloupcový graf znázorňující rostoucí hodnotu modulu pružnosti od hrotu parohu k proximální pedikulární kosti. Převzato z [2].

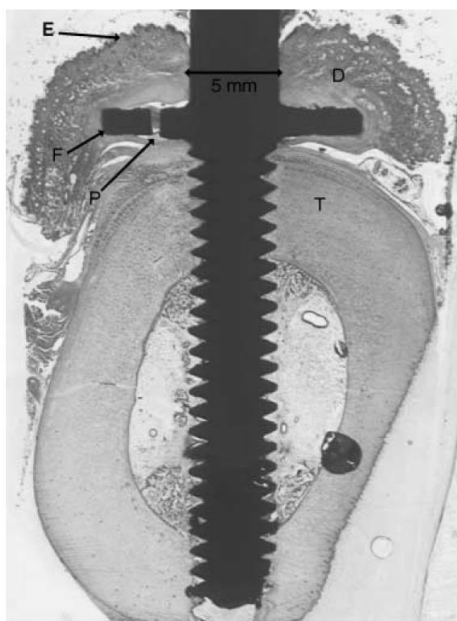
Předpokládá se, že rostoucí tuhost pozorovaná vůči pedikulární kosti má za následek menší posunutí parohu směrem k transkutánnímu rozhraní, čímž se omezí diferenciální pohyb mezi měkkými tkáněmi a kostí a dále se stabilizuje spojení. [2]

Zjištění studie Pendegrass a kol. [2] naznačují, že transkutánní rozhraní je udržováno v důsledku těsného utěsnění mezi subepiteliálními dermálními tkáněmi a pedikulární kostí. Předpokládá se, že toto těsnění představuje fyzickou bariéru pro migraci epiteliálních buněk prostřednictvím kolagenových vláken pocházejících z pórů v pedikulární kosti. Pórovitost pedikulární kosti svědčí o povrchové morfologii, která je nezbytná k tomu, aby se mohlo vyvinout rozhraní měkké a tvrdé tkáně, které může podporovat transkutánní spojení bez infekce. [2]

Do nového designu standardní konstrukce ITAP (přímý kolík z titanové slitiny Ti6Al4V, viz studie [1]), která napodobuje strukturu jeleního paroží, byla začleněna porézní příruba, umístěná pod povrchovou epiteliální vrstvou, aby se dále zvýšila poréznost a povrchová plocha ITAP. Průměr příruby byl 10 mm a do příruby byla vyvrtáno 24 otvorů o průměru 0.7 mm, aby se simulovala porézní povaha pediklové struktury pozorované u jeleního parohu. Dále byl aplikován HA povlak (tloušťka 70 μm) na část implantátu pronikající kůží. HA je hlavní složkou kostního minerálu a je jak vysoce porézní, tak biokompatibilní. Bylo prokázáno, že vyvolává přichycení měkkých tkání a podporuje růst tkání na bázi fibroblastů in vivo. Povlak byl aplikován za účelem zvýšení pórovitosti povrchu, aby se zlepšilo uchycení a růst měkkých tkání a aby se mezi implantátem a dermálními tkáněmi vytvořilo těsné utěsnění, čímž se zabrání srůstání epitelu směrem ke kosti a následné infekci. Na hladkou vnější leštěnou část ITAP byl aplikován povlak DLC, aby se snížila potenciální bakteriální kolonizace, napomohlo čištění a prodloužila životnost. Povlak byl umístěn tak, aby napodoboval pozorovanou měnící se morfologii mezi parohem, ke kterému měkké tkáně neulpívají v transkutánní fázi, a pediklem, kde je pozorováno těsné rozhraní, když je samet stažen. [2]

Implantáty s těmito konstrukčními úpravami byly zkoušeny in vivo na zvířecím modelu identickém se standardním ITAP designem. Vzorky byly po 4 týdnech in situ

podrobeny histologickému testování. Řezy byly proříznuty středem implantátů, vybroušeny, vyleštěny a byla provedena histologie (Obr. 21). [2]



Obr. 21: Podélný řez skrz přírubu ITAP zobrazující tibií (T), dermis (D), epidermis (E) a přírubu (F) s pórem (P). Převzato z [2].

Řezy byly podrobeny hodnocení růstu epitelu směrem ke kosti, % připojení epiteliální a subepiteliální vrstvy a výsledky byly porovnány s výsledky ITAP designu ze studie [1]. [2]

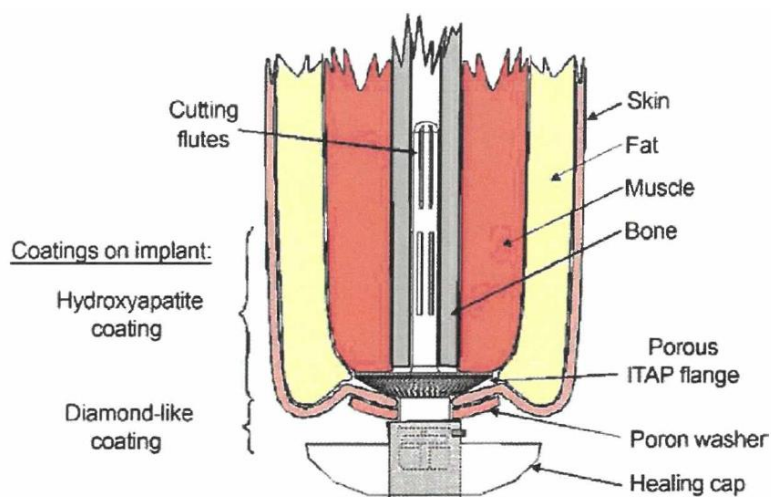
Konstrukční úpravy, provedené na základě studie jeleního paroží, vedly k výraznému snížení srůstání epitelu směrem ke kosti kolem příruby ve srovnání s rovným designem ITAP. Bylo pozorováno významné zvýšení procenta připojení epiteliální vrstvy kolem příruby ve srovnání s designem rovného implantátu. Střední hodnoty procenta přichycení subepiteliální vrstvy byly výrazně vyšší u přírubového implantátu ve srovnání s designem rovného implantátu. Kolem implantátů s přírubou bylo pozorováno těsné utěsnění mezi epidermis a povlakem HA. Subepiteliální dermální tkáň byla v těsném kontaktu s celým povrchem příruby a tam, kde byly póry v přírubě rozřezány, bylo prokázáno úplné prorůstání strukturami pórů. [2]

Bylo ukázáno, že u jeleního paroží existuje těsné spojení mezi vrstvami měkkých tkání a pediklem. Pomocí tohoto přírodního analogu byla vyvinuta ITAP s přírubou, která optimalizuje dermální uchycení a snižuje růst epitelu směrem ke kosti. Nebylo však pozorováno konzistentní připojení epitelu. Přerušování epiteliální vrstvy bez připojení k transkutánní struktuře implantátu vede k infekci, protože poskytuje potenciální vstup pro patogeny z vnějšího prostředí. Připojení epitelu k povrchu implantátu se považuje za nezbytný předpoklad, pokud má být ITAP použit klinicky. [20]

Pendegrass a kol. [20] zkoumali utěsnění kožní bariéry kolem transkutánních implantátů in vitro. Pro utěsnění kožní bariéry se musí keratinocyty připojit přímo k povrchu implantátu. Ukázalo se, že lidské keratinocyty jsou schopné proliferace a uchycení na substrátech z titanové slitiny Ti6Al4V in vitro prostřednictvím fokálních adhezí a

hemidesmozomů bez ohledu na topografii povrchu. Avšak proliferace a uchycení keratinocytů jsou ovlivněny povrchovou topografií biomateriálů, která se používá k podpoře jejich růstu. Počet hemidesmozomů byl výrazně nižší na pískovaných substrátech ve srovnání s hladce leštěnými, strojově upravenými a kyselinou leptanými substráty. Fokální adheze byly pozorovány na všech substrátech, ale jejich počet byl významně vyšší na hladce leštěných substrátech ve všech časových bodech. Vyvýšeniny a prohlubně v substrátu představují fyzickou bariéru pro šíření migrujících buněk. Ukázalo se, že hemidesmozomy jsou mechanismem, kterým gingivální epitelální buňky utěsňují transkutánní rozhraní na normálním dentoepiteliálním spojení a také zprostředkovávají připojení keratinocytů na povrch implantátu. Protože hladší povrch zlepšil přilnavost, předpokládá se, že hladká topografie povrchu na rozhraní epitel-ITAP by mohla zvýšit připojení keratinocytů na povrch implantátu in vivo a vytvořit účinnou bariéru proti infekci. Po dosažení dostatečného dermálního přichycení k zabránění srůstání epitelu in vivo je dosažení těsnění na rozhraní epitel-implantát prostřednictvím hemidesmozomů zásadní pro budoucnost ITAP. [20]

Výsledkem předchozích studií [1], [2] a [20] je intraoseální transkutánní amputační protéza (ITAP) napodobující biologické transkutánní rozhraní u jeleního parohu – příklad biomimetiky. Kůže na rozhraní s jeleními parohy je tenká (bez tuku) a je pevně držena na povrchu pediklu mnoha kolagenovými vlákny. Tato vlákna zajišťují, že kůže zůstává vzhledem k paroží nehybná. V případové studii [16] jsou popsány zkušenosti s ITAP v případě transhumerální amputace s 2letým sledováním. Kritickou částí návrhu ITAP je porézní podkožní příruba, která napodobuje povrch jeleního parohu na transkutánním rozhraní. Příruba a část dřívku implantátu jsou potaženy HA, aby se dále podpořilo prorůstání měkkých tkání (Obr. 22). Tyto konstrukční prvky podporují adhezi měkkých tkání na povrch ITAP, aby se snížila jejich pohyblivost vzhledem k implantátu, ale stejně jako u všech forem implantátu ukotveného v kosti je primární stability implantátu ITAP dosaženo prostřednictvím oseointegrace na dřívku implantátu. [16]

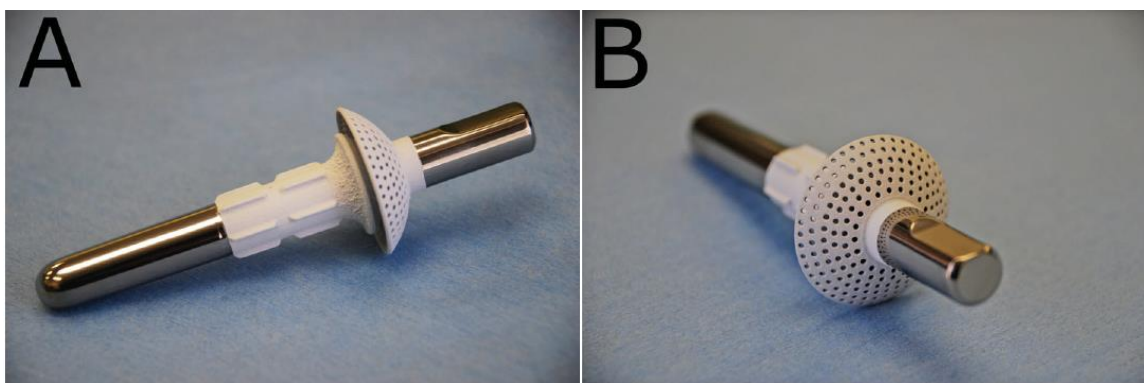


Obr. 22: Implantát ITAP z titanové slitiny in situ. Podélné řezné drážky zabraňují rotaci implantátu v kosti. Příruba je perforovaná s otvory o průměru 0.7 mm, které umožňují prorůstání měkkých tkání a přišití překrývající kůže. To snižuje relativní pohyb kůže a vytváří těsnění mezi vnitřním a vnějším prostředím. Terapeutická krytka a podložka se používají k přidržení kůže na přírubě, dokud není dosaženo přilnutí. Převzato z [16].

ITAP zjednodušil proces připojení a odpojení myoelektrické paže pacientky. Dva roky po zavedení implantátu zůstalo rozhraní kůže-implantát bez infekce, výtoku nebo bolesti, přičemž pacientka používala protetickou paži denně po většinu dne, což naznačuje, že rozhraní je robustní a spolehlivé. Avšak teprve dlouhodobé sledování potvrdí, zda v dalších desetiletích nedojde na tomto rozhraní k maligní degeneraci. Pacientka je schopna plavat ve veřejných bazénech, ale na ochranu ostatních plavců si připevňuje terapeutickou krytku. [16]

ITAP se zavádí v jednom chirurgickém kroku, což vede k výraznému urychlení rehabilitace a vyhnutí se dalšímu chirurgickému zákroku – klíčová motivace pro mnoho pacientů po amputaci. Použití jednosložkového implantátu také zabrání jakýmkoli obavám z uvolnění, ohnutí nebo zlomení sekundární komponenty. Ohnutí a zlomení implantátu ITAP je relativně nepravděpodobné, protože je vyroben ze slitiny titanu Ti6Al4V. Pokud však připustíme možnost zlomeniny transkutánní komponenty ITAP, revize by vyžadovala odstranění celého implantátu, na rozdíl od dvoustupňového implantátu. Proto bylo mezi ITAP a vnější protézu vloženo bezpečnostní zařízení, které je navrženo tak, aby se přestříhlo, pokud zatížení aplikované na protézu překročí stanovený limit (≥ 10 kg). To také chrání humerus před zlomeninou v případě pádu na rekonstruovanou končetinu. V delším časovém horizontu je možné, že ITAP bude možné zavést při primární amputaci, což by dále zkrátilo interval mezi amputací a obnovením funkce končetiny. [16]

Fitzpatrick a kol. [17] popsali klinickou aplikaci ITAP pro záchranu končetiny u čtyř psů. Na Obr. 23 je fotografie demonstrující funkci a design ITAP. ITAP byl vyroben ze slitiny titanu Ti6Al4V. Distanční část dřívku a příruba byly plazmově nastříkány titanem (tloušťka 70 až 100 μm) a následně ošetřeny HA (50–70 μm), aby se získal porézní povrch pro podporu integrace kosti a kůže. Mímotělní část, sloužící pro připojení exoprotézy, byla potažena povlakem DLC (tloušťka 2 až 4 μm), aby se snížila adheze bakterií. Perforace v přírubě implantátu (otvory o průměru 0.7 mm) simulují porézní pedikulární strukturu pozorovanou u jeleního parohu a umožňuje subepiteliální prorůstání a přichycení měkkých tkání, jak bylo u těchto psů prokázáno vizuální kontrolou nebo palpací a po histologickém vyšetření. To bylo pravděpodobně zesíleno povlakem HA, stejně jako kostní integrace na dřívku implantátu. [17]



Obr. 23: Fotografie demonstrující konstrukční prvky ITAP. (A) a (B) ukazují rovný ITAP, který se skládá z intraoseálního dřívku, perforované příruby ve tvaru „deštníku“ a distálního „čepu“. HA povlak příruby a části intraoseálního dřívku je zřetelně viditelný jako bílý pás ve srovnání s šedkovým vzhledem zbytku dřívku a čepu. Převzato z [17].

Komplikace zahrnovaly zlomeninu ITAP, která byla úspěšně zvládnuta výměnou ITAP a rigidní vnitřní fixací. K selhání implantátu zlomeninou v nejdistančnějším bodě rozhraní kost-implantát došlo u jednoho psa 9 týdnů po nasazení exoprotézy. Předpokládaný způsob selhání bylo cyklické zatěžování, které lze přičíst nevhodné distribuci sil z exoprotézy, proto bylo nutné provést změny v konstrukci exoprotézy. Dermální integrace s ITAP bylo dosaženo do 3 týdnů a psi chodili bez bolesti do 8 týdnů. Histologické vyšetření 9 měsíců po implantaci u jednoho psa ukázalo vynikající kostní a dermální integraci bez známek marsupilizace nebo infekce. Histologické řezy prokázaly začlenění příruby do dermální tkáně s epidermis přiléhající ke dřívku implantátu. Epidermis srůstal podél dřívku implantátu do hloubky přibližně 3 mm. Příruba nebyla v dermální tkáni zapouzdřena, ale spíše byly evidentní fibroblasty přichycené k povrchu HA. Póry příruby byly obsazeny fibroblasty s dobře zarovnanými kolagenovými vlákny. [17]

Byly provedeny studie, které prokázaly zvýšenou adhezi fibroblastů na fibronectinem silanizované titanové slitině Ti6Al4V (SiFn) a na hydroxyapatitu s adsorbovaným fibronectinem (HAFn). Povrchy SiFn a HAFn vedly k příznivějšímu zarovnání buněk in vivo, což znamená, že připojení dermální tkáně bylo zesíleno. Tyto výsledky naznačují, že povrchy SiFn a HAFn by mohly být užitečné při optimalizaci těsnění měkkých tkání kolem ITAP. [21]

Podle Trenta a Van Dyka [22] výše popsané metody používané k vytvoření stabilního rozhraní kůže-implantát ukázaly určitý přínos při řešení určitých nedostatků, ale dosud neexistuje žádná publikovaná literatura, která by popisovala úspěšný klinický překlad těchto nebo podobných metod. Komplikace zahrnují marsupilizaci, epidermální srůstání, infekce, záněty, permigrace (nekróza, ke které dochází v porézních implantátech), avulze nebo jejich kombinace. K vyřešení těchto problémů a ve snaze vytvořit soudržné spojení implantátu s kůží byla například povrchová struktura titanu upravována tak, aby zahrnovala póry nebo mikrodrážky, a bylo pozorováno, že to zlepšuje integraci kůže a v omezené míře inhibuje srůstání nebo marsupilizaci. Bylo zjištěno, že úspěšná adheze kůže k implantátu závisí na hloubce pórů. Při menších velikostech pórů buňky nemigrovaly snadno do pórů, ale při větších velikostech pórů buňky procházejí permigrací. Také byl použit HA jako povlak transkutánních implantátů, který prokázal zvýšenou adhezi buněk na titanových substrátech. HA povlaky však vykazovaly škodlivé přerůstání kůže a studie nezahrnovaly funkční buněčné testy, které by prokázaly homeostázu kůže. Je třeba provést další výzkum, aby se vyvinul přístup, který vytvoří rozhraní kůže-implantát, které může dosáhnout dlouhodobého úspěchu u pacientů po amputaci. Dalším potenciálním řešením je rozhraní kůže-implantát navržené tak, aby napodobovalo spojení nehet-kůže, tedy bezinfekční a mechanicky stabilní rozhraní. [22]

Trent a Van Dyke [22] napsali, že nehty, vlasy, zvířecí vlna a kopyta jsou všechny složeny z keratinu a lze je považovat za přírodní transkutánní „zařízení“. Nehet je ukázkovým příkladem přirozeného systému s kožním rozhraním, které je mechanicky i biologicky stabilní, a proto bylo cílem jejich práce vytvořit biomimetický povlak pro transkutánní zařízení, který dokáže napodobit lidský nehet, a prokázat jeho schopnost podporovat stabilní rozhraní s kožní tkání. Keratinové povlaky prokázaly schopnost přichycení kožních buněk (tj. fibroblastů a keratinocytů) prostřednictvím fokálních adhezí na titanovém substrátu. Hlavním problémem při spojení

keratinového povlaku s titanovým substrátem je dlouhodobá stabilita (časové období stability keratinových povlaků bylo krátké vzhledem k předpokládané životnosti transkutánního implantátu – transkutánní zařízení může vyžadovat povlak, který přetrvává roky, nikoli dny nebo měsíce). [22]

Na základě předchozích výsledků na keratinových vláknech a s ohledem na slibné vlastnosti keratinu při kontaktu s měkkými tkáněmi (stimulace adheze a růstu fibroblastů) byl ve výzkumné práci Ferrarise a kol. [23] poprvé spojen keratin s titanem ve formě souvislého silného povlaku (tloušťka 6–11 μm) nebo funkcionalizací. Protože hlavními problémy při spojení keratinu s biomateriály jsou jeho mechanická adheze a dlouhodobá stabilita, byl v práci [23] zvažován účinek plazmové povrchové předúpravy titanu s cílem zlepšit vazbu keratin-titan. Navíc bylo použito tepelné zesíťování keratinu za účelem zlepšení jeho biologické stability. Testované povlaky a funkcionalizace byly mechanicky a chemicky stabilní. Předúprava titanového substrátu kyslíkovou plazmou zvýšila adhezi v případě povlaku. Scratch testy prokázaly dobrou přilnavost a stabilitu (mechanickou i chemickou) pro keratinové silné povlaky. Dobrá adheze povlaku je základní charakteristikou pro bezpečnou aplikaci u transkutánních implantátů, které musí během implantačního chirurgického zákroku vydržet tření. Hladký souvislý povlak keratinu je zajímavý, když je potřeba snížit adhezi bakterií bez ohrožení kolonizace povrchu fibroblasty, protože bakterie na rozdíl od fibroblastů přednostně ulpívají na drsných površích. Kromě toho může být keratin dopován antibakteriálními kovovými ionty, který tak implantátu zajistí antibakteriální vlastnosti pro omezení bakteriální kontaminace. [23]

2.4 Sumarizace oseointegrovaných amputačních protéz

V současnosti jsou OPRA, ILP a OPL jedinými komerčně dostupnými systémy pro přímé kosterní připevnění vnějších protéz končetin. Systémy POP a Kompresní zařízení jsou stále ve vývoji, ale již dospěly do fáze klinických experimentů na lidech. Systém ITAP dokončil svou klinickou studii, ale nebyl uveden na trh. [3, 4]

Pro přehled předchozích poznatků budou v této kapitole porovnány jednotlivé oseointegrované amputační protézy z mechanického hlediska, z hlediska použitých bezpečnostních prvků a z hlediska chirurgického a rehabilitačního.

Porovnání implantačních oseointegrovaných systémů z mechanického hlediska

Porovnání implantačních systémů ILP a OPL s implantačním systémem OPRA ukazuje, že OPRA postupuje u amputací dolních končetin pomalejším rehabilitačním protokolem. To by mohlo naznačovat, že k dosažení mechanicky stabilního rozhraní kost-implantát u závitového implantátu je zapotřebí delší doba než u implantátu s lisovaným uložením. Je však třeba vzít v úvahu i historický vývoj implantátů. Konstrukce závitového implantátu použitá v systému OPRA byla vyvinuta na základě zkušeností získaných v dentální implantologii u prvního a nejdelšího uživatele oseointegrace, zatímco konstrukce implantátu s lisovaným uložením pochází z intramedulárních kyčelních implantátů. [4]

Dalším rozdílem mezi klinicky dostupnými implantačními systémy je intramedulární délka implantátu (140–180 mm u ILP, 160 mm u OPL a 80 mm u OPRA). To ukazuje, že lisované implantáty vyžadují delší intramedulární délku k dosažení stabilního spojení v podélném směru než implantát se závitem. Kratší délka implantátu je výhodná, protože je méně náročná na zbývající délku pahýlu. Dále, v případě katastrofického selhání, kdy nejhorší scénář vyžaduje reamputaci nad implantátem, vede kratší intramedulární délka k delší reziduální délce pahýlu po reamputační operaci. [4]

Pro dosažení vrůstání kosti do povrchu implantátu je trendem použití titanové slitiny Ti6Al4V v kombinaci s porézním povrchem implantátu. Stupeň poréznosti se mezi systémy liší, ale nevyhnutelně přichází s kompromisem v podobě snížené mechanické pevnosti a únavových vlastností v těchto oblastech. Aby byl výsledek dlouhodobě úspěšný, je nezbytné získat stabilní spojení mezi implantátem a kostí. Předpokládá se, že malé relativní pohyby mezi implantátem a kostí mohou způsobit vytvoření vláknité vrstvy kolem implantátu, což vede k mechanické nestabilitě a nutnosti revize implantátu. K dosažení stabilního spojení mezi implantátem a kostí byly použity různé přístupy. Ve studovaných systémech byly nalezeny tři různé strategie ukotvení implantátu do kosti:

- závitový spoj (OPRA)
- lisované rozhraní (ILP, OPL, ITAP a POP)
- příčné intraoseální čepy v kombinaci s pružinovým mechanismem (Kompresní zařízení). [3, 4]

Závitový spoj má ze své podstaty dobrou mechanickou stabilitu v podélném směru. Počáteční rotační stability je dosaženo třením (propojení závitu implantátu s kostí) a dlouhodobé stability je dosaženo kombinací tření a mechanického zablokování, kdy kostní tkáň narůstá do makro, mikro a nano „nerovností“ na povrchu implantátu. Lisované

rozhraní má nižší podélnou axiální stabilitu, zpočátku spoléhá pouze na tření a dlouhodobě se spoléhá jak na tření, tak na vrůstání kosti pro podélnou a rotační stabilitu. Ukotvení implantátu do kosti příčnými intraoseálními čepy v kombinaci s tlakovou silou na rozhraní kost-límec s povrchovými vlastnostmi podporujícími vrůstání kosti do límce přirozeně vytváří vysokou mechanickou stabilitu jak v podélném směru, tak i ve směru rotace. Aby se vytvořilo stabilnější rozhraní mezi implantátem a kostí, byly k některým implantačním systémům přidány další funkce. Patří mezi ně podélné drážky nebo rýhované oblasti pro lepší rotační stabilitu jako u systémů OPRA, OPL a ITAP, zakřivení podél podélné osy, jak se používá v systémech ILP, OPL a POP a rozšířené nebo límcové zakončení na rozhraní s distálním koncem kosti, jak se používá ve všech systémech kromě OPRA. Porézní vnější povrchy se používají lokálně ve všech implantačních systémech ke zlepšení prorůstání kosti do povrchu implantátu. [3, 4]

Aby se zabránilo podráždění a povrchovým infekcím, které by mohly potenciálně vést k závažnějším hlubokým infekcím, používají se na transkutánním rozhraní v implantačních systémech dva přístupy. Prvním přístupem je vytvoření stomie a pokusit se zabránit adhezi kůže a měkkých tkání hladkým povrchem na transkutánní komponentě jako u OPRA, OPL, POP a pozdějších návrhů systému ILP. V systému OPRA je tento přístup kombinován se suturou kůže přímo k distálnímu konci kosti na transkutánním rozhraní, aby se minimalizoval relativní pohyb a vytvořila se infekční bariéra. Druhým přístupem je vytvoření infekční bariéry podporou prorůstání měkkých tkání do transkutánní oblasti implantátu. Tento přístup se používá u ITAP, Kompresního zařízení a dřívějších konstrukcích systémů ILP tím, že mají porézní povrch na transkutánní části. [4]

Ve všech studovaných implantačních systémech kromě ILP je objemovým materiálem implantátu titanová slitina Ti6Al4V. Pro ILP je místo toho použita slitina kobaltu, chromu a molybdenu. [4]

Bezpečnostní zařízení

Byla přijata bezpečnostní opatření k ochraně kosti a implantátu před přímým vystavením vysokému zatížení, zejména v případě pádu. Implantační systém OPRA má různá bezpečnostní zařízení pro různé úrovně amputace. Jsou to samostatné komponenty, které jsou zapojeny mezi podpěrou a protézou končetiny a automaticky uvolňují spojení mezi implantátem a protézou, pokud jsou vystaveny zatížení přesahujícímu předem stanovenou mez. Všechny bezpečnostní systémy OPRA chrání před nadměrným kroutícím momentem kolem podélné osy, zatímco transfemorální systém také chrání před nadměrnými ohybovými momenty v normálové rovině podélné osy. Limity uvolňování pro systémy jsou nastaveny tak, aby byly dostatečně vysoké, aby se zabránilo uvolnění při běžném používání a zároveň dostatečně nízké, aby se zajistilo, že nedojde k poškození kosti nebo systému implantátu. Limity jsou nastaveny na kroutící moment 15 Nm a ohybový moment 70 Nm. V případě uvolnění může být bezpečnostní systém uveden do normálního provozu pacientem bez nutnosti setkání s protetikem. Bezpečnostní systémy ILP a OPL chrání před přenosem vysokých točivých momentů na implantát připojovacím adaptérem připevněným mezi distálním koncem dvoukuželového adaptéru a vnější protézou. Připojovací adaptér je vybaven bezpečnostním mechanismem, který se skládá z jednoho nebo několika střížných kolíků, které jsou určeny k přestřihnutí v případě, že je

implantát vystaven vysokému torznímu zatížení. Pokud k tomu dojde, výměnu zlomené části lze provést v klinickém prostředí. Informace o bezpečnostních systémech ostatních implantátů jsou omezené, avšak případová studie ITAP o transhumerálně amputovaném pacientovi [16] zmiňuje, že ITAP je vybaven bezpečnostní komponentou, namontovanou mezi implantátem a protézou, která je navržena tak, aby se zlomila při zatížení odpovídajícím 10 kg nebo více. [4]

Chirurgický přístup

Ze systémů implantovaných lidským subjektům je ITAP jediným systémem, který je vždy implantován v rámci jediné operace. Ostatní systémy se většinou řídily dvoustupňovými chirurgickými protokoly, i když u systémů OPRA, OPL a Kompresního zařízení byly hlášeny i jednostupňové postupy. V první fázi se provede řez na distálním konci pahýlu, zbytková kost se vystruží a připraví pro zavedení implantátu. Po zavedení implantátu se řez zcela uzavře. Kost a kůže se nechají po určitou dobu zahojit, aby se umožnila oseointegrace. Ve druhé fázi je transkutánní část vložena svým proximálním koncem do implantované komponenty a distální konec prochází kůží. [4]

Oblast subkutánní tkáně okolo transkutánního rozhraní by měla být odtučněna. Redukce podkožní tkáně se ukázala jako zásadní pro udržení transkutánního rozhraní bez nepříznivých reakcí. Podkožní tkáň může obsahovat faktory, které stimulují proliferaci a migraci epiteliálních buněk. [1, 3]

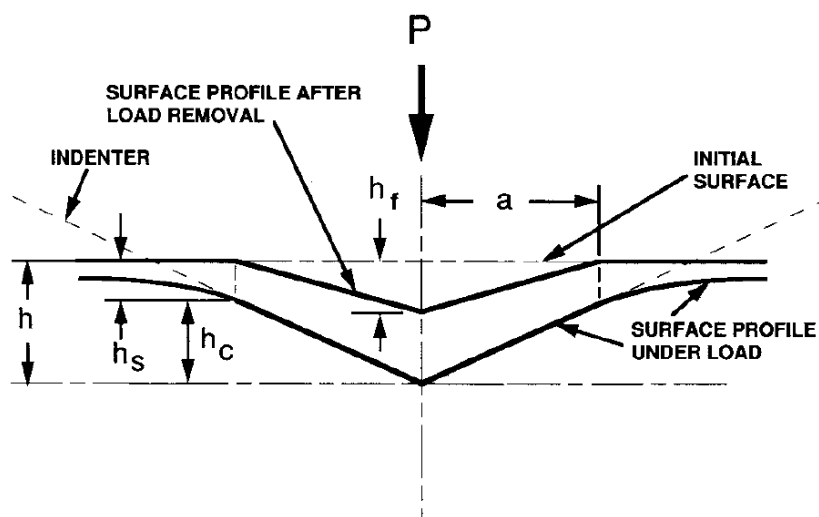
Rehabilitace

Než může být implantát plně zatížen, předepisují se různé doby hojení a rehabilitace. Dodržuje se plán, ve kterém je na vnější část implantačního systému aplikováno postupně vyšší zatížení, dokud není nakonec povoleno plné zatížení vnější protézou. Doporučená doba mezi prvním chirurgickým zákrokem a dobou, kdy je pacientovi umožněno plně zatížit systém externí protézou, se liší u jednotlivců, systémů implantátů a úrovně amputace. Podle standardního protokolu OPRA by tato doba měla být přibližně 12 měsíců u transfemorálních amputací, zatímco u ILP a OPL se doporučuje nést plnou váhu na protézu po 2,5–3 a 4–5 měsících. U ostatních oseointegračních amputačních protéz je počet hlášených případů v tomto ohledu příliš malý. [4]

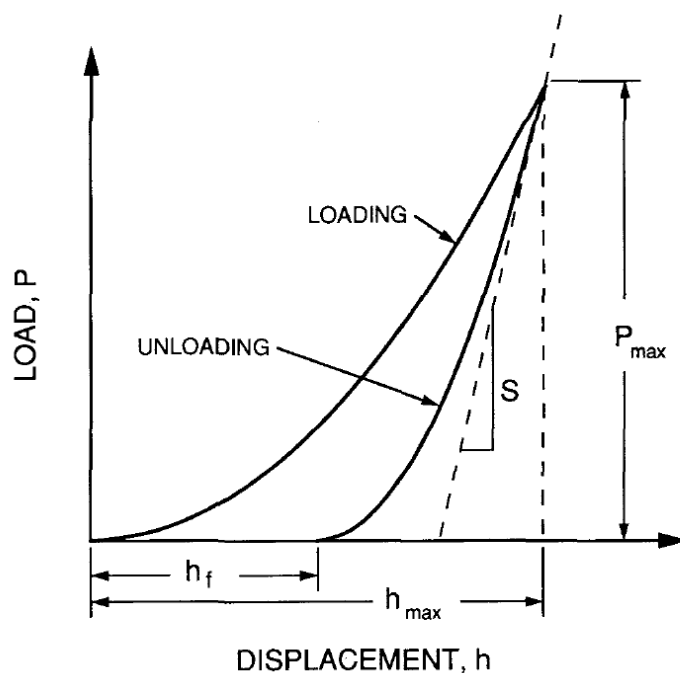
2.5 Nanoindentace

Nanoindentace je technika používaná k měření mechanických vlastností materiálů v nano měřítku. Původně se nanoindentační metody používaly pro hodnocení tvrdosti a modulu pružnosti vzorků materiálů malých objemů a tenkých vrstev, avšak od té doby byly vylepšeny tak, že jsou použitelné pro hodnocení mechanické odezvy vzorků malých objemů a tenkých vrstev na aplikované zatížení, včetně zkoumání elastických a plastických deformací, časově závislého mechanického chování, zbytkového napětí či vyhodnocení creepových a relaxačních odezev materiálu na zatížení. Nanoindentační techniky byly také přizpůsobeny pro studium biologických materiálů, které se významně liší od technických materiálů, pro které byly nanoindentační techniky původně optimalizovány. Relativně malé objemy materiálu potřebné pro kvantitativní mechanické testování pomocí nanoindentace znamenají, že lze zkoumat cenné vzorky, jakými jsou například miliony let staré fosilie. Také se vyvíjejí techniky, které umožňují stanovení konstitutivního chování materiálu (tj. chování mezi napětím a deformací). Ve většině moderních nanoindentačních systémů, jejichž několik variant je komerčně dostupných, existuje automatizovaný $x - y$ stupeň, který umožňuje provedení mnoha jednotlivých mechanických testů na povrchu materiálu, typicky v nějakém definovaném mřížkovém poli. Je tak možné „mapovat“ mechanické informace přes vymezený rovný povrch. [24, 25]

Při nanoindentaci se hrot indentoru přivede do kontaktu s povrchem vzorku, zatlačí se do materiálu silou P (v řádech μN), což způsobí posunutí hrotu do hloubky h (v řádech nm) a opět se vytáhne (Obr. 24). Během cyklu zatěžování a odlehčování indentoru se průběžně zaznamenává aplikovaná síla P a hloubka proniknutí indentoru do povrchu vzorku h (Obr. 25). Je také možné zaznamenávat i čas t . Místo řízení aplikované síly na hrot indentoru je možné řídit také posun hrotu. [24, 25]

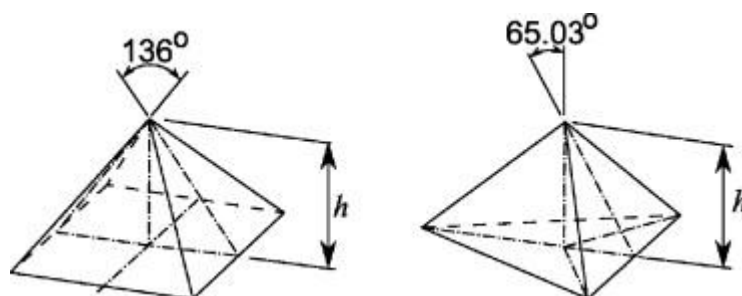


Obr. 24: Schématické znázornění jednotlivých sekcí při nanoindentaci. h – indentační hloubka, h_c – kontaktní hloubka, h_f – hloubka otisku po odlehčení indentoru, h_s – posunutí povrchu po obvodu kontaktu, P – zatížení indentoru, a – kontaktní poloměr. Převzato z [26].



Obr. 25: Schématické zobrazení dat zatížení (P) - hloubka (h) z nanoindentačního experimentu. P_{\max} – maximální zatížení indentoru, h_f – konečná hloubka otisku po odlehčení, h_{\max} – hloubka při maximálním zatížení, S – počáteční kontaktní tuhost. Převzato z [26].

Mezi typické materiály indentoru patří diamant, karbid wolframu a safír. Existuje několik různých geometrií hrotu indentoru, například Vickersův a Berkovichův indentor (Obr. 26) nebo sférické, kónické či válcové (ploché) indentory (s velkým poloměrem). [24, 25]



Obr. 26: Geometrie Vickersova indentoru (vlevo) a Berkovichova indentoru (vpravo). Převzato z [24].

Standartně se pro vyhodnocení mechanických vlastností z naměřených dat používá analytický model podle Olivera a Pharra. Analýza podle Olivera a Pharra popsaná v roce 1992 ve studii [26] je založena na elasticko-plastickém kontaktním mechanickém modelu a provádí se na odlehčovací křivce, z jejíž tečny k počátku lze určit kontaktní tuhost S vztahem [25, 26]

$$S = \frac{dP}{dh} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_r \sqrt{A} \quad (1)$$

kde A je kontaktní plocha a E_r je redukovaný modul, pro který platí

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (2)$$

kde ν je Poissonovo číslo materiálu vzorku, E je Youngův modul pružnosti materiálu vzorku, ν_i je Poissonovo číslo materiálu indentoru a E_i je Youngův modul pružnosti materiálu indentoru. Elastické konstanty diamantového indentoru pro výpočet Youngova modulu vzorku z Rovnice (2) jsou $\nu_i = 0,07$ a $E_i = 1141 \text{ GPa}$. [26]

Kontaktní plocha je dána vztahem

$$A(h_c) = 24,5h_c^2 + C_1h_c^1 + C_2h_c^{1/2} + C_3h_c^{1/4} + \dots + C_8h_c^{1/128} \quad (3)$$

kde C_0 až C_8 jsou konstanty, které musí být stanoveny experimentálně. Byly však zjištěny i zkrácené formy Rovnice (3) popisující funkci kontaktní plochy s menším počtem členů a vyšší přesností. Kontaktní hloubka h_c je dána vztahem

$$h_c = h_{max} - h_s \quad (4)$$

kde h_{max} značí hloubku při maximálním zatížení a posunutí povrchu po obvodu kontaktu h_s se vypočítá ze vztahu

$$h_s = \epsilon \frac{P_{max}}{S} \quad (5)$$

kde P_{max} značí maximální zatížení indentoru a ϵ je geometrická konstanta, jejíž hodnoty se pohybují v rozmezí od $\epsilon = 0,72$ pro kónický hrot, $\epsilon = 0,75$ pro Berkovichův nebo Vickersův hrot, až po $\epsilon = 1$ pro plochý hrot. [24, 26]

Horních 80% odlehčovacích křivek zatížení P versus hloubka h odpovídá rovnici

$$P = \alpha(h - h_f)^m \quad (6)$$

kde α a m jsou konstanty a h_f je hloubka otisku po odlehčení indentoru. [24, 26]

Tvrдость lze určit z následující definice

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (7)$$

kde A značí průmět kontaktní plochy. [26]

2.6 Mechanické vlastnosti

Biomateriály jsou syntetické nebo přírodní materiály, které se používají při výrobě struktur nebo implantátů, které nahrazují ztracenou nebo nemocnou biologickou strukturu, aby se obnovila forma a funkce biologické struktury. Biomateriál tak pomáhá zlepšovat kvalitu života a dlouhověkost lidských bytostí. Oblast biomateriálů prokázala rychlý růst, aby odpovídala požadavkům stárnoucí populace. Aby implantát sloužil delší dobu bez odmítnutí, měl by mít použitý biomateriál vysokou odolnost proti korozi a opotřebení, navíc by měl být biokompatibilní. Očekává se, že materiály použité na výrobu implantátů budou netoxické a neměly by v lidském těle způsobovat žádné zánětlivé nebo alergické reakce. Úspěch biomateriálů závisí především na reakci lidského těla na implantát, a to měří biokompatibilitu materiálu. Dva hlavní faktory, které ovlivňují biokompatibilitu materiálu, jsou reakce hostitele vyvolaná materiálem a degradace materiálu v tělesném prostředí. Nízká odolnost implantátů proti opotřebení a korozi vede k uvolňování nekompatibilních kovových iontů z implantátů do těla. Bylo zjištěno, že uvolněné ionty způsobují alergické a toxické reakce. [27, 28]

Vybrané příklady kovů a slitin, které se používají v aplikacích implantátů, jejich mikrostruktura a jejich mechanické vlastnosti (modul pružnosti, mez pevnosti) jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Vybrané kovy a slitiny používané pro implantáty v porovnání s kostí, jejich mikrostruktura a mechanické vlastnosti. Převzato z [27, 28].

Materiál		Mikrostruktura	Modul pružnosti E [GPa]	Mez pevnosti [MPa]
Kost	spongiózní	Viskoelastický kompozit	0,01-3,00	90-140
	kortikální		4,4-28,8	
Nerezová ocel 316L		Austenit	200	480 (žíhaná) 585 (kovaná za tepla)
CoCrMo		Austenit	200-230	565 (litá) 1200 (kovaná)
Komerčně čistý Ti (stupeň 4)		α	105	550 (žíhaný)
Ti6Al4V		$\alpha+\beta$	110	780 (žíhaná) 1000 (kovaná za tepla)
Ti29Nb13Ta4.5Zr		β	65	420 (žíhaná)
Ti35Nb7Zr5Ta		β	55	590 (žíhaná)
Ti35Nb7Zr5Ta0.40		β	66	1010 (žíhaná)
Ti15Mo5Zr3Al		β	80	930 (žíhaná)

Očekává se, že materiál nahrazující kost bude mít elastický modul ekvivalentní modulu kosti. Elastický modul kosti se pohybuje v rozsahu od 4 do 30 GPa v závislosti na typu kosti a směru měření. Materiály, které mají vyšší tuhost než kost, zabraňují přenosu potřebného napětí na sousedící kost, což vede k resorpci kosti kolem implantátu a následně k uvolnění implantátu. Tato biomechanická nekompatibilita, která vede ke smrti kostních buněk, se nazývá stress shielding efekt. Pro implantaci je tedy nutné použít materiál s kombinací vysoké pevnosti a nízkého modulu blíže kosti, aby se zabránilo uvolnění implantátů a revizním operacím a k prodloužení provozní doby implantátů. [27]

Tuhost titanu a jeho slitin je podstatně nižší než u jiných konvenčních kovových materiálů pro implantáty, jako je nerezová ocel nebo slitiny CoCrMo, jak ukazuje Tab. 3. Proto ve srovnání s nerezovou ocelí a slitinami CoCr jsou slitiny na bázi Ti vynikajícími biomateriály pro dlouhodobou implantaci díky jejich relativně nízkému Youngovu modulu, dobré odolnosti proti únavě a vynikající biokompatibilitě. Nejběžnější slitiny Ti používané při implantacích jsou však slitiny typu α a $\alpha + \beta$, které stále vykazují relativně vysoký modul pružnosti (105 GPa a 110 GPa) ve srovnání s modulem pružnosti kosti (max. 30 GPa). Proto se tyto slitiny obecně nedoporučují při výrobě implantátů, které přenášejí zatížení na kost pro dlouhodobou implantaci (více než 10 let). Navíc nerezová ocel, slitiny na bázi CoCr a Ti6Al4V, nejběžnější slitiny ortopedických implantátů, nejsou z biologického hlediska ideální slitiny pro dlouhodobé implantace do lidského těla, a to kvůli jejich vysokému obsahu vysoce cytotoxických prvků (např. V, Ni, Co). Nikl je také známý jako alergenní karcinogenní prvek, který vykazuje jednu z nejvyšších citlivostí v testech na kovové alergen. Také bylo zjištěno, že ionty Al i V uvolněné ze slitiny Ti6Al4V jsou spojeny s dlouhodobými zdravotními problémy, jako je Alzheimerova choroba či neuropatie. To vedlo k vývoji nízkomodulových β -titanových slitin, které se skládají z kompatibilních legovacích přísad (tj. Ta, Nb, Zr, Mo, W, Sn, a další) a mají Youngův modul bližší modulu kosti ve srovnání se slitinou Ti6Al4V. Struktury $\alpha + \beta$ mají vyšší pevnost, vyšší tažnost a vyšší nízkocyklovou únavu, zatímco struktury β mají vyšší lomovou houževnatost. [27, 28]

2.7 Aditivní výroba

Aditivní výroba (neboli 3D tisk) je definována jako proces spojování materiálů za účelem výroby objektů z trojrozměrných modelových dat, obvykle vrstvu po vrstvě, přidáváním materiálu. [29]

V dnešní době se 3D tisk stal důležitou technologií v lékařské oblasti díky své schopnosti přizpůsobit implantáty potřebám každého jednotlivce. Mezi podstatné vlastnosti aditivní výroby patří zakázková výroba, schopnost výroby složité geometrie přímo z výchozích materiálů bez použití tradičních výrobních metod (vytlačování, kování či odlévání a sekundární obráběcí procesy pro dosažení požadovaných tvarů), nízké náklady pro malo až středně sériovou výrobu, krátká doba výroby a bezproblémové propojení s běžnými lékařskými 3D zobrazovacími technikami. Navíc je tato technologie integrována s technikou počítačem podporovaného navrhování (Computer Aided Design, CAD), což umožňuje vytvářet objekty volného tvaru z materiálů, které jsou biokompatibilní a biologicky rozložitelné. Implantáty přizpůsobené pacientům na míru zkracují dobu strávenou na sále a následnou hospitalizaci, čímž se snižují celkové náklady na léčbu, a to jak u lidí, tak také u zvířat. V důsledku toho je aditivní výroba vhodná pro širokou škálu biomedicínských aplikací. Mezi hlavní aplikace 3D tisku v medicíně patří ortopedické a dentální implantáty, modely tkáňového inženýrství (např. biologicky odbouratelné scaffoldy s umělou rychlostí degradace), anatomické modely, farmakologické návrhy (testování léků), lékařské nástroje a biomedicínské přístroje. Předoperační tisknuté anatomické modely způsobily revoluci ve způsobu, jakým byli chirurgové a studenti medicíny trénováni na chirurgické zákroky. [29-32]

2.7.1 Přehled technologií aditivní výroby

Organizace pro standardizaci ASTM a ISO rozděluje technologie aditivní výroby dle ISO/ASTM 52900-15 do sedmi různých kategorií [33, 34]:

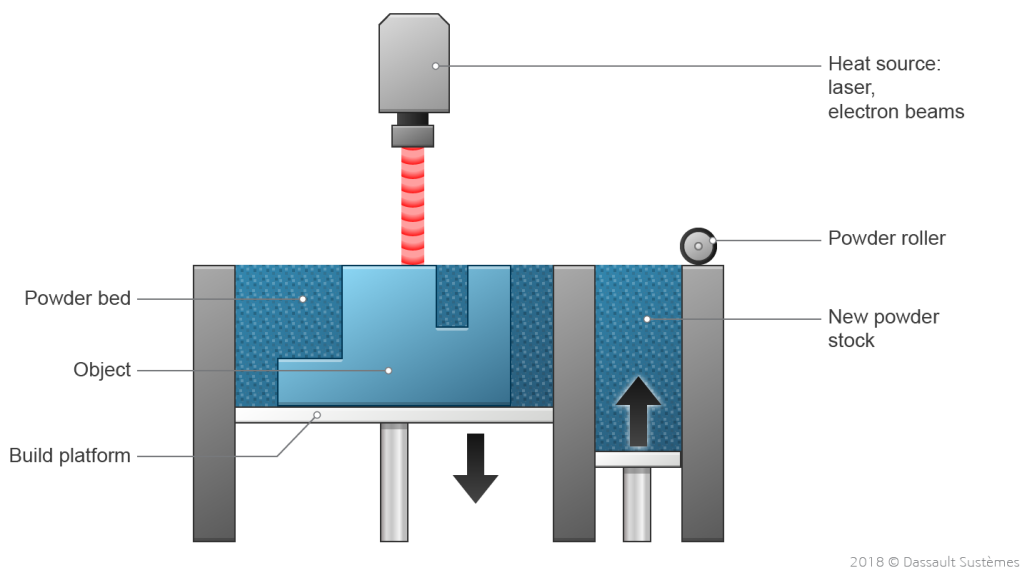
- Technologie slinování prášků (Powder Bed Fusion, PBF)
- Technologie extruze materiálu (Material Extrusion, ME)
- Technologie fotopolymerizace (Vat Photopolymerization, VP)
- Technologie tryskání materiálu (Material Jetting, MJ)
- Technologie tryskání pojiva (Binder Jetting, BJ)
- Technologie laminace (Sheet Lamination, SL)
- Technologie přímé energetické depozice (Directed Energy Deposition, DED).

Každý proces aditivní výroby vyžaduje 3D model objektu, který bude vyráběn. Nejpoužívanějším formátem souboru, který mohou 3D tiskárny číst, je STL (standard triangle language). STL model je pak rozdělen na vrstvy a dále zpracován na příkazy pro konkrétní stroj pro aditivní výrobu. [33, 34]

Power Bed Fusion (PBF)

Existují čtyři běžné tiskové techniky na bázi prášku (Power Bed Fusion, PBF): **Selective Laser Sintering (SLS)**, **Selective Laser Melting (SLM)**, **Direct Metal Laser Sintering (DMLS)** a **Electron Beam Melting (EBM)**. Mezi těmito čtyřmi práškovými tiskovými technikami jsou zřejmé rozdíly jak v tiskovém procesu, tak ve vlastnostech produktu.

Elektronový paprsek (EBM) nebo laser (SLS, SLM, DMLS) snímá vrstvu prášku a selektivně jej spojuje. Jak je práškové lože postupně snižováno, nanáší se nová vrstva prášku pomocí čepele nebo válečku, následně tepelný zdroj selektivně spojuje další části nové vrstvy tisknutého objektu s dříve ztuhlými vrstvami (Obr. 27). [30, 31]



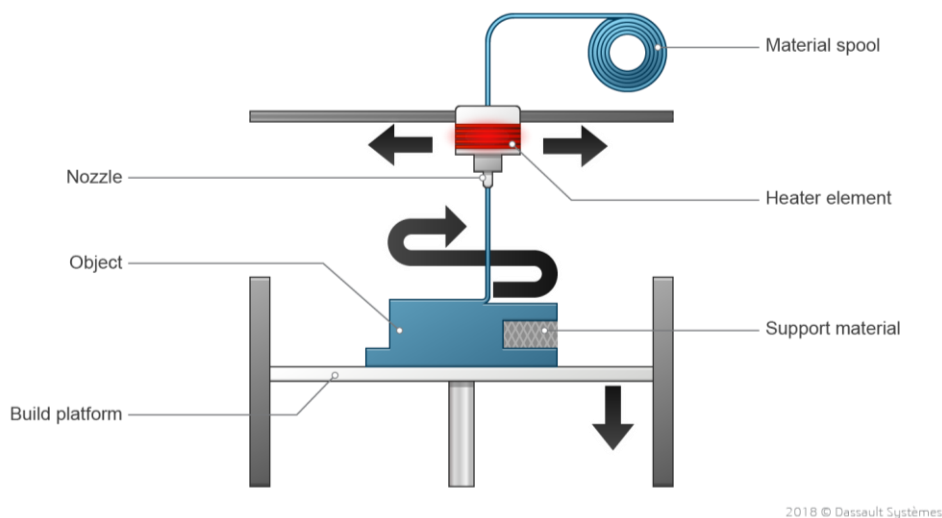
Obr. 27: Schéma technologie PBF. Převzato z [34].

Na rozdíl od slinovacích technik (SLS, DMLS) techniky SLM a EBM plně roztaví prášek laserem a elektronovým paprskem. Pro práci elektronového paprsku si práškové lože v tiskárně EBM udržuje vysokou pracovní teplotu (>870 K). To přímo ovlivňuje kvalitu zpracování zejména v detailech mikrostruktury. Produkty tisknuté pomocí techniky SLM si oproti tomu zachovávají vyšší tribologické, mechanické a korozní vlastnosti. Vzhledem k rozdílům mezi slinováním a tavením jsou povrchy výrobků tisknutých slinovacími technikami (SLS a DMLS) drsné, protože prášky nejsou zcela roztaveny. Mezi materiály používanými v procesu SLS patří například polyamid (PA) a Alumide (směs hliníkového prášku a polyamidu), ale také slitiny titanu, slitiny kobaltu a chromu, slitiny titanu a niklu a nerezová ocel. Metody SLM a DMLS se používají výhradně pro výrobu kovových dílů. Proces DMLS spéká prášky a je omezen na slitiny, stejně jako SLS, včetně slitin na bázi titanu. Zatímco SLM dosahuje úplného roztavení prášku, proto je možné používat i jednosložkové kovy, jako je hliník. V současné době mají systémy DMLS lasery o výkonu 100 W až 1 kW, které jsou dostatečné pro úplné roztavení kovové suroviny, a SLM a DMLS se používají zaměnitelně. Metody SLM a DMLS vyžadují dodatečné podpěrné konstrukce pro kompenzaci vysokého zbytkového napětí a pro omezení výskytu deformací. Proces EBM vyniká rychlejšími sestavováním výrobku než SLM, SLS a DED díky použití vysokoenergetického elektronového paprsku a vysoké rychlosti skenování. Oproti SLM vytváří EBM menší zbytkové napětí, avšak nevýhodou EBM je horší kvalita povrchu. [29- 32, 34]

Mezi metody PBF se řadí také **Multi Jet Fusion (MJF)**. Na vrstvu prášku se nanese činidlo a následným zahřátím prvků vznikne pevná vrstva. [34]

Material Extrusion (ME)

Tisk založený na extruzi materiálu (Material Extrusion, ME) je běžně označován jako **Fused Deposition Modeling (FDM)** nebo ekvivalentně jako **Fused Filament Fabrication (FFF)** a je jedním z nejoblíbenějších procesů pro amatérský 3D tisk. Základním materiálem je filament z termoplastického materiálu. Vlákno je přiváděno z cívky přes pohybující se vyhřívanou tiskovou hlavu. Roztavený materiál je vytlačován z jedné či více trysek tiskové hlavy a vytváří pevné objekty nanášením vrstvy po vrstvě (Obr. 28). [30, 31, 34]



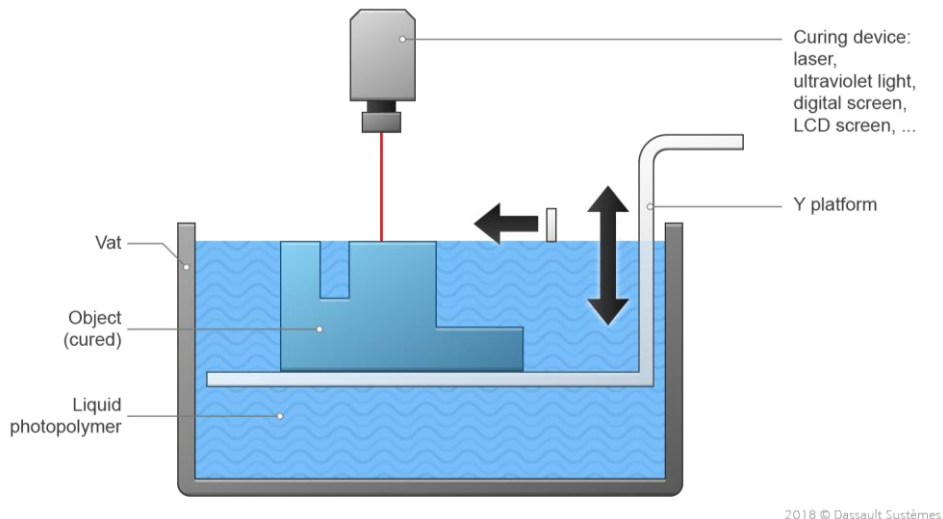
Obr. 28: Schéma technologie ME. Převzato z [34].

Lze vytlačovat širokou škálu materiálů, například akrylonitrilbutadienstyren (ABS), polylaktickou kyselinu (PLA), termoplastický polyuretan (TPU) nebo polyetheretherketon (PEEK). Pomocí této techniky 3D tisku lze navíc extrudovat materiály podobné pastě, jako je keramika nebo beton. Když bylo možné vybavit 3D tiskárnu více tiskovými hlavami, byl urychlen výrobní proces a zpřístupnila se tím možnost kompozitní výroby (např. **Composite Filament Fabrication (CFF)**). Avšak kompozity lze tisknout technikou extruze materiálu i na strojích vybavených pouze jedním extruderem. Jedinou podmínkou je, že základní materiál (termoplast) je přítomen v dostatečném množství, aby bylo zaručeno spojení mezi vrstvami. Kombinace dvou materiálů v jednom vlákně tedy umožnila dřevěný 3D tisk (částice dřeva vložené do PLA), kovový 3D tisk (kovové částice vložené do termoplastu) a dokonce i karbonový 3D tisk (uhlíková vlákna vložená do termoplastu). [34]

Vat Photopolymerization (VP)

Základním principem technologie fotopolymerizace (Vat Photopolymerization, VP) je kapalný fotosenzitivní polymer obsažený v kádě, který je selektivně vytvrzován tepelným zdrojem (paprsek laseru nebo světla). Mezi běžné procesy fotopolymerizace patří **Stereolitografie (SLA)** a **Digital Light Processing (DLP)**. Během výrobního procesu SLA je koncentrovaný paprsek UV světla nebo laseru zaostřen na povrch kádě naplněné tekutým fotopolymerem a vytváří každou vrstvu požadovaného 3D objektu pomocí zesíťování nebo degradace polymeru. Po dokončení nové vrstvy se tisková platforma postupně ponoří hlouběji do nádrže a vytvoří se nová další vrstva (Obr. 29). SLA byla první technologie aditivní výroby použitá v medicíně v roce 1994. Pro proces DLP se používá projektor k

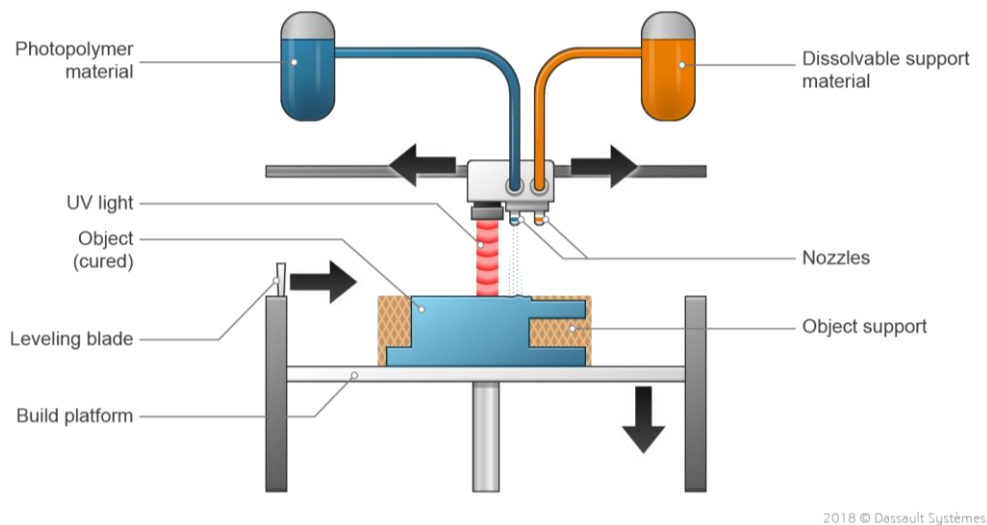
ozáření každé vrstvy přes celou platformu najednou. Protože projektor je digitální obrazovka, obraz každé vrstvy se skládá ze čtvercových pixelů, což vede k vrstvě tvořené malými kvádry nazývanými voxely. Jednou z výhod techniky DLP ve srovnání s SLA je její schopnost současně vytvrdit celou jednu vrstvu pryskyřice, zatímco laser potřebuje postupně osvětlovat celý povrch tím, že jej vykreslí. Proto je DLP rychlejší metoda tisku ve srovnání s metodou SLA. [30, 34]



Obr. 29: Schéma technologie VP. Převzato z [34].

Material Jetting (MJ)

Technika tryskání materiálu (Material Jetting, MJ) je často přirovnávána ke standardnímu procesu 2D inkoustového tisku. Objekty jsou vytvářeny po jednotlivých vrstvách využitím fotopolymerů, které při vystavení světlu nebo teple tuhnou. Výrobní proces tryskáním materiálu umožňuje 3D tisk různých materiálů v rámci stejné součásti. Trysky v tiskové hlavě dávkuje fotopolymer a vytváří vrstvu po vrstvě. Když jsou kapičky materiálu nanášeny na stavební platformu, jsou přímo vytvrzovány pomocí UV světla (Obr. 30). Procesy tryskání materiálu vyžadují podporu, která se často tiskne současně během procesu z rozpustného materiálu. Nosný materiál se pak odstraní během následného zpracování. [34]

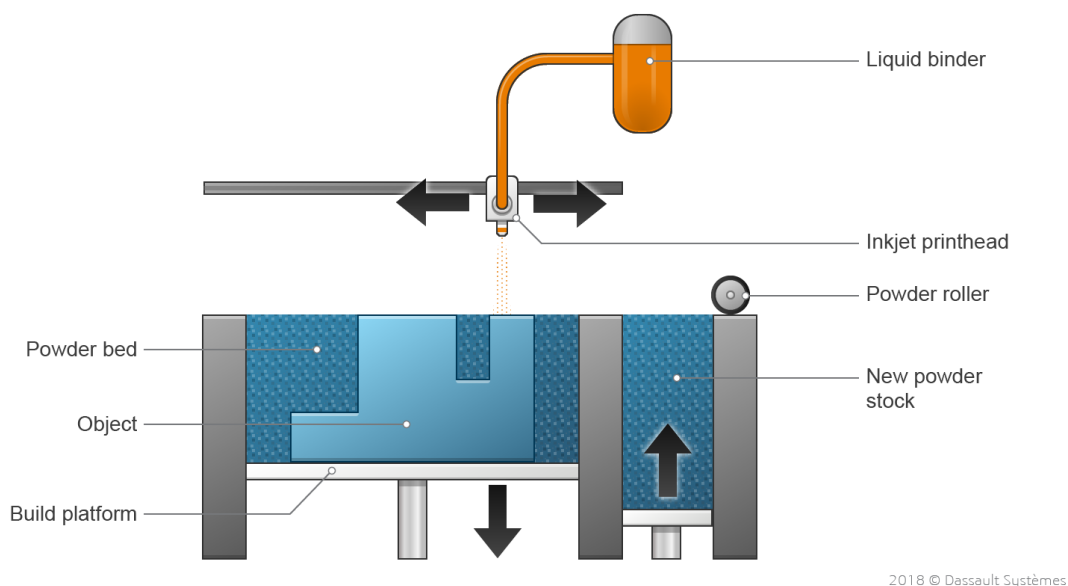


Obr. 30: Schéma technologie MJ. Převzato z [34].

Nejčastěji používané MJ techniky jsou: **Drop On Demand (DOD)**, **PolyJet** a **NanoParticle Jetting (NPJ)**. Hlavními nevýhodami tisku technologií tryskání materiálu jsou vysoká cena a skutečnost, že UV-aktivované fotopolymery časem ztrácejí mechanické vlastnosti a mohou se stát křehkými. [34]

Binder Jetting (BJ)

Technika tryskání pojiva (Binder Jetting, BJ) je dvou krokový proces, který odděluje tisk součásti od jejího slinování. V prvním kroku jsou předměty vytvářeny vstříkáním pojiva do oblastí práškové vrstvy, která bude součástí předmětu. Proces se opakuje vrstvu po vrstvě, dokud nejsou všechny vrstvy hotové (Obr. 31). Po dokončení prvního kroku je potřeba vytisknuté předměty zbavit pojiva a slinovat. Práškové materiály jsou buď na bázi keramiky nebo kovu. Často se přidává infiltrační látka pro zlepšení mechanických vlastností dílů. Infiltrační látkou je obvykle kyanoakrylátové lepidlo (v případě keramiky) nebo bronz (v případě kovů). Mezi běžné techniky BJ patří např. **ColorJet Printing (CPJ)**. Stejně jako u technologií PBF lze nezpracovaný prášek z procesu BJ recyklovat a znovu použít. [31, 34]

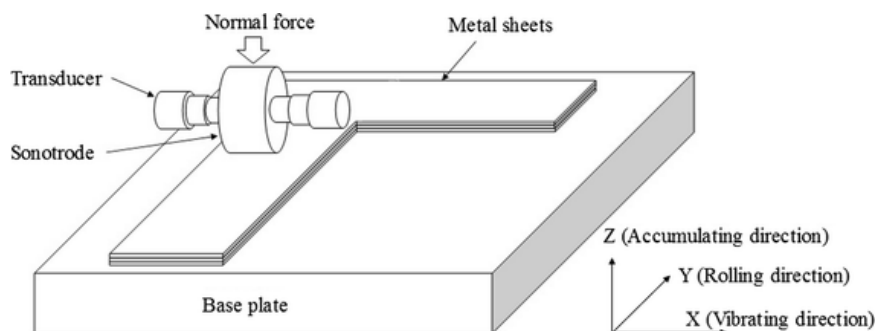


Obr. 31: Schéma technologie BJ. Převzato z [34].

Ve srovnání s technikami PBF má metoda tryskání pojiva (BJ) tu výhodu, že během tiskového procesu výroby nevyužívá teplo, což zabraňuje vytváření zbytkového napětí ve vyráběných dílech. Technologie BJ jsou přesnější ve srovnání s technologiemi PBF. Navíc stroje BJ jsou levnější a systémy BJ jsou obvykle rychlejší, avšak vyžadují po vytisknutí dílu dodatečné zpracování. Poréznost je však hlavním problémem u dílů tisknutých technologií BJ, protože tato technika je ve své podstatě procesem práškové metalurgie. Snížení pórovitosti je dosaženo během slinování vytisknutého dílu. Snížení pórovitosti ve vytisknutém materiálu může výrazně zlepšit jeho mechanické vlastnosti, protože pórovitost působí jako koncentrátor napětí a podporuje šíření trhlin. Kovové díly vyrobené pomocí technologie BJ mají horší mechanické vlastnosti, oproti SLM, protože zrna materiálů se zcela nespojí. [31, 34]

Sheet Lamination (SL)

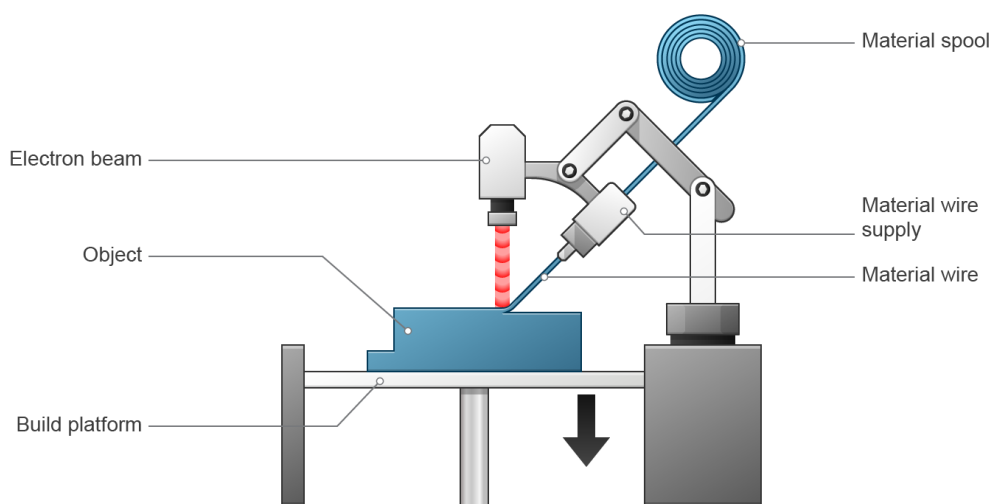
Technologie laminace (Sheet Lamination, SL) známá také jako **Laminated Object Manufacturing (LOM)**, spočívá ve spojování několika vrstev materiálu ve formě fólie. Každá fólie je řezána do tvaru nožem nebo laserem, aby se přizpůsobila průřezu objektu. Nejčastěji používanou výrobní technikou SL je **Ultrasonic Additive Manufacturing (UAM)**. Působením ultrazvukové vlny a mechanického tlaku na svazky plechů při pokojové teplotě jsou rozhraní vrstvených plechů spojena spíše difúzí než tavením (Obr. 32). Naskládané plechy jsou spojeny ve 3D objekt bez použití jakéhokoli zdroje tepla. Před spojením ultrazvukovou konsolidací se plechy často řezou podle navržené geometrie. Technologie SL běžně vyrábějí díly z kombinace PVC (polyvinyl chlorid) a lepidla, což vede k odolným, a přesto levným modelům. Dále byla vyvinuta technika laminování založená na papíru. Papírové modely mohou být plnobarevné, mají vlastnosti podobné dřevu a mohou být podle toho dále opracovány. Nejnovější vývoj technologie SL umožnil použití desek z uhlíkových vláken a různých kompozitů, ale tyto techniky nejsou zatím příliš rozšířené. Například technika, která spojuje vláknové kompozity s termoplastem a vytváří tak velmi pevné díly se označuje jako **Composite Based Additive Manufacturing (CBAM)**. [34, 35]



Obr. 32: Schéma metody UAM. Převzato z [35].

Directed Energy Deposition (DED)

Namísto použití práškového lože používá proces DED vstupní surovinu ve formě prášku vyfukovaného tryskou nebo ve formě drátu spolu se zdrojem energie, jako je laser nebo elektronový paprsek, k roztavení a nanesení materiálu na povrch substrátu, vrstvu po vrstvě (Obr. 33). Techniky DED lze rozdělit do dvou hlavních kategorií na základě vstupních surovin. První kategorie zahrnuje metody vyvinuté z tradiční svařovací techniky využívající jako vstupní surovinu kovový drát (např. **Electron Beam Additive Manufacturing (EBAM)**). Druhá kategorie zahrnuje metody, které využívají vstupní materiál ve formě prášku (např. technika **Laser Engineered Net Shaping (LENS)** využívá laser k tisku dílů vrstvu po vrstvě přímo z kovů, slitin, keramiky nebo kompozitů ve formě prášku). Po dokončení procesu lze nepoužitý vyfouknutý prášek recyklovat. [29, 34, 35]



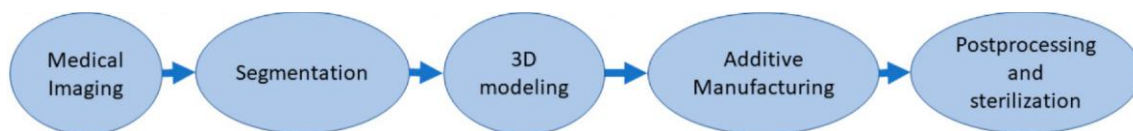
2018 © Dassault Systèmes

Obr. 33: Schéma technologie DED. Převzato z [34].

2.7.2 Aditivní výroba implantátů

Vzhledem k téměř neomezené geometrické volnosti lze techniky aditivní výroby použít k výrobě implantátů na míru se složitou geometrií, s ohledem na fyzické a anatomické charakteristiky pacienta. To vede ke snížení celkových nákladů na léčbu, zkrácení doby operace v důsledku předoperačního plánování a následně i doby anestezie a snížení rizika infekce. V důsledku toho dochází k výraznému zlepšení rekonvalescence pacienta a pooperačních výsledků. [36]

Typický proces výroby implantátu na míru pomocí aditivní výroby vyžaduje zachycení anatomie pacienta pomocí lékařského zobrazování, jako je počítačová tomografie (Computed Tomography, CT) nebo zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging, MRI). Poté je tento digitální 3D model anatomie pacienta použit jako referenční návrh pro specifické přizpůsobení modelu implantátu pro pacienta. Při získávání CAD modelu implantátu na míru se provádí simulace metodou konečných prvků pro kontrolu struktury, což může do počátečního návrhu implantátu vnést určité změny, dokud struktura neuspokojí potřebu. Většina kovových implantátů na míru je vyrobena pomocí technologie PBF, což vyžaduje různé kroky následného zpracování, jako je obrábění podpěr, leštění a tepelné zpracování. Před klinickou operací je třeba implantáty sterilizovat. Obr. 34 znázorňuje typický průběh procesu pro implantáty vyrobené aditivní výrobou počínaje lékařským zobrazováním a segmentací, po které následuje 3D modelování implantátu až po aditivní výrobu, následné zpracování a sterilizaci. [33, 37]



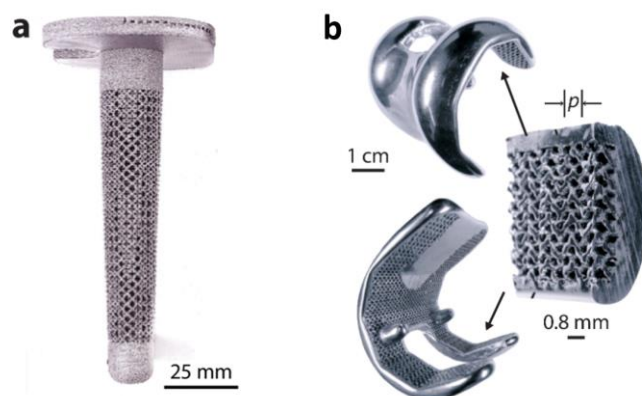
Obr. 34: Typický průběh procesu návrhu implantátu na míru. Převzato z [33].

Kvůli nesouladu mechanických vlastností mezi kovovými implantáty a kostí jsou ortopedické implantáty náchylné ke vzniku stress shielding efektu, což vede k následné kostní resorpci a případnému selhání implantace. S rozvojem 3D tisku je však

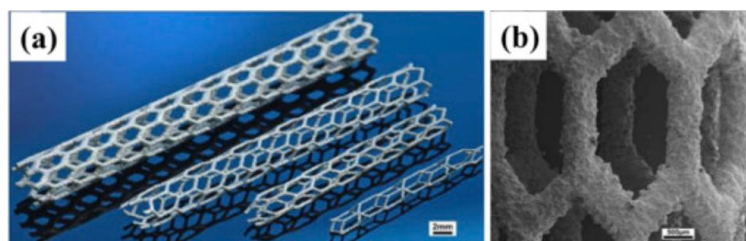
možné tisknout kovové implantáty s porézní strukturou s řízenou velikostí pórů, jednotkovou buňkou a vzájemnou konektivitou pórů. Volbou poréznosti a jednotkové buňky lze přizpůsobit tuhost implantátu tak, aby se blížila tuhosti přirozené kosti, čímž se snižují problémy související se stress shielding efektem, zatímco texturované povrchy mohou také podporovat růst tkání. Kromě toho lze vrůstání kosti do povrchu implantátu dosáhnout pomocí implantátu s porézností mezi 50 % a 80 %, propojenými póry a velikostí pórů od 100 μm do 1200 μm . [31, 32, 36]

Složité vnější tvary a složitou vnitřní strukturu je obtížné získat pomocí konvenčních výrobních metod (prášková metalurgie, kování, odlévání či válcování s následným opracováním do finálních tvarů a rozměrů pomocí obrábění). Tyto tradiční výrobní procesy vždy nevyhnutelně vedou k velkému množství odpadu materiálu, vysokým výrobním nákladům a dlouhé dodací lhůtě. 3D tisk umožňuje hromadnou výrobu přizpůsobených kovových implantátů, protože má výhody v podobě krátké doby výroby, vysoké opakovatelnosti a nízkých nákladů při malé až středně sériové výrobě, avšak ceny strojů pro aditivní výrobu jsou vysoké a přesnost a povrchová úprava dílů je nižší než u dílů vyrobených obráběním. [29-32, 36]

Převážná většina aditivně vyrobených implantátů je vyrobena prostřednictvím technik PBF, protože mohou zpracovávat mnoho kovů a slitin biomedicínského zájmu, jako jsou slitiny titanu (Obr. 35a), slitiny kobaltu a chromu (Obr. 35b), slitiny zinku (Obr. 36), nerezové oceli, hořčík, ale také polymery (například PEEK). [30, 31]

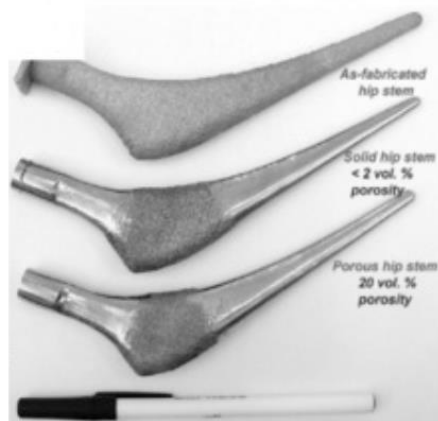


Obr. 35: Příklady částí náhrady kolenního kloubu s pórovitou strukturou zabraňující stress shielding efektu a podporující prorůstání kosti, aditivně vyrobených metodou EBM. (a) Tibiální dřív z Ti6Al4V. (b) Femorální komponenta ze slitiny kobaltu a chromu. Převzato z [31].



Obr. 36: Zinkové stenty vyrobené metodou SLM: (a) fotografie, (b) SEM snímek. Převzato z [32].

Také technologie DED mají potenciál vyrábět implantáty s pórovitou strukturou (Obr. 37) z různých kovů, včetně slitin titanu, nerezových ocelí nebo slitin s tvarovou pamětí. [32]



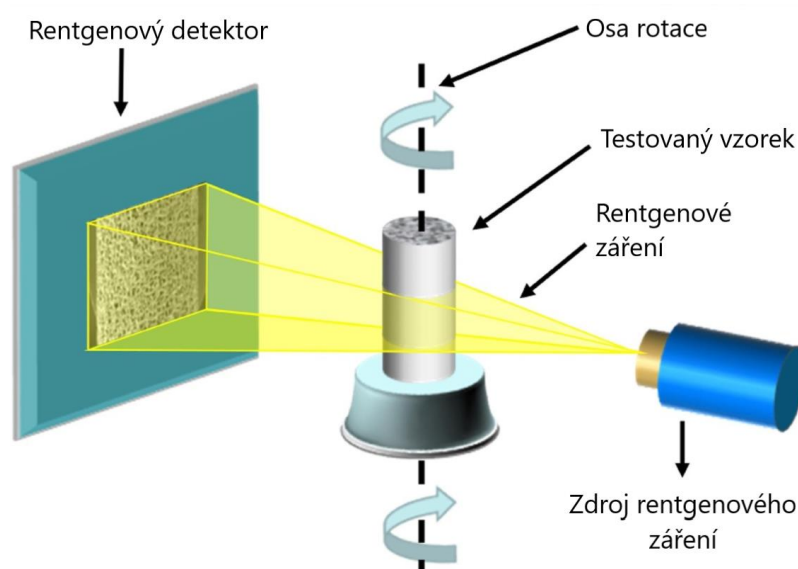
Obr. 37: Kyčelní dříky z titanu vyrobené metodou LENS s různou pórovitostí. Převzato z [32].

Komerční systémy technologie BJ mohou také tisknout kovy zajímavé pro biomedicínské aplikace, jako jsou nerezová ocel 316L, titanová slitina Ti6Al4V, slitiny kobaltu a chromu a komerčně čistý titan. [31]

2.8 Mikropočítačová tomografie (Micro-CT)

Mikropočítačová tomografie (micro-CT nebo mikrotomografie) je nedestruktivní zobrazovací technika využívající rentgenové záření, která umožňuje digitalizaci vzorku ve třech rozměrech s vysokým rozlišením (1-100 μm). Na základě rentgenového zobrazení vytváří plnou virtuální reprezentaci vnitřních i vnějších prvků snímaného objektu. S těmito výslednými 3D modely lze poté interaktivně manipulovat na obrazovce (rotace, zoom, virtuální pitva, izolace částí, které nás zajímají), nebo lze provádět řadu sofistikovaných 3D měření – od jednoduchých měření délky a objemu až po hustotu, pórovitost, tloušťku a další parametry související s materiálem. Schopnost micro-CT zobrazování vizualizovat vnitřní i vnější rysy testovaného vzorku v mikrometrickém rozlišení, aniž by došlo ke zničení vzorku, činí tuto techniku ideální pro digitalizaci cenných vzorků. Navíc po skenování mohou být neporušené vzorky podrobeny dalším testům, čímž se řeší problém nedostatku vzorků. [38, 39]

Typický micro-CT systém se skládá hlavně ze čtyř částí: rentgenového zdroje, otočného stolku, detektoru a počítačového systému. Základní princip techniky micro-CT souvisí se získáním velkého souboru radiografických projekcí (2D snímků) vzorku kolem rotační osy. Vzorek se umístí na otočný stůl mezi zdroj rentgenového záření a detektor (Obr. 38). Při průchodu rentgenového záření vzorkem je rentgenové záření zeslabeno a vznikající rentgenové záření se sníženou intenzitou je zachycováno detektorem. Z měření detektoru se vypočítají dráhy rentgenového záření a odvodí se tzv. koeficienty útlumu rentgenového záření. Vzhledem k tomu, že koeficient útlumu koreluje s hustotou materiálu, výsledné 2D snímky odhalují materiálové fáze ve vzorku. Poté se rotací vzorku získají 2D snímky v různých úhlových polohách. Rekonstruované 2D snímky lze vizualizovat ve 3D pomocí softwaru pro vykreslování objemu. K dispozici je řada produktů (např. Dragonfly). [38-40]



Obr. 38: Schematické znázornění systému micro-CT. Převzato z [40] a upraveno.

Je ale také možná varianta micro-CT systému, kde se zdroj rentgenového záření s detektorem kruhově otáčí kolem vzorku, zatímco vzorek je pevně fixován na místě. [41]

Micro-CT skenování je náchylné k artefaktům, které mohou zhoršit kvalitu micro-CT snímků. Protože se v rentgenovém micro-CT používají polychromatické rentgenové paprsky, paprsky s nižší energií jsou vzorkem snadno zeslabeny, vzniká tak efekt známý jako tvrdnutí svazku (beam hardening), který přinese do zrekonstruovaného CT obrazu artefakty, které lze obvykle účinně zmírnit vložením kovového filtru, který během skenování odstraňuje fotony s nízkou energií, mezi zdroj rentgenového záření a snímáný vzorek. Výběr materiálu filtru (např. hliník, měď a jejich kombinace) a tloušťky filtru je obvykle založen na kompromisech při analýzách kontrastu, redukce artefaktů a šumu. Byly vyvinuty různé techniky, kterými lze minimalizovat artefakty způsobené tvrdnutím svazku. Kromě použití filtrů lze například účinky tvrdnutí svazku do určité míry snížit použitím beam hardening korekce rekonstrukčního softwaru, pokud je k dispozici. Kromě artefaktů, které mohou být vytvořeny i jinými procesy během skenování, je pro kvalitu CT snímků rozhodující také nastavení systému micro-CT, jako je rozlišení skenování, napětí zdroje, proud paprsku a počet projekcí. [38-40]

K dispozici jsou různé stroje s různými charakteristikami, jako je rentgenové napětí, proud a prostorové rozlišení, protože není možné, aby jeden micro-CT systém pokryl všechny rozsahy prostorových rozlišení mezi 100 μm a 1 μm . Volba prostorového rozlišení je klíčovou otázkou pro získání uspokojivého obrazu dané struktury. Při vysokém rozlišení jsou zobrazovány složité detaily, nicméně skenování s vysokým rozlišením vyžaduje více času a výsledný velký soubor dat představuje výzvu pro ukládání a zpracování dat. [39, 41]

Paralelně k rentgenovému micro-CT byla také vyvinuta micro-CT se synchrotronovými zdroji. Výhodou použití synchrotronových zdrojů je zejména zobrazování vzorků s prostorovým rozlišením až několik desítek nanometrů s vysokým poměrem signálu k šumu a rychlými časy skenování. Synchrotronové zdroje nabízejí tok fotonů o několik řádů vyšší než konvenční rentgenky. Umožňují také použití monochromatických rentgenových paprsků, čímž se zamezí tvorbě artefaktů vzniklými efektem tvrdnutí svazku. Avšak dostupnost synchrotronových zdrojů je omezená. [41]

3 Cíle práce

Byly stanoveny tyto cíle práce:

- a) Kritická rešerše (klíčová slova: nanomechanické vlastnosti, intraoseální implantát, transkutánní implantát, bioinspirovaný implantát, 3D tisk).
- b) Příprava a provedení nanoindentačního experimentu.
- c) Vyhodnocení experimentálních dat a interpretace výsledků.

4 Experiment

Vzorek paroží i s kůží a s lebkou daňka skvrnitého (*Dama dama*) z čeledi jelenovitých (*Cervidae*) byl získán z daňčí farmy Pavla Friedbergera. Detail jednoho parohu je zobrazen na Obr. 39. Jedná se o dvouletého samce (tzv. špičák), který byl poražen v polovině března 2022 (v transkutánní fázi paroží).

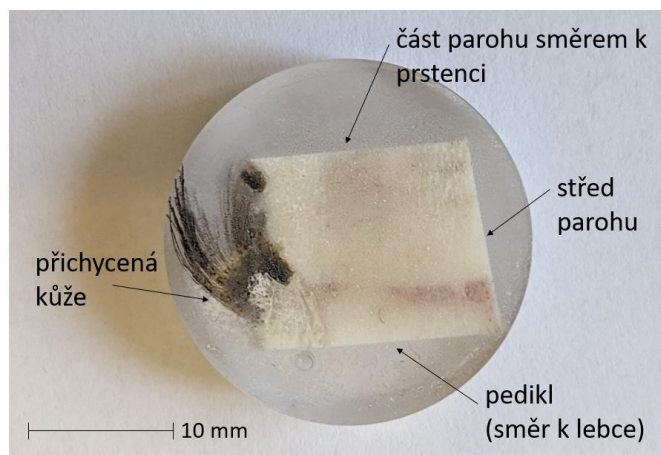


Obr. 39: Detail jednoho parohu dvouletého samce daňka skvrnitého v transkutánní fázi

4.1 Nanoindentace

4.1.1 Příprava vzorku

Vzorek pro nanoindentaci (Obr. 40) byl nařezán pilou Secotom-50 (Struers, Ltd., Willich, Germany) s diamantovým kotoučem. Byl vyříznut segment parohu v místě, kde se přichycuje kůže (na pediklu, pod prstencem parohu), dále byl proveden řez sagitální rovinou parohu a řez středem parohu. Vyříznutý segment parohu byl zalit do dvousložkového čirého epoxidového lepidla s nízkou viskozitou Araldite 2020 vytvrzujícího se při pokojové teplotě. Pro nanoindentační měření je zapotřebí zajistit hladký a rovný povrch indentovaného vzorku. Pro přípravu povrchu byl použit brusný a leštící stroj TegraPol-11 (Struers, Ltd., Willich, Germany) s maximální rychlostí 120 ot/min a maximální silou brusné hlavy 20 N. Postup broušení je uveden v Tab. 4. Poté byl vzorek až do testování zmrazen.



Obr. 40: Vzorek připravený pro nanoindentační měření

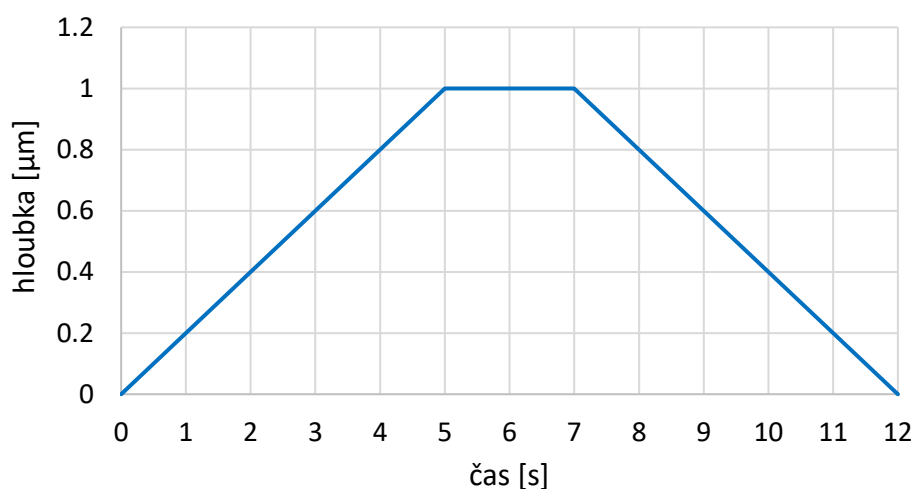
Tab. 4: Postup broušení vzorku pro nanoindentaci

Brusivo/velikost	Zatížení [N]	Rychlost [ot/min]	Čas [s]
35 µm diamantový kotouč	5	120	120
15 µm diamantový kotouč	5	120	120
9 µm diamantová suspenze	15	120	360
3 µm diamantová suspenze	10	120	240
1 µm diamantová suspenze	5	120	240
0.05 µm SiO ₂ suspenze	2.5	100	300

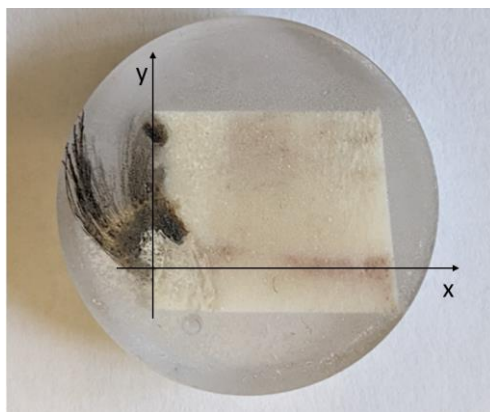
4.1.2 Nanoindentační experiment

Nanoindentační měření byla provedena na přístroji TriboIndenter™ TI 950 (Hysitron, Inc., Minneapolis, USA) v Laboratoři nanoindentačních zkoušek FS ČVUT v Praze. Pro získání mechanických vlastností vzorku byla použita posuvem řízená kvazistatická nanoindentace. Při testování byl použit hrot Berkovich. Vzorek byl testován na vzduchu.

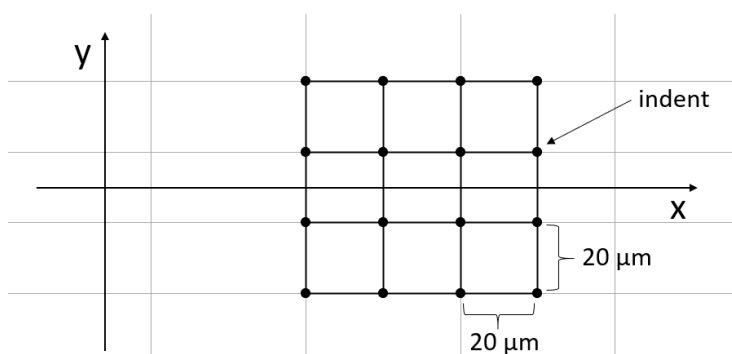
Měření bylo řízeno zatěžovací funkcí: zatížení 5 s – relaxace 2 s – odlehčování 5 s (Obr. 41). Při této zatěžovací funkci dochází nejprve k penetraci hrotu indentoru do vzorku do maximální hloubky 1 µm po dobu 5 s, další 2 s je udržována konstantní hloubka 1 µm a následuje odlehčování, které trvá 5 s.

**Obr. 41:** Zatěžovací funkce použitá pro nanoindentační měření

Na každé definované souřadnici x (Obr. 42) byla naměřena matice indentů (4x4 indenty) se separací 20 µm mezi jednotlivými indenty (Obr. 43). Vzorek byl proměřen od levého kraje (vstup srsti do pediklu) do středu pediklu s následujícími kroky na souřadnici x: 30 µm (levý okraj vzorku), 110 µm, 190 µm, 270 µm, 350 µm, 430 µm, 510 µm, 1000 µm, 1500 µm, 2000 µm, 3000 µm. Dále pak 3500 µm a 3580 µm. Pak dále 4000 µm, 5000 µm, 6000 µm, 7000 µm, 8000 µm, 10000 µm, 12000 µm, 14000 µm. Poslední matice indentů byla naměřena na x-ové souřadnici 15700 µm, tj. pravý okraj vzorku představující střed parohu. Ke každé matici indentů byl pořízen snímek povrchu vzorku pomocí světelného mikroskopu zabudovaného v nanoindentoru.



Obr. 42: Zavedený souřadný systém



Obr. 43: Schéma matice indentů

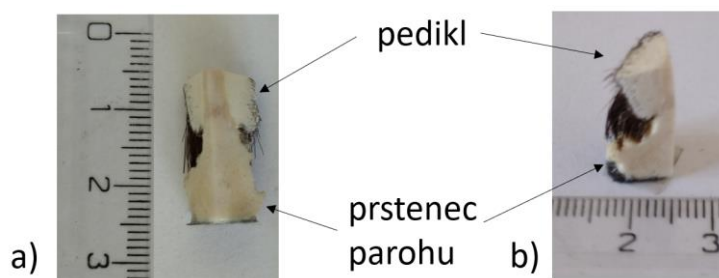
4.1.3 Analýza dat

Naměřená data byla ve formátu závislosti zatížení na posuvu hrotu indentoru. Celkem bylo provedeno 22 matic indentů (16 indentů na jednu matici, tedy celkem 352 indentů). Některé nanoindentační křivky byly vyřazeny z důvodu vysoké drsnosti povrchu (špatný kontakt mezi hrotem a povrchem vzorku), což bylo zřejmě způsobeno úbytkem tekutin v měkkých fázích vzorku během měření. V softwaru TriboScan™ byl analýzou odlehčovacích křivek pomocí modelu Olivera a Pharra pro každý indent vypočten redukovaný modul E_r a tvrdost H .

4.2 Micro-CT

4.2.1 Příprava vzorku

Vzorek byl připraven resekci celého paroží pilou Secotom-50 (Struers, Ltd., Willich, Germany) s diamantovým kotoučem jako jeden kvadrant o výšce 20 mm a opsaném průměru 9 mm (Obr. 44). Poté byl až do testování vzorek zmrazen.



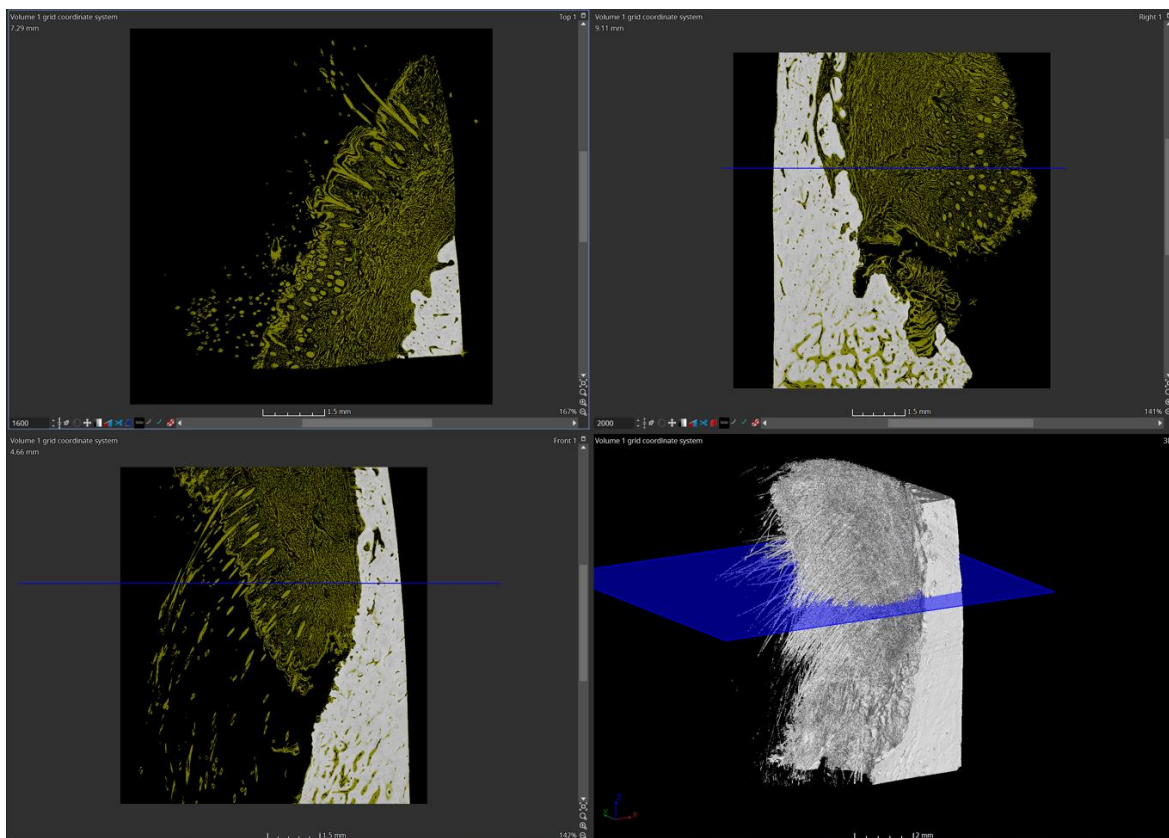
Obr. 44: Vzorek pro micro-CT skenování

4.2.2 Nastavení experimentu

Za účelem strukturální analýzy připraveného vzorku byl na ÚTAM AV ČR vyvinut micro-CT zobrazovací systém v konfiguraci s mikroohniskovou rentgenovou lampou L10101 (Hamamatsu, Japan), Gadox scintilačním plochým detektorem XRD 3025 (Varex Imaging, USA) a otočným stolcem. Pro získání nejlepší možné kvality obrazu byl zdroj rentgenového záření provozován při napětí 100 kV a proudu 40 μ A odpovídající výstupnímu výkonu 4 W a spotu terčíku 5 μ m. Geometrické nastavení zobrazovacího systému spolu s detektorem o fyzické velikosti 300.8 x 251.2 mm a 3008 x 2512 px maticí umožnily metodou filtrované zpětné projekce s využitím FDK (Feldkamp, Davis a Kress) algoritmu získat volumetrická data s voxelu velikosti 4.1 x 4.1 x 4.1 μ m. Skenovací procedura se skládá z 10800 projekcí s dobou pořízení jedné projekce 4.2 s. Byl použit hliníkový filtr tloušťky 2 mm.

4.2.3 Analýza dat

Data byla rekonstruována pomocí algoritmu Feldkampa, Davise a Kresse [42] implementovaného v softwaru VGSTUDIO MAX (Volume Graphics, Germany) vyvinutého pro analýzu a vizualizaci objemových dat získaných počítačovou tomografií. S výsledným 3D modelem je možné v softwaru VGSTUDIO MAX virtuálně manipulovat (rotace, zoom, prohlížení vnitřní struktury pomocí řezů atd.) nebo provádět různá měření, např. měření pórovitosti v definované oblasti (Obr. 45).

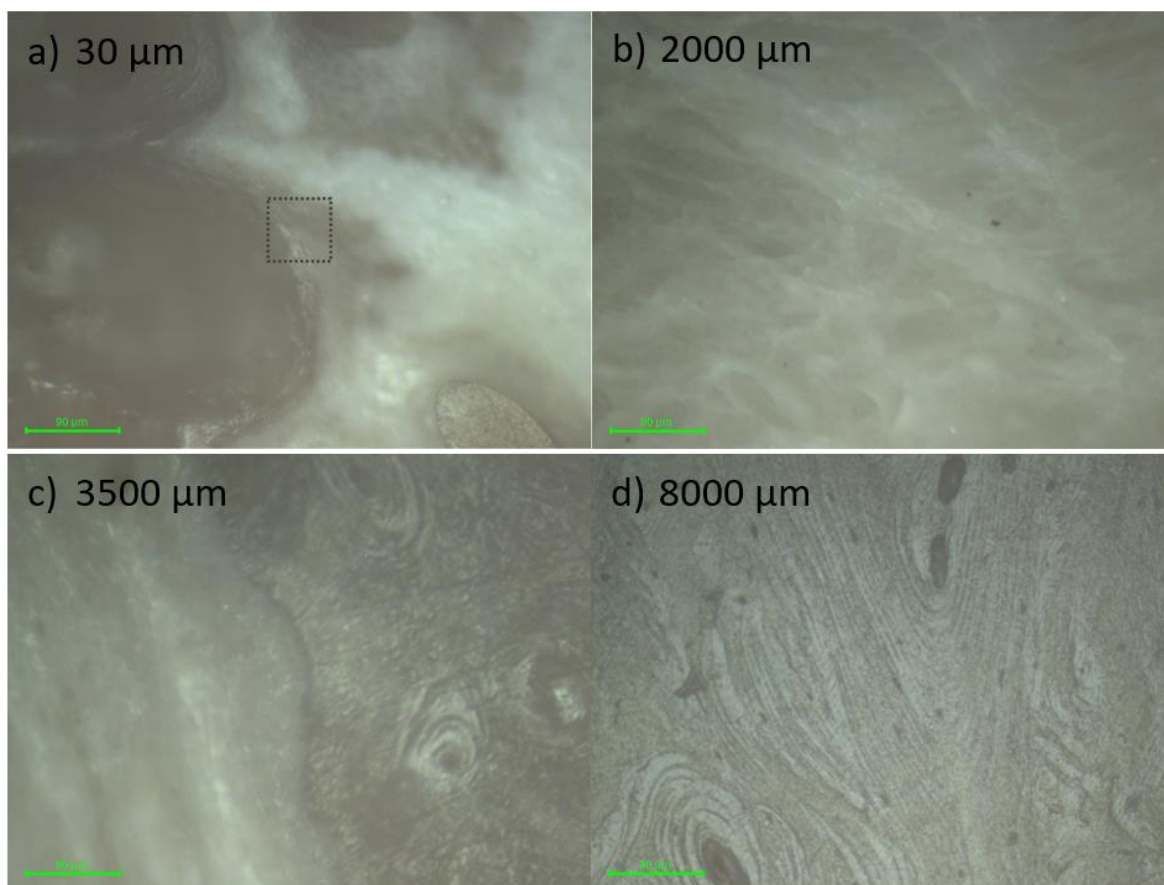


Obr. 45: Ukázka práce s výsledným 3D modelem skenovaného vzorku v softwaru VGSTUDIO MAX. Vpravo dole 3D model s naznačenou plochou řezu, příslušný transverzální řez je zobrazen vlevo nahoře. Vpravo nahoře sagitální řez a vlevo dole frontální řez.

5 Výsledky

5.1 Nanoindentace

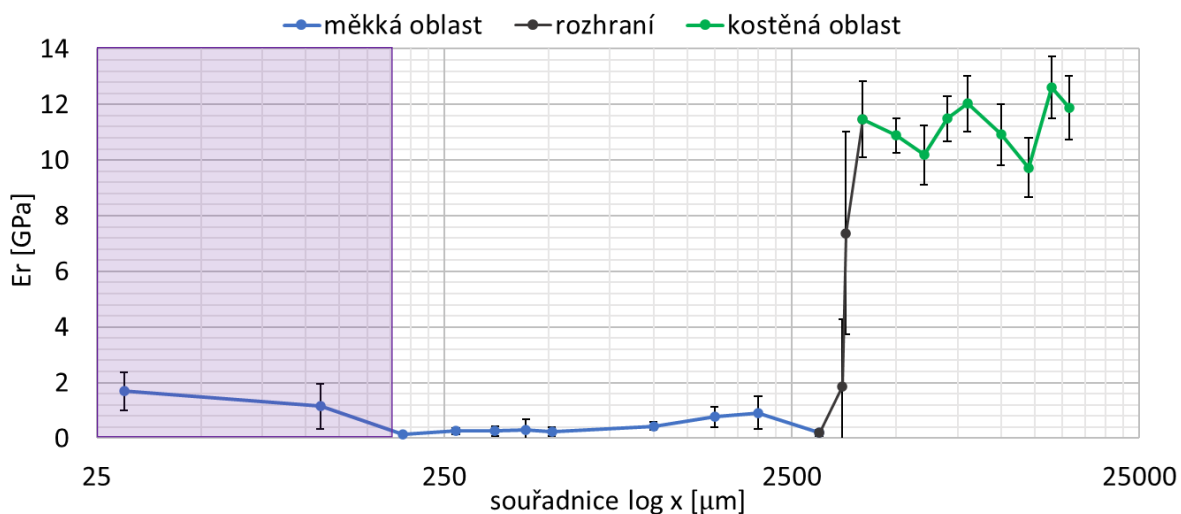
Ze snímků indentovaných oblastí pořízených světelným mikroskopem, který je zabudovaný v nanoindentoru od vnějšího okraje vzorku (Obr. 46a) do pravého okraje vzorku (znázorňující střed pediklu) jsou zřetelně vidět dvě rozlišné materiálové fáze. Od vnějšího okraje vzorku se směrem do středu nachází „světlá“ fáze, jejíž tloušťka je zhruba 3.5 mm (Obr. 46b). Dále je směrem do středu pediklu vidět kostěná fáze (Obr. 46d). Mezi oběma fázemi je jasně zřetelné rozhraní (Obr. 46c). Snímky všech indentovaných oblastí jsou k nahlédnutí v Příloze 1 na přiloženém CD.



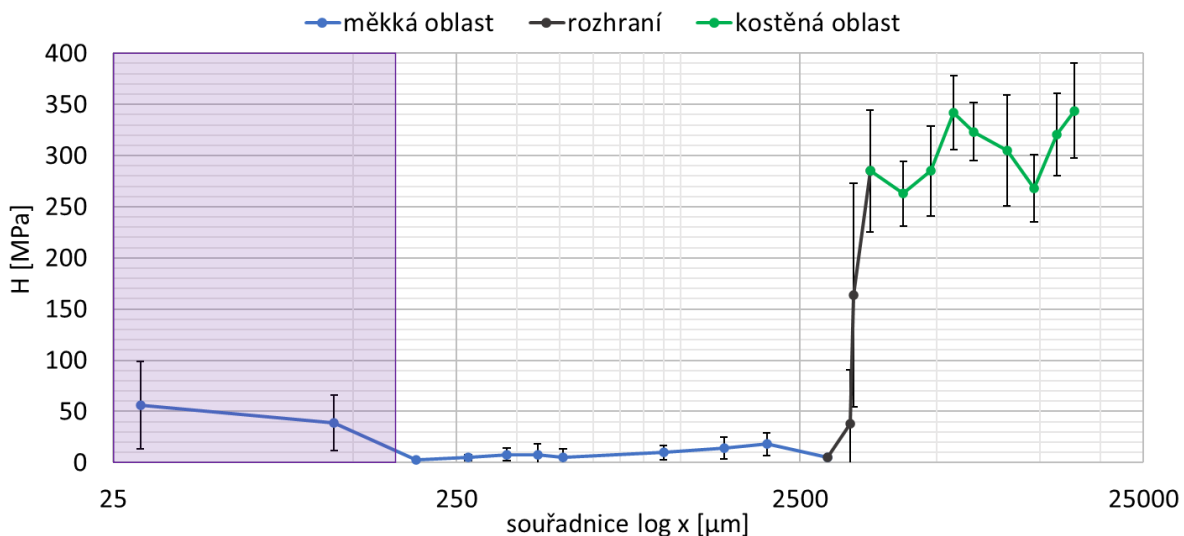
Obr. 46: Ukázky snímků pořízených světelným mikroskopem zabudovaným v nanoindentoru. a) souřadnice $x=30\ \mu\text{m}$, vnější okraj vzorku, čárkovaný čtverec znázorňuje umístění a velikost matice indentů. b) souřadnice $x=2000\ \mu\text{m}$, ukázka struktury „světlé“ fáze. c) souřadnice $x=3500\ \mu\text{m}$, rozhraní mezi „světlou“ a kostěnou fází. d) souřadnice $x=8000\ \mu\text{m}$, ukázka kostěné struktury. Indentace byla provedena uprostřed každého snímku.

Podle mikrostruktury indentované oblasti byla naměřená data z nanoindentace roztříděna do dvou oblastí – měkká („světlá“) oblast a kostěná oblast, mezi kterými je ostré rozhraní a tyto oblasti mají řádově odlišné mechanické vlastnosti (Obr. 47 a 48). Hodnoty redukovaného modulu E_r měkké oblasti se pohybují v rozmezí 136.58 – 919.91 MPa a hodnoty tvrdosti H se pohybují v rozmezí 3.01 – 18.01 MPa. Hodnoty redukovaného modulu E_r kostěné oblasti se pohybují v rozmezí 9731.44 – 12620.01 MPa a hodnoty tvrdosti H se pohybují v rozmezí 262.84 – 343.74 MPa (Tab. 5 a 6). Na vnějším okraji vzorku,

kde se vyskytuje srst zvířete, mohou být naměřená data ovlivněna přítomností epoxidového lepidla zasahujícího do krajních pórů vzorku a srst jím navíc může být nasáklá. Proto nanoindentační měření pro souřadnice $x = 30 \mu\text{m}$ (Obr. 46a) a $x = 110 \mu\text{m}$ jsou vynechány z analýzy.



Obr. 47: Průměrné hodnoty redukovaných modulů E_r v jednotlivých maticích indentů v závislosti na logaritmizované souřadnici x . Fialový obdélník vymezuje oblast, která je pravděpodobně ovlivněná epoxidem.



Obr. 48: Průměrné hodnoty tvrdostí H v jednotlivých maticích indentů v závislosti na logaritmizované souřadnici x . Fialový obdélník vymezuje oblast, která je pravděpodobně ovlivněná epoxidem.

Tab. 5: Průměrné hodnoty redukovaných modulů E_r v jednotlivých maticích indentů a jejich směrodatné odchylky σ

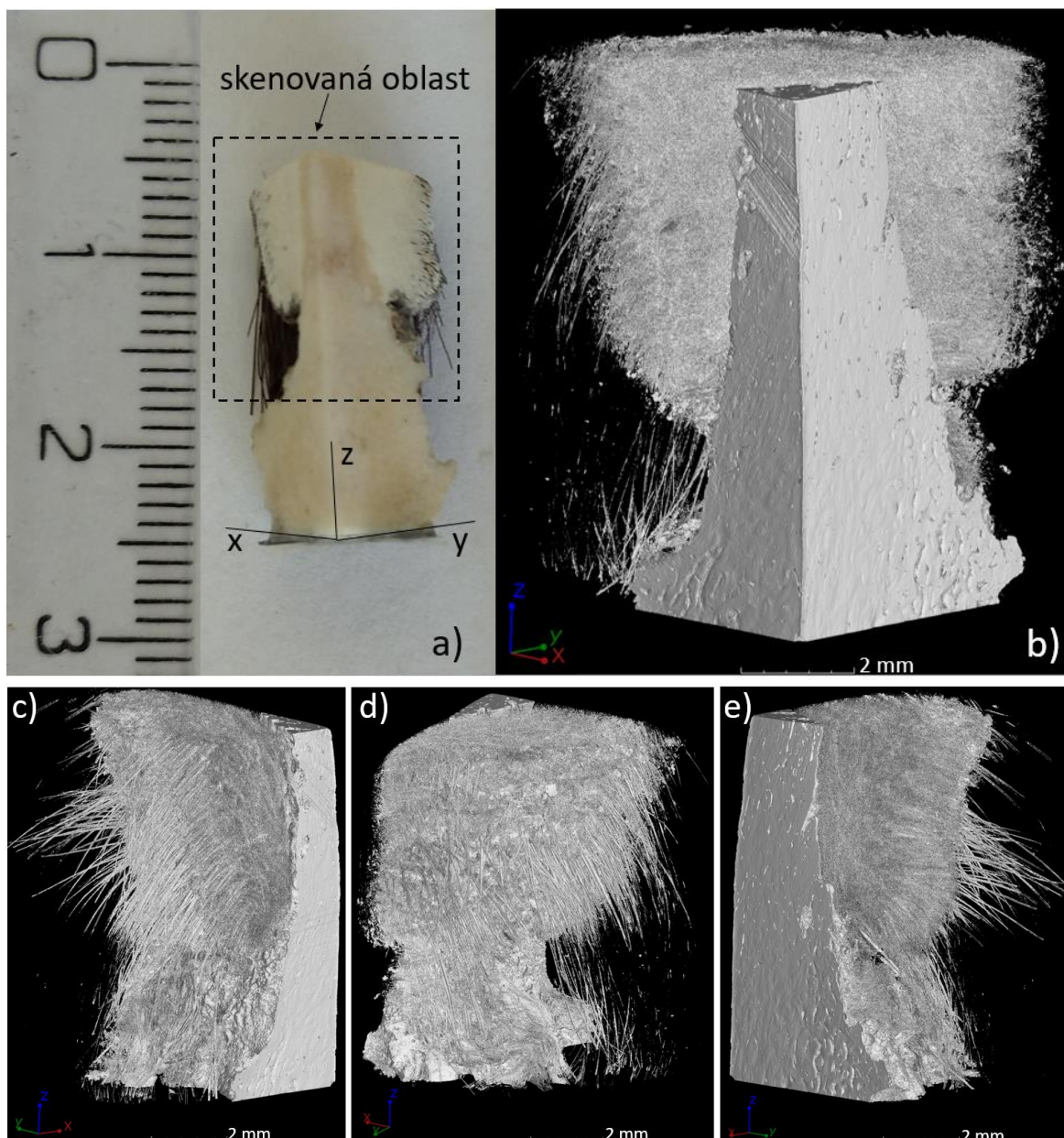
souřadnice x [μm]	30	110	190	270	350	430	510	1000
Er [GPa]	1.6897	1.1484	0.1366	0.2568	0.2566	0.3067	0.2256	0.4430
σ [GPa]	0.6951	0.8017	0.0207	0.1068	0.1762	0.3901	0.1599	0.1490
souřadnice x [μm]	1500	2000	3000	3500	3580	4000	5000	6000
Er [GPa]	0.7658	0.9199	0.1951	1.8663	7.3759	11.4762	10.8808	10.1867
σ [GPa]	0.3612	0.6006	0.1182	2.4043	3.6315	1.3646	0.6215	1.0678
souřadnice x [μm]	7000	8000	10000	12000	14000	15700		
Er [GPa]	11.4926	12.0359	10.9215	9.7314	12.6200	11.8795		
σ [GPa]	0.8107	1.0021	1.0993	1.0738	1.1177	1.1527		

Tab. 6: Průměrné hodnoty tvrdostí H v jednotlivých maticích indentů a jejich směrodatné odchylky σ

souřadnice x [μm]	30	110	190	270	350	430	510	1000
H [MPa]	56.0186	38.9778	3.0077	4.7949	7.6903	8.0011	5.3568	9.7373
σ [MPa]	43.0331	27.2054	1.0384	2.7317	6.2246	10.6672	8.1699	7.2378
souřadnice x [μm]	1500	2000	3000	3500	3580	4000	5000	6000
H [MPa]	14.2221	18.0085	4.8740	38.0796	163.5666	285.0152	262.8448	285.0084
σ [MPa]	10.4331	10.9700	0.7676	52.4612	109.4106	59.7076	31.6118	44.0912
souřadnice x [μm]	7000	8000	10000	12000	14000	15700		
H [MPa]	341.6340	323.3165	304.9477	268.2665	320.6315	343.7398		
σ [MPa]	36.1934	28.5887	54.4882	32.9567	40.5096	46.5669		

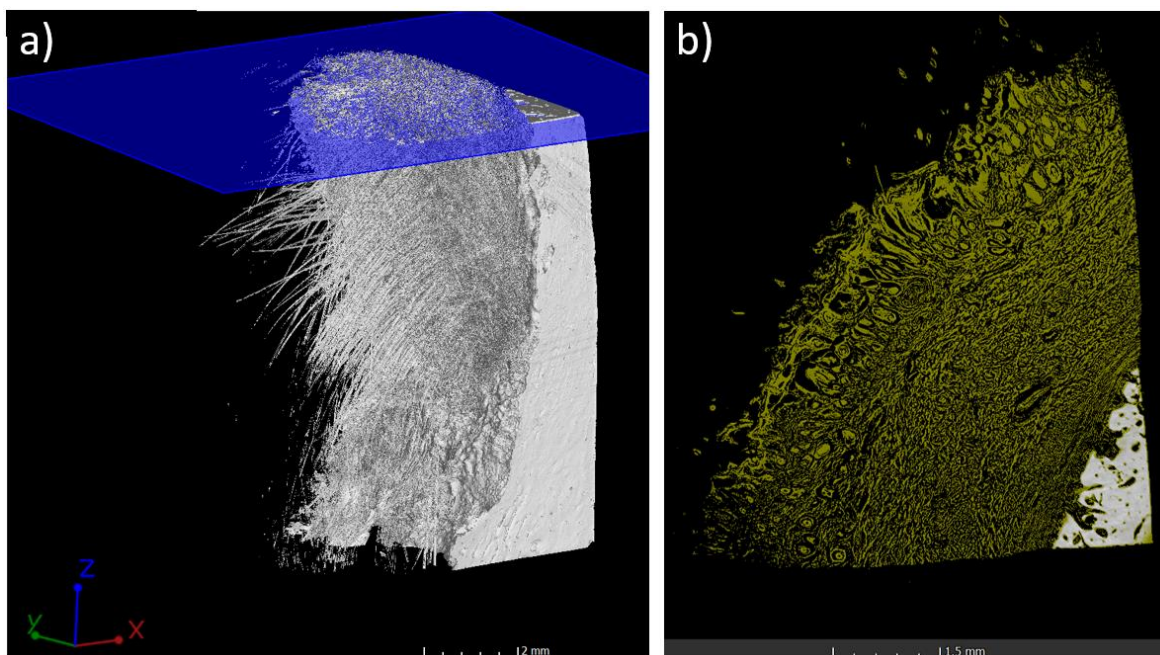
5.2 Micro-CT

Výsledný 3D model po rekonstrukci dat získaných z mikropočítačové tomografie je zobrazen na Obr. 49. Pro zorientování se v modelu je ukázáno porovnání s fotografií skenovaného vzorku. Na 3D modelu vzorku jsou jasně rozlišitelné obě materiálové fáze – měkká oblast i se srstí a kostěná oblast.

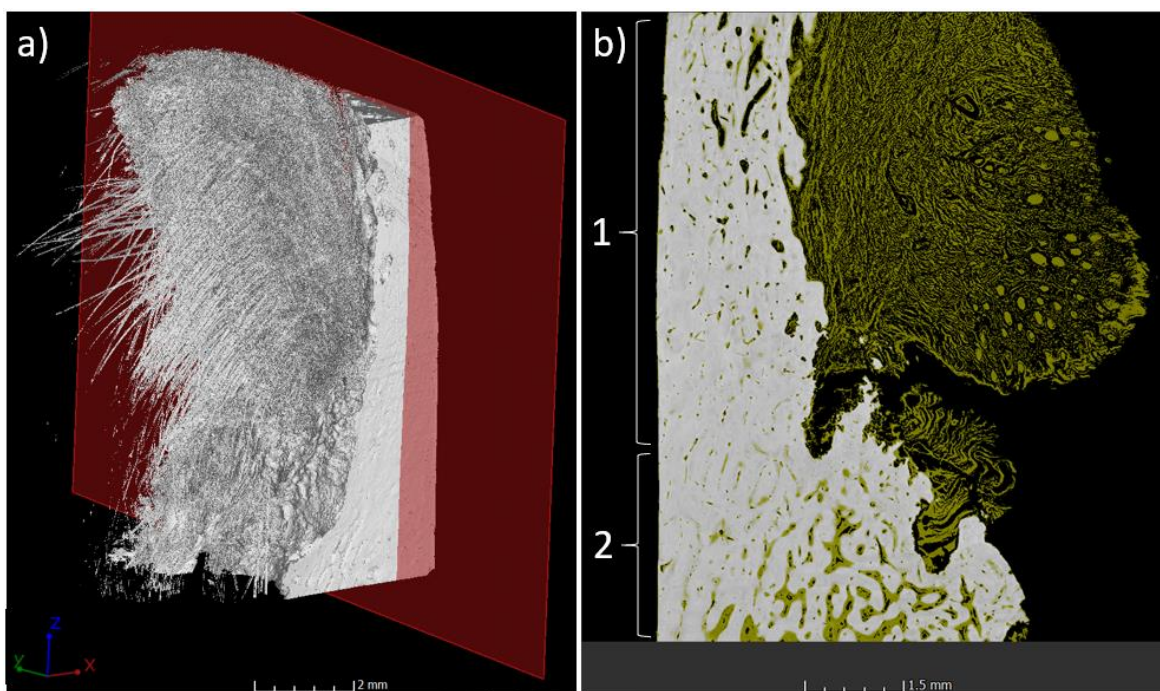


Obr. 49: a) Fotografie skenovaného vzorku, b) výsledný 3D model vzorku ve stejném pohledu jako na fotografii, c) 3D model pohled zleva, d) 3D model pohled na srst, e) 3D model pohled zprava.

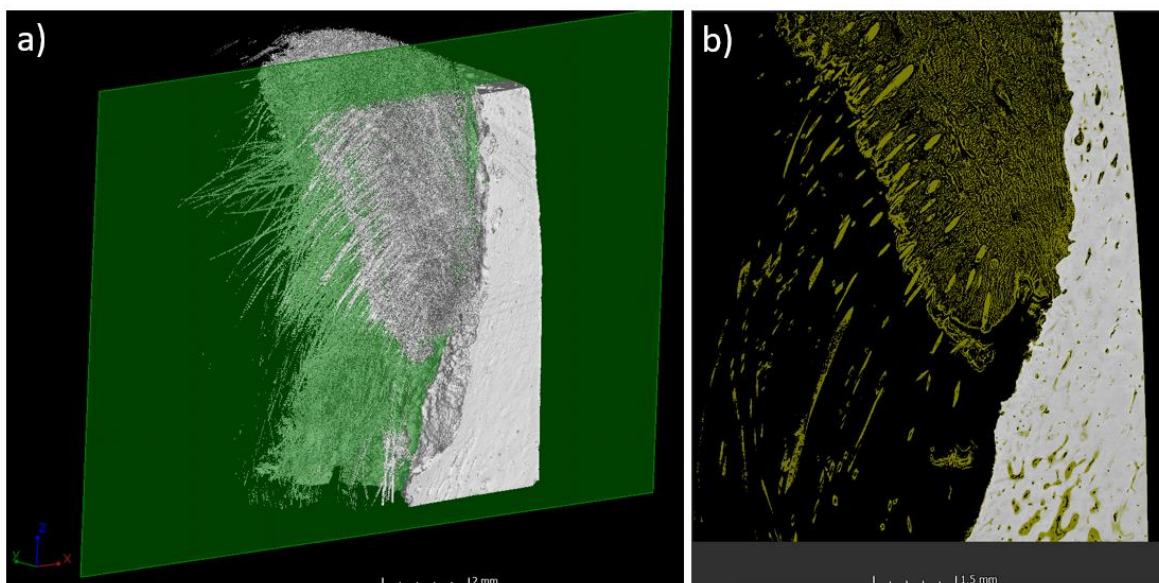
Za účelem prozkoumání vnitřní mikrostruktury vzorku byly vytvořeny řezy 3D modelem třemi ortogonálními rovinami (transverzální, sagitální a frontální). Bylo vytvořeno 10 transverzálních řezů (Obr. 50), 5 sagitálních řezů (Obr. 51) a 5 frontálních řezů (Obr. 52). Všechny vytvořené řezy jsou k nahlédnutí v Příloze 2 na přiloženém CD.



Obr. 50: Ukázka transverzálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez transverzální rovinou. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.

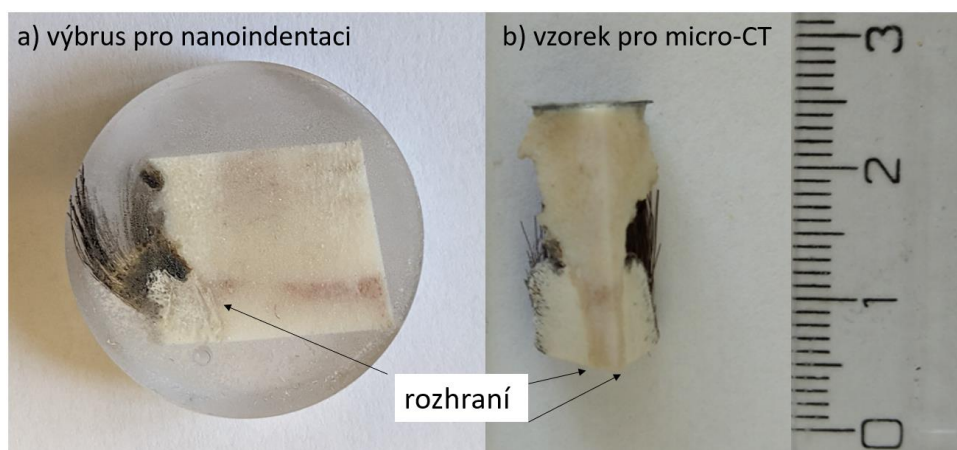


Obr. 51: Ukázka sagitálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez sagitální rovinou. 1 – pedikl, 2 – prstenec parohu. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.



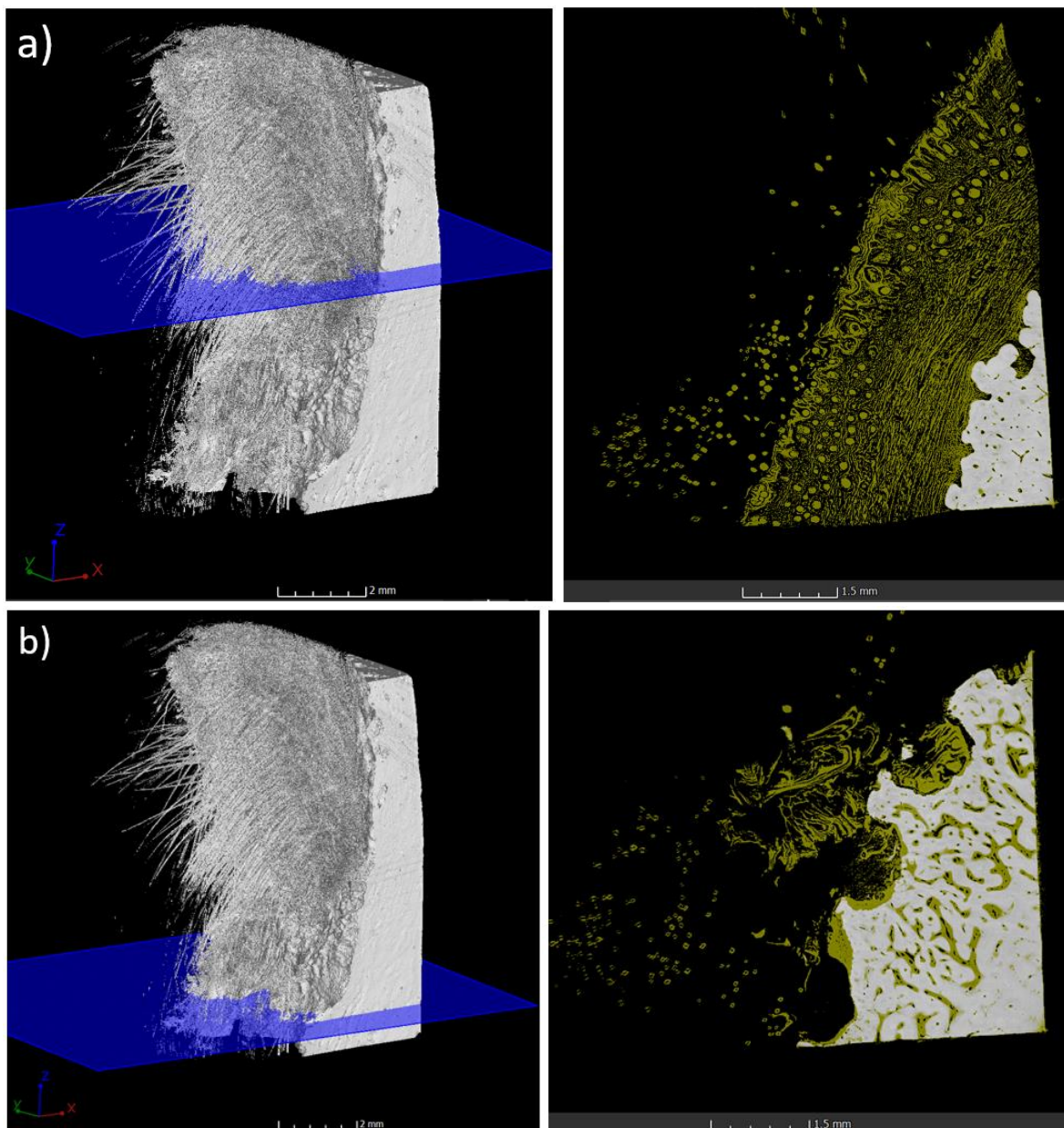
Obr. 52: Ukázka frontálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez frontální rovinou. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.

Na všech řezech je viditelná hranice mezi měkkou fází (žlutá barva) a kostěnou fází. Hranice mezi měkkou a kostěnou fází je také vidět pouhým okem na fotografii vzorku, který byl podroben micro-CT i na výbrusu pro nanoindentaci (Obr. 53).



Obr. 53: Fotografie: a) výbrusu pro nanoindentaci, b) vzorku pro micro-CT skenování. Černé šipky ukazují na hranici mezi měkkou a kostěnou fází.

Na sagitálních a frontálních řezech 3D modelu vzorku je patrný přechod mezi pediklem a parohem. Prstenec parohu má výrazně větší pórovitost kostěné struktury v porovnání s pediklem, jak dokazuje transverzální řez pediklem v porovnání s transverzálním řezem prstence parohu (Obr. 54).



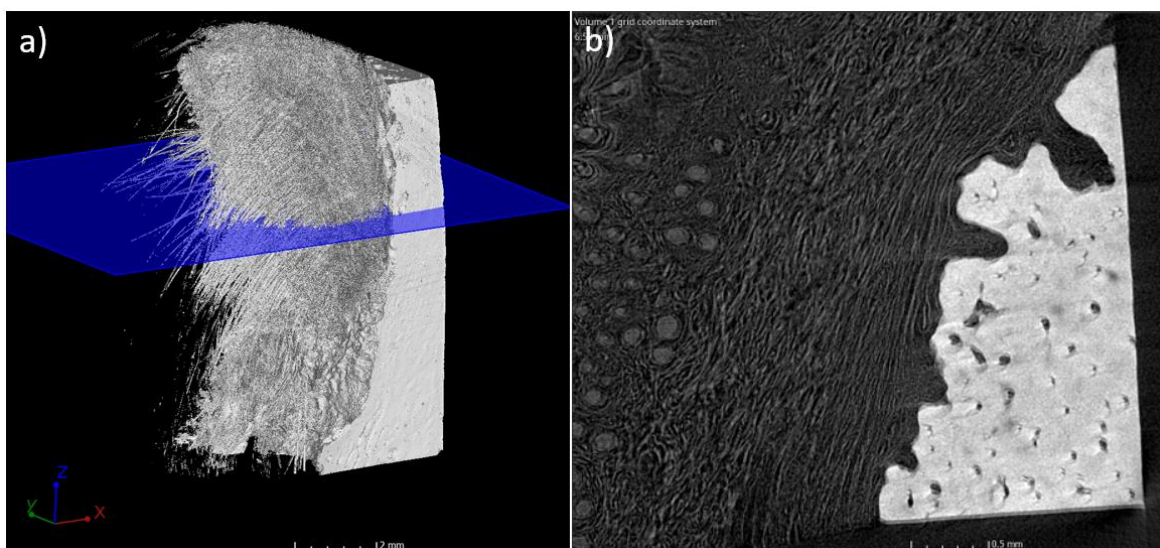
Obr. 54: Znárodnění rozdílů mezi pediklem a parohem. a) Transverzální řez pediklem. b) Transverzální řez prstencem parohu, který má výrazně větší pórovitost kostěné struktury v porovnání s pediklem.

6 Diskuse

V indentované měkké oblasti byly naměřeny řádově vyšší hodnoty redukovaného modulu, než se uvádí pro lidskou kůži. Hodnota redukovaného modulu indentované měkké oblasti se pohybuje v rozmezí od 136.58 MPa do 919.91 MPa. Pro hodnotu Youngova modulu lidské kůže se v literatuře udává rozmezí od 0.05 MPa do 20 MPa v závislosti na typu měření a tloušťky kůže a hodnota redukovaného modulu lidské kůže měřeného indentací se pohybuje v řádu desítek kPa [43].

C. Li a J. M. Suttie [44] se zabývali histologickými studii tvorby kůže pediklu a její přeměny na samet u jelena evropského a napsali, že pedikly a rostoucí paroží se skládají z vnějších a vnitřních složek. Vnější složku tvoří pediklová kůže a samet parohu. Kůže pediklu je typická kůže skalpu jelena, zatímco samet parohu je specializovaná kůže. Na rozdíl od kůže na těle jelena a pediklu postrádá samet podkožní vazivo, ale má schopnost tvořit nové vlasové folikuly. Vnitřní složka se skládá z osifikované chrupavky. Dále pomocí histologie doložili, že kůže pediklu sestává z epidermis, dermis a podkožního vaziva a že periost lemuje povrch pediklové kosti a v různých místech nabývá různé tloušťky.

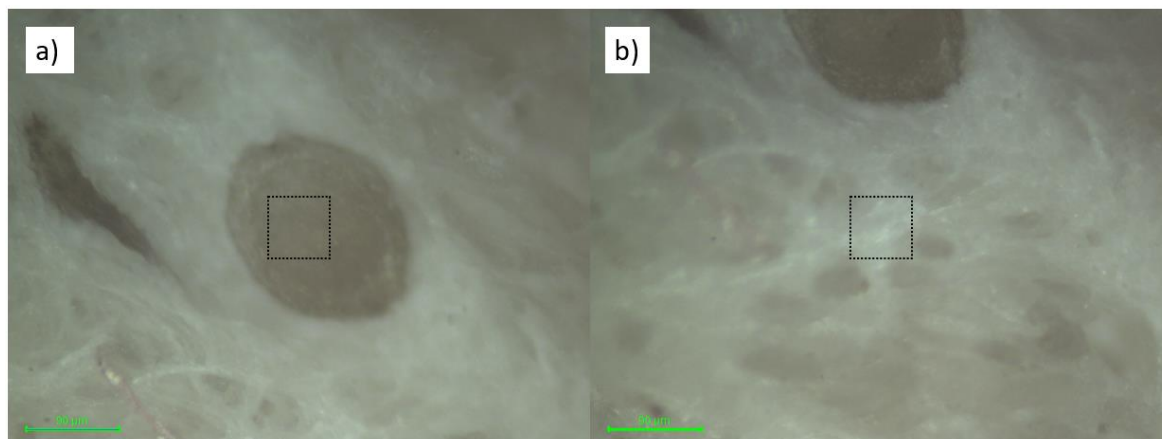
Z toho důvodu si myslím, že indentovaná měkká oblast je oblastí měkkých tkání skládající se z kůže pediklu a periostu. Kůže pediklu se tedy nepřipojuje přímo k povrchové pórovité struktuře kostěné fáze (pediklové kosti), ale mezi kůží a kostní tkání je mezivrstva, ke které se připojuje kůže a která zároveň vrůstá do tvrdé kostěné tkáně a touto mezivrstvou by mohl být právě periost. Transverzální řez pediklem znázorňující nehomogenní mikrostrukturu měkké oblasti ukazuje Obr. 55.



Obr. 55: Transverzální řez pediklem. a) 3D model s naznačenou plochou řezu. b) Řez znázorňující nehomogenní mikrostrukturu měkké oblasti (šedá barva). Bílou barvou je na řezu zobrazena kostěná oblast.

V měkké fázi se vyskytují kruhové útvary, které mají vyšší tuhost i tvrdost oproti měkké fázi. Tyto kruhové útvary se podle snímků ze světelného mikroskopu vyskytují v měkké fázi zhruba do 1.5 mm její tloušťky. V hloubce 1 mm od vnějšího okraje vzorku byl pro porovnání s měkkou fází nanoindentačnímu měření podroben jeden z takových

kruhovitých útvarů (Obr. 56). V kruhovitěm útvaru byl naměřen redukovaný modul $E_r = 2.7614 \pm 0.2870$ GPa a tvrdost $H = 133.04 \pm 25.51$ MPa. Zatímco v okolní měkké fázi byl naměřen redukovaný modul $E_r = 0.4429 \pm 0.1490$ GPa a tvrdost $H = 9.74 \pm 7.24$ MPa. Kruhovitý útvar má vyšší hodnotu redukovaného modulu a vyšší hodnotu tvrdosti v porovnání s okolní měkkou fází, ale nižší hodnoty redukovaného modulu a tvrdosti oproti hodnotám zjištěným v kostěné fázi. Může se jednat o seřízlé chlupy srsti, nebo cibulky chlupů.



Obr. 56: Snímky pořízené světelným mikroskopem zabudovaným v nanoindentoru pro souřadnici $x = 1000$ μm . a) kruhovitý útvar s vyšší tuhostí i tvrdostí oproti měkké fázi. b) měkká fáze. Čárkovaný čtverec znázorňuje velikost a umístění matice indentů.

Struktura parohu je uzpůsobená ke „strkacím“ soubojům samců v době říje a od hrotu parohu směrem k pediklu dochází k postupnému tuhnutí [2]. Pórovitost parohu tedy může mít přirozený efekt v podobě snížení tuhosti parohu, aby při soubojích nedocházelo k porušení struktury parohů. Avšak zkoumaný vzorek paroží pochází z daňka, který byl poražen v polovině března, přičemž daňci shazují paroží v dubnu až v květnu. Vzhledem k tomu, by mohla být pórovitost na prstenci parohu způsobená již započatou činností osteoklastů odbourávajících kost, protože při shazování paroží dochází k oddělení právě mezi prstencem parohu a pediklem.

Z časových důvodů nebyla provedena histologie vzorku pediklu, která by potvrdila nebo vyvrátila tvrzení uvedená v diskusi výše. Pro potvrzení, o jaké vrstvy měkkých tkání se jedná, je nutné udělat histologii pediklu. Vzorky pro nanoindentaci a micro-CT pochází ze stejného parohu, ale každý byl vyříznut na jiném místě. Pro příště by mělo být nanoindentační měření a micro-CT propojeno s histologií téhož vzorku, aby bylo možné porovnávat mechanické vlastnosti vzhledem k mikrostruktuře vzorku.

Pendegrass a kol. v [1], [2] a [20] zkonstruovali transkutánní rozhraní ITAP tak, že lidská kůže je přetáhnuta přes perforovanou přírubu potaženou HA a k tomuto tvrdému pórovitému HA povlaku se má lidská kůže přichytit a prorůstat jím (kapitola 2.3). Pracovali tedy s hypotézou, že se kůže jelena připojuje přímo k pórovitému povrchu pediklové kosti. Podle mého názoru je taková konstrukce kožního rozhraní nefunkční, protože by mezi pediklovou kostí a kůží jelena mohla být přítomna mezivrstva, která tyto dvě odlišné tkáně spojuje. To podporuje fakt, že pokusy na lidech vedly k rozpadu transkutánního rozhraní s HA a ITAP nakonec nebyla uvedena na trh [3]. Vývoj transkutánního rozhraní u ITAP

provázelo od začátku hned několik problémů, mezi nimi marsupilizace, epidermální srůstání, infekce, záněty, permigrace, avulze nebo jejich kombinace [22]. Vzhledem k hodnotám mechanických vlastností naměřených v oblasti měkkých tkání pediklu a zobrazení rozhraní měkkých tkání a pediklu pomocí micro-CT se domnívám, že je pro funkční těsnící transkutánní rozhraní nutné mezi lidskou kůží a kovový implantát vložit měkkou mezivrstvu, která bude mechanicky připevněna k implantátu na transkutánním rozhraní a do které bude prorůstat kůže a tato mezivrstva by tedy měla simulovat funkci periostu.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provést a vyhodnotit nanoindentační experiment na vzorku daňčího paroží představujícího biomimetický model pro bezinfekční transkutánní rozhraní oseointegrované amputační protézy. Výsledky této práce by měly sloužit jako podklad pro vývoj funkčního oseointegrovaného implantačního systému s těsnícím transkutánním rozhraním pro transfemorální amputace, který bude vyroben pomocí 3D tisku.

V rešeršní studii byla popsána anatomie kosti a kůže, přehled dosavadního řešení oseointegrovaných amputačních protéz, dále popis nanoindentačního měření, mechanických vlastností kovových biomateriálů, používaných pro oseointegrované protézy, metod aditivní výroby a poslední kapitola rešeršní studie obsahuje popis nedestruktivní zobrazovací techniky micro-CT.

Nanoindentační experiment byl proveden na vzorku pediklu dvouletého samce daňka skvrnitého v transkutánní fázi. Pomocí modelu Olivera a Pharra byly vyhodnoceny hodnoty redukovaných modulů a tvrdostí od vnějšího okraje do středu pediklu. Naměřená data byla rozdělena podle hodnot redukovaných modulů a tvrdostí do dvou oblastí – měkké tkáně a kostní tkáň. Dále bylo provedeno skenování vzorku paroží pomocí micro-CT. Po rekonstrukci dat byla provedena virtuální pitva výsledného 3D modelu skenovaného vzorku. Pomocí sagitálních, frontálních a transversálních řezů 3D modelem byla zobrazena vnitřní mikrostruktura vzorku. Mezi měkkou a kostěnou fází bylo pozorováno ostré rozhraní. Byla navržena hypotéza, že se kůže pediklu nepřipojuje přímo ke kostní tkáni, ale mezi kůží a kostní tkání pediklu by mohla být umístěna mezivrstva, na kterou se připojuje kůže a která má zároveň schopnost prorůstat do pórovité povrchové vrstvy kostní tkáně. Touto mezivrstvou by mohl být periost.

Všechny cíle práce byly splněny. K ověření navržené hypotézy by bylo vhodné provést histologii měkkých tkání pediklu a další potřebné testování.

Seznam použité literatury

- [1] C. J. Pendegrass, A. E. Goodship, G. W. Blunn, Development of a soft tissue seal around bone-anchored transcutaneous amputation prostheses, *Biomaterials*, **27** (2006) 4183-4191. ISSN 0142-9612
- [2] C. J. Pendegrass, A. E. Goodship, J. S. Price, G. W. Blunn, Nature's answer to breaching the skin barrier: an innovative development for amputees, *Journal of anatomy*, **209** (2006) 59-67. ISSN 0021-8782
- [3] J. S. Hoellwarth, K. Tetsworth, S. R. Rozbruch, M. B. Handal, A. Coughlan, M. Al Muderis, Osseointegration for Amputees: current implants, techniques, and future directions, *JBJS Reviews*, **8** (2020) 1-10. ISSN 2329-9185
- [4] A. Thesleff, R. Brånemark, B. Håkansson a kol., Biomechanical Characterisation of Bone-anchored Implant Systems for Amputation Limb Prostheses: A Systematic Review, *Annals of biomedical engineering*, **46** (2018) 377-391. ISSN 0090-6964
- [5] R. Hudák, D. Kachlík a kol., *Memorix anatomie*, 4. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-420-0
- [6] J. W. Rohen, C. Yokochi, E. Lütjen-Drecoll, *Color Atlas of Anatomy: A Photographic Study of the Human Body*, 7. vydání, Schattauer, 2011. ISBN 9781582558561
- [7] R. Čihák, *Anatomie 1*, 2. upr. a dopl. vyd., Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 8071699705
- [8] R. Čihák, *Anatomie 3*, 1. vydání, Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 80-7169-140-2
- [9] I. Dylevský, *Základy funkční anatomie člověka*, Fakulta biomedicínského inženýrství, Praha: České vysoké učení technické, 2013. ISBN 9788001052495
- [10] F. Clemente, B. Håkansson, C. Cipriani a kol., Touch and Hearing Mediate Osseoperception, *Scientific reports*, **7** (2017) 45363. ISSN 2045-2322
- [11] M. Pitkin, Design features of implants for direct skeletal attachment of limb prostheses. *Journal of biomedical materials research Part A*, **101** (2013) 3339-3348. ISSN 1549-3296
- [12] M. Örgel, A. Ranker, A. Harb, C. Krettek, H. H. Aschoff, Transkutane osseointegrierte Prothesensysteme (TOPS) nach Majoramputation der unteren Extremität: Eine retrospektive 3-Jahres-Analyse, *Orthopade*, **50** (2021) 4-13. ISSN 1433-0431
- [13] M. Al Muderis, W. Lu, J. Li, Osseointegrated Prosthetic Limb for the treatment of lower limb amputations, *Unfallchirurg*, **120** (2017) 306–311. ISSN 1433-044X
- [14] M. J. Kramer, B. J. Tanner, A. E. Horvai a kol., Compressive osseointegration promotes viable bone at the endoprosthetic interface: retrieval study of Compress® implants, *International Orthopaedics*, **32** (2008) 567–571. ISSN 1432-5195

- [15] R. L. McGough, M. A. Goodman, R. L. Randall, J. A. Forsberg, B. K. Potter, B. Lindsey, The Compress® transcutaneous implant for rehabilitation following limb amputation, *Unfallchirurg*, **120** (2017) 300-305. ISSN 1433-044X
- [16] N. V. Kang, C. J. Pendegrass, L. Marks, G. W. Blunn, Osseocutaneous integration of an intraosseous transcutaneous amputation prosthesis implant used for reconstruction of a transhumeral amputee: case report, *The Journal of Hand Surgery*, **35** (2010) 1130-1134. ISSN 0363-5023
- [17] N. Fitzpatrick, T. J. Smith, C. J. Pendegrass, R. Yeadon, M. Ring, A. E. Goodship, G. W. Blunn, Intraosseous Transcutaneous Amputation Prosthesis (ITAP) for Limb Salvage in 4 Dogs, *Veterinary surgery*, **40** (2011) 909-925. ISSN 0161-3499
- [18] K. Bewilogua, D. Hofmann, History of diamond-like carbon films — From first experiments to worldwide applications, *Surface & coatings technology*, **242** (2014) 214-225. ISSN 0257-8972
- [19] C. A. Love, R. B. Cook, T. J. Harvey, P. A. Dearnley, R. J. K. Wood, Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants—a review, *Tribology international*, **63** (2013) 141-150. ISSN 0301-679X
- [20] C. J. Pendegrass, D. Gordon, C. A. Middleton, S. N. Sun, G. W. Blunn, Sealing the skin barrier around transcutaneous implants: in vitro study of keratinocyte proliferation and adhesion in response to surface modifications of titanium alloy, *Journal of Bone and Joint Surgery – British Volume*, **90** (2008) 114-121. ISSN 0301-620X
- [21] M. Chimutengwende-Gordon, C. Pendegrass, G. Blunn, Enhancing the soft tissue seal around intraosseous transcutaneous amputation prostheses using silanized fibronectin titanium alloy, *Biomedical Materials*, **6** (2011) 025008. ISSN 1748-6041
- [22] A. Trent, M. E. Van Dyke, Development and characterization of a biomimetic coating for percutaneous devices, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **182** (2019) 110351. ISSN 0927-7765
- [23] S. Ferraris, M. Prato, C. Vineis, A. Varesano, G. Gautier Di Confiengo, S. Spriano, Coupling of keratin with titanium: A physico-chemical characterization of functionalized or coated surfaces, *Surface & coatings technology*, **397** (2020) 126057. ISSN 0257-8972
- [24] D. A. Lucca, K. Herrmann, M. J. Klopstein, Nanoindentation: Measuring methods and applications, *CIRP annals*, **59** (2010) 803-819. ISSN 0007-8506
- [25] M. L. Oyen, Nanoindentation of biological and biomimetic materials, *Experimental techniques*, **37** (2013) 73-87. ISSN 0732-8818
- [26] W. C. Oliver, G. M. Pharr, An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *Journal of Materials Research*, **7** (1992) 1564–1583. ISSN 0884-2914
- [27] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, A. K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Progress in materials science*, **54** (2009) 397-425. ISSN 0079-6425

- [28] M. Abdel-Hady Gepreel, M. Niinomi, Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, **20** (2013) 407-415. ISSN 1751-6161
- [29] S. Liu, Y. C. Shin, Additive manufacturing of Ti6Al4V alloy: A review, *Materials & design*, **164** (2019) 107552. ISSN 0264-1275
- [30] D. Fan, Y. Li, X. Wang a kol., Progressive 3D Printing Technology and Its Application in Medical Materials, *Frontiers in pharmacology*, **11** (2020) 122. ISSN 1663-9812
- [31] L. F. Velásquez-García, Y. Kornbluth, Biomedical Applications of Metal 3D Printing, *Annual Review of Biomedical Engineering*, **23** (2021) 307-338. ISSN 1523-9829
- [32] J. Ni, H. Ling, S. Zhang a kol., Three-dimensional printing of metals for biomedical applications, *Materials Today Bio*, **3** (2019) 100024. ISSN 2590-0064
- [33] M. Salmi, Additive Manufacturing Processes in Medical Applications, *Materials*, **14** (2021) 191. ISSN 1996-1944
- [34] *3DEXPERIENCE Marketplace | Make: 3D PRINTING - ADDITIVE* [online]. Dassault Systèmes. Dostupné z: <https://make.3dexperience.3ds.com/processes/3D-printing> [cit. 2022-04-04]
- [35] Y. Zhang, L. Wu, X. Guo, S. Kane, Y. Deng, Y. Jung, J. Lee, J. Zhang, Additive Manufacturing of Metallic Materials: A Review, *Journal of Materials Engineering and Performance*, **27** (2018) 1-13. ISSN 1059-9495
- [36] A. Iatecola, G. A. Longhitano, L. H. M. Antunes a kol., Osseointegration Improvement of Co-Cr-Mo Alloy Produced by Additive Manufacturing, *Pharmaceutics*, **13** (2021) 724. ISSN 1999-4923
- [37] L. Bai, C. Gong, X. Chen, Y. Sun, J. Zhang, L. Cai, S. Zhu, S. Xie, Additive Manufacturing of Customized Metallic Orthopedic Implants: Materials, Structures, and Surface Modifications, *Metals (Basel)*, **9** (2019) 1004. ISSN 2075-4701
- [38] K. Keklikoglou, S. Faulwetter, E. Chatzinikolaou, P. Wils, J. Brecko, J. Kvaček, B. Metscher, C. Arvanitidis, Micro-computed tomography for natural history specimens: a handbook of best practice protocols, *European Journal of Taxonomy*, **522** (2019) 1-55. ISSN 2118-9773
- [39] S. T. Ho, D. W. Hutmacher, A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds, *Biomaterials*, **27** (2006) 1362-1376. ISSN 0142-9612
- [40] Y. Liu, D. Xie, R. Zhou, Y. Zhang, 3D X-ray micro-computed tomography imaging for the microarchitecture evaluation of porous metallic implants and scaffolds, *Micron*, **142** (2021) 102994. ISSN 0968-4328
- [41] F. Peyrin, P. Dong, A. Pacureanu, M. Langer, Micro-and Nano-CT for the Study of Bone Ultrastructure, *Current Osteoporosis Reports*, **12** (2014) 465–474. ISSN 1544-1873
- [42] L. A. Feldkamp, L. C. Davis, J. W. Kress, Practical cone-beam algorithm, *Journal of the Optical Society of America A*, **1** (1984) 612-619. ISSN 1084-7529

[43] C. Pailler-Mattei, S. Bec, H. Zahouani, In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests, *Medical engineering & physics*, **30** (2008) 599-606. ISSN 13504533

[44] C. Li, J. M. Suttie, Histological studies of pedicle skin formation and its transformation to antler velvet in red deer (*Cervus elaphus*), *The Anatomical record*, **260** (2000) 62-71. ISSN 0003-276X

Seznam obrázků

- Obr. 1:** Transverzální řez středem pravého stehna (řez 2; pohled zespodu). 1 – *Femur*, 2 – *M. vastus intermedius*, *M. vastus lateralis*, 3 – *Nervus ischiadicus*, 4 – *M. biceps femoris*, 5 – *M. semitendinosus*, 6 – *M. rectus femoris*, 7 – *M. vastus medialis*, 8 – *Arteria femoralis*, *Vena femoralis*, 9 – *M. sartorius*, 10 – *M. adductor*, 11 – *M. gracilis*, 12 – *M. semimembranosus*. Převzato z [6]. 11
- Obr. 2:** Podíl kompaktní a spongiosní kostní tkáně u dlouhých kostí. 1 – spongiosní kost, 2 – kompaktní kost, 3 – dřevná dutina, 4 – periost. Převzato z [7]. 12
- Obr. 3:** Schématický model těla dlouhé kosti. 1 – endost, 2 – periost, 3 – céva z periostu procházející Volkmannovým kanálkem do cév Haversových systémů, 4 – Sharpeyova vlákna, 5 – cévy v periostu. Převzato z [7]. 13
- Obr. 4:** Stavba kůže (řez). 1 – pokožka, 2 – škára, 3 – podkoží, 4 – podkožní fascie. a – zrohovatělá vrstva pokožky, b – vlas, chlup, c – germinativní vrstva pokožky, d – svalové snopce napřimovače chlupu, e – mazová žláza, f – kožní receptory, g – potní žláza, h – vlasová cibulka, i – kožní receptor (hmat), j – tukový lalůček, k – cévní zásobení kůže (A, V – tepny a žíly). Převzato z [9]. 14
- Obr. 5:** A – Schéma OPRA. B – Rentgenový snímek během 1. fáze implantace. C – Rentgenový snímek po umístění podpěry (2. fáze implantace). Převzato z [3]. 18
- Obr. 6:** Fixtura systému OPRA. Vnější povrch v tmavě šedé oblasti je upraven pro zvýšení oseointegrace. Detailní pohled ukazuje nanostrukturu povrchové úpravy BioHelix™. Převzato z [4]. 19
- Obr. 7:** Ztenčení kompaktní kosti v distálních zónách. Převzato z [11]. 19
- Obr. 8:** Protéza Endo-Exo (Obr. 3A a 3B, převzato z [3]) a ILP (Obr. 3C, převzato z [4]). 20
- Obr. 9:** A – Fotografie OPL, existují tři provedení. B – Rentgenový snímek OPL typu A u pacienta, který podstoupil amputaci femuru. Převzato z [3]. 22
- Obr. 10:** Fotografie POP. Převzato z [3]. 23
- Obr. 11:** Rentgenový snímek kompresního zařízení se schématickým znázorněním, ukazujícím pružinový systém. Převzato z [4]. 24
- Obr. 12:** Aplikace ITAP v lidském palci a ukazováčku. Fotografie (A) a (B) demonstrují vzhled in vivo s exoprotézou a bez ní. (C) je dorzopalmární rentgenový snímek ruky téhož pacienta ukazující intraoseální dřík a subdermální přírubu zařízení ITAP in situ. Převzato z [17]. 25
- Obr. 13:** Ukázka designu ITAP. Převzato z [3] a upraveno. 27
- Obr. 14:** Obrázky znázorňující vzhled konstrukce implantátu s přírubou povlakovanou HA (a) a z půdorysu, zobrazující provedení s hladkou přírubou (b). Převzato z [1]. 28
- Obr. 15:** Schématické znázornění hodnot zaznamenaných pro kvantitativní hodnocení dermální integrace. Převzato z [1]. 28

Obr. 16: Vzorek paroh – pedikl (transkutánní fáze) po maceraci prokazující výrazný rozdíl v morfologii na rozhraní mezi paroží (A) a pediklovou (P) kostí. Bílé šipky vymezují polohu připojení epitelální vrstvy. Měřítka = 1 cm. Převzato z [2].	30
Obr. 17: Podélný řez vzorkem paroh-pedikl s měkkými tkáněmi (ST) připojenými na rozhraní paroh-pedikl (A–P) bezprostředně pod korunkou parohu (AC). Měkké tkáně vykazují kontinuální spojení s pedikulární kostí (PC). Měřítka = 1 cm. Převzato z [2].	30
Obr. 18: SEM mikrofotografie rozhraní paroží (A) a pediklu (P), prokazující jasnou hranici mezi morfologií v linii připojení epitelu (šipka). Pedikl (P) má vyšší frekvenci větších pórů ve srovnání s parohem (A). Zvětšení obrazu × 10. Převzato z [2].	31
Obr. 19: Obdélníkový nosník (32 × 2 × 2 mm) testovaný na čtyřbodovém ohýbacím stole na zkušebním stroji Hounsfield. Převzato z [2].	31
Obr. 20: Sloupcový graf znázorňující rostoucí hodnotu modulu pružnosti od hrotu parohu k proximální pedikulární kosti. Převzato z [2].	32
Obr. 21: Podélný řez skrz přírubu ITAP zobrazující tibi (T), dermis (D), epidermis (E) a přírubu (F) s pórem (P). Převzato z [2].	33
Obr. 22: Implantát ITAP z titanové slitiny in situ. Podélné řezné drážky zabraňují rotaci implantátu v kosti. Příruba je perforovaná s otvory o průměru 0.7 mm, které umožňují prorůstání měkkých tkání a přišití překrývající kůže. To snižuje relativní pohyb kůže a vytváří těsnění mezi vnitřním a vnějším prostředím. Terapeutická krytka a podložka se používají k přidržení kůže na přírubě, dokud není dosaženo přilnutí. Převzato z [16].	34
Obr. 23: Fotografie demonstrující konstrukční prvky ITAP. (A) a (B) ukazují rovný ITAP, který se skládá z intraoseálního dřívku, perforované příruby ve tvaru „deštníku“ a distálního „čepu“. HA povlak příruby a části intraoseálního dřívku je zřetelně viditelný jako bílý pás ve srovnání s šedo-kovovým vzhledem zbytku dřívku a čepu. Převzato z [17].	35
Obr. 24: Schématické znázornění jednotlivých sekcí při nanoindentaci. h – indentační hloubka, h_c – kontaktní hloubka, h_f – hloubka otisku po odlehčení indentoru, h_s – posunutí povrchu po obvodu kontaktu, P – zatížení indentoru, a – kontaktní poloměr. Převzato z [26].	41
Obr. 25: Schématické zobrazení dat zatížení (P) - hloubka (h) z nanoindentačního experimentu. P_{max} – maximální zatížení indentoru, h_f – konečná hloubka otisku po odlehčení, h_{max} – hloubka při maximálním zatížení, S – počáteční kontaktní tuhost. Převzato z [26].	42
Obr. 26: Geometrie Vickersova indentoru (vlevo) a Berkovichova indentoru (vpravo). Převzato z [24].	42
Obr. 27: Schéma technologie PBF. Převzato z [34].	47
Obr. 28: Schéma technologie ME. Převzato z [34].	48
Obr. 29: Schéma technologie VP. Převzato z [34].	49
Obr. 30: Schéma technologie MJ. Převzato z [34].	49
Obr. 31: Schéma technologie BJ. Převzato z [34].	50

Obr. 32: Schéma metody UAM. Převzato z [35].	51
Obr. 33: Schéma technologie DED. Převzato z [34].	52
Obr. 34: Typický průběh procesu návrhu implantátu na míru. Převzato z [33].	52
Obr. 35: Příklady částí náhrady kolenního kloubu s pórovitou strukturou zabraňující stress shielding efektu a podporující prorůstání kosti, aditivně vyrobených metodou EBM. (a) Tibiální dřík z Ti6Al4V. (b) Femorální komponenta ze slitiny kobaltu a chromu. Převzato z [31].	53
Obr. 36: Zinkové stenty vyrobené metodou SLM: (a) fotografie, (b) SEM snímek. Převzato z [32].	53
Obr. 37: Kyčelní dříky z titanu vyrobené metodou LENS s různou pórovitostí. Převzato z [32].	54
Obr. 38: Schematické znázornění systému micro-CT. Převzato z [40] a upraveno.	55
Obr. 39: Detail jednoho parohu dvouletého samce daňka skvrnitého v transkutánní fázi	58
Obr. 40: Vzorek připravený pro nanoindentační měření	58
Obr. 41: Zatěžovací funkce použité pro nanoindentační měření	59
Obr. 42: Zavedený souřadný systém	60
Obr. 43: Schéma matice indentů	60
Obr. 44: Vzorek pro micro-CT skenování	60
Obr. 45: Ukázka práce s výsledným 3D modelem skenovaného vzorku v softwaru VGSTUDIO MAX. Vpravo dole 3D model s naznačenou plochou řezu, příslušný transversální řez je zobrazen vlevo nahoře. Vpravo nahoře sagitální řez a vlevo dole frontální řez.	61
Obr. 46: Ukázky snímků pořízených světelným mikroskopem zabudovaným v nanoindentoru. a) souřadnice $x=30\ \mu\text{m}$, vnější okraj vzorku, čárkovaný čtverec znázorňuje umístění a velikost matice indentů. b) souřadnice $x=2000\ \mu\text{m}$, ukázka struktury „světlé“ fáze. c) souřadnice $x=3500\ \mu\text{m}$, rozhraní mezi „světlou“ a kostěnou fází. d) souřadnice $x=8000\ \mu\text{m}$, ukázka kostěné struktury. Indentace byla provedena uprostřed každého snímku.	62
Obr. 47: Průměrné hodnoty redukovaných modulů E_r v jednotlivých maticích indentů v závislosti na logaritmizované souřadnici x . Fialový obdélník vymezuje oblast, která je pravděpodobně ovlivněná epoxidem.	63
Obr. 48: Průměrné hodnoty tvrdostí H v jednotlivých maticích indentů v závislosti na logaritmizované souřadnici x . Fialový obdélník vymezuje oblast, která je pravděpodobně ovlivněná epoxidem.	63
Obr. 49: a) Fotografie skenovaného vzorku, b) výsledný 3D model vzorku ve stejném pohledu jako na fotografii, c) 3D model pohled zleva, d) 3D model pohled na srst, e) 3D model pohled zprava.	65

Obr. 50: Ukázka transverzálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez transverzální rovinou. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.....	66
Obr. 51: Ukázka sagitálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez sagitální rovinou. 1 – pedikl, 2 – prstenec parohu. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.	66
Obr. 52: Ukázka frontálního řezu 3D modelem vzorku. a) 3D model s naznačenou plochou řezu, b) řez frontální rovinou. Žlutou barvou je v řezu vyznačená měkká oblast a bílou barvou kostěná oblast.	67
Obr. 53: Fotografie: a) výbrusu pro nanoindentaci, b) vzorku pro micro-CT skenování. Černé šipky ukazují na hranici mezi měkkou a kostěnou fází.	67
Obr. 54: Znázornění rozdílu mezi pediklem a parohem. a) Transverzální řez pediklem. b) Transverzální řez prstencem parohu, který má výrazně větší pórovitost kostěné struktury v porovnání s pediklem.....	68
Obr. 55: Transverzální řez pediklem. a) 3D model s naznačenou plochou řezu. b) Řez znázorňující nehomogenní mikrostrukturu měkké oblasti (šedá barva). Bílou barvou je na řezu zobrazena kostěná oblast.	69
Obr. 56: Snímky pořízené světelným mikroskopem zabudovaným v nanoindentoru pro souřadnici $x = 1000 \mu\text{m}$. a) kruhovitý útvar s vyšší tuhostí i tvrdostí oproti měkké fázi. b) měkká fáze. Čárkovaný čtverec znázorňuje velikost a umístění matice indentů.	70

Seznam tabulek

Tab. 1: Rozdělení kostry lidského těla a terminologie. Převzato z [5].	11
Tab. 2: Srovnání oseointegrovaných implantačních systémů pro připojení amputačních protéz končetin. Převzato z [3, 4].	17
Tab. 3: Vybrané kovy a slitiny používané pro implantáty v porovnání s kostí, jejich mikrostruktura a mechanické vlastnosti. Převzato z [27, 28].	44
Tab. 4: Postup broušení vzorku pro nanoindentaci	59
Tab. 5: Průměrné hodnoty redukovaných modulů E_r v jednotlivých maticích indentů a jejich směrodatné odchytky σ	64
Tab. 6: Průměrné hodnoty tvrdostí H v jednotlivých maticích indentů a jejich směrodatné odchytky σ	64

Seznam příloh

Příloha 1 (CD) – snímky indentovaných oblastí pořízené pomocí světelného mikroskopu zabudovaného v nanoindentoru

Příloha 2 (CD) – řezy 3D modelem vzorku paroží získaného pomocí micro-CT