VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NÁSTŘIKŮ HYDROXYAPATITU DEPONOVANÝCH TECHNOLOGII HYBRIDNÍHO VODOU-STABILIZOVANÉHO PLAZMOVÉHO HOŘÁKU Z VODNÝCH ROZTOKŮ

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF SOLUTION PRECURSOR HYDROXYAPATITE COATINGS DEPOSITED VIA HYBRID WATER-STABILIZED PLASMA GUN

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Zdeněk Antoš**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Jan Čížek, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2018

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav materiálových věd a inženýrství
Student:	**Bc. Zdeněk Antoš**
Studijní program:	Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor:	Materiálové inženýrství
Vedoucí práce:	**Ing. Jan Čížek, Ph.D.**
Akademický rok:	2017/18

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

Příprava a charakterizace nástřiků hydroxyapatitu deponovaných technologii hybridního vodou-stabilizovaného plazmového hořáku z vodných roztoků

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

S ohledem na technologický pokrok v oblasti žárových nástřiků je v posledních letech věnována zvýšená pozornost depozici nástřiků přímo z vodných roztoků. Tato metodologie nejen obchází mnohá úskalí tradičních postupů depozice z práškových materiálů, ale rovněž umožňuje tvorbu nanostrukturních nástřiků, čímž otevírá netušené možnosti v aplikačním potenciálu.

Hydroxyapatit (HA) je pro svou podobnost s lidskou kostní tkání hlavní komponentou používanou v rámci biofyzikálního inženýrství, zejména v oblasti náhrad kosterního aparátu (např. kyčelní náhrady). Tradiční nástřiky HA připravené žárovými metodami jsou odzkoušeny dlouholetou praxí, ale jejich vlastnosti (zejména mechanické) jsou neustále zdrojem polemik ve vědecké literatuře.

Jedním z cílů práce bude výroba vodných roztoků HA pomocí chemické syntézy. Hlavním cílem práce potom bude pokus o přípravu nástřiků HA plazmovým nanášením (spolupráce s Ústavem fyziky plazmatu v Praze) přímo z vodných roztoku, tj. bez nutnosti výroby a zpracování práškových prekurzorů. Tyto nástřiky budou charakterizovány zejména s ohledem na jejich strukturu a fázové složení (přítomnost škodlivých fází).

Cíle diplomové práce:

- vypracovat rešerši na téma biokompatibiliních materiálů a metod žárového nanášení,
- seznámit studenta s procesem výroby hydroxyapatitu metodou mokré chemické syntézy,
- výroba vodného roztoku hydroxyapatitu,

- pokus o depozici nástřiků HA z roztoku technologií hybridní-WSP,
- charakterizace získaných nástřiků z pohledu strukturu a fázového složení.

Seznam doporučené literatury:

HENCH, L. L. An Introduction to Bioceramics. World Scientific, 386 p., 1993.

CANDIDATO, R. T., SOKOLOWSKI, P., PAWLOVSKI, L., DENOIRJEAN, A. Preliminary study of hydroxyapatite coatings synthesis using solution precursor plasma spraying. Surface and Coatings Technology, vol. 277, pp. 242-250, 2015. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2015.07.046.

MEJIAS, A., CANDIDATO, R. T., PAWLOWSKI, L., CHICOT, D. Mechanical properties by instrumented indentation of solution precursor plasma sprayed hydroxyapatite coatings: Analysis of microstructural effect. Surface and Coatings Technology, vol. 298, pp. 93-102, 2016. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2016.04.028.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2017/18.

V Brně, dne 26. 10. 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ DĚKANÁT 11

L. S.

prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.
ředitel ústavu

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

Abstrakt

Povlaky hydroxyapatitu jsou již dlouhou dobu v lékařství používány jako bariéra mezi kovovým jádrem náhrady a okolní živou tkání. Plazmový nástřik je běžně používanou technologií pro tvorbu takových povlaků. Tato práce se zabývá vlastnostmi povlaků hydroxyapatitu vytvořených technologií plazmového nástřiku s hybridním systémem stabilizace oblouku (WSP-H). Zároveň využívá inovativní metodu dávkování výchozího materiálu v podobě vodného roztoku (SPPS). Cílem práce bylo vyrobit vodné roztoky hydroxyapatitu a z nich poté deponovat nástřiky s využitím WSP-H. Tyto nástřiky byly charakterizovány z pohledu morfologie, chemického a fázového složení. Dále byly podrobeny biologickému testování biokompatibility kultivací a následnou analýzou buněk RAW 264.7 a MG-63. Nástřiky vytvořené SPPS vykazují výraznou členitost povrchu, která je vhodná pro biologickou aplikaci. Z testování biokompatibility bylo zjištěno, že tyto povlaky budou v lidském těle dobře tolerovány. Po dostatečné optimalizaci nástřikových parametrů a dosažení fázové čistoty nástřiku bude tento postup výroby povlaku hydroxyapatitu vhodnou náhradou starších metod.

Summary

Hydroxyapatite coatings have been used as a barrier between a metal core of replacement and living tissue for long time in medicine. Plasma spray is a typical technology for preparation these coatings. This thesis concerns a new plasma spray technology with hybrid system of arc stabilization (WSP-H). Simultaneously it uses an innovative method of feeding the initial material in a form of water suspension (SPPS). The aim of this thesis was to produce water solutions of hydroxyapatite and make coatings with WSP-H. These coatings were characterized in terms of their morfology, chemical and phase composition. Their biocompatibility was tested by a cultivation and an analysis of RAW 264.7 and MG-63 cells. The coatings made by SPPS have a very rough surface which is suitable for biological application. The biocompatibility testing discovered that the coatings will by tolerated in a human body very well. This method of production of hydroxyapatite coatings could be a good replacement of older methods after a better optimalisation of the processing parameters and after reaching purity of coating.

Klíčová slova

Hydroxyapatit, hybridní vodou-stabilizovaný plazmový hořák, WSP-H, LPPS

Keywords

Hydroxyapatite, hybrid water-stabilized plasma gun, WSP-H, LPPS

ANTOŠ, Z. *Příprava a charakterizace nástřiků hydroxyapatitu deponovaných technologii hybridního vodou-stabilizovaného plazmového hořáku z vodných roztoků.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018. 65 s. Vedoucí Ing. Jan Čížek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na zadané téma vypracoval samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu.

Bc. Zdeněk Antoš

Nejprve chci poděkovat Ing. Janu Čížkovi, Ph.D., za příjemnou spolupráci a vždy ochotný přístup při vypracování této práce. Ing. Michaele Matějkové za vysvětlení a pomoc při výrobě HA i při následné analýze. Velké díky patří i MUDr. Miloslavu Kverkovi, Ph.D., a jeho týmu za umožnění a pomoc při vypracování biologické části práce.

Bc. Zdeněk Antoš

Obsah

1 Úvod **13**

2 Rešerše literatury **14**
2.1 Termální nástřiky . . . 14
2.1.1 Technologie termálních nástřiků . . . 15
2.1.2 WSP-H 500 – Hybridní vodou–stabilizovaný plazmatický nástřik . . . 19
2.1.3 LPPS – Plazmatický nástřik s tekutým prekurzorem . . . 20
2.2 Biomateriály . . . 21
2.2.1 Kalcium fosfáty . . . 24
2.2.2 Titan a jeho slitiny . . . 27
2.3 Testování biologické kompatibility . . . 29
2.3.1 Vybraná zařízení pro biologické testování . . . 29
2.3.2 Vybrané buňky pro biologické testování . . . 33

3 Experimentální plán **35**
3.1 Materiály . . . 35
3.1.1 Výroba roztoku HA mokrou syntézou . . . 35
3.1.2 Příprava substrátu . . . 36
3.2 Depozice nástřiků . . . 37
3.2.1 WSP-H – Hybridní vodou–stabilizovaný plazmatický nástřik . . . 37
3.2.2 Plynem stabilizovaný plazmatický nástřik . . . 38
3.3 Metalografická a chemická analýza . . . 38
3.3.1 Příprava vzorků . . . 39
3.3.2 Stanovení fázového složení pomocí XRD . . . 39
3.3.3 Stanovení prvkového složení pomocí XRF . . . 39
3.3.4 Pozorování v REM . . . 39
3.4 Biologické testy . . . 40
3.4.1 Příprava vzorků . . . 41
3.4.2 Nasazování a kultivace buněk . . . 41
3.4.3 Příprava buněk pro analýzu . . . 42

4 Výsledky **43**
4.1 Nástřiky HA z prášku . . . 43
4.2 Prvotní nástřiky . . . 43
4.3 Vlastnosti deponovaných nástřiků . . . 44
4.3.1 Morfologie nástřiků . . . 44
4.3.2 Chemická analýza nástřiků . . . 45
4.3.3 Fázová analýza nástřiku . . . 47
4.4 Biologický potenciál . . . 48
4.5 Povrch po kultivaci . . . 53

5 Diskuze výsledků **54**

6 Závěr **56**

Literatura **57**

Seznam použitých zkratek a symbolů **62**

Seznam obrázků **64**

Seznam tabulek **65**

1 Úvod

Hydroxyapatit se již dlouhou dobu používá v různých odvětvích lékařství, a to především jako kostní náhrady díky jeho podobnosti s kostní tkání. Mechanické vlastnosti tohoto materiálu ovšem nedovolují používat jeho objemovou formu na těžce zatěžované implantáty jako např. náhrada kyčelní kosti. Proto se využívá především tenkých povlaků vytvořených plazmovým nástřikem na kovové jádro.

Vytvoření nástřiku z vodného roztoku značně zjednodušuje, urychluje a nakonec i zlepšuje celý proces. Nejen že se přímo vynechává mnoho složitých a zdlouhavých kroků nutných při výrobě hydroxyapatitového prášku, ale lze tímto způsobem vytvořit i nanometrickou strukturu výsledného povlaku. Také je jednodušší přidání a rozmíchání dalších částic, které vylepšují biokompatibilitu, jako je např. antibakteriální stříbro.

Hlavním cílem práce bylo vytvoření co nejčistšího roztoku hydroxyapatitu a jeho následnou depozici pomocí plazmového nástřiku. Povlaky by měly obsahovat hydroxyapatit s nejmenším možným obsahem jiných fází. Povrch nástřiku by měl být strukturovaný se zvýšenou porozitou pro vhodné prorůstání buněk.

Nástřiky v této práci byly vytvořeny pomocí hybridního vodou–stabilizovaného plazmového hořáku WSP®-H 500 na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR, v. v. i. Tento hořák nabízí možnost volby nástřikových parametrů, kterých tradiční způsoby plazmového nástřiku nejsou schopny.

Povlaky byly deponovány na titanové slitině Ti6Al4V, která se již při biologických aplikacích osvědčila. Nejprve byly vytvořeny prvotní série nástřiků pro zkoušku zvolených nástřikových parametrů. Následně byla na těchto vzorcích zavedena metodika analýzy. Dále byly vytvořeny další série s optimalizovanými parametry a s pokusem o zavedení stříbrných částic do některých nástřiků. Tato práce se zabývá především těmito pokročilými sériemi.

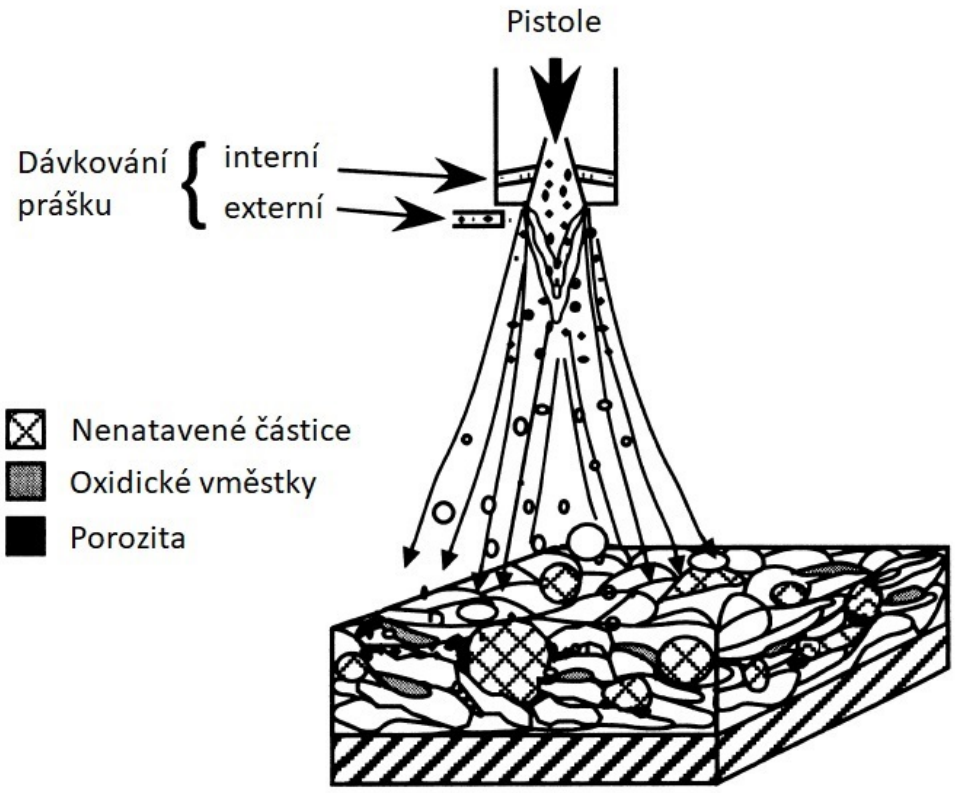
Nakonec byly nástřiky podrobeny počátečnímu biologickému testování v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. Toto testování bylo prováděno za účelem určení vhodnosti materiálu pro biologické aplikace.

2 Rešerše literatury

2.1 Termální nástřiky

Termální nástřiky jsou skupinou technologií, při kterých dochází k nanášení povlaků na povrch substrátu pomocí tepelné a kinetické energie. První metodou termálního nástřiku byla tzv. Shoopovací pistole pojmenovaná po svém vynálezci M. U. Shoopovi, který se tomuto odvětví věnoval od konce 19. století. Zdokonalením této technologie vznikl hořák pro nástřik plamenem. V průběhu 20. století byly vynalezeny další metody termálních nástřiků, které se od původního vzoru liší především zdrojem tepla, ale i způsobem urychlení částic nanášeného materiálu nebo jeho dávkováním. [1]

Průběh nástřiku a princip přilnutí částic na povrch substrátu je zřejmý z obr. 2.1. Jedná se o schematické zobrazení termálního nástřiku. Procesní plyn je vháněn do pistole a slouží k urychlení částic nanášeného materiálu vůči povrchu substrátu. Materiál se do pistole dávkuje v podobě prášku nebo jako drát, který je vsunut axiálně s přívodem procesního plynu. Tlak plynu s pomocí geometrie trysky urychluje natavené částice na povrch substrátu, kde vytvářejí povlak. Povlak je tvořen tzv. splaty (deponované kapky materiálu), póry, nenatavenými částicemi a oxidickými vměstky. [1, 2]



Obrázek 2.1: Průběh termálního nástřiku a depozice částic [1]

Splaty

Po natavení dojde vlivem povrchového napětí ke sbalení práškových částic do kulového tvaru. Při dopadu materiál zaběhne do nerovného povrchu a deformuje se do úzkého disku - splatu. Tak se vytvoří silná mechanická vazba mezi substrátem a povlakem. Ze splatů je vytvořena typická lamelární struktura nástřiku. K získání správné struktury splatů je nutné optimalizovat teplotu a rychlost částic. Pokud nedojde k natavení částic, na povrchu substrátu se částice nezdeformují, a tím se sníží soudržnost nástřiku. Zároveň se zvýší porozita nástřiku okolo nezaběhlých částic nebo se vůbec nedeponují a pružně se odrazí. Při příliš vysoké rychlosti depozice může naopak dojít k velkému zúžení splatu a tím k necelistvosti nástřiku. [1, 2]

Porozita

Porozita výrazně ovlivňuje všechny vlastnosti výsledného nástřiku. Jedná se především o adhezi a kohezi povlaku. Póry vznikají kolem nenatavených částic nebo oxidických vměstků, které nedokáží zaběhnout do nerovností, a tím vytvoří průduch mezi splaty. Při nástřiku materiálu s velkým koeficientem teplotní roztažnosti může dojít k výraznému smrštění splatů, a tím ke vzniku póru. Porozita může vznikat i při příliš ostrém úhlu nástřiku, kdy dochází k nedokonalému překryvu splatů. Při některých aplikacích je porozita nástřiku žádoucí např. u ložisek pro vnik maziva nebo při medicínských aplikacích, kde je nutné, aby buňky prorůstaly dovnitř materiálu. [1, 2]

Oxidické vměstky

Oxidy se dostávají do nástřiku při natavení částice materiálu v plamenu nebo plazmě za přítomnosti vzduchu (kyslíku). Na povrchu natavené částice vzniká film oxidu. Oxidy způsobují snížení adheze i koheze nástřiku a zvyšují jeho porozitu. Snížení obsahu oxidických vměstků lze docílit optimalizací nástřikových parametrů jako je teplota, čímž se sníží náchylnost k oxidaci, nebo rychlost nástřiku a vzdálenosti pistole od substrátu, tím se sníží doba setrvání částic na vzduchu. Další možností je nevystavovat částice kyslíku a využít vakuové komory nebo kontrolované atmosféry. [1, 2]

2.1.1 Technologie termálních nástřiků

V tabulce 2.1 lze vidět srovnání vlastností termálních nástřiků s jinými běžně používanými způsoby povlakování. Výraznou výhodou těchto technologií je vysoká variabilita tloušťky nástřiku, ale i možnost nanášet téměř všechny druhy materiálu. V průběhu nanášení není nutné udržovat vysoké vakuum a pořizovací cena a cena procesu je relativně nízká.

Tabulka 2.1: Hlavní charakteristiky základních povlakovacích metod [3]

Charakteristika	Elektrolytické pokovování	Termální nástřiky	CVD	PVD
Cena vybavení	nízká	nízká–střední	střední	střední–vysoká
Procesní atmosféra	vodný roztok	atmosferická až mírné vakuum	atmosferická–střední vakuum	vakuum
Tloušťka vrstvy	střední–silná	silná	slabá–silná	slabá–střední
Teplota povrchu	nízká	nízká–střední	střední–vysoká	nízká
Přilnavost	střední mech. vazba, dobrá chem. vazba	dobrá mechanická vazba	dobrá chem. vazba, výborná difusní vazba	střední mech. vazba, dobrá chem. vazba
Výsledný povrch	středně hrubý až lesklý	hrubý až hladký	hladký až lesklý	hladký až lesklý
Materiály	kovy	kovy, polymery, kovy/keramika	kovy, keramika, polymery	kovy, keramika, polymery

Nástřik plamenem

Nejstarší z používaných technologií v praxi. Jedná se o jednoduchou metodu nástřiku. Dochází k natavení dávkovaného prášku nebo odtavení drátu pomocí plamene vzniklého ze směsi vhodného paliva a stlačeného kyslíku. Tlakem plynů a vhodné geometrie trysky dochází k urychlení částic proti substrátu. Tato technologie je velice jednoduchá a levná, ale plamen nedokáže dostatečně tavit částice a rychlost depozice je nízká. Proto je výsledný nástřik málo adherující s vysokou porozitou. [1, 2, 3]

Nástřik elektrickým obloukem

Podobně jako u svařování vzniká při nástřiku mezi elektrodami elektrický oblouk a vznikajícím teplem dochází k jejich odtavování. Elektrody jsou vyrobeny z materiálu vytvářejícího povlak. Proud vzduchu nebo inertního plynu unáší odtavené kapky materiálu vůči povrchu substrátu. Plyn je pouze nosný, proto nemá tak vysokou teplotu a nedochází k ohřívání substrátu. Metoda je levná a efektivní, ale i při použití inertního plynu dochází k oxidaci částic a lze nanášet pouze vodivé materiály. [1, 2, 3]

D-gun – výbušné nanášení

K natavení a urychlení práškových částic dochází pomocí směsi paliva a kyslíku zažehnuté elektrickým výbojem ze zapalovací svíčky. Oproti ostatním metodám nástřiku nedochází k nepřetržitému nanášení materiálu. Jednotlivé výbuchy nanesou vždy malou dávku a poté dochází k proplachu hlavně od spalin plynným dusíkem. Vzhledem k vysoké teplotě výbuchu a intenzivnímu urychlení lze touto metodou nanést povlaky s minimální porozitou. [1, 2, 3]

HVOF – High velocity oxy-fuel

Tato metoda dosahuje velmi vysokých rychlostí částic s nižší teplotou. Tím je omezena oxidace částic. Vysokých rychlostí nástřiku se dosahuje pomocí tlaku pracovního plynu a výhodné geometrie trysky. Vhodná volba paliva a správné mísení s kyslíkem ovlivňuje teplotu nástřiku. Optimální volbou těchto parametrů se dosahuje vysoké přilnavosti povlaku s minimální porozitou. [1, 2, 3]

Kinetické naprašování za studena

Přestože se tato technologie řadí do skupiny termálních nástřiků, pohybuje se její teplota na řádově nižší úrovni a nikdy nepřekračuje teplotu tavení nanášeného materiálu. Nedochází tedy k natavování částic a vazba k povrchu substrátu se vytváří pouze plastickou deformací. To vede k eliminaci oxidace materiálu a zachování původního fázového složení, ale zároveň k omezení na nanášení pouze plastických materiálů. Vysokých rychlostí depozice se dosahuje stlačením a předehřevem nosného plynu a vhodnou geometrií trysky. Rychlost částic se musí pohybovat v intervalu tzv. depozičního okna. Pokud by byla nižší, neměly by částice dostatečnou energii k plastizaci a uchycení na povrchu. V případech, kdy je rychlost vyšší, dochází k odrážení částic od substrátu. [1, 2, 3, 4]

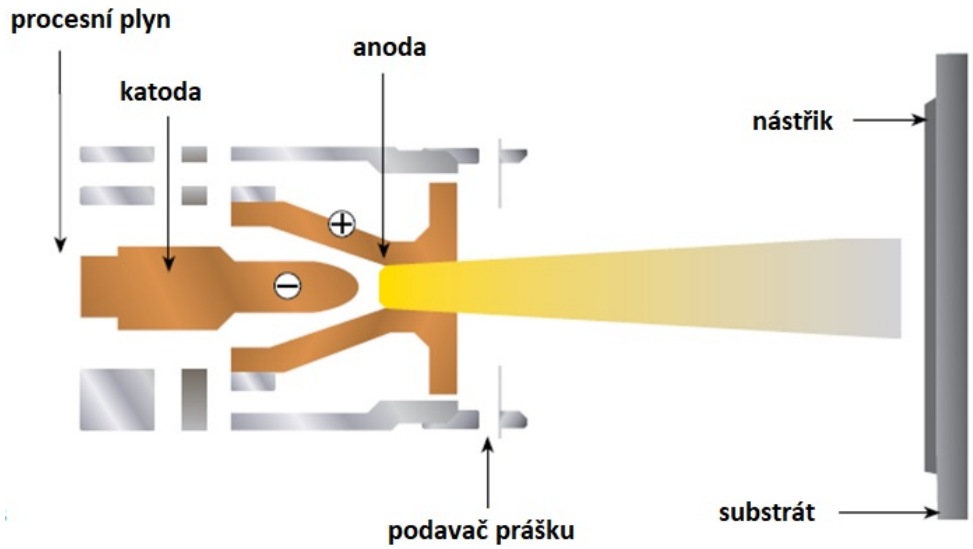
Plazmatický nástřik

Při hoření elektrického oblouku dochází k ionizaci částic plynu, tím se plyn stává vodivým a uzavírá elektrický oblouk. K ionizaci dochází ve chvíli, kdy má atom plynu dostatek energie na to, aby odtrhl své valenční elektrony. Tento stav je nestabilní, s vysokou vnitřní energií. Pokud vnější zdroj přestane energii dodávat, dojde k rekombinaci iontu a elektronů a vyzáření přebytku vnitřní energie ve formě tepla a světla. [1, 3]

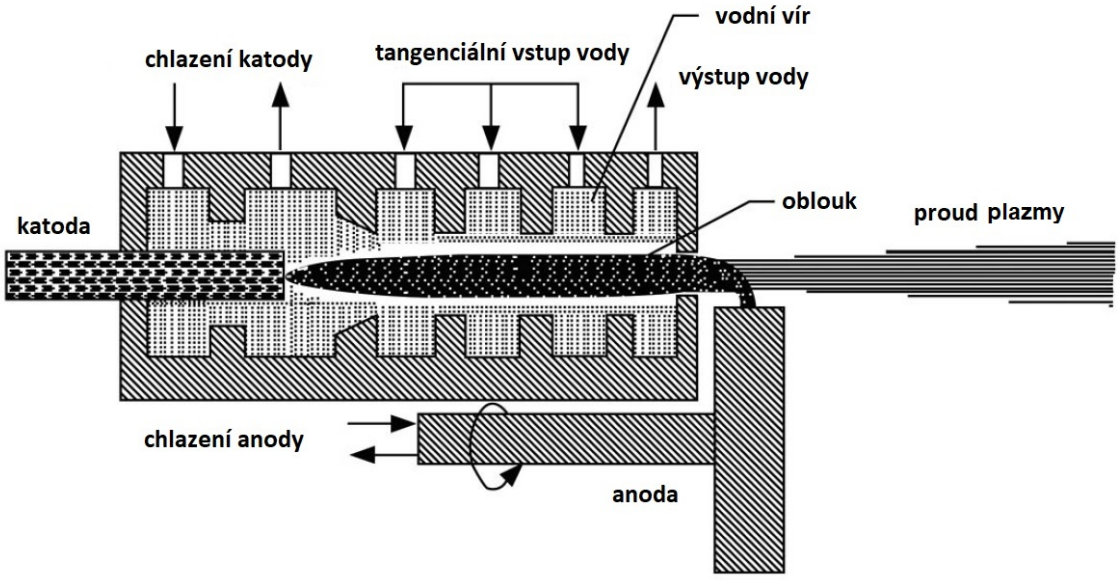
Na obr. 2.2a lze vidět hořák pro plazmatický nástřik se stabilizací oblouku pomocí plynu. Mezi katodou a anodou hoří elektrický oblouk. Katoda je vyrobená z wolframu díky jeho vysoké teplotě tavení a dobrým elektrickým vlasnostem. Anoda je z mědi a je zevnitř chlazená vodou. Procesní plyn, proudící okolo katody do oblouku, se ionizuje a vzniká plazma. Obvykle se využívá Ar, He, Ar/H_2 nebo N_2/H_2 pro jejich snadnou ionizaci a vysokou teplotu vzniklého plazmatu. Průtokem plynu lze lehce ovlivnit hmotnostní průtok vzniklého plazmatu (obr. 2.3). Do proudu plazmatu přes podavač proudí prášek, který je strháván, nataven a deponován na povrch substrátu. Teplota plazmy výrazně závisí na použitém procesním plynu, ale obvykle dosahuje teplot v rozmezí 10 000–20 000 K. [1, 3, 5]

Vodou–stabilizovaný plazmový hořák je zobrazen na obr. 2.2b. Jeho konstrukce je velmi odlišná od plynem stabilizovaného hořáku. Voda protéká celým hořákem, který je výrazně delší. Přívod vody již není veden okolo katody, ale tangenciálně vůči hořícímu oblouku. To vytváří vír, který stabilizuje oblouk a následně i proud plazmatu. Katoda je vyrobená z wolframu a celá je obklopená vodou kvůli chlazení. Výhodou oproti dříve používanému grafitu je jeho životnost. Grafit postupně odhoříval, proto musel být kontinuálně vtlačován do komory. Anoda má tvar disku a je vyrobená z mědi. Při hoření elektrického oblouku disk rotuje, aby nechodázelo k jednostranné elektrodové erozi. I když je anoda mimo komoru

hořáku, je vnitřně chlazena vodou. Vodní vír vytvořený kolem elektrického oblouku tvoří vnitřní stěnu hořáku. Tím se zamezuje prostupu tepla do vlastní stěny hořáku a lze využívat vyšších teplot. Voda se v okolí oblouku vypařuje a vzniklá vodní pára se ionizuje. Jelikož se pára vypařuje přímo uvnitř hořáku, není možné nezávisle na výkonu kontrolovat množství a hmotnostní průtok vzniklého plazmatu. Na obr. 2.3 je vidět pouze mírné zvýšení průtoku plazmatu při velkém zvýšení výkonu oblouku. Nízký hmotnostní průtok má za následek malé urychlení částic vůči substrátu. Ve srovnání s plynem stabilizovaným hořákem dochází k nízké rychlosti depozice. Zvýšení akcelerace částic lze ovlivňovat pouze zvyšováním proudu elektrického oblouku, tím se zvyšuje i entalpie a teplota plazmy, která je typicky kolem 25 000 K. [1, 3, 5, 7, 8]

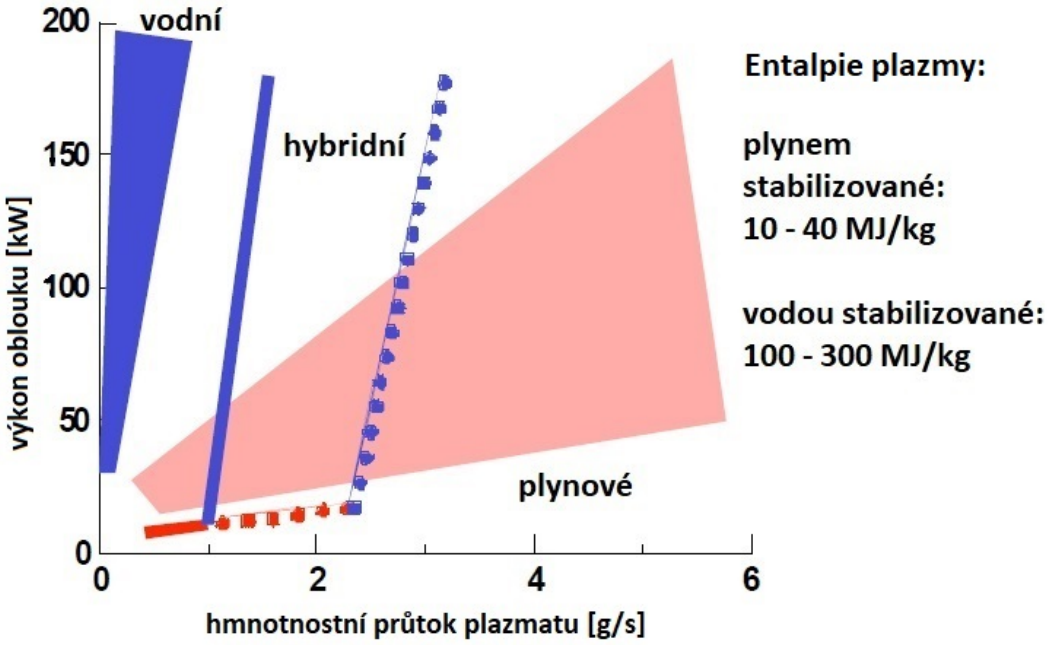


(a) Schéma plynem stabilizovaného plazmového hořáku [6]



(b) Schéma vodou–stabilizovaného plazmového hořáku [5]

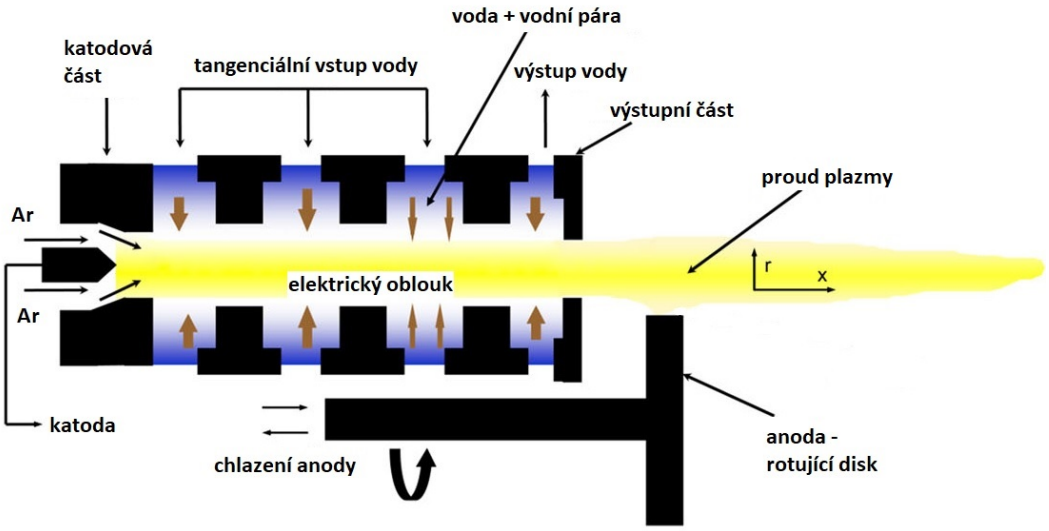
Obrázek 2.2: Schémata hořáků pro plazmatický nástřik



Obrázek 2.3: Operační režimy plazmových hořáků, červená čára – řízení hmotnostního průtoku plazmatu pomocí plynem stabilizované části hořáku, modrá čára – řízení výkonu oblouku pomocí vodou–stabilizované části hořáku [5]

2.1.2 WSP-H 500 – Hybridní vodou–stabilizovaný plazmatický nástřik

Hybridní systém stabilizace oblouku plynem i vodou zároveň je výsledkem snahy o kompenzaci nedostatků nástřiku při jednotlivých režimech a vyplnění mezery v nástřikových parametrech. Jak je vidět na obr. 2.3 může plynem stabilizovaný plazmový hořák pracovat s vysokým výkonem jen při velkém zvýšení hmotnostního průtoku plazmatu. Vodou–stabilizovaný plazmový hořák již s malým zvýšením hmotnostního průtoku výrazně zvyšuje výkon i entalpii, ale průtok lze moderovat pouze omezeně pomocí proudu elektrického oblouku. Z obr. 2.4 je zřejmé, že hybridní systém přímo kombinuje oba režimy. Katodová část je stejná jako u plynové stabilizace. Okolo wolframové katody proudí procesní plyn, kterým lze řídit hmotnostní průtok plazmatu s nevýraznou změnou výkonu – červená čára v obr. 2.3 (v případě použití plynu s nízkou entalpii jako je Ar). Druhá část je velice podobná jako u vodou–stabilizovaného hořáku. Proudící plyn vytlačuje vodu z katodové části. Dále vzniká v důsledku tangenciálního přítoku vody vír okolo elektrického oblouku, který ho stabilizuje. V důsledku vysoké teploty oblouku dochází ke vzniku vodní páry, která zvyšuje entalpii a teplotu plazmy až na úroveň vodou–stabilizovaného hořáku – modrá čára v obr. 2.3. Hořák je zakončen měděným rotujícím diskem anody. Výsledek kombinace plynu a vody je plazmový hořák s vysokou teplotou plazmy a vysokým hmotnostním průtokem. [5, 7, 9, 10]



Obrázek 2.4: Schéma hybridního vodou–stabilizovaného plazmového hořáku [9]

2.1.3 LPPS – Plazmatický nástřik s tekutým prekurzorem

Dosažení submikronové nebo nanometrické mikrostruktury povlaku pomocí plazmového nástřiku s práškovým podáváním materiálu má mnoho komplikací. Samotná výroba nanometrického prášku je obtížná a časově náročná, další problémy však nastávají při procesu nanášení. Prášek s tak malými rozměry má minimální hmotnost, proto je těžké takové částice pro depozici dostatečně urychlit. Při extrémních teplotách plazmatického nástřiku dochází k odpaření části materiálu i u vysokotavitelných materiálů. Při takto malých rozměrech částic může dojít k odpaření celého objemu. K řešení těchto problémů se využívá LPPS – nástřik s tekutým prekurzorem (liquid precursor plasma spraying) metodami SPS – plazmatický nástřik ze suspenze (suspension plasma spraying) a SPPS – plazmatický nástřik z roztoku (solution precursor plasma spraying). V obou případech výrazně záleží na vlastnostech tekutého nosiče, který musí mít vhodnou viskozitu, povrchové napětí a dobré tepelné vlastnosti. Je nutné, aby se při dávkování prekurzoru do proudu plazmatu kapalina atomizovala, urychlila vůči substrátu a následně odpařila, zatímco částice se dostatečně natavily. Nejčastěji se používá voda nebo organická rozpouštědla jako např. etanol. [11, 12, 13]

SPS – Plazmatický nástřik ze suspenze

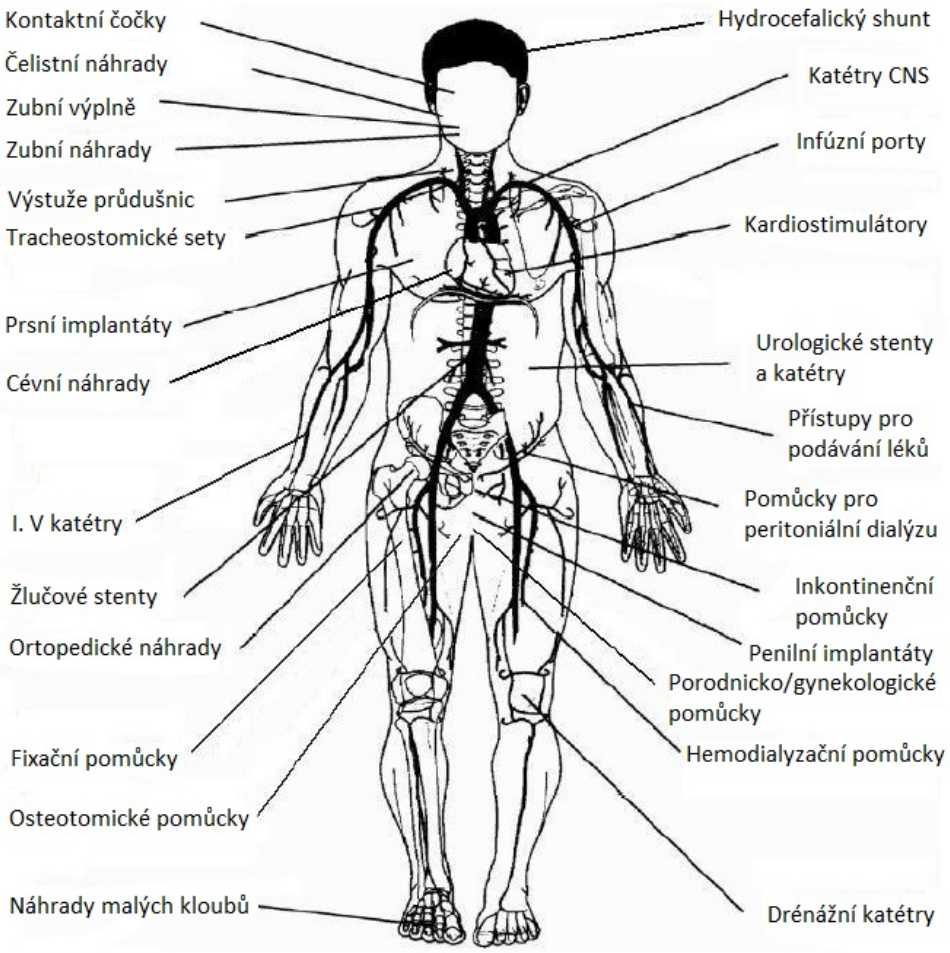
Suspenze je heterogenní směs pevné a kapalné látky. Práškový materiál submikronových rozměrů se rozmíchá ve vhodném kapalném nosiči, který musí udržovat prášek v dispergovaném stavu a zabránit aglomeraci a sedimentaci. Kvůli tomu se do suspenze přidávají disperganty, které částice obalí a udrží se tak ve stabilním koloidním stavu. [9, 11, 13]

SPPS – Plazmatický nástřik z roztoku

Roztokem je myšleno, že nanášené částice jsou vyrobeny chemickou precipitací. Takto vyrobené částice mají nanometrické rozměry a jsou již připravené na dávkování přímo do proudu plazmatu. Tímto krokem se eliminuje mnoho obtížných a zdlouhavých procesů, které byly zapotřebí pro konvenční nanášení z prášku či SPS. Opět je nutné udržovat vhodné vlastnosti roztoku, aby se při nástřiku kapalina dobře atomizovala a odpařila. [11, 12]

2.2 Biomateriály

Biomateriály jsou skupinou materiálů, které jsou spojené s biologickým systémem (lidským tělem) za účelem zlepšit, léčit nebo nahradit tkáň, orgán nebo funkční část těla. Z této definice vyplývá, že se může jednat o opravu nebo náhradu téměř kterékoliv části těla. S vývojem nových materiálů, metod výroby a implantace se počet možných tělesných úprav dále zvyšuje. Některé z nich jsou zobrazeny na obr. 2.5. [14, 15, 16]



Obrázek 2.5: Aplikace biomateriálů [17]

Důležitým pojmem spojeným s biomateriály je biokompatibilita. Dnes rozlišujeme různé úrovně biokompatibility materiálů – biotoxické, bioinertní, bioaktivní a biologicky rozkladatelné [15, 17, 18]:

- biotoxické – Tkáň v okolí biotoxického materiálu odumírá (většina kovů).
- bioinertní – Biologický systém na bioinertní materiál nereaguje nebo ho obalí nově vzniklou vazivovou tkání, vytváří se pouze slabá nebo žádná vazba s tkání, používá se např. na náhradu celého nebo části oka, zubů, chlopní (inertní keramiky – Al_2O_3, ZrO_2; polymery – PMMA, UHMWPE; titanové slitiny).
- bioaktivní – Biologický systém na implantát reaguje pozitivně a vytváří se výrazně silnější vazba s okolní tkání než v případě bioinertních materiálů, používá se např. na lůžka zubů, kostní implantáty (bioskla, hydroxyapatit – HA).
- biologicky rozkladatelné – Dochází k postupnému rozpouštění, nahrazení a vyloučení biomateriálu, používá se např. na šití, vaskulární náhrady, trubičky pro dávkování léků (polymery – PGA, PLA; keramiky – trikalcium fosfát TCP). [15, 18, 19, 20]

Do začátku 20. století prakticky neexistovaly biomateriály jak je známe dnes. V historii se objevovaly např. náhrady chrupu za zvířecí nebo dřevěné zuby. Používaly se tedy přírodní materiály, které ale nebyly v přímém kontaktu s tkání. Teprve v roce 1938 doktor Strock poprvé úspěšně provedl spojení kosti pomocí šroubu z chromkobaltmolybdenové slitiny a v roce 1940 byla provedena první implantace kovového kyčelního kloubu. Po těchto prvních úspěších se výzkum implantologie a osseointegrace začal rychle rozvíjet. V roce 1952 byl pro toto odvětví jako ideální kov objeven titan a jeho slitiny, které se začaly používat téměř pro všechny aplikace. První biologické výzkumy týkající se hydroxyapatitu se objevily v roce 1969. Bylo zjištěno, že je to přirozený biominerál, který se vyskytuje v kostech a zubech. Aplikace objemového hydroxyapatitu jsou dodnes obtížné kvůli nízké lomové houževnatosti, proto se využívá převážně povlaků na kovových substrátech zhotovených např. plazmovým nástřikem. Kovové jádro má vhodné mechanické vlastnosti, zatímco biokompatibilní povlak hydroxyapatitu zamezuje přímému styku kovu s tkání. [16, 18, 19, 21]

Biomateriály se dají rozdělit do čtyř hlavních materiálových skupin: kovy, keramika, polymery a jejich kompozity. U těchto materiálů je kladen velký důraz na mechanické, biologické a chemické, tepelné a některé speciální vlastnosti:

- mechanické vlastnosti – Jedná se o vlastnosti jako jsou Youngův modul pružnosti, pevnost, lomová houževnatost, tvrdost, únavová životnost a hustota. Jsou vyžadovány optimální hodnoty, aby byly co nejvíce podobné kostem či tkáním. Např. příliš velký modul pružnosti znamená nedostatečné ohnutí kostní náhrady při zatěžování a může způsobovat komplikace.
- biologické a chemické vlastnosti – Tyto vlastnosti vyjadřují biokompatibilitu materiálu. Především jde o reaktivitu, toxicitu a korozní vlastnosti.
- tepelné vlastnosti – Je nutné, aby implantát měl co nejvíce podobné tepelné vlastnosti původních tkání. Pokud by byly koeficienty prostupu tepla a teplotní rozta-

žnosti výrazně odlišné, mohlo by při velkých a rychlých změnách teplot docházet k rozdílným změnám rozměrů a to by vedlo k bolestivosti, uvolnění či praskání implantátu.

- speciální vlastnosti – Jedná se například o chování materiálu v elektrickém či magnetickém poli nebo o schopnost fázové změny a porozitu, která výrazně ovlivňuje mechanické vlastnosti materiálu. [15, 16, 18, 19, 20, 21]

Kovové materiály

Kovové materiály mají obvykle vysoké hodnoty mechanických vlastností, takže i dobrou lomovou houževnatost nebo únavovou životnost. Většina kovů je pro biologický systém toxická a reaktivní. Mají také často vysokou hustotu. To umožňuje použití pouze omezených druhů kovových materiálů, jako jsou např. CoCrMo slitiny, korozivzdorné oceli (316L), slitiny s tvarovou pamětí (NiTi), slitiny zlata a platiny, a především titan a titanové slitiny (Ti6Al4V, Ti6Al7Nb) – viz tabulka 2.2. Žádný z těchto kovů a slitin není přirozeně bioaktivní, ale existují metody modifikace povrchu, díky kterým se povrch bioaktivním stane. Jednou z nich je již dříve zmíněný plazmatický nástřik HA a další je ovlivnění povrchové vrstvy pomocí tepelného zpracování. [15, 16, 18, 19, 21]

Tabulka 2.2: Používané kovové biomateriály v medicíně [22]

Klinická oblast	Použití	Materiál
Ortopedie	Klouby	316L, CoCr(Mo), Ti6Al4V
	Fixace kostí	316L, Ti, Ti6Al4V
	Fixace páteře	316L, Ti, Ti6Al4V
Kardiologie	Tělo implantovaného umělého srdce	Ti
	Sedla "chlopní"	Ti6Al4V
	Kardiostimulátor - tělo elektrody	Ti, Ti6Al4V Ti, PtIr
Ušní	Elektrody stimulující vnitřní ucho	Pt
	Umělý bubínek	316L
Stomatologie	Protetika	AuAgCu(Pt, Pd), PdAgCuAu, NiCr, CoCr, Ti
	Implantologie	Ti, Ti6Al4V, NiTi
	Ortodoncie - dráty	316L, NiTi, Co,Cr
Obecná chirurgie	Jehly	304
	Skalpely	Oceli legované chromem
	Stenty	Materiály s tvarovou pamětí (NiTi)

Keramické materiály

Keramické materiály jsou nejbližší přírodním biomateriálům, proto jsou z pohledu biokompatibility nejlepší volbou. Existují keramiky náležící do skupiny bioinertních (Al_2O_3, ZrO_2), biologicky rozkladatelných (TCP), ale i bioaktivních (HA – hydroxyapatit, biosklo)

viz tabulka 2.3. Další výhodou je, že jsou korozně i tepelně odolné. Na rozdíl od kovů mají velmi nízkou lomovou houževnatost a únavovou životnost. Jejich mechanické vlastnosti jsou výrazně závislé na porozitě, která je ale v případě biokompatibility vyžadována pro dobré prorůstání buněk a vznik pevné vazby. Také výroba a obrábění keramických materiálů je obtížná, proto se s výhodou používají hlavně k tvorbě povlaků. [18, 19, 23, 24]

Tabulka 2.3: Používané keramické biomateriály [24]

Keramika	Chemické značení	Použití
Oxid hlinitý	Al_2O_3	Bioinertní
Oxid zirkoničitý	ZrO_2	
Pyrolytický grafit	Py-C	
Biosklo	$Na_2OCaOP_2O_3$-SiO	Bioaktivní
Hydroxyapatit (sintrován při vysoké teplotě)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	
Hydroxyapatit (sintrován při nízké teplotě)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Biologicky rozkladatelný
Trikalciumfosfát	$Ca_3(PO_4)_2$	

Polymerní materiály

Polymerní materiály nemají moc dobré mechanické vlastnosti pro nosné části, ale využívají se pro drobné, málo zatížené díly jako jsou vaskulární náhrady, kontaktní čočky, oční náhrady, prsní implantáty a další. Jejich předností je nízká hustota a velmi dobrá odolnost vůči agesivnímu prostředí biologického systému. [17, 19, 21]

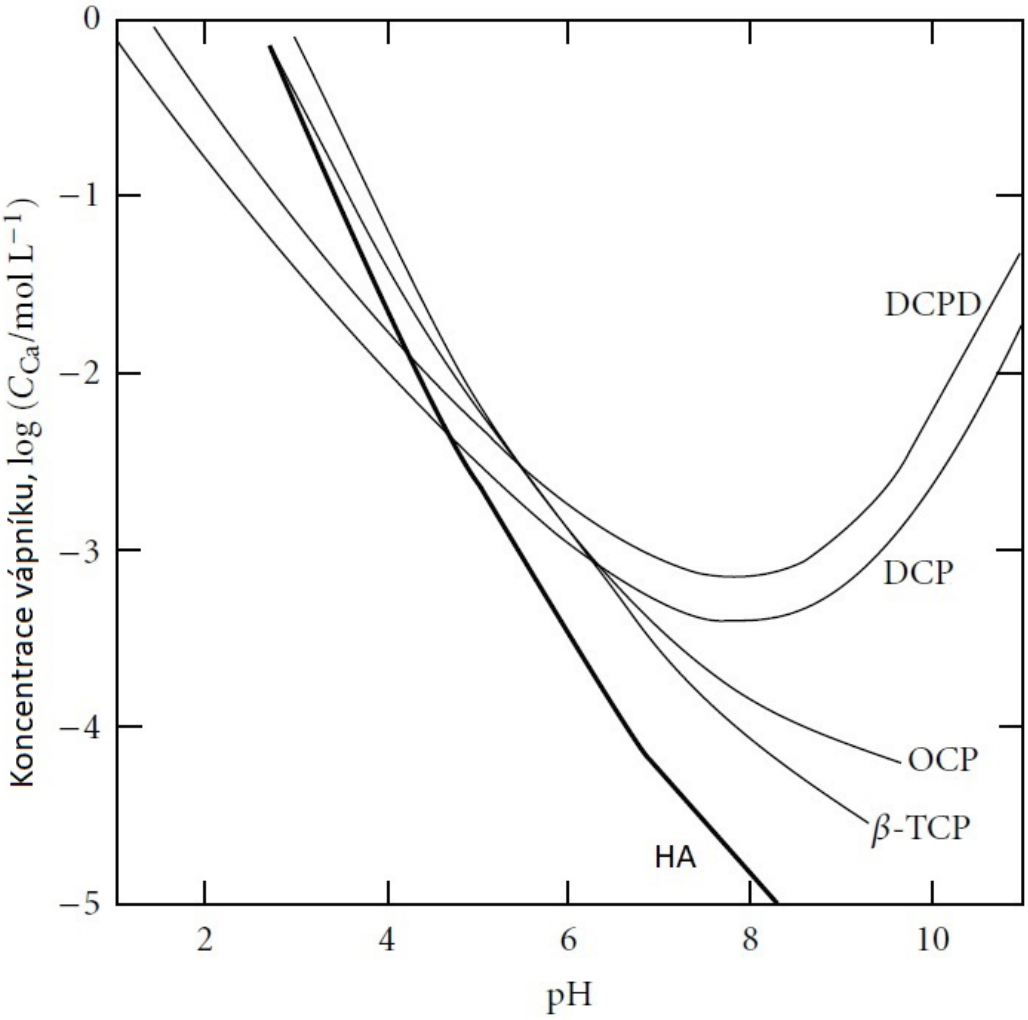
Kompozitní materiály

Kompozitní materiály jsou kombinací předchozích materiálů, které využívají jednotlivých výhod a eliminují nevýhody samostatných materiálů. Vývoj biokompatibilních kompozitů proběhl během posledních 30 let a přinesl kombinace s polymerní matricí a keramickým plněním (HAPEX – PE polyethylen a HA, PVA/HA – polyvinylalkohol a HA). [19, 25]

2.2.1 Kalcium fosfáty

Kalcium fosfáty jsou skupina keramických materiálů na bázi kationtů vápníku (Ca^{2+} – kalcium) a aniontové skupiny obsahující fosfor (PO_4^{3-}, $P_2O_7^{3-}$, $P_3O_9^{4-}$, aj. - fosfát). Na základě typu fosfátové skupiny a stechiometrii sloučeniny lze spočítat poměr Ca/P, který má zásadní vliv na stabilitu a biokompatibilitu daného kalcium fosfátu. V tabulce 2.4 jsou zobrazeny některé vybrané kalcium fosfáty a jsou seřazeny podle Ca/P poměru. Stabilita ve vodném prostředí (jako jsou například tělní tekutiny) je znázorněna na obr. 2.6 v diagramu rozpustnosti kalcium fosfátů v závislosti na pH roztoku při teplotě 37 °C. Ve vodném roztoku se všechny sloučeniny na bázi Ca-P rozpouštějí, ale při pH $< 4{,}2$ je nejstabilnější DCP (Dikalcium fosfát), zatímco při pH $> 4{,}2$ se téměř stabilním stává hydroxyapatit (Ca/P = 1,67) v doprovodu β-TCP. Uvnitř těla, kde se vyskytují kalcium

fosfáty, je pH vyšší než 4,2 a proto je zřejmé, že hydroxyapatit bude nejčastěji se vyskytujícím kalcium fosfátem, tedy ho tělo bude i nejlépe příjmat – bioaktivita. Zároveň to znamená, že β-TCP lze využít jako biologicky rozkladatelný materiál. [15, 18, 19, 26, 27]



Obrázek 2.6: Diagram rozpustnosti pro kalcium fosfáty při teplotě 37 °C [23, 27]

Hydroxyapatit

Hydroxyapatit je díky své chemické podobnosti ke kalcifikovaným tkáním (kosti, zubní sklovina – kvůli použití zubních past s obsahem fluoru, který nahrazuje OH^-, se zde často vyskytuje fluorapatit se stejným Ca/P = 1,67) a stabilitě v agresivním prostředí těla ideálním materiálem pro chirurgické náhrady. Jak však bylo uvedeno v kapitole 2.2, mechanické vlastnosti keramických materiálů nejsou vhodné pro těžce namáhané kostní náhrady. Navíc se tyto vlastnosti dále zhoršují při zvyšující se porozitě, která je nutná pro správnou fixaci a prorůstání osteoblastů. Některé základní vlastnosti HA jsou zobrazeny v tabulce 2.5. [23, 24]

Hydroxyapatit se běžně vyskytuje v přírodě ve formě fosfátového minerálu apatitu v různých barvách. Chemický vzorec této látky je $Ca_5(PO_4)_3(OH)$, obvykle se ale zapisuje v jeho přirozené dvoumolekulové formě $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Vyskytují se i apatity se substituovanou hydroxylovou skupinou OH^-, např. anionty F^- – fluorapatit, O^- – oxoapatit a Cl^- – chlorapatit. Existují i sloučeniny s nahrazenou fosfátovou skupinou $(PO^4)^{3-}$ a kationtem Ca^{2+}, ale v těchto případech se mění poměr Ca/P, a tím se mění i biokompatibilita a stálost látky v daném vodném prostředí. Prášek i suspenze čistého HA jsou obvykle bílé. [19, 23, 29]

Tabulka 2.4: Kalcium fosfáty [15, 23, 26]

2,00	Tetrakalcium fosfát	TTCP	$Ca_4O(PO_4)_2$
1,67	Hydroxyapatit	HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
1,67	Fluorapatit	FA	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$
1,50	Trikalcium fosfát	TCP	$Ca_3(PO_4)_2$
1,33	Oktakalcium fosfát	OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$
1,00	Dikalcium fosfát dihydrát	DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
1,00	Dikalcium fosfát	DCP	$CaHPO_4$
1,00	Kalcium pyrofosfát	CPP	$Ca_2P_2O_7$
0,67	Tetrakalcium dihydrogen fosfát	TDHP	$Ca_4H_2P_6O_{20}$
0,50	Monokalcium fosfát mohohydrát	MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$
0,50	Kalcium metafosfát	CMP	$Ca(PO_3)_2$

Tabulka 2.5: Základní vlastnosti hydroxyapatitu [28]

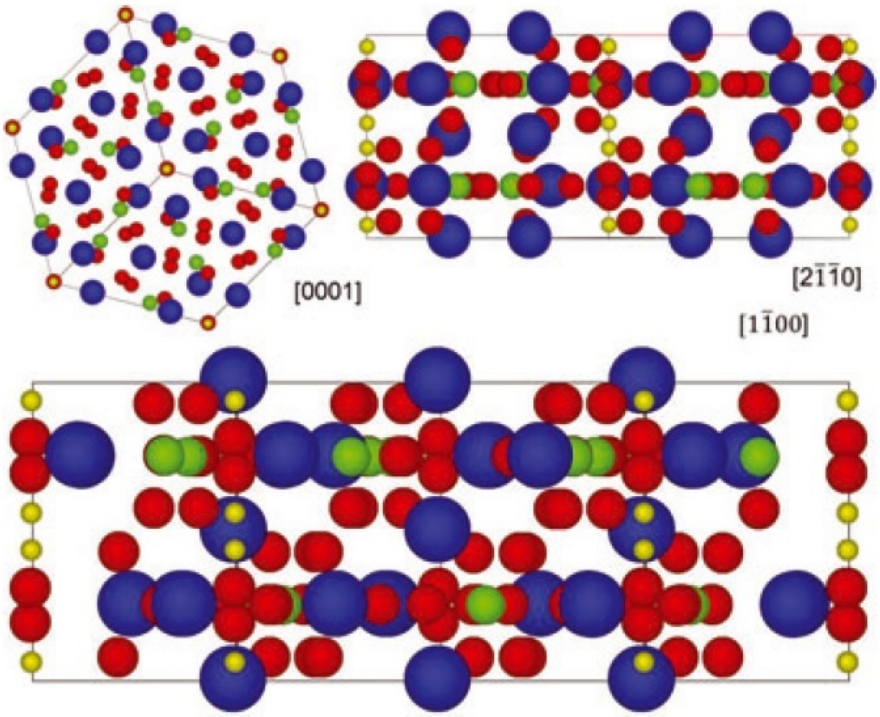
Vlastnost	Hodnota
Hustota $[g \cdot cm^{-3}]$	3,15
Molekulární hmotnost $[g \cdot mol^{-1}]$	502,31
Youngův modul $[GPa]$	85-90
Knoopova tvrdost $[MPa]$	3450
Koeficient teplotní roztažnosti $[10^{-6}K^{-1}]$	11
Teplota tavení $[°C]$	1660
Lomová houževnatost $[MPa \cdot m^{\frac{1}{2}}]$	1,0
Weibullův modul [-]	5-12

Krystalizace hydroxyapatitu obvykle probíhá v hexagonální struktuře s prostorovou grupou $P6_3/m$ s mřížovými parametry a = b = 0,943 nm, c = 0,688 nm a $\gamma = 120°$ (viz obr. 2.7a), ale vyskytuje se i v monoklinické formě $P2_1/b$ s parametry a = 0,942 nm, b = 2a = 1,885 nm, c = 0,688 nm a $\gamma = 120°$ (viz obr. 2.7b). [29]

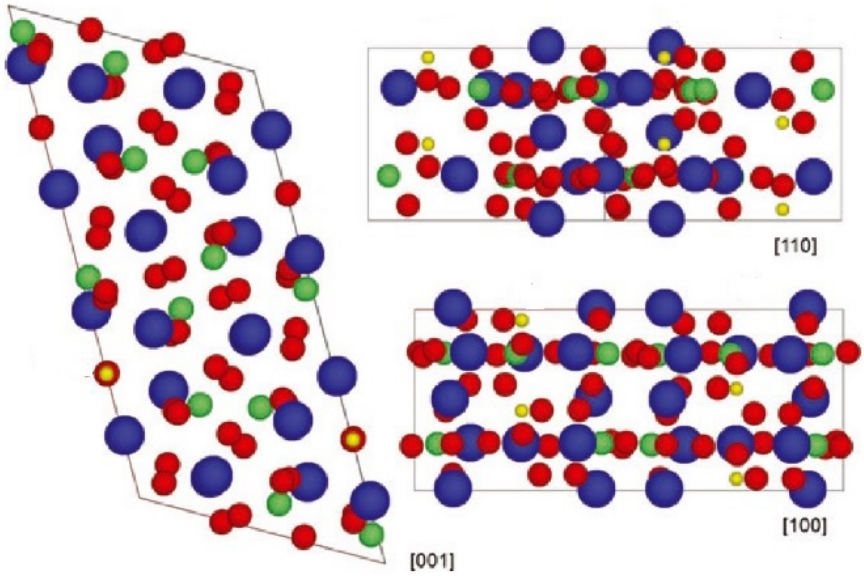
2.2.2 Titan a jeho slitiny

CP (komerčně čistý) titan a titanové slitiny jsou dnes nejrozšířenější kovové materiály používané v medicíně umělých náhrad. Oproti ostatním kovům a slitinám (např. oceli, Co-Cr, Ni atd.) vykazuje lepší vlastnosti téměř v každém ohledu. Jedná se především o dobré vlastnosti biokompatibility, ale i o nízkou hustotu a Youngův modul pružnosti (bližší k hodnotě kosti) nebo výborné antikorozní vlastnosti i v agresivním prostředí těla. V dnešní době se již od přímého voperování kovového implantátu ustupuje. Využívá se povrchových úprav, které podporují převážně uchycení a přijetí náhrady biologickým systémem. To určuje kovové jádro hlavně jako nositele mechanických vlastností. [17, 20, 21, 30]

Titan je polymorfní kov, který se získává převážně těžbou minerálu rutilu, ale existují i vzácnější formy, a to anatas, brookit a ilmenit. Nízkoteplotní stabilní fáze α krystalizuje v HCP struktuře a vysokoteplotní fáze β krystalizuje v BCC struktuře. Přísadové prvky lze rozdělit do skupin α-stabilizujících (Al, nečistoty – O, N, C atd.) a β-stabilizujících (V, Nb, Mo, Zr, Fe, Cr atd.). Na obr. 2.8 je možné vidět rozdělení titanových slitin podle obsahu přísadových prvků. Nejpoužívanější slitinou na bázi titanu je Ti6Al4V, která patří do skupiny $\alpha+\beta$. Byla vytvořena pro účely vojenského letectví, ale později byly zjištěny její vyjímečné biokompatibilní vlastnosti. V současnoti však převládají tendence nahradit Al a V, protože při dlouhodobém vystavení tkáně těmto iontům může docházet ke zdravotním problémům, jako jsou Alzheimrova choroba, neuropatie nebo osteomalacie. Vanad lze nahradit např. niobem (Ti6Al7Nb). Nahrazení hliníku je ale obtížnější, proto se hliník přímo vynechává, a tím se slitiny přesunují do skupiny metastabilních slitin β (Ti29Nb13Ta4.6Zr, Ti35Nb7Zr5Ta atd.). Dalšími výhodami této skupiny je ještě nižší Youngův modul pružnosti a dobrá tvařitelnost za studena. [20, 30, 31, 32]

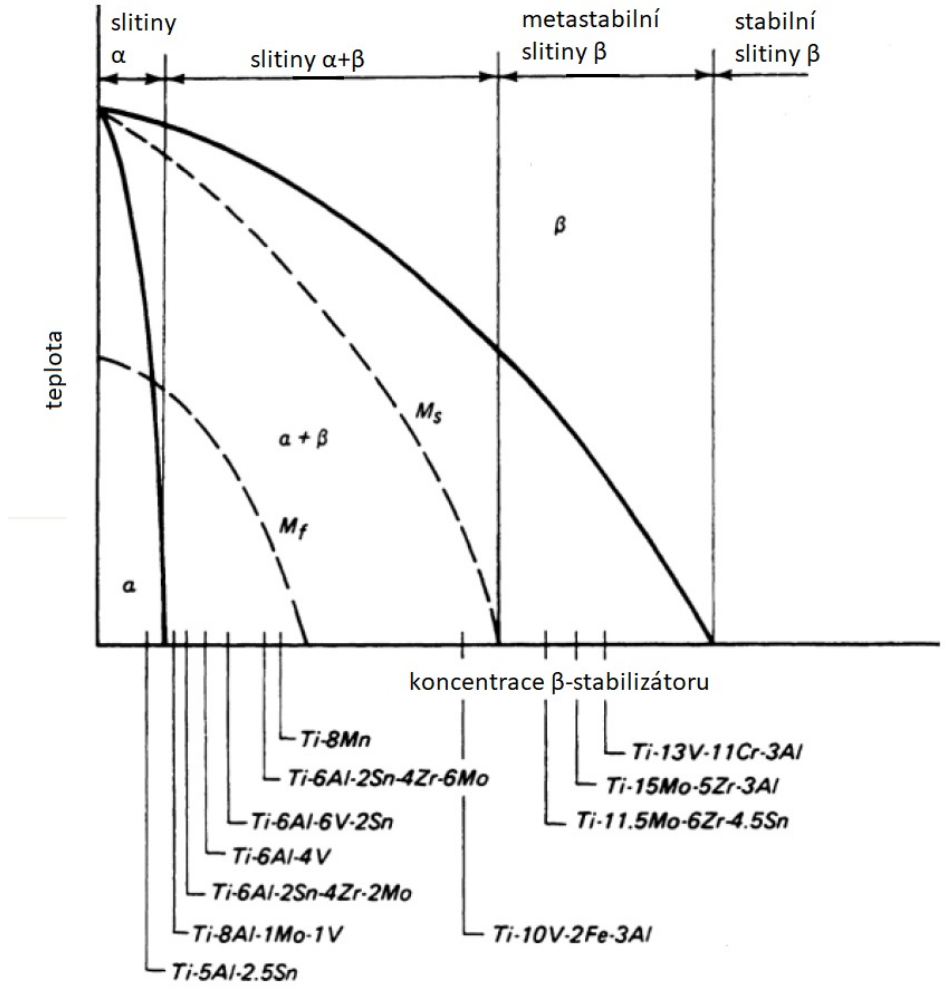


(a) Hexagonální struktura HA P6_3/m v rovinách [0001], [2$\bar{1}\bar{1}$0] a [1$\bar{1}$00]



(b) Monoklinická struktura HA P2_1/b v rovinách [001], [110] a [100]

Obrázek 2.7: Existující struktury hydroxyapatitu (Ca = modrá, P = zelená, O = červená a H = žlutá) [29]



Obrázek 2.8: Rozdělení titanových slitin podle obsahu přísadových prvků [31]

2.3 Testování biologické kompatibility

Metody experimentálního testování biologické kompatibility materiálu se živými buňkami „in vitro“ (testování v laboratorních podmínkách, překlad z latiny: „ve skle“) s sebou nese značná omezení a zjednodušení, proto se využívá jako prvotní metodika a po úspěšném pokusu se přechází na testování „in vivo“ (překlad z latiny: „v živém“). Největším omezením a zároveň zjednodušením je práce v přísně sterilním prostředí, se sterilními nástroji a nutností dekontaminace vzorků po předešlé manipulaci. Znečištění vzorků může způsobit falešně pozitivní výsledky, které nelze odlišit od skutečných výsledků. Proto je nutné se kontaminaci vyvarovat. Zároveň se do posloupnosti práce řadí zkoušky a kontroly, které o nesterilitě informují a dále se s výsledky musí pracovat s ohledem na tuto skutečnost.

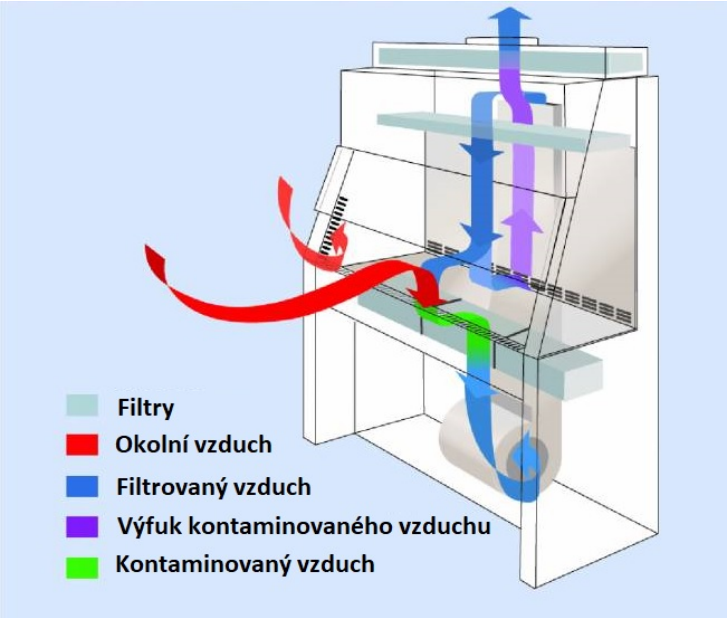
2.3.1 Vybraná zařízení pro biologické testování

Tato kapitola se věnuje obecným principům fungování přístrojové techniky, která je využívána pro vyhodnocování a práci s biologickými vzorky. V biologické části práce byl

používán laminární box, konfokální mikroskop, průtokový cytometr a ELISA. Konkrétní specifikace přístrojů jsou uvedeny v kapitole 3.4.3.

Laminární box

Z důvodu atmosferického znečištění (prach, popel atd.) nelze považovat za sterilní ani čistou laboratoř, která je opatřená kvalitní vzduchotechnikou s filtry. Pro opravdu sterilní práci se používá tzv. laminární box, který se dezinfikuje za pomocí UV záření, aby se odstranilo bakteriální znečištění. Laminární proudění filtrovaného vzduchu se využívá k tomu, aby se do otevřeného boxu atmosferické znečištění nedostalo, případně aby se vnesené částice odsály. Na obr. 2.9 si lze všimnout mřížování v přední i zadní části boxu, kterými je nasáván laminární proud vzduchu. Pokud se uvnitř boxu nachází otevřená nádoba, přímé proudění tuto nádobu obtéká a vytváří pomyslné víko, proto se vnitřek nádoby nekontaminuje. [33]

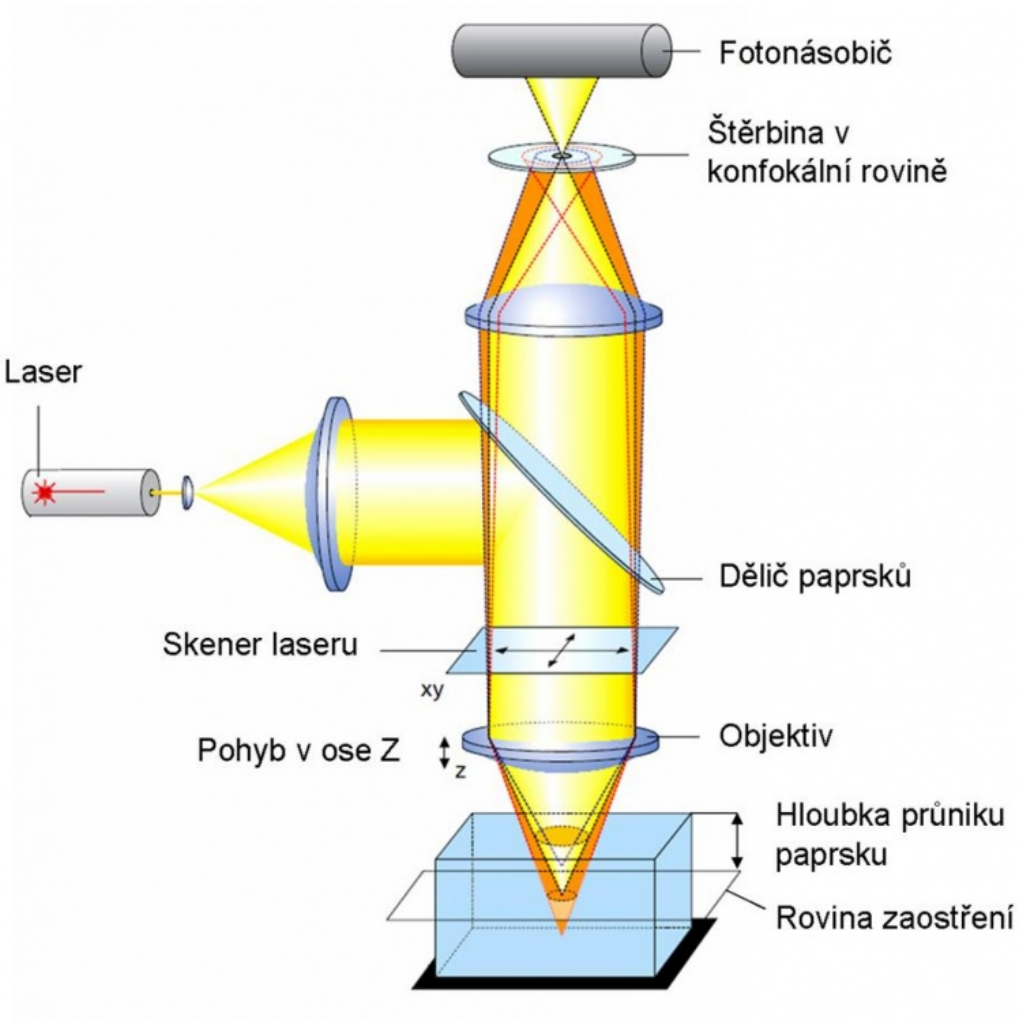


Obrázek 2.9: Schéma laminárního boxu [33]

Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskop je světelný zobrazovací přístroj, který se od konvenčního světelného mikroskopu liší použitým zdrojem světla a způsobem filtrace přijímaného signálu. Tento druh mikroskopie byl vytvořen primárně pro biologické účely, kde je potřebné zkoumat pouze úzkou rovinu v silnějším průsvitném preparátu, ale své využití má i v materiálových vědách. V roce 1957 přišel americký věděc Marvin Minsky s prvním návrhem konfokálního miskroskopu. Na obr. 2.10 je znázorněno jednoduché schéma vystihující fungování přístroje. Za zdrojem světla je zdrojová clona, která vytváří bodový zdroj. Světlo osvětluje objektivovou čočku, která ho zaostřuje na vzorek. Před detektorem se nachází clona v konfokální rovině (v druhé ohniskové rovině objektivové čočky) a filtruje veškeré světlo, které nevychází z ohniskové roviny na vzorku. To má za následek vysoké rozlišení

výsledného signálu, protože obraz neruší signál z okolních rovin. Toto zobrazování má spoustu omezení, protože je signál přijímán pouze z ohniskové roviny. Jelikož je ohnisko čočky v ideálním případě pouze bod, je nutné, aby svazek světla po vzorku rastroval. To je dnes zprostředkováno pomocí soustavy zrcadel. Hloubka ostrosti je minimální a záleží na velikosti štěrbiny v detektorové cloně. Hlavním problémem je malý kontrast způsobený odfiltrováním většiny signálu. Proto je nutné používat silný zdroj světla. V dnešní době se používá laser, který je téměř ideální bodový zdroj, je monochromatický a má dostatečnou intenzitu. Takto intenzivní zdroj prosvítí preparáty dostatečně hluboko, aby bylo možné vytvořit obrazy z více rovin a počítačově vytvořit 3D model. [34, 35, 36, 37]



Obrázek 2.10: Schéma konfokálního mikroskopu [36]

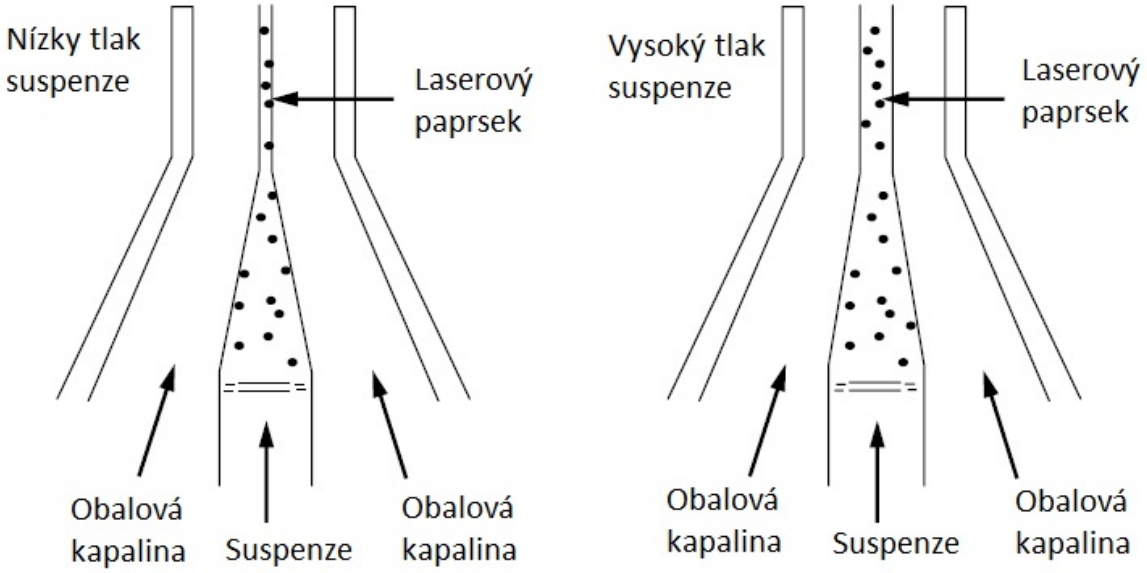
V biologii se často využívá fluorescence. Jedná se o metodu zobrazení pouze určitých částí buněk, např. jader, které se obarví fluorochromem (vhodnou látkou reagující na určitou vlnovou délku záření). Elektrony přijímají energii záření s nižší vlnovou délkou a vyzařují ji jako záření s vyšší vlnovou délkou (v tomto případě UV – viditelné spektrum). Fluorescence způsobuje, že na výsledném obraze jsou s vysokým kontrastem a určitou barvou vidět požadované části, které v běžném zobrazení vidět nejsou. V tomto směru je laser nevýhodou, protože fluorochromy na světlo reagují a postupně se „vysvítí“. [37]

Průtokový cytometr

Technologie průtokového cytometru je náhradou za analytickou cytometrii, která je při velkých počtech vzorků nepoužitelná. Průtokový cytometr dává informace o tvaru, velikosti a členitosti částic (nejčastěji buněk, virů, kvasinek atd.). Na základě těchto informací je dokáže rozdělit podle typu, ale i na živé, mrtvé či apoptotické (apoptóza – programovaná buněčná smrt). Všechna data lze získat z velkého objemu za velice krátký čas. [38]

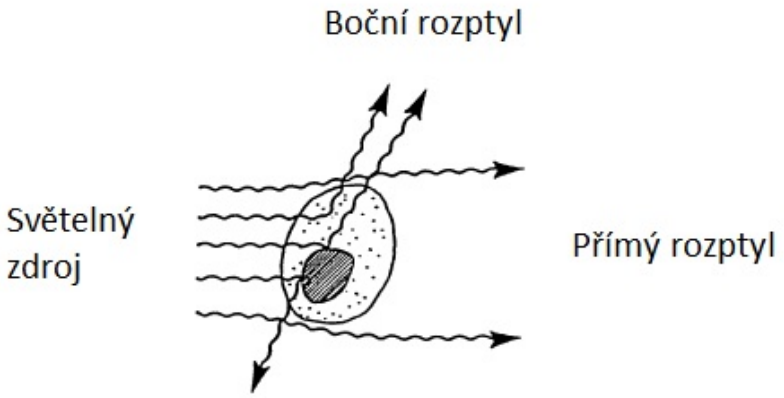
Cytometr lze rozdělit na 3 části: fluidika, optika a elektronika.

- Fluidika má za úkol dopravit částice k laserovému paprsku tak, aby byla částice ve středu paprsku a v daný moment pouze jedna. Toho je docíleno vstřikováním suspenze částic do proudu obalové kapaliny, která suspenzi při zúžení kapiláry ztenčí tak, že se částice musí poskládat za sebe. Jak je vidět na obr. 2.11, je nutné nejprve optimalizovat tlak kapalin. Zároveň nesmí dojít k turbulenci suspenze.



Obrázek 2.11: Hydrodynamická fokusace proudu suspenze [38]

- Optická část se skládá především z laserů různých vlnových délek, filtrů záření a soustav zrcadel. Různé vlnové délky jsou používány, protože se často využívá fluorescence (viz 2.3.1 – konfokální mikroskop). Laserový paprsek se od částice odráží a rozptyluje se buď přímo (FSC – forward scatter), nebo bočně (SSC – side scatter). FSC obsahuje informaci o velikosti částice, zatímco SSC nese informaci o morfologii částice a fluorescenční záření (obr. 2.12). Aby se rozeznaly fluorescence z různých fluorochromů, jsou zde filtry, které snímají pouze určité rozmezí vlnových délek a ty jsou počítačově vyhodnocovány.
- Elektronickou část tvoří především 2 sady detektorů. Fotodioda pro snímání silného signálu FSC a fotonásobič pro detekci obvykle slabého signálu SSC a fluorescence. Signály z detektorů se přenáší do počítače, kde dochází k vyhodnocování výsledků. [38]



Obrázek 2.12: Interakce světla s částicí v průtokovém cytometru [38]

ELISA

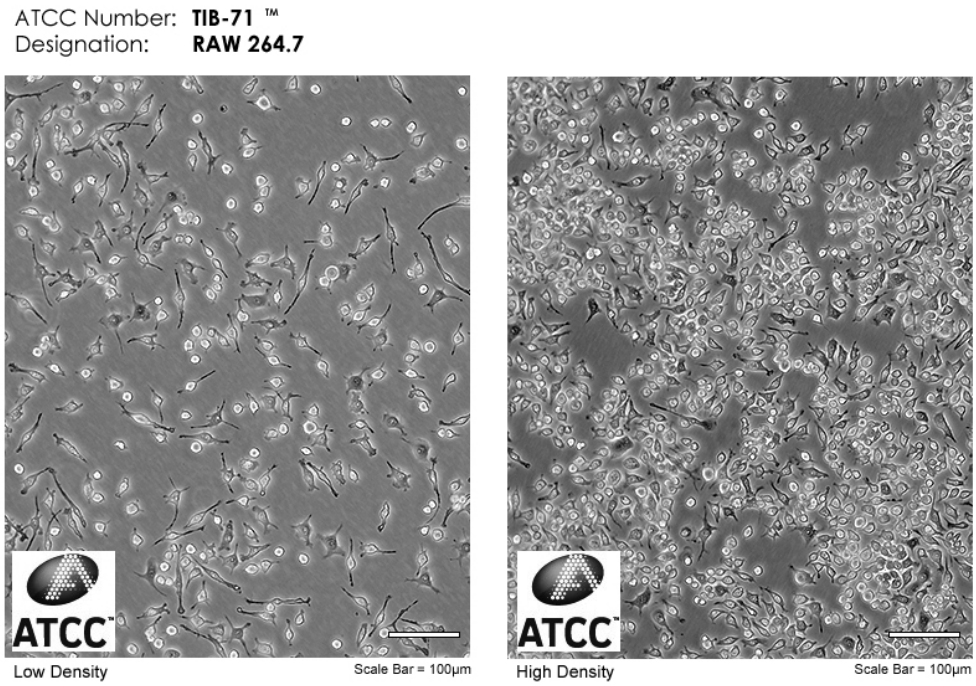
ELISA je metoda měření absorbance daného roztoku. Přidáním vhodné látky do měřeného roztoku se změní jeho barva a tím i absorbance při určité vlnové délce světla. Jedná se o metodu standartovou, což znamená, že je pro kvantitativní analýzu nutné využít standartů se známými hodnotami absorbance. Touto metodou lze měřit např. počet buněk nebo obsahy protilátek po kultivaci. [39]

2.3.2 Vybrané buňky pro biologické testování

V této části práce budou popsány buňky, které byly vybrány pro hodnocení biokompatibility vzorků. Bude uveden obecný popis buněk a výrobcem doporučená manipulace.

RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

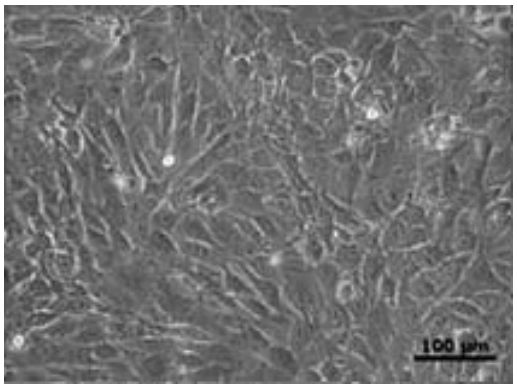
Buňky RAW 264.7 (obr. 2.13) jsou myší buňky typu makrofág (buňka účastnící se imunitní reakce). Tato linie buněk pochází od dospělého myšího samce. Buňky jsou nakažené rakovinou, aby vytvářely tumory. Tím je zajištěno, že se budou stále množit. Kultivace těchto buněk je výrobcem doporučená v kompletním médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) s 10% obsahem Fetal Bovine Serum (FBS). Tyto látky poskytují buňkám obživu, vhodné prostředí pro kultivaci a podporují jejich růst a odolnost. RAW 264.7 se nechávají růst v kultivačních lahvích v prostředí inkubátoru 37°C a 5% CO_2 a je nutné, aby se každý druhý až třetí den vyměnilo vyčerpané médium. Jelikož jsou buňky silně adherující na povrch a jsou relativně odolné, používá se pro sklízení a pasážování (oddělení části buněk do další kultivační lahve, aby měly buňky dostatek místa pro množení a růst), metoda škrábání, kdy se po dně lahve jezdí sterilním škrabadlem. [40, 41]



Obrázek 2.13: Mikroskopický snímek buněk RAW 264.7 [40]

MG-63 (ATCC® CRL-1427™)

Buňky MG-63 (obr. 2.14) jsou lidské buňky typu fibroblast (buňka produkující hmotu, v tomto případě osteoblast produkující kostní tkáň). Tato linie buněk pochází od muže ve věku 14 let europoidní rasy. Tyto buňky jsou také nakaženy formou rakoviny postihující kostní tkáň. Tím je opět zajištěno množení a růst. Buňky je vhodné kultivovat v kompletním médiu Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) s 10% obsahem FBS. Dané médium poskytuje vhodnou potravu buňkám a ideální prostředí pro množení a růst. MG-63 se nechávají růst v kultivačních lahvích v prostředí inkubátoru 37°C a 5% CO_2 a je nutné, aby se každý druhý až třetí den vyměnilo vyčerpané médium. Tyto buňky také adherují na dno kultivační lahve, ale pro sklízení a pasážování se používá trypsinizace. Jedná se o chemickou cestu uvolnení buněk ode dna lahve pomocí Trypsin-EDTA. [42, 43]



Obrázek 2.14: Mikroskopický snímek buněk MG-63 [43]

3 Experimentální plán

V prvním kroku byly vyrobeny vodné roztoky HA mokrou syntézou. Pomocí XRD (rentgenová difrakční analýza) vysušeného roztoku bylo zjišťováno fázové složení výchozího materiálu.

Dále byly roztoky použity na tvorbu nástřiků s pomocí plazmového hořáku WSP®-H 500 na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR, v. v. i. Vytvořené povlaky byly podrobeny XRD, XRF (rentgenová fluorescenční spektroskopie) a REM (rastrovací elektronová mikroskopie) analýze s EDS (energiově disperzní spektroskopie) mapováním.

Nakonec bylo provedeno inicializační testování biokompatibility povlaků HA deponovaných tímto inovativním způsobem na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. Testování zahrnovalo kultivaci dvou druhů buněk a jejich následnou analýzu pomocí průtokové cytometrie, konfokální mikroskopie a ELISA.

3.1 Materiály

Materiál, který byl v této práci použit, je hydroxyapatit vyrobený mokrou syntézou a využíván byl v podobě vodného roztoku. Povlaky byly vytvářeny na substrátech z titanové slitiny Ti6Al4V, která je již dlouhou dobu v lékařství používána.

3.1.1 Výroba roztoku HA mokrou syntézou

Mokrou syntézu HA lze rozdělit do několika skupin: chemická precipitace, sol-gel, hydrolytická, emulzní, hydrotermální a sonochemická metoda. Nejčastěji se používá první zmíněná chemická precipitace. Hlavními výhodami této metody jsou vysoká produktivita, jednoduchost, nízká cena výroby a nanometrické rozměry vyrobených částic HA. Proces výroby spočívá v překapávání roztoku látky bohaté na PO_4^{3-} do roztoku látky s obsahem Ca^{2+}. Během přenosu je nutné produkt opatrně míchat, průběžně kontrolovat jeho pH a zároveň udržovat konstantní teploty obou roztoků. [44, 45]

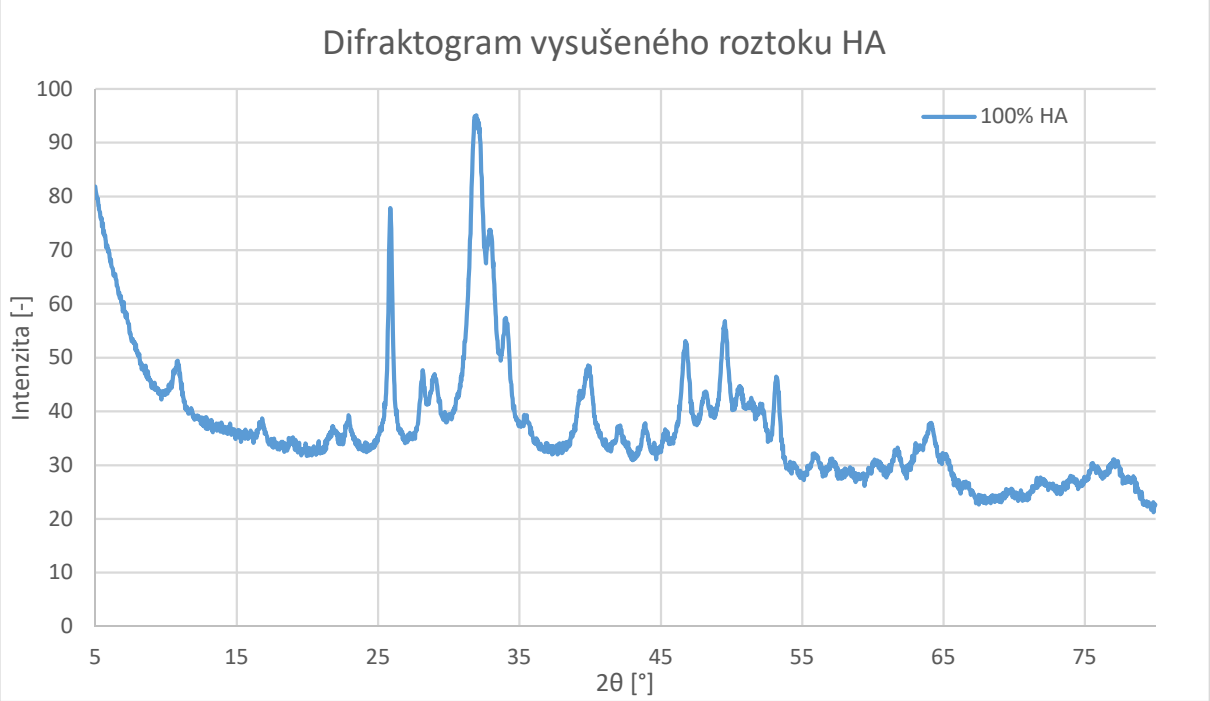
V tomto případě byla použita kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4) a hydroxid vápenatý ($Ca(OH)_2$) a tyto látky byly smíchány podle rovnice 3.1. [44]

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O \tag{3.1}$$

H_3PO_4 o objemu 95,12 ml byla rozmíchána ve 2 l deionizované vody a tento roztok byl udržován při stále teplotě 40 °C. Druhý roztok byl vytvořen smícháním 142,2 g $Ca(OH)_2$ s dalšími 2 l deionizované vody a zahřát na 37 °C. Roztok H_3PO_4 byl dávkován do roztoku $Ca(OH)_2$ rychlostí 0,9 l/h. Precipitace byla ukončena ve chvíli, kdy roztok dosáhl pH 8,9.

Po dokončení dávkování byl výsledný produkt udržován na teplotě 37 °C při stálém míchání další 2 hodiny. Po uplynutí této doby byl roztok vody a částic hydroxyapatitu přelit do lahví. Takto připravené nanočástice HA ve vodném prostředí se přímo vkládají do speciální pumpy pro dávkování do proudu plazmatu.

Touto jednoduchou metodou byl vyroben 100% čistý HA. Čistota výchozího materiálu byla potvrzena pomocí XRD na částicích, které byly získány vysušením roztoku. Obr. 3.1 znázorňuje záznam z měření.



Obrázek 3.1: Fázová analýza XRD vysušeného roztoku HA

Stříbro má antibakteriální vlastnosti, proto byla snaha o vytvoření nástřiku s alespoň 5% obsahem stříbra. Pro tento pokus se použil stejný roztok HA jako v ostatních nástřikových sériích, ale před nástřikem byl přimíchán dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Dusičnan se vlivem působení vysoké entalpie plazmatu rozkládá a vzniká čisté stříbro nanometrických rozměrů.

3.1.2 Příprava substrátu

Jako substráty byly použity destičky z titanové slitiny Ti6Al4V. Geometrie destiček byla 30 x 20 x 3 mm. Těchto rozměrů bylo dosaženo pásovou pilou a hrany byly zarovnány čelní frézou. Před nástřikem byl povrch otryskán pro zvýšení adheze povlaku. Tryskání bylo provedeno hranatými částicemi α-Al_2O_3 o velikosti 200–350 μm. Substrát byl otryskán ve směru kolmo na povrch ze vzdálenosti cca 150 mm. Posledním krokem před depozicí bylo odmaštění vzorku v ultrazvukové lázni isopropanolu po dobu 10 minut.

3.2 Depozice nástřiků

3.2.1 WSP-H – Hybridní vodou–stabilizovaný plazmatický nástřik

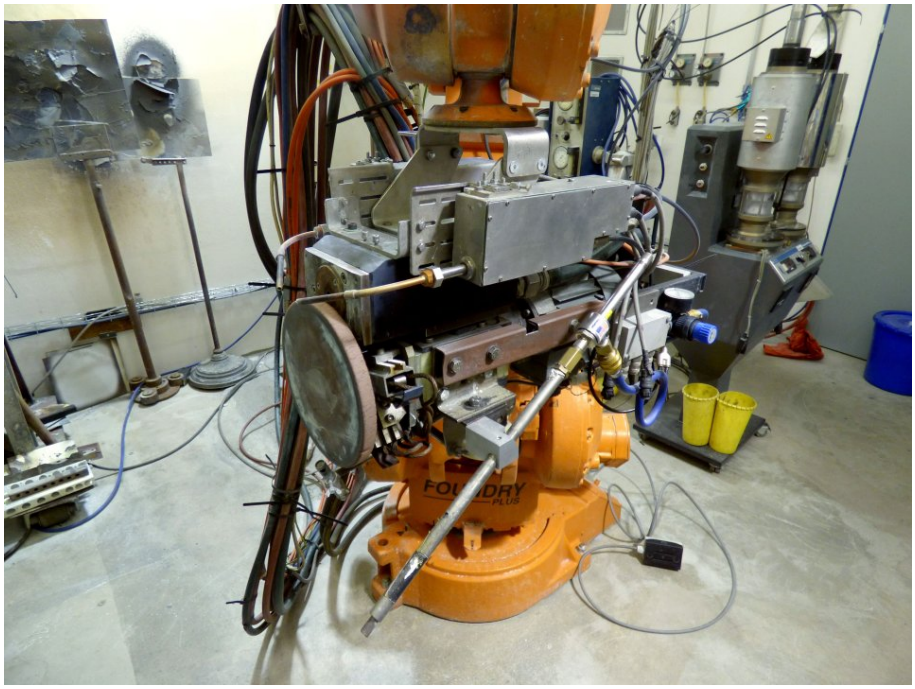
Depozice nástřiků proběhla pomocí hybridního vodou–stabilizovaného plazmového hořáku WSP®-H 500 na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR, v. v. i., s dávkováním roztoku do proudu plazmatu (obr 3.2). Byly provedeny 2 prvotní série nástřiků pro zjištění funkčnosti metodiky depozice. Na těchto vzorcích byla také zkoušena vhodnost použitých metod analýzy. Poté byly vytvořeny další 3 nástřikové série. Nástřikové parametry a parametry dávkování roztoku jsou uvedeny v tabulce 3.1. Každá změna parametrů má vliv na výsledné vlastnosti povlaku jako je adheze a koheze, porozita nebo tloušťka. Vzorky vytvořené z roztoku byly posuzovány v porovnání s již optimalizovanými vzorky vytvořenými standardním plazmovým nástřikem z prášku.

Tabulka 3.1: Použité nástřikové parametry

Série nástřiku	A1	A2	B1	B2	B3
Počet přejezdů	60	60	150	102	136
Výchozí roztok	HA	HA	HA	HA+$AgNO_3$	HA+$AgNO_3$
Výkon hořáku [A]	500	400	500	500	30
Průtok argonu [slpm]	15	15	15	15	20
Nástřiková vzdálenost [mm]	100	100	100	100	150
Průměr trysky [mm]	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Vzdálenost dávkování [mm]	30	30	30	30	30
Úhel dávkování [°]	25	25	25	25	25
Tlak dávkování [bar]	3,5	2,5	3	3	3
Rychlost dávkování [g/min]	105	90	98	99	99

Otočný karusel, který lze vidět na obr. 3.3, se používá pro uchycení substrátů při samotném procesu depozice. Frekvence otáčení karuselu se volí okolo 20 Hz. Rotace karuselu společně s parametry dávkování roztoku (tabulka 3.1) a pohybem hořáku zaručuje, že na všechny substráty bude nanesena právě jedna vrstva nástřiku za jeden přejezd.

Karusel také napomáhá regulaci teploty substrátů. Teplota je kontrolována termokamerou v reálném čase. Před začátkem depozice se provede předehřev substrátů na teplotu mezi 200–270 °C. Předehřev je prováděn provozem plazmového hořáku „na prázdno“ (bez dávkování deponovaného materiálu). Po dosažení teploty předehřevu se začne do proudu plazmatu dávkovat roztok. Depozicí jedné vrstvy nástřiku se teplota substrátu zvýší na 350–450 °C. Před nanesením další vrstvy se hořák přesune dále od karuselu, aby nezahříval substráty. Na karusel je zavedeno vzduchové chlazení ze strany a zezadu, které zchladí substráty na původní teplotu předehřevu. Tímto způsobem je proveden požadovaný počet přejezdů, které nejvíce ovlivňují výslednou tloušťku nástřiku. Zamýšlená tloušťka při těchto experimentech byla 30–100 μm.



Obrázek 3.2: WSP®-H 500, Ústav fyziky plazmatu AV ČR, v. v. i.

Obrázek 3.3: Otočný karusel s uchycenými vzorky [9]

3.2.2 Plynem stabilizovaný plazmatický nástřik

Nově vytvořené vzorky z WSP-H byly srovnávány se vzorky vytvořenými pomocí klasického plynového hořáku. Tyto vzorky byly označeny PS. Nástřiky byly připraveny již dříve pomocí plynem stabilizovaného plazmového hořáku SG-100 (Praxair, USA), NTU, Singapur.

3.3 Metalografická a chemická analýza

Nejprve byla provedena analýza fázového složení pomocí XRD a prvkového složení s využitím XRF. Dále byly připraveny vzorky v řezu pro pozorování struktury vrstvy v REM a vytvoření prvkových map pomocí EDS.

3.3.1 Příprava vzorků

Substráty s nástřikem byly rozřezány laboratorní kotoučovou pilou s vodním chlazením. Chlazení vodou bylo voleno, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku jinou chladící kapalinou. Vzorky byly zality za studena, protože při zalévání za tepla pod tlakem by mohlo dojít ke zborcení křehkého a pórovitého nástřiku a strukturovaného povrchu. Metalografické výbrusy byly ve vyleštěném stavu pozorovány v REM.

3.3.2 Stanovení fázového složení pomocí XRD

Rentgenová difrakční analýza byla provedena na přístroji X'pert (PANalytical, Nizozemsko) za účelem stanovení fázového složení nástřiku. Při měření byla použita Bragg-Bretanova geometrie a Cu-Kα záření. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v software Highscore s využitím databází PDF2 a ICSD pro kvantitativní analýzu. Další měření bylo provedeno na přístroji D8 Discover (Bruker, Německo) s vyhodnocením amorfního podílu fází.

3.3.3 Stanovení prvkového složení pomocí XRF

Bylo provedeno měření prvkového složení pomocí spektrometru XRF Axios (PANanalytical, Nizozemsko) na VŠCHT v Praze. Jako zdroj rentgenového záření byla použita Rh lampa. Pro kvantitativní analýzu byl použit software SuperQ. Při měření HA byly zjištěny pouze prvky Ca a P, protože O a H leží mimo rozlišení tohoto přístroje.

3.3.4 Pozorování v REM

HA je nevodivý materiál, proto bylo nutné výbrus před pozorováním potáhnout vodivým povlakem, aby nedocházelo k jeho nabíjení. Pozorování bylo provedeno na rastrovacím elektronovém mikroskopu Ultra Plus (Zeiss, Německo) při urychlovacím napětí 20 kV. Každé místo bylo vyfoceno při zvětšení 200x, 500x a 800x při detekci sekundárních (SE) i zpětně odražených elektronů (BSE).

Dále byly vytvořeny EDS mapy pro vyhodnocení rozložení obsahu jednotlivých prvků. Mapování bylo vyhodnocováno v software AZtec (Oxford Instruments, Velká Británie).

V poslední fázi byl pozorován povrch nástřiku před a po kultivaci buněk na dvou přístrojích a to Ultra Plus (Zeiss, Německo) a Evo MA 15 (Zeiss, Německo) při urychlovacím napětí 20 kV. Snímky byly pořízeny při zvětšení 300x, 1000x a 3000x. Nakonec bylo vyhodnoceno prvkové složení pomocí EDS.

3.4 Biologické testy

Biologické testování bylo provedeno na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i., pod vedením MUDr. Miloslava Kverky, Ph.D.

Nejprve bylo nutné připravit vzorky vhodných rozměrů pro tento druh testů. Dále byla provedena příprava buněk RAW a MG-63, kterými se nechaly porůstat vzorky. Pro vyhodnocení těchto testů byla využita konfokální mikroskopie, průtoková cytometrie a ELISA. Během práce bylo použito několik reagencií. Jejich seznam je uveden v tabulce 3.2.

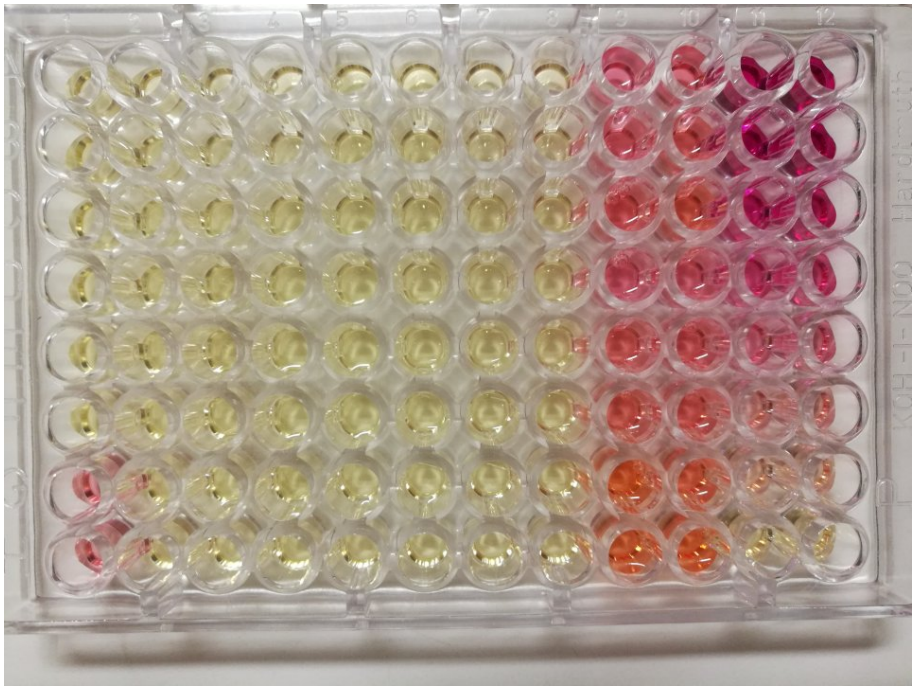
Tabulka 3.2: Seznam použitých reagencií

Reagencie	**Oficiální název**	**Výrobce**	**Katalogové číslo**
RAW 264.7	Abelson murine leukemia virus transformed murine, morphology: monocyte/macrophages	ATCC®	TIB-71™
MG-63	osteosarcoma, morphology: fibroblast	ATCC®	CRL-1427™
DMEM medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich	D5796
FBS	Fetal Bovine Serum	Biochrom	S0115
Na-pyruvát	sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	P8574
EMEM - MG63 medium	Eagle's Minimum Essential Medium	Sigma-Aldrich	M2279
L-glutamin	L-glutamine	Sigma-Aldrich	G5790
antibiotika	Penicillin - Streptomycin	Sigma-Aldrich	P0781
WST - 1	Cell Proliferation Reagent WST-1	CELLPRO-RO Roche	0000000116448070 01
Trypanová modř	Trypan blue	Sigma-Aldrich	T8154
CFDA SE	Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit	ThermoFisher Scientific	V12883
Hoechst 33342	bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich	14533
Nuclear RED DRAQ 5	DRAQ5™ Fluorescent Probe Solution	ThermoFisher Scientific	62251
Trypsin - EDTA	Trypsin - EDTA solution	Sigma-Aldrich	T4049
Lipopolysacharid	LPS from Salmonella abortus equi S-form	ENZO	ALX-581-009-L001
Polymixin B	Polymyxin B sulfate salt	Sigma-Aldrich	P4932
FVD-eF780	eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	eBioscience	65-0865-14
CD40-PE	Rat anti-mouse CD40 - Fykoerythrinem (PE)	eBioscience	12-0401-82
CD127-Alexa488	Rat anti-mouse CD127 - Alexa Fluor® 488	Biolegend	135018
CD80-PerCP-Cy5.5	Armenian Hamster anti-mouse CD80 - PerCP/Cy5.5	Biolegend	104722
CD14-APC	Mouse CD14 Monoclonal Antibody (61D3), APC	eBioscience	17-0149-42
TNF-α	Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	R & D systems	DY410
IL-6	Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R & D systems	DY406
IL-1β	Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R & D systems	DY401

3.4.1 Příprava vzorků

Pro biologické testování musely být připraveny speciální vzorky o rozměrech 7 x 7 mm. Tento rozměr byl zvolen, protože kultivační destičky s 96 jamkami mají průměr kulaté jamky 10 mm (obr. 3.4).

Pro kultivaci buněk „in vitro“ je nutné pracovat se sterilními vzorky. Vzorky byly nejprve opláchnuty proudem speciální sterilizované vody Aqua pro injectione pro injekční využití. Poté byly sterilizovány v autoklávu.



Obrázek 3.4: Kultivační destička 96 jamek

3.4.2 Nasazování a kultivace buněk

Se sterilními vzorky bylo nutné již manipulovat pouze v komoře laminárního boxu. Buňky MG-63 byly nanášeny přímo na povrch vzorku. S ohledem na pozorování buněk MG-63 v konfokálním mikroskopu byly buňky při nasazování obarveny barvou CFDA SE.

Buňky RAW 264.7 byly nejprve nasazeny do kultivační destičky a po uchycení na ně byly naneseny vzorky. V tomto případě byl vzorek suspenze prášku seškrábaného z povrchu destičky a kondiciované medium, kultivační médium DMEM pro buňky RAW, které bylo vystaveno destičce na 24 h v třepačce. Do některých jamek byl přidán lipopolysacharid (LPS), na který buňky reagují silnou imunitní reakcí. Totožná kultivace byla provedena i v přítomnosti Polymixinu B, který blokuje signalizaci LPS. Přítomnost těchto látek dává kontrolu funkčnosti metodiky a sterility vzorků.

Všechny buňky byly nanášeny v počtech 10, 20, 40 a 60 tisíc buněk na jamku. Koncentrace buněk byla měřena pomocí Trypanové modři a Bürkerovy komůrky. Trypanová modř buňky zvýrazní a ty se počítají v komůrce, která má přesně vymezené rozměry. Tím lze určit průměrnou koncentraci buněk. Takto připravené kultivační destičky byly ponechány pro krátkodobou (24 h) a dlouhodobou (72 h nebo 96 h) kultivaci v inkubačním prostředí 37°C a 5% obsahu CO_2.

3.4.3 Příprava buněk pro analýzu

Vzorky s buňkami MG-63 byly po kultivaci přeneseny do čisté destičky, kde byla připravena barva Nuclear RED DRAQ 5 pro zvýraznění jader pro konfokální mikroskopii. Měření bylo provedeno na konfokálním mikroskopu FV-1000 (Olympus, Japonsko). Byly pořízeny fotografie v jedné rovině a série snímků, které byly poskládány do 3D obrazu. Zbylé supernatanty (médium po kultivaci buněk) byly zmraženy pro měření ELISA. Do připravených jamek k měření proliferace (množení) buněk byla přidána látka WST-1, která při změření absorbance ELISA dává informaci o počtu buněk v jamce.

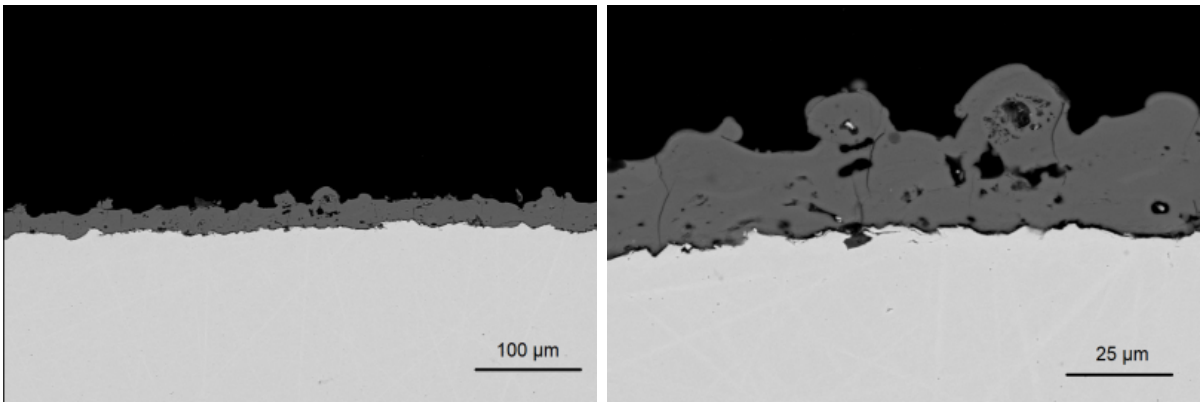
Supernatanty buněk RAW byly také zmraženy pro měření ELISA. Buňky, které zůstaly usazené v destičce, byly seškrábány a byly k nim přidány protilátky (CD40-PE, CD127--Alexa488, CD80-PerCP-Cy5.5, CD14-APC). Tyto látky se usazují pouze na určitém druhu buněk a podle nich lze buňky roztřídit při průtokové cytometrii. K roztřídění těchto buněk byl použit průtokový cytometr LSRII s HTS (BD Biosciences, USA).

Supernatanty byly použity pro měření protizánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-6, IL-1β) metodou ELISA na přístroji Multiskan Ascent 354 (Labsystems Oy, Finsko). Obsah cytokinů se zvyšuje při zánětu nebo kontaminaci vzorku.

4 Výsledky

4.1 Nástřiky HA z prášku

Morfologie nástřiku vytvořeného standardním plynem stabilizovaným plazmovým hořákem z práškového prekurzoru je zobrazena na obr. 4.1. Povrch nástřiku je téměř rovinný bez výraznějších výstupků. Nástřik je celistvý s pravidelným výskytem mikrotrhlin. Póry se v nástřiku vyskytují hlavně v okolí nenatavených částic nebo oxidických vměstků. Tloušťka nástřiku je průměrně 26 μm.



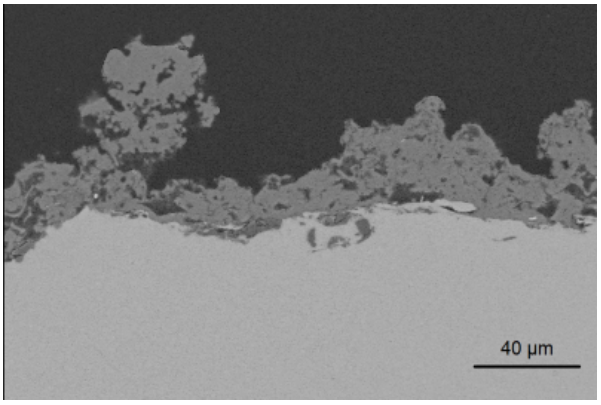
Obrázek 4.1: Průřez strukturou vzorku PS, zobrazení v BSE

4.2 Prvotní nástřiky

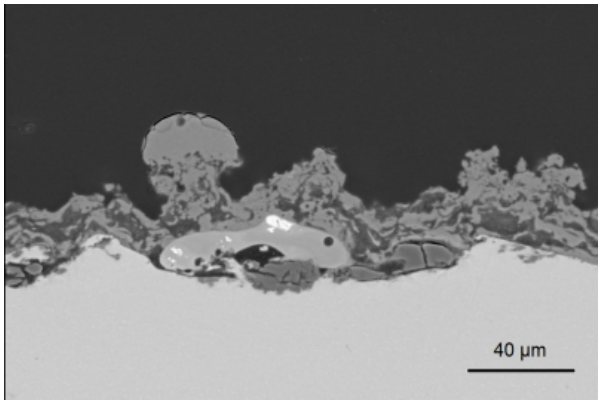
Pro série A1 a A2 byla provedena pouze analýza pomocí REM a analýza fázového složení XRD. Jejich výsledky je možné vidět na obr. 4.2 a v tabulce 4.1. Morfologie povrchu je členitá, což ukazuje na vhodné prostředí pro kultivaci buněk. V nástřiku se vyskytují nežádoucí fáze TTCP a CaO. Již u těchto povlaků lze vidět cizí částice na povrchu substrátu (obr. 4.2b). Předpoklad, že se jedná o částice α-Al_2O_3, se potvrdil v kapitole 4.3.2. Na základě těchto informací byla do posloupnosti práce zařazena navíc analýza XRF a EDS mapování pro zjištění složení cizího materiálu.

Tabulka 4.1: Výsledky analýzy XRD vzorků A1 a A2

Obsah [hm%]		
Fáze	A1	A2
Amorfní	?	7,0
HA	80,2	85,9
TTCP	14,4	10,8
CaO	5,4	3,4



(a) Průřez strukturou vzorku, zobrazení v BSE, vzorek A1



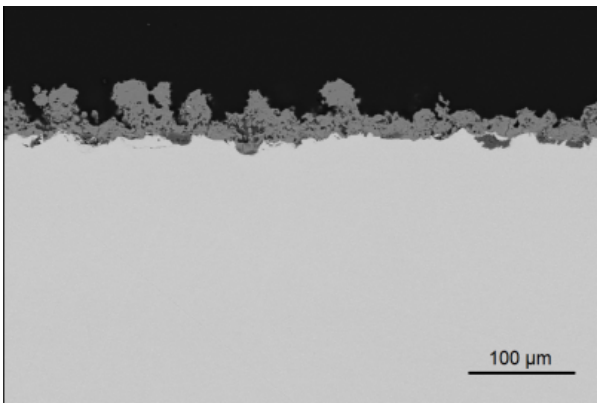
(b) Průřez strukturou vzorku, zobrazení v BSE, vzorek A2

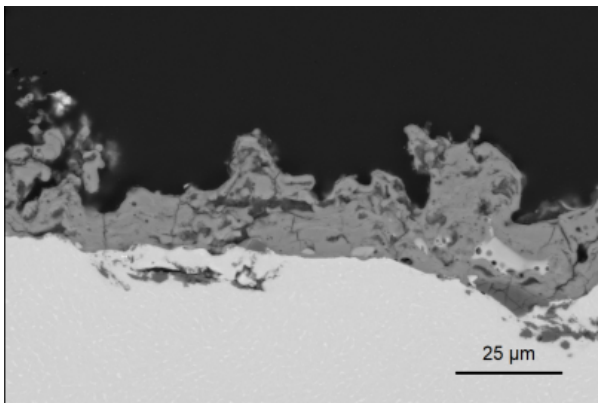
Obrázek 4.2: Průřez strukturou vzorků prvotních nástřiků

4.3 Vlastnosti deponovaných nástřiků

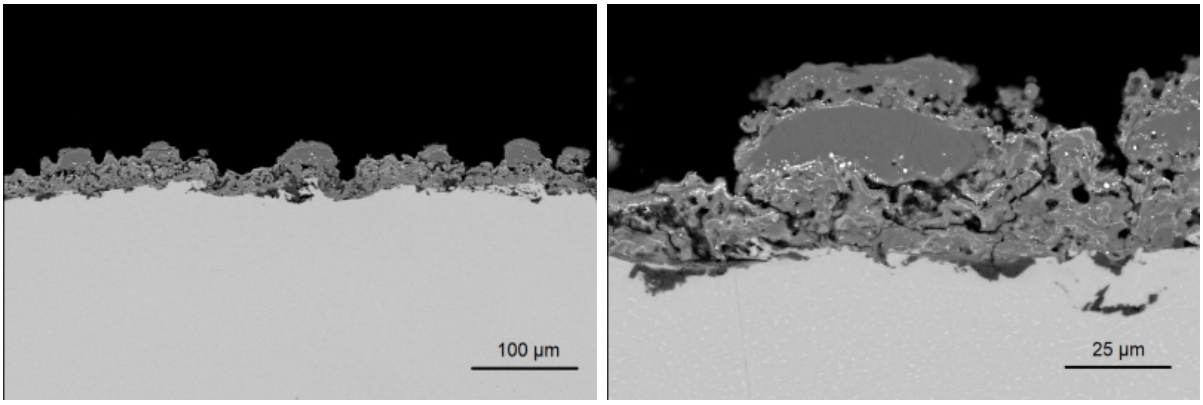
4.3.1 Morfologie nástřiků

Na obr. 4.3, 4.4 a 4.5 lze vidět průřezy strukturou nástřiků označených B1, B2 a B3. Povrchy jsou nerovné a vytváří se na nich výběžky HA stromovitého tvaru. U sérií B2 a B3, kde bylo přidáno stříbro (bílé tečky jsou částice stříbra viz obr. 4.4 a 4.5) jsou tyto výběžky nižší a širší. Mezi těmito útvary se tvoří otevřené póry. Na detailních snímcích lze vidět, že se v povlaku nacházejí i uzavřené póry různých velikostí. Po celé délce nástřiků se nacházejí mikrotrhliny. I přes vysoký výkon hořáku (tabulka 3.1) mohou být tyto nedostatky způsobeny nedostatečným natavením částic. Okolo nenatavené částice může dojít ke vzniku póru nebo k vytvoření mikrotrhliny. Průměrná tloušťka nástřiku u sérií B1 a B2 činí 26 μm. U série B3 byla dosažena větší tloušťka 55 μm.

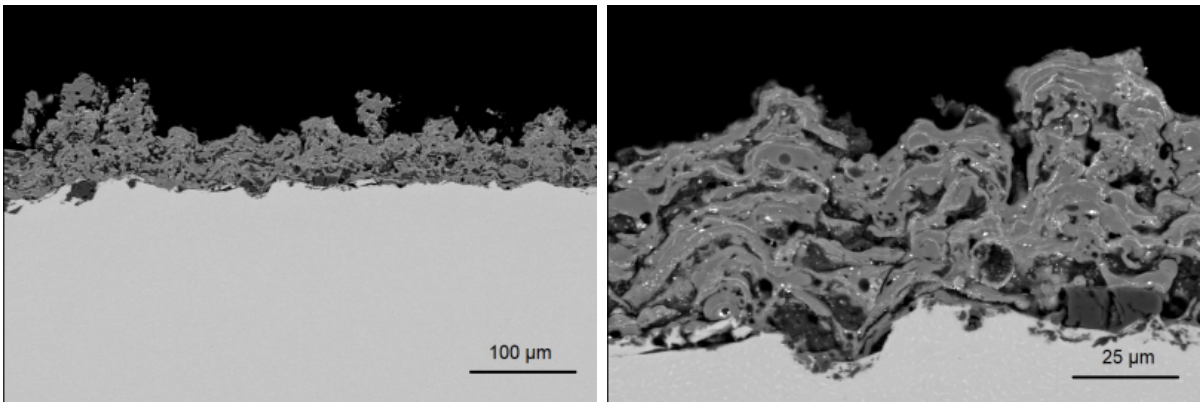




Obrázek 4.3: Průřez strukturou vzorku B1, zobrazení v BSE



Obrázek 4.4: Průřez strukturou vzorku B2, zobrazení v BSE



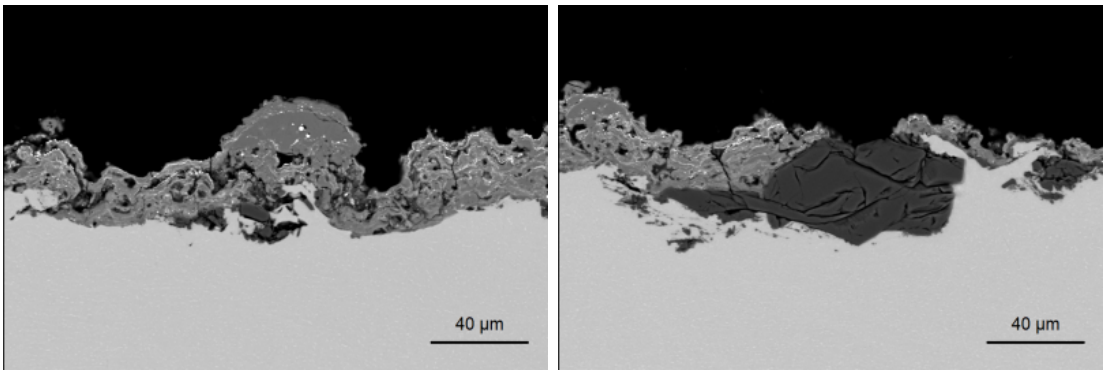
Obrázek 4.5: Průřez strukturou vzorku B3, zobrazení v BSE

4.3.2 Chemická analýza nástřiků

Při EDS mapování prvkového rozložení bylo zjištěno, že se hranaté částice α-Al_2O_3 při tryskání přichytávaly na tryskaný povrch substrátu. Tyto částice zůstaly v povrchu i po ultrazvukovém čištění. Slitina Ti6Al4V je měkká, proto částice pronikají hluboko do povrchu. Tuto skutečnost lze vidět na EDS mapách zobrazující rozložení Al a O (obr. 4.7 a 4.8), ale i na snímcích REM při detekci BSE (obr. 4.6). Ve většině případů došlo k depozici nástřiku a překrytí nežádoucích částic, ale některé velké částice zůstaly na volném povrchu.

Prvkové mapy EDS vzorků B2 a B3 jsou zobrazeny na obr. 4.7 a 4.8. Je zřejmé, že Ag bylo deponováno v celé tloušťce nástřiku. Obr. 4.4 a 4.5 ukazují řádkovité rozložení částic Ag. Pro oba nástřiky byly použity výrazně odlišné nanášecí parametry (tabulka 3.1), proto je rozložení Ag v nástřiku na první pohled jiné. U vzorku B2 (obr. 4.4) se nacházejí velká místa bez obsahu Ag, zatímco B3 (obr. 4.5) obsahuje Ag s pravidelnějším uspořádáním.

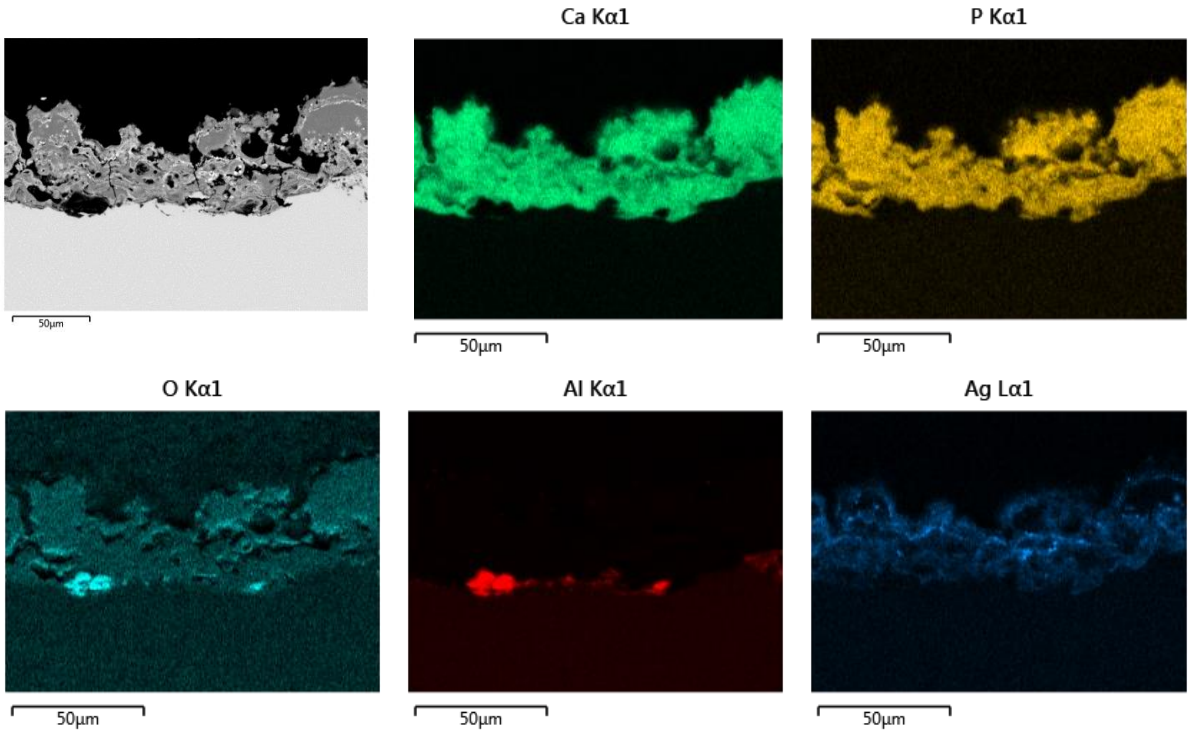
Metodou XRF byl stanoven procentuální obsah prvků v nástřiku, viz tabulka 4.2. Byly nalezeny pouze prvky Ca a P, protože O a H leží mimo rozlišení tohoto přístroje. Ag v sériích B2 a B3 je obsaženo dokonce ve vyšších koncentracích než původně předpokládaných 5 hm%.



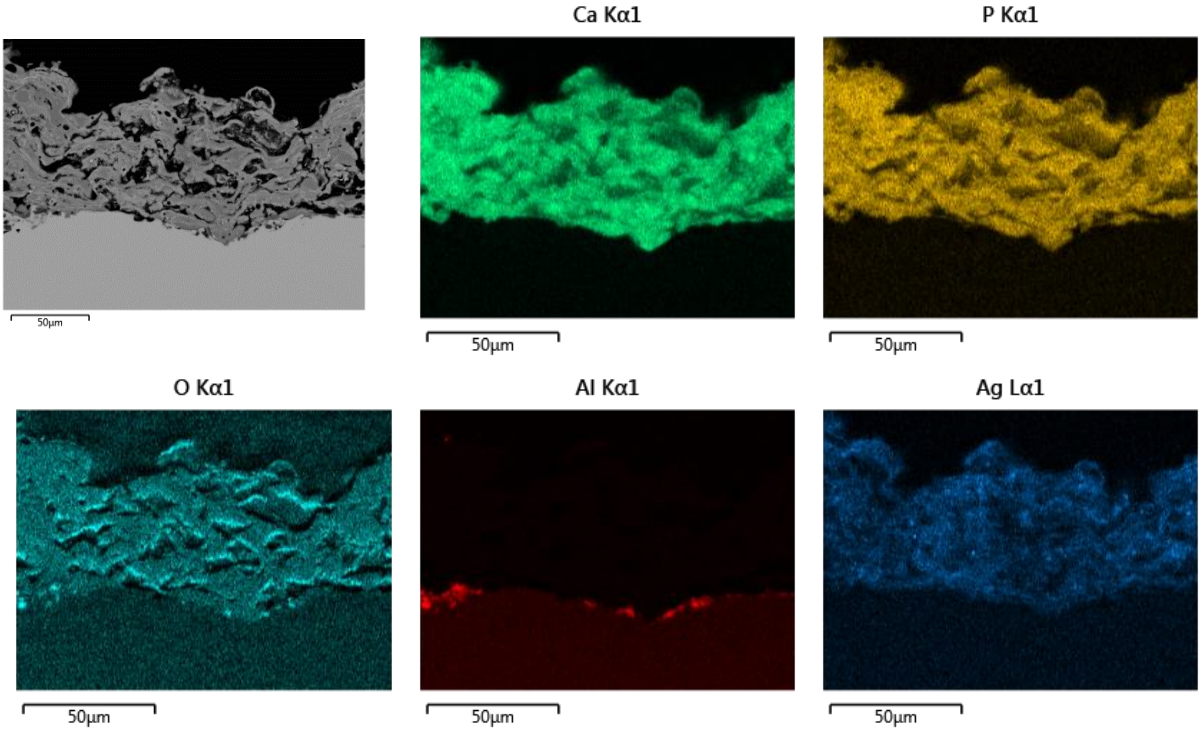
(a) Zakryté částice α-Al_2O_3, zobrazení v BSE

(b) Nezakryté částice α-Al_2O_3, zobrazení v BSE

Obrázek 4.6: Částice α-Al_2O_3 přichycené v substrátu po tryskání, vzorek B2



Obrázek 4.7: Prvková mapa EDS vzorku B2



Obrázek 4.8: Prvková mapa EDS vzorku B3

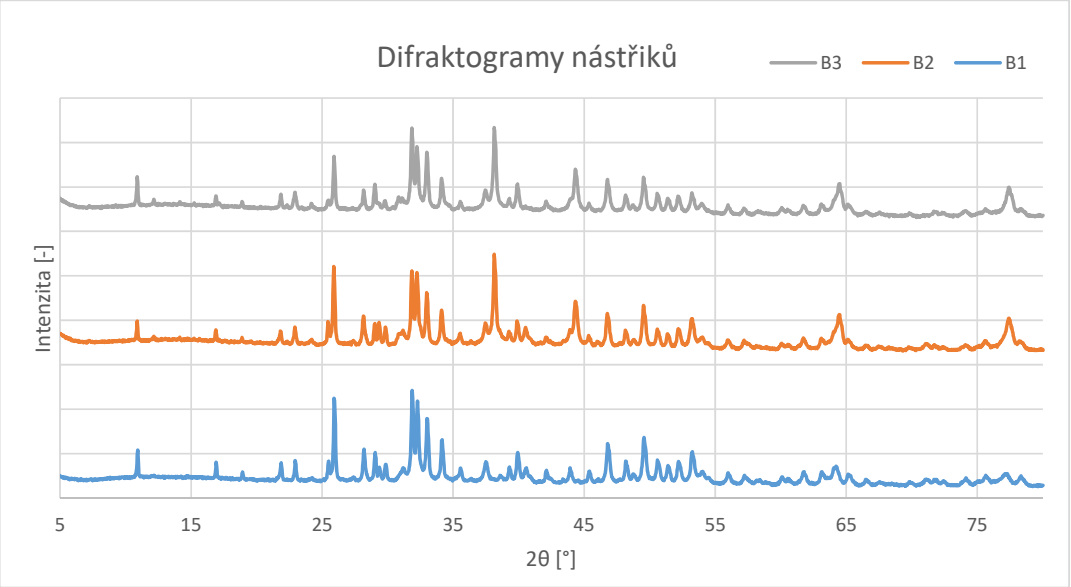
Tabulka 4.2: Výsledky analýzy XRF vzorků B1, B2 a B3

Obsah [hm%]			
Prvek	B1	B2	B3
Ca	77,7	66,8	69,3
P	22,1	20,6	18,3
Ag	-	12,5	12,3

4.3.3 Fázová analýza nástřiku

Výsledky fázové analýzy XRD jsou zobrazeny na obr. 4.9 a tabulce 4.3. I přes 100% čistý HA ve výchozím roztoku (obr. 3.1) došlo vlivem vysoké teploty plazmatu k rozkladu části HA na méně stabilní kalcium fosfáty a CaO.

V kapitole 4.3.2 je uvedeno rozložení stříbra v nástřiku. Fázová analýza dokazuje, že se jedná o čisté částice stříbra, nikoliv o jeho sloučeninu (tabulka 4.3).



Obrázek 4.9: Difraktogramy nástřiků B1, B2 a B3

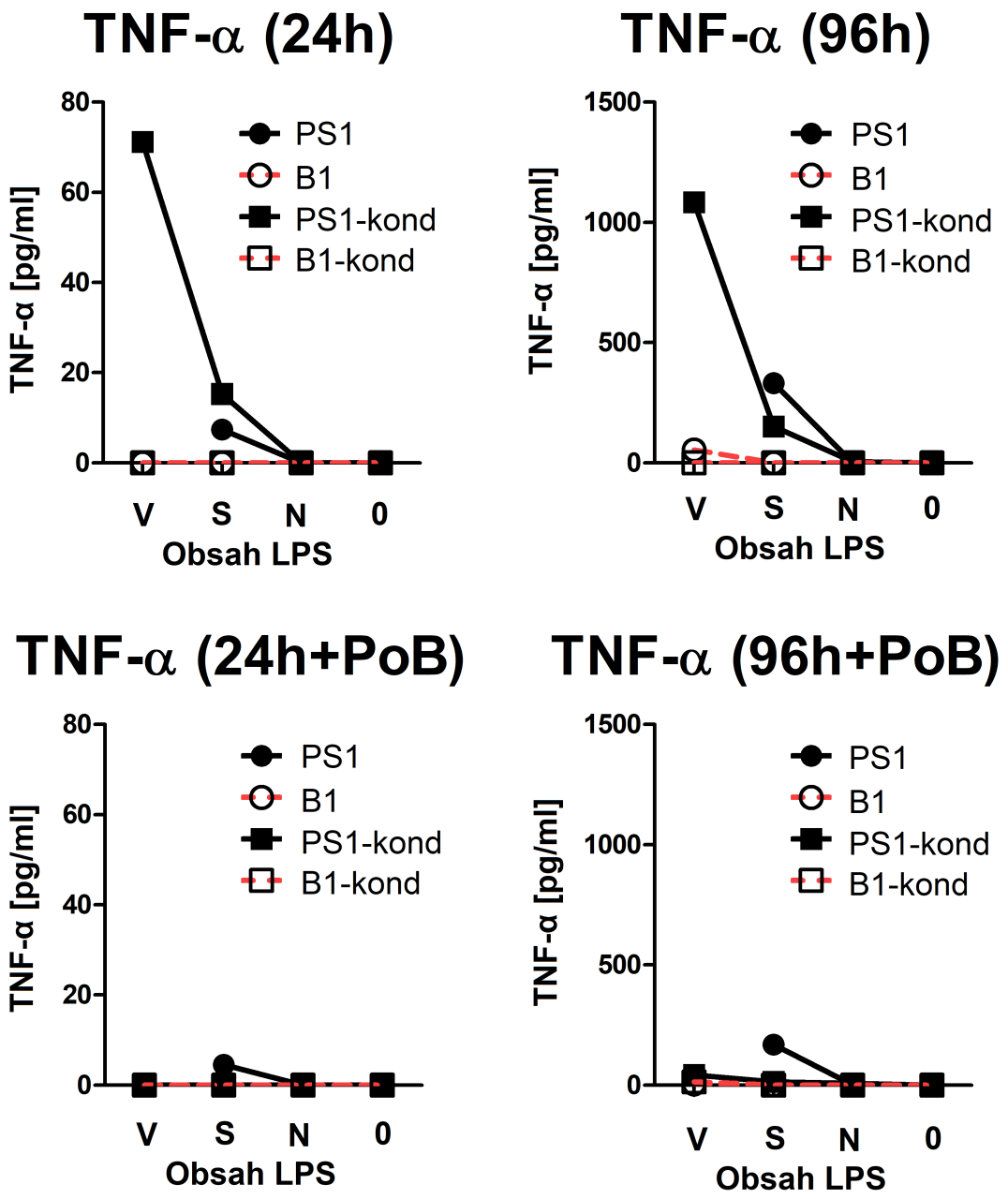
Tabulka 4.3: Výsledky analýzy XRD vzorků B1, B2 a B3

Obsah [hm%]			
Fáze	B1	B2	B3
Amorfní	6,5	10,0	6,0
HA	77,7	64,4	71,3
TTCP	14,5	16,7	6,6
TCPα	2,9	3,6	6,3
TCPβ	-	2,4	3,2
CaO	4,9	4,8	5,0
Ag	-	8,1	7,6

4.4 Biologický potenciál

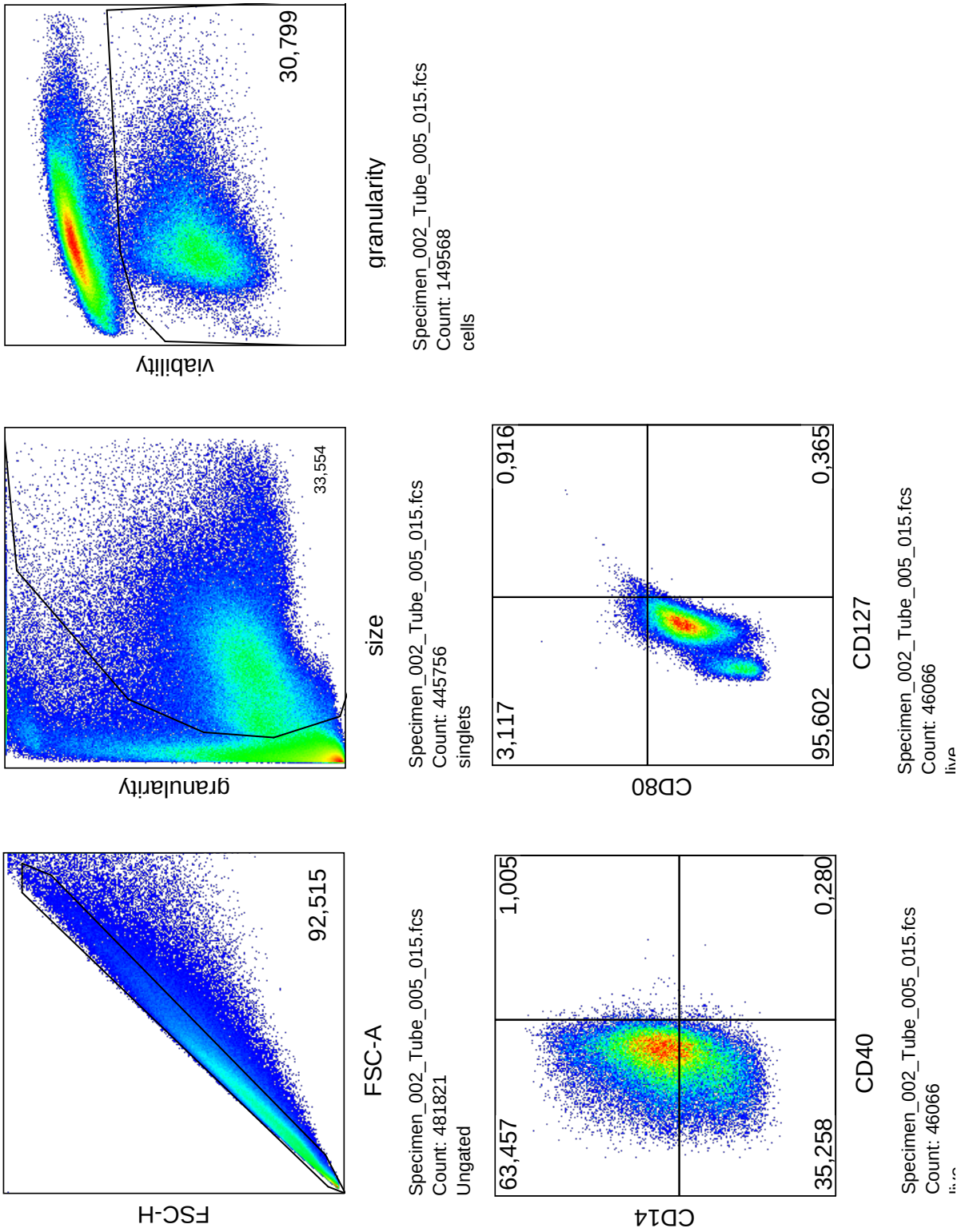
Výsledky testování ELISA na přítomnost protizánětlivých cytokinů TNF-α, IL-6, IL-1β byly abnormální pouze v případě cytokinu TNF-α. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny na obr. 4.10. TNF-α se produkuje rychle po infekci. Vysoké hodnoty obsahu TNF-α naznačují vznik zánětu nebo kontaminaci vzorku.

Na obr. 4.11 lze vidět výsledek vzorku B1-2 z průtokového cytometru ve formě tzv. dot-plotů. První graf pouze selektuje singlety (buňky procházející samostatně). Další 2 grafy vybírají pouze živé buňky na základě jejich tvaru a velikosti. Poslední 2 grafy zobrazují množství adsorbovaných markerů na povrchu buňky. Markery se adsorbují pouze za určitých podmínek, např. CD40 se adsorbuje tím více, čím více je buňka aktivována.



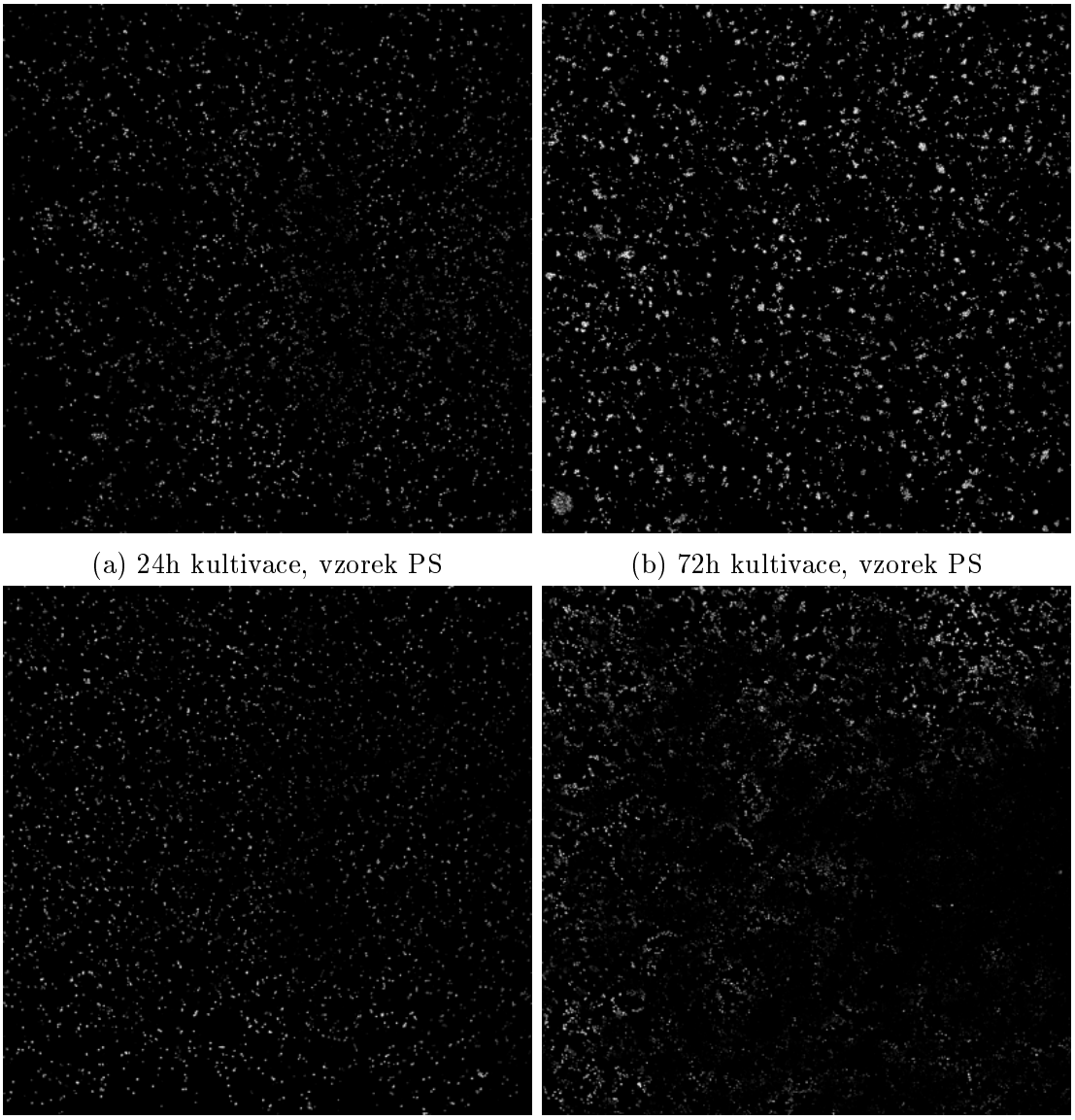
Obrázek 4.10: Výsledky ELISA pro cytokin TNF-α, kond - kondiciované medium, V - vysoký, S - střední, N - nízký

Snímky z konfokálního mikroskopu jsou zobrazeny na obr. 4.12. Každá viditelná částice zobrazuje jedno jádro buňky. Z těchto signálů byla spočítána hustota buněk na vzorku stříkaném z prášku i z roztoku při stejném počtu nasazených buněk. Pro vzorek PS byl výsledek 250 buněk/mm^2 po 24h kultivaci a 420 buněk/mm^2 po 72 h. U vzorku B1 200 buněk/mm^2 a 400 buněk/mm^2.



Obrázek 4.11: Výsledek z průtokového cytometru vzorku B1-2

Na obr. 4.13 jsou zobrazeny 3D snímky z konfokálního mikroskopu. Tyto výsledky přesně souhlasí s hodnocením morfologie nástřiku v kapitole 4.3.1. Buňky kopírují povrch nástřiku, který je pro vzorek PS mírně nerovný (obr. 4.13a), pro vzorek B1 výrazně nerovný (obr. 4.13b) a kultivační sklo dokonale rovinné (obr. 4.13c).



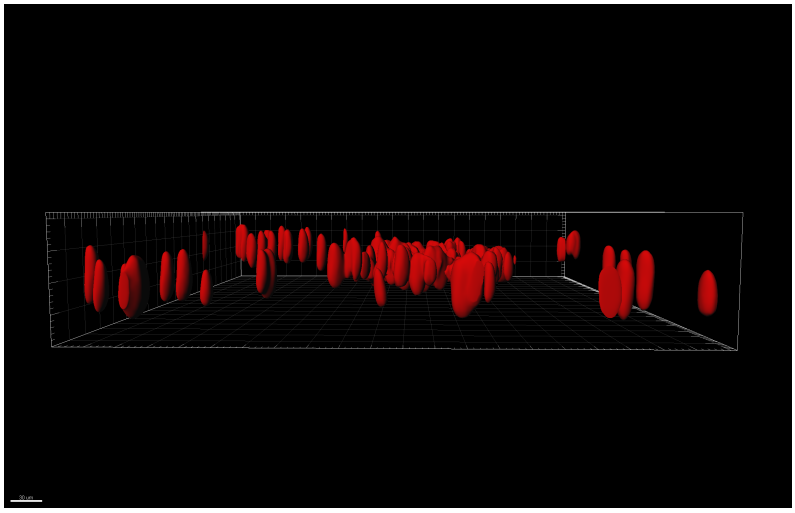
(a) 24h kultivace, vzorek PS

(b) 72h kultivace, vzorek PS

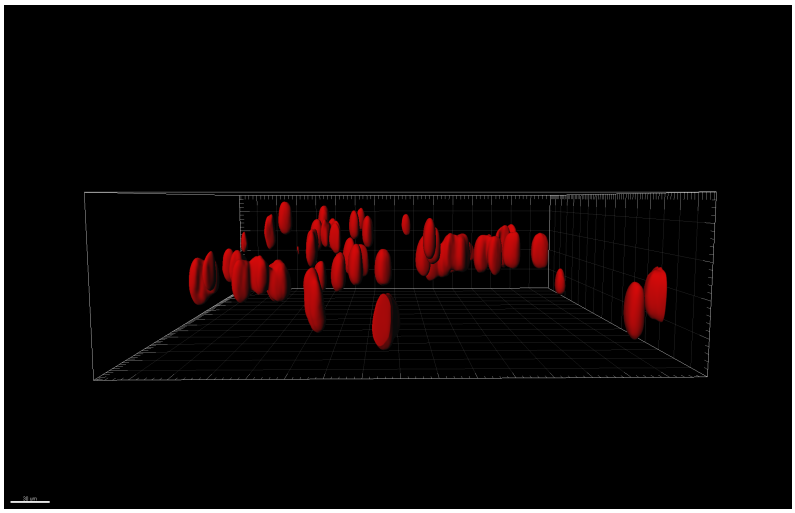
(c) 24h kultivace, vzorek B1

(d) 72h kultivace, vzorek B1

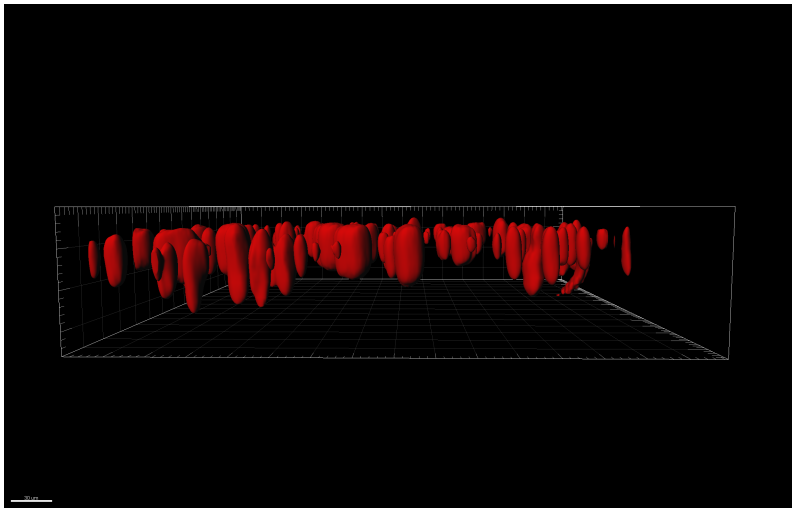
Obrázek 4.12: Snímky jader buněk MG-63 z konfokálního mikroskopu



(a) 72h kultivace, vzorek stříkaný z prášku



(b) 72h kultivace, vzorek stříkaný z roztoku

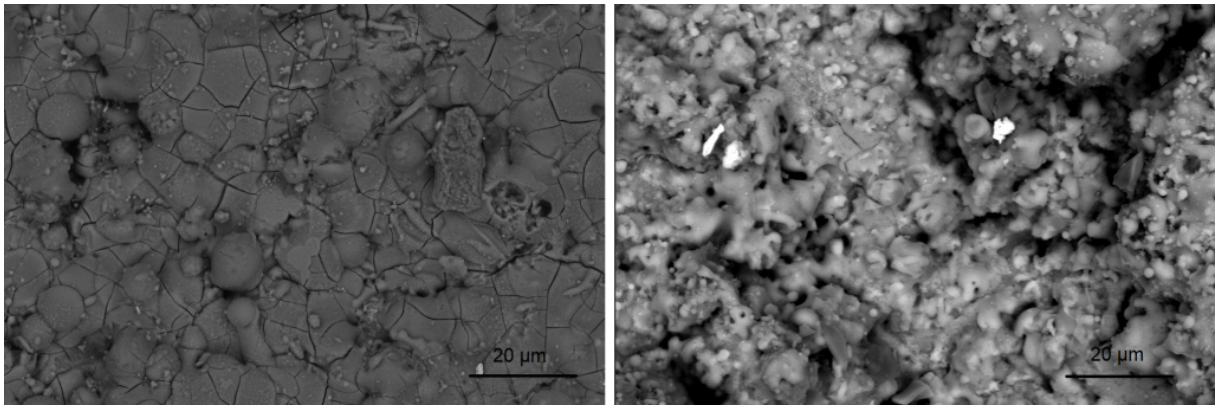


(c) 72h kultivace, kultivační sklo

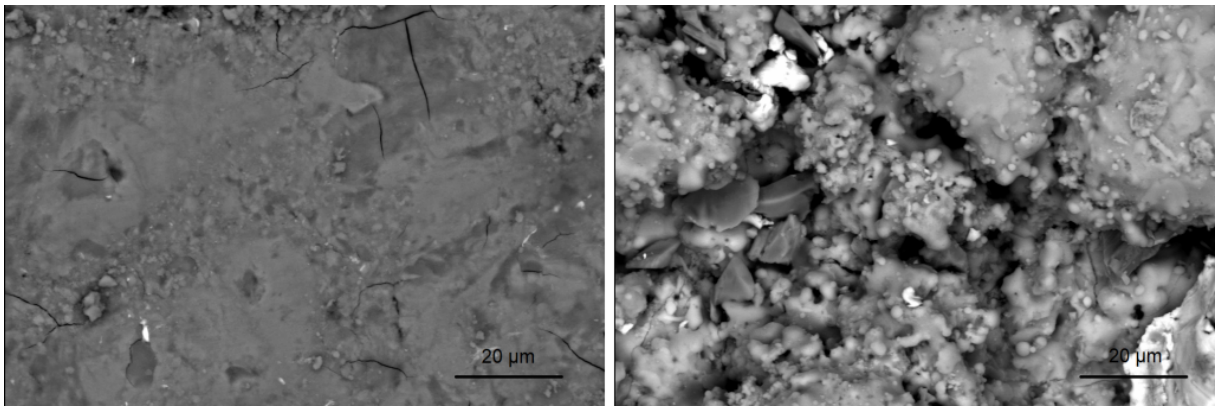
Obrázek 4.13: 3D snímky z konfokálního mikroskopu, orientace vzorku od spodní části - substrát, nástřik, buňky

4.5 Povrch po kultivaci

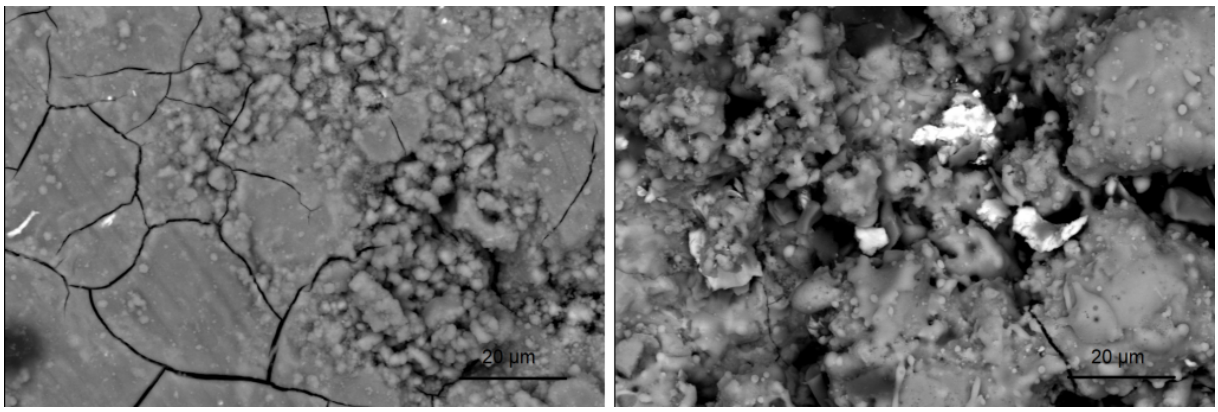
Na obr. 4.14 lze vidět povrchy vzorků před kultivací, po 24h kultivaci a 72h kultivaci. Jelikož u vzorku B1 (vpravo) nedošlo k výraznější změně povrchu nástřiku po působení buněk, je možné říci, že je povlak stabilní. Vzorek PS (vlevo) byl kultivací buněk ovlivněn. Prostředí buněk rozložilo povrchovou vrstvu nástřiku a došlo k ovlivnění jeho morfologie. EDS analýza potvrzuje, že nedošlo k prvkové změně nástřiku.



(a) Před kultivací



(b) 24h kultivace



(c) 72h kultivace

Obrázek 4.14: Zobrazení povrchu nástřiků před a po kultivaci vzorku PS (vlevo) a B1 (vpravo)

5 Diskuze výsledků

Při vysokém ředění výchozího roztoku může docházet k neúplnému odpaření nosné tekutiny (zvláště jedná-li se o vodu), a tím k nedostatečnému natavení částice. Tato částice se i přesto deponuje a je překryta dalšími již natavenými částicemi. V některých případech se zbylá kapalina odpaří ihned po depozici, vytvářejí se uzavřené póry a šíří se mikrotrhliny z ostrých hran částic. Kapalina může být také uzavřena v nástřiku a odpaří se až při dalších přejezdech. Huang et al. [46] tvrdí, že při úniku odpařené kapaliny dochází ke vzniku velkých otevřených pórů, které tvoří výběžky z povrchu nástřiku.

Při porovnání struktury povlaku stříkaného z roztoku (obr. 4.3, 4.4, 4.5) a z prášku (obr. 4.1) lze vidět téměř rovinný povrch práškového vzorku s malými uzavřenými póry. Struktura tohoto typu není pro biologickou aplikaci vhodná, protože relativně velké osteoblasty nemají možnost prorůstání do materiálu a pevného uchycení. Na obr. 4.13 z konfokálního mikroskopu je vidět buňky, které kopírují povrch nástřiku a prorůstají do otevřených pórů.

Při chemické analýze byl zjištěn výskyt částic Al_2O_3 na povrchu substrátu. Jelikož se jedná o inertní keramiku, neměla by jejich přítomnost výrazně zhoršovat biokompatibilitu nástřiku. V případě nezakrytých částic (obr. 4.6b) by mohlo docházet k horší vazbě mezi náhradou a tkání, a tím k uvolňování náhrady. Případně by mohlo dojít i k vydrolení částic Al_2O_3 a k odkrytí povrchu substrátu. Pro další výzkum by měly být použity optimálně zvolené parametry tryskání, aby se tyto částice na substrátu nezachytávaly. Také by měla být dosažena větší tloušťka nástřiku. Při tloušťce povlaku větší než 40 μm by měly být překryty i velké částice.

Částice stříbra se úspěšně podařilo deponovat společně s HA. $AgNO_3$ bylo možné jednoduše rozmíchat v předem připraveném roztoku HA. Dusičnan se v proudu plazmatu vlivem vysoké entalpie rozložil za vzniku částic čistého stříbra nanometrických rozměrů. Tímto způsobem je možné se vyhnout složitým krokům při tvorbě a manipulaci s nanometrickým práškem Ag. Rozložení částic Ag je vidět na obr. 4.7 a 4.8. Je zřejmé, že se Ag deponovalo v každé vrstvě nástřiku. Takto pravidelně rozložené částice nanometrické velikosti by měly mít dobré antibakteriální účinky. Toto tvrzení podporuje i Zhang et al. [48].

Výsledky z analýzy XRF v tabulce 4.2 ukazují prvkové složení nad mezí rozlišitelnosti přístroje. Je jasné, že nástřik nebyl kontaminován žádným cizím prvkem kromě záměrně dopovaného Ag. Fázová analýza metodou XRD zobrazená na obr. 4.9 a v tabulce 4.3 dokazuje, že Ag obsažené v nástřiku není vázáno ve sloučenině, ale vyskytuje se jako čistý prvek. Kromě HA se v povlaku vyskytují i méně stabilní kalcium fosfáty TTCP a TCP a nežádoucí oxid vápenatý CaO. Zvýšený obsah těchto fází při využití LPPS referují ve svých pracích i Candidato et al. [12] nebo Aruna et al. [49]. Snížení obsahu nežádoucích fází bude náplní další optimalizace nástřikových parametrů.

Z obr. 4.10 vyplývá, že vzorky PS zřejmě nebyly dostatečně sterilizovány. Napovídá tomu výrazný pokles obsahu TNF-α po přidání PoB. PoB blokuje pouze signalizaci LPS, takže produkce TNF-α v přítomnosti PoB naznačuje buď kontaminaci jiným stimulantem nebo vznik zánětu. Které tvrzení je pravdivé lze určit pouze statisticky při velkém množství vzorků. Povlaky B1 nevykazují výraznou tvorbu TNF-α ani bez přítomnosti PoB. Z toho lze vyvodit, že vzorky byly dostatečně sterilní a nemají sklon k tvorbě zánětů. Výsledky průtokové cytometrie potvrzují předešlé výsledky analýzy ELISA.

Na snímcích z konfokálního mikroskopu na obr. 4.12 jsou zobrazena jádra buněk. Z rostoucí hustoty jader lze předpokládat, že na obou površích byly buňky MG-63 schopny se dělit a zvyšovat svůj počet. U vzorků stříkaných z roztoků není měření hustoty buněk touto metodou vhodné, protože u nerovného povrchu (obr. 4.13b) mohou být některé buňky umístěny nad nebo pod konfokální rovinou a tudíž se nezobrazí. Na obr. 4.12b je vidět, že buňky vytvářejí klastry. Z toho lze vyvodit, že se buňky shlukují a odmítají sdílet svůj povrch s povrchem nástřiku PS.

REM analýza povrchu nástřiku před a po kultivaci je zobrazená na obr. 4.14. Ani po 72h kultivaci buněk MG-63 není zřetelná výrazná změna povrchu nástřiku B1. Lze tedy konstatovat, že povlak vytvořený z kapalného prekurzoru je stabilní a nedochází k jeho ovlivnění při působení buněk a jejich prostředí.

6 Závěr

Cílem práce byla výroba vodných roztoků hydroxyapatitu metodou mokré syntézy, vytvoření nástřiků pomocí hybridního vodou–stabilizovaného plazmového hořáku a jejich následná charakterizace z pohledu morfologie, fázového a prvkového složení. Dále byl proveden pokus o vytvoření povlaku hydroxyapatitu dopovaného částicemi stříbra přimícháním dusičnanu stříbrného do výchozího roztoku. Nad rámec původního zadání práce byly vzorky podrobeny inicializačnímu testování biokompatibility. Z těchto experimentů byly vyvozeny následující závěry:

- Metodou chemické precipitace lze jednoduše vytvořit vodný roztok hydroxyapatitu se 100% čistotou, který lze přímo dávkovat do proudu plazmatu.
- Povrch nástřiku z roztoku je oproti běžným práškovým nástřikům výrazně strukturovaný. Vytváří se velké otevřené póry, které jsou vhodné pro biologické aplikace.
- Při depozici dochází vlivem vysoké entalpie plazmy k rozkladu části hydroxyapatitu na méně stabilní kalcium fosfáty a nežádoucí CaO. Snížení obsahu CaO bude předmětem další optimalizace nástřikových parametrů.
- $AgNO_3$ se v proudu plazmatu rozkládá a vznikají částice čistého stříbra nanometrických rozměrů. Tyto částice by měly mít antibakteriální účinky a tím podporovat biokompatibilitu samotného hydroxyapatitu.
- Nástřiky vytvořené z roztoku nemají sklon k tvorbě zánětů a budou v biologickém systému velmi dobře tolerovány. Strukturovaný povrch vytváří vhodné prostředí pro prorůstání osteoblastů a vytvoření pevné vazby.
- Povlaky zůstávají stabilní i po působení buněk při dlouhodobé kultivaci.

Tento postup tvorby povlaků hydroxyapatitu již v počátečním stádiu vykazuje dobré výsledky. Po následující pokročilé optimalizaci nástřikových parametrů, je pravděpodobné, že nahradí stávající metody depozice povrchových bioaktivních vrstev na kosterních a kloubních náhradách.

Literatura

[1] DAVIS, J.R. *Handbook of Thermal Spray Technology*. ASM International, 2004. ISBN 978-0-87170-795-6.

[2] PAWŁOWSKI, L. *The science and engineering of thermal spray coatings*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2008. ISBN 978-0-471-49049-4.

[3] TUCKER, R.C. *ASM handbook*. Materials Park: ASM International, c2013. ISBN 978-1-61503-996-8.

[4] PAPYRIN, A.N. *Cold spray technology*. London: Elsevier, 2007. ISBN 00-804-5155-1.

[5] HRABOVSKÝ, M. Thermal Plasma Generators with Water Stabilized Arc. *The Open Plasma Physics Journal* [online]. 2009, 99–104 [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: http://www.projectsoft.sk/file/clanek-thermalPlasma.pdf

[6] Plasma Spraying. In: *AM Philpot (Hard Chrome) Ltd* [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: http://www.amphardchrome.co.uk/plasma-spraying.php

[7] KAVKA, T., J. MATĚJÍČEK, P. CTIBOR et al. Plasma Spraying of Copper by Hybrid Water-Gas DC Arc Plasma Torch. *Journal of Thermal Spray Technology* [online]. 2011, **20**(4), 760–774 [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1007/s11666-011-9633-1. ISSN 1059-9630. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11666-011-9633-1

[8] CTIBOR, P., M. KAŠPAROVÁ, J. BELLIN et al. Plasma Spraying and Characterization of Tungsten Carbide-Cobalt Coatings by the Water-Stabilized System WSP. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2009, **2009**, 1–11 [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1155/2009/254848. ISSN 1687-8434. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/amse/2009/254848/

[9] MUSALEK, R., J. MEDRICKY, T. TESAR, et al. Suspensions Plasma Spraying of Ceramics with Hybrid Water-Stabilized Plasma Technology. *Journal of Thermal Spray Technology* [online]. 2017, **26**(1-2), 37–46 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1007/s11666-016-0493-6. ISSN 1059-9630. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11666-016-0493-6

[10] JENIŠTA, J., H. TAKANA, H. NISHIYAMA et al. Integrated parametric study of a hybrid-stabilized argon–water arc under subsonic, transonic and supersonic plasma flow regimes. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2011, **44**(43), 435204 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1088/0022-3727/44/43/435204. ISSN 0022-3727. Dostupné z: http://stacks.iop.org/0022-3727/44/i=43/a=435204?key=crossref.b18fa5b1b319cee44d9d0c148af0df34

[11] FAUCHAIS, P., M. VARDELLE, S. GOUTIER, et al. Key Challenges and Opportunities in Suspension and Solution Plasma Spraying. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online]. 2015, **35**(3), 511–525 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1007/s11090-014-9594-5. ISSN 0272-4324. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11090-014-9594-5

[12] CANDIDATO, R.T., P. SOKOŁOWSKI, L. PAWŁOWSKI, et al. Preliminary study of hydroxyapatite coatings synthesis using solution precursor plasma spraying. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2015, **277**, 242–250 [cit. 2018-02-22]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2015.07.046. ISSN 02578972. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897215301559

[13] TOMA, F.L., A. POTTHOFF, L. BERGER, et al. Demands, Potentials, and Economic Aspects of Thermal Spraying with Suspensions: A Critical Review. *Journal of Thermal Spray Technology* [online]. 2015, **24**(7), 1143–1152 [cit. 2018-02-22]. DOI: 10.1007/s11666-015-0274-7. ISSN 1059-9630. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11666-015-0274-7

[14] WILLIAMS, D.F. *The Williams dictionary of biomaterials.* Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

[15] ČÍŽEK, J. *Thermally sprayed bio-ceramic coatings: a study on process parameters influence on coating properties.* Nanyang Technological University, 2010. Disertační práce. School of Mechanical and Aerospace Engineering.

[16] JOSKA, L. *Kovové biomateriály I.* [online]. VŠCHT, 2015 [cit. 2018-02-22]. Dostupné z: https://ipl.vscht.cz/files/uzel/0024309/2015%20Kovove%20biomaterialy%20A.pdf. Prezentace.

[17] PARK, J.B., R.S. LAKES. *Biomaterials: an introduction.* 3rd ed. New York: Springer, c2007.

[18] HENCH, L. L. *An Introduction to bioceramics.* Second edition. London: Imperial College Press, 2013. ISBN 9781908977151.

[19] BALGOVÁ, Z. *Syntéza a vlastnosti biokompozitních materiálů s potenciálním využitím v medicíně.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 84 s. Vedoucí dizertační práce prof. Dr. Ing. Martin Palou.

[20] GEETHA, M., A.K. SINGH, R. ASOKAMANI et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science* [online]. 2009, **54**(3), 397–425 [cit. 2018-02-022]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2008.06.004. ISSN 00796425. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642508001126

[21] RATNER, B.D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.

[22] JOSKA, L. *Kovové biomateriály II.* [online]. VŠCHT, 2015 [cit. 2018-02-22]. Dostupné z: https://ipl.vscht.cz/files/uzel/0024309/2015%20Kovove%20biomaterialy%20A.pdf?redirected. Prezentace.

[23] LEVINGSTONE, T.J. *Optimisation of Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings.* Dublin City University, 2008. Disertační práce. Dublin City University.

[24] PRAKASAM, M., J. LOCS, K. SALMA-ANCANE et al. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2015, **6**(4), 1099–1140 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.3390/jfb6041099. ISSN 2079-4983. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2079-4983/6/4/1099

[25] HENESS, G., B. BEN-NISSAN. Innovative Bioceramics. *MATERIALS FORUM* [online]. 2004, (27), 104–114 [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: https://opus.lib.uts.edu.au/bitstream/10453/5698/1/2004001146.pdf

[26] WANG, L., G.H. NANCOLLAS. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(11), 4628–4669 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1021/cr0782574. ISSN 0009-2665. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr0782574

[27] KURODA, K., M. OKIDO. Hydroxyapatite Coating of Titanium Implants Using Hydroprocessing and Evaluation of Their Osteoconductivity. *Bioinorganic Chemistry and Applications* [online]. 2012, 1–7 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1155/2012/730693. ISSN 1565-3633. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/bca/2012/730693/

[28] SHAVANDI, A., A.E.A. BEKHIT, Z.F. SUN, A. ALI. A Review of Synthesis Methods, Properties and Use of Hydroxyapatite as a Substitute of Bone. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering* [online]. 2015, **25**, 98–117 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.4028/www.scientific.net/JBBBE.25.98. ISSN 2296-9845. Dostupné z: http://www.scientific.net/JBBBE.25.98

[29] REYES-GASGA, J., E.L. MARTÍNEZ-PIÑEIRO, É.F. BRÈS. Crystallographic structure of human tooth enamel by electron microscopy and x-ray diffraction: hexagonal or monoclinic? *Journal of Microscopy* [online]. 2012, **248**(1), 102–109 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2012.03653.x. ISSN 00222720. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2012.03653.x

[30] NIINOMI, M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2016, **4**(5), 445–454 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1016/j.stam.2003.09.002. ISSN 1468-6996. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.stam.2003.09.002

[31] DONACHIE, M.J. *Titanium: a technical guide.* 2nd ed. Materials Park: ASM International, 2004. ISBN 08-717-0686-5.

[32] EISENBARTH, E., D. VELTEN, M. MÜLLER et al. Biocompatibility of β-stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(26), 5705–5713 [cit. 2018-02-27]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.021. ISSN 01429612. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204000663

[33] Introduction to Biological Safety Cabinets. *The Baker Company* [online]. 2018 [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: https://www.bakerco.com/introduction-biological-safety-cabinets

[34] PADDOCK, S.W. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Molecular Biotechnology* [online]. 2000, **16**(2), 127–150 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1385/MB:16:2:127. ISSN 1073-6085. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1385/MB:16:2:127

[35] PAWLEY, J.B. *Handbook of biological confocal microscopy.* 3rd ed. New York, NY: Springer, c2006. ISBN 0-387-25921-x.

[36] BÁLKOVÁ, R. Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM). *CHEMPOINT* [online]. Brno: Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, 2018, 31. 10. 2011 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm

[37] SEDLÁŘOVÁ, M. KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE. *Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého* [online]. 2018, 2010 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: http://www.botanika.upol.cz/atlasy/confmicro/index.php

[38] *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide* [online]. Boston, 2002 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD--Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf. Review. Boston University Flow Cytometry Core Facility.

[39] AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4–15 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. ISSN 01969781. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019697811500131X

[40] RAW 264.7 (ATCC TIB-71). *ATCC* [online]. 2017 [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo_country=cz# generalinformation

[41] KVERKA, M., J.M. HARTLEY, T. CHU et al. Immunogenicity of coiled-coil based drug-free macromolecular therapeutics. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(22), 5886–5896 [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.063. ISSN 01429612. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214003238

[42] MG-63 (ATCC CRL-1427). *ATCC* [online]. 2017 [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1427.aspx?geo_country=cz

[43] DETSCH, R., O. GUILLON, L. WONDRACZEK et al. Initial Attatchment of rMSC and MG-63 Cells on Patterned Bioglass Substrates. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2012, **14**(3), B38−B44 [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1002/adem.201180068. ISSN 14381656. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/adem.201180068

[44] SADAT-SHOJAI, M., M. KHORASANI, E. DINPANAH-KHOSHDARGI et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(8), 7591–7621 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.012. ISSN 17427061. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113001840

[45] FIHRI, A.Z., Ch. LEN, R.S. VARMA et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2017, **347**, 48–76 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.06.009. ISSN 00108545. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854517301601

[46] HUANG, Y., L. SONG, X. LIU et al. Hydroxyapatite coatings deposited by liquid precursor plasma spraying: controlled dense and porous microstructures and osteoblastic cell responses. *Biofabrication* [online]. 2010, **2**(4), 045003 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1088/1758-5082/2/4/045003. ISSN 1758-5082. Dostupné z: http://stacks.iop.org/1758-5090/2/i=4/a=045003?key=crossref.8de7ff37e4838003df59f49603c35ca0

[47] KUMARI, R., J.D. MAJUMDAR. Microstructure and surface mechanical properties of plasma spray deposited and post spray heat treated hydroxyapatite (HA) based composite coating on titanium alloy (Ti-6Al-4V) substrate. *Materials Characterization* [online]. 2017, **131**, 12–20 [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1016/j.matchar.2017.06.011. ISSN 10445803. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044580317306721

[48] ZHANG, X., W. CHAIMAYO, Ch. YANG et al. Silver-hydroxyapatite composite coatings with enhanced antimicrobial activities through heat treatment. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2017, **325**, 39–45 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2017.06.013. ISSN 02578972. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897217306163

[49] ARUNA, S.T., S. KULKARNI, M. CHAKRABORTY et al. A comparative study on the synthesis and properties of suspension and solution precursor plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Ceramics International* [online]. 2017, **43**(13), 9715–9722 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.ceramint.2017.04.146. ISSN 02728842. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884217307496

Seznam použitých zkratek a symbolů

CP	komerčně čistý
FA	fluorapatit
HA	hydroxyapatit
PE	polyethylen
SE	sekundární elektron - mód zobrazení v REM
BCC	kubická prostorově středěná mřížka
BSE	zpětně odražený elektron
CMP	kalcium metafosfát
CPP	kalcium pyrofosfát
DCP	dikalcium fosfát
EDS	energiově disperzní spektroskopie
FCS	přímý rozptyl fotonů v průtokové cytometrii
FBS	Fetal Bovine Serum
HCP	hexagonální těsně uspořádaná mřížka
LPS	lipopolysacharid
OCP	oktakalcium fosfát
PGA	polyglycolid
PLA	polylactid
PVA	polyvinylalkohol
REM	rastrovací elektronová mikroskopie
SPS	plazmatický nástřik ze suspenze (Suspension plasma spraying)
SSC	boční rozptyl fotonů v průtokové cytometrii
TCP	trikalcium fosfát
XRD	rentgenová difrakční analýza
XRF	rentgenová fluorescenční spektroskopie
WSP	vodou–stabilizovaný plazmatický nástřik
DCPD	dikalcium fosfát dihydrát
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E-MEM	Eagle's Minimum Essential Medium

LPPS	plazmatický nástřik s tekutým prekurzorem (Liquid precursor plasma spraying)
MCPM	monokalcium fosfát monohydrát
PMMA	polymethylmethakrylát
SPPS	plazmatický nástřik z roztoku (Solution precursor plasma spraying)
TTCP	tetrakalcium fosfát
TDHP	tetrakalcium dihydrogem fosfát
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight polyethylene (vysokohmotnostní polyethylen)

Seznam obrázků

2.1 Průběh termálního nástřiku a depozice částic 14
2.2 Schémata hořáků pro plazmatický nástřik 18
2.3 Operační režimy plazmových hořáků 19
2.4 Schéma hybridního vodou–stabilizovaného plazmového hořáku 20
2.5 Aplikace biomateriálů 21
2.6 Diagram rozpustnosti pro kalcium fosfáty při teplotě 37°C 25
2.7 Možné struktury hydroxyapatitu 28
2.8 Rozdělení titanových slitin podle obsahu přísadových prvků 29
2.9 Schéma laminárního boxu 30
2.10 Schéma konfokálního mikroskopu 31
2.11 Hydrodynamická fokusace proudu suspenze 32
2.12 Interakce světla s částicí v průtokovém cytometru 33
2.13 Mikroskopický snímek buněk RAW 264.7 34
2.14 Mikroskopický snímek buněk MG-63 34
3.1 Fázová analýza XRD vysušeného roztoku HA 36
3.2 WSP®-H 500, Ústav fyziky plazmatu AV ČR, v. v. i. 38
3.3 Otočný karusel s uchycenými vzorky 38
3.4 Kultivační destička 96 jamek 41
4.1 Průřez strukturou vzorku PS, zobrazení v BSE 43
4.2 Průřez strukturou vzorků prvotních nástřiků 44
4.3 Průřez strukturou vzorku B1, zobrazení v BSE 44
4.4 Průřez strukturou vzorku B2, zobrazení v BSE 45
4.5 Průřez strukturou vzorku B3, zobrazení v BSE 45
4.6 Částice α-Al_2O_3 přichycené v substrátu po tryskání 46
4.7 Prvková mapa EDS vzorku B2 46
4.8 Prvková mapa EDS vzorku B3 47
4.9 Difraktogramy nástřiků B1, B2 a B3 48
4.10 Výsledky ELISA pro cytokin TNF-α 49
4.11 Výsledek z průtokového cytometru vzorku B1-2 50
4.12 Snímky jader buněk MG-63 z konfokálního mikroskopu 51
4.13 3D snímky z konfokálního mikroskopu 52
4.14 Zobrazení povrchu nástřiků před a po kultivaci vzorku PS a B1 53

Seznam tabulek

2.1 Hlavní charakteristiky základních povlakovacích metod 16
2.2 Používané kovové biomateriály v medicíně 23
2.3 Používané keramické biomateriály 24
2.4 Kalcium fosfáty 26
2.5 Základní vlastnosti hydroxyapatitu 27
3.1 Použité nástřikové parametry 37
3.2 Seznam použitých reagencií 40
4.1 Výsledky analýzy XRD vzorků A1 a A2 43
4.2 Výsledky analýzy XRF vzorků B1, B2 a B3 47
4.3 Výsledky analýzy XRD vzorků B1, B2 a B3 48