

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta strojního inženýrství
Ústav materiálových věd a inženýrství

Ing. Aleš Matoušek

**KOMPOZITNÍ STOMATOLOGICKÉ BIOMATERIÁLY -
STRUKTURA, ANALÝZA, VLASTNOSTI**

DENTAL COMPOSITE BIO-MATERIALS - STRUCTURE,
ANALYSIS, PROPERTIES

ZKRÁCENÁ VERZE PH.D. THESIS

Obor:	Fyzikální a materiálové inženýrství
Školitel:	Prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc.
Školitel specialista:	Prof. Ing. Martin Trunec, Dr.
Oponenti:	Prof. MUDr. Jiří Vaněk, CSc. Prof. Ing. Lubomír Lapčík CSc. Prof. Ing. Jaroslav Fiala, CSc.

Datum obhajoby: xx. xx. 2012

KLÍČOVÁ SLOVA: stomatologické materiály, nanostrukturní biopovlaky, ZrO_2 , Al_2O_3 , HA, SiO_2 , velikost zrn, povrchová drsnost, bioaktivita, biokompatibilita, buněčná dilatace, HeLa, L929, MG63, buněčná selekce, světelná mikroskopie, AFM, SEM

KEYWORDS: dental materials, nanostructured bio-coatings, ZrO_2 , Al_2O_3 , HA, SiO_2 , grain size, surface roughness, bioactivity, biocompatibility, cell dilatation, HeLa, L929, MG63, cell selection, light microscopy, AFM, SEM

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE:

Oddělení vědy a výzkumu, VUT FSI Brno

©Aleš Matoušek, 2012

ISBN

ISSN

OBSAH

1. Úvod	1
2. Současný stav řešené problematiky	2
3. Cíl práce	4
4. Experimentální část	5
4.1 Materiály	5
4.1.1 Objemové keramiky a kompozity	5
4.1.2 Povlakované materiály	5
4.1.3 Buněčné linie použité pro in vitro testy	5
4.2 Postupy	7
4.2.1 Příprava objemových keramik a kompozitů	7
4.2.2 Příprava keramických povlaků	7
4.2.3 Analytické metody k určení mechanických vlastností	8
4.2.4 Biologické dilatační testy in-vitro cytotoxicity	9
5. Výsledky a diskuze	11
5.1 Objemové keramiky a kompozity	11
5.1.1 Příprava a charakterizace objemových keramik a kompozitů	11
5.1.2 Matematický model kinetiky dilatace buněk v přítomnosti keramických materiálů	15
5.1.3 Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik a kompozitů ve výluhu	16
5.1.4 Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik v přímém kontaktu	18
5.2 Keramické povlaky	21
5.2.1. Hodnocení povrchových vlastností keramických substrátů a povlaků	22
5.2.2. Testování soudržnosti povlaku a substrátu indentační zkouškou ..	22
5.2.3. Biologické dilatační in-vitro testy keramických povlaků ve výluhu	22
6. Závěr	24
7. Literatura	26
8. Curriculum VITAE	30
9. ABSTRACT	31

1. ÚVOD

Jako biokeramické materiály jsou označovány přírodní anebo umělé materiály určené především pro náhradu tvrdých tkání (kosti, zuby,...). Aby tuto funkci mohly plnit, musí být biokompatibilní s živou tkání, netoxické a nesmí vyvolávat negativní nebo jen minimální odezvu v hostitelském těle. Biokeramiky je možné rozdělit na [1]: Bioinertní keramiky (Al_2O_3 , ZrO_2 a TiO_2) [2], které nereagují s okolními tkáněmi [3, 4] a u níž nevzniká chemická vazba mezi implantátem a kostní tkání. Kostní buňky osídlují povrch a v případě porézní keramiky vniká nově vytvořená kost na omezenou vzdálenost do pórů. Bioaktivní keramiky [5] aktivují vznik přímé vazby s obklopujícími tkáněmi (hydroxyapatit - HA) [6]. Můžou být také používány v porézní formě (pórovitost 55 - 70 %), která umožňuje prorůstání kostních tkání do struktury. Aby toto nastalo je zapotřebí dodržet minimální průměr pórů 100 μm (podle některých autorů 200 - 500 μm) pro zajištění krevního zásobování a výživy kostní tkáně [7]. Vstřebatelné keramiky [5] jsou postupně rozloženy tělem a vstřebány $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (TCP) [4].

Kromě monolitických keramických materiálů existují materiály také keramické kompozity. Důvodem pro výrobu keramických kompozitů je zlepšení fyzikálních, mechanických a biologických vlastností implantátů.

Kompozitní biomateriály vznikají kombinací dvou nebo více makroskopicky odlišných biomateriálů. Vrstevnaté kompozity na, kterých je vrstva matrice střídána vrstvou výztuhy [8, 9] (např. keramické kompozity vrstva Al_2O_3 - vrstva ZrO_2). Zvláštní skupinou vrstevnatých kompozitů jsou biokeramické povlaky [6]. Jejich cílem je gradovat mechanické, fyzikální a biologické vlastnosti implantátu (substrátu) až už kovového (např. slitiny Ti-12Mo-6Zr-2Fe, Ti-15Mo-5Zr-3Al,...) [10], či keramického (např. Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 ,...) [11].

Pro testování biokompatibility materiálů se používá řada testů, jsou to mimo jiné také metody přímé a metody výluhové. Při metodě přímé je tkáň přímo vystavena působení materiálu. U metod výluhových je materiál ponořený za specifických podmínek do kapaliny. Ve které je po určitou dobu (např. 24 hodin) při teplotě lidského těla (např. 37°C). Chemický rozbor výluhu může poskytnout cennou informaci o vyluhovatelnosti materiálů. Pro přípravu výluhů jsou využívány hydrofilní tekutiny (např. fyziologický roztok) nebo lipofilní materiály (např. dimetylsulfoxid – DMSO). Také lze použít směsi jako acetaldehyd a voda. [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. Keramické materiály dostávají dnes do popředí zájmu lékařů implantologů, pro svou zanedbatelnou toxicitu a vysokou otěruvzdornost a nahrazují stále víc dnes používané kovové materiály.

Téma disertační práce s názvem „Kompozitní stomatologické biomateriály - struktura, analýza, vlastnosti“ je zaměřeno na získání nových a prohloubení dosud publikovaných informací především o vlivu velikosti zrn, drsnosti povrchu a chemického složení oxidových keramik na jejich bioaktivitu.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Teoretickým základem mé práce je výzkum Thomase J. Webstera, jehož první článek týkající se adheze osteoblastů na nanostrukturní keramice pochází z roku 1999 [20]. Keramické substráty použité v této práci byly tři. Prvním substrátem bylo borosilikátové sklo (referenční vzorek), druhým substrátem byl slinutý disk $\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$ a třetím substrátem byl TiO_2 . Po slinutí byly velikosti zrn keramik menší než 100 nm. Jako testovací buněčná osteoblastická linie byla použita primokultura získaná z neonatální krysí lebky. Hodnotila se buněčná adheze v časech 0,5; 1; 2; 4 hodiny, dělení osteoblastů, velikost kolonie osteoblastů, syntéza alkalické fosfatázy, obsah vápníku v mimobuněčné matrici. Dle výsledků uvedených v této práci se u nanozrné keramiky zlepšily všechny výsledky biologických testů.

Další jeho publikace z roku 2000 [21], má název „Specifické proteiny zprostředkující zvýšenou adhezi osteoblastů na nanofázové keramice“. Testované materiály (Al_2O_3 a TiO_2), velikost vzorků a velikosti slinutých zrn byly stejné jako u předchozího článku. Novým materiálem zařazeným do testu byl nanočásticový hydroxyapatit (HA). Byla použita testovací buněčná kultura krysí fibroblastoidní linie CRL-1231 a osteoblastoidní linie získaná z neonatální krysí lebky. Při biologických testech buněčné adheze se projevil příznivý vliv nanozrných Al_2O_3 , TiO_2 a HA keramik na osteoblastickou buněčnou linii. U fibroblastoidní linie a endoteliálních buněk příznivý vliv zaznamenán nebyl. Koncentrace sledovaných proteinů, albuminu, denaturovaného kolagenu, fibronectinu, vitrovectinu se u nanozrného Al_2O_3 zvýšila. Pouze koncentrace proteinu laminin byla vyšší u mikrostrukturní keramiky. Porovnání koncentrací proteinů u mikrostrukturního a nanostrukturního hydroxyapatitu dalo obdobné výsledky jako v případě oxidové keramiky Al_2O_3 . Mikrostrukturní HA dosahoval vyšší koncentrace pouze u albuminu a lamininu.

Práce publikovaná roku 2000 má název „Rozšířené funkce osteoblastů na nanofázové keramice“. [22]. Cílem této práce bylo studium bioaktivity osteoblastické primokultury, která byla získána z neonatální krysí lebky. Testovací vzorky materiálů Al_2O_3 , TiO_2 a HA byly totožné s předchozími pracemi tohoto autora. Hodnotilo se zde dělení osteoblastů a bylo dosaženo lepších výsledků u nanokeramik oproti konvenčním keramikám. Dále se zjišťovala plocha dilatovaných buněk. V dilatačním testu buněk lepších výsledků dosáhly mikrostrukturní materiály. V testu alkalické fosfatázy byly osteoblasty kultivovány 7 dní a jako kontrola sloužila 14 denní kultivace na borosilikátovém skle. Nejvyšších hodnot alkalické fosfatázy bylo dosaženo u nanokrystalických materiálů. Dále byl na testovaných materiálech proveden test depozice vápníku (Ca). Kultivace trvala 14 dní a depozitované Ca bylo detekováno pouze na nano Al_2O_3 keramice.

Další publikace z roku 2001 [23] má název „Rozšířená funkce osteoklastických buněk na nanofázové keramice“. Použité testovací materiály

jsou totožné jako v předchozích pracích, a to nanočásticové Al_2O_3 a HA. K testování byla použita buněčná primokultura získaná z krysího morku. U biologických testů se hodnotila tzv. TRAP (Tartare Rezistant Acid Phosphatase) aktivita. U mikrokystalických materiálů nebyla TRAP aktivita zjištěna, kdežto u nanofázových materiálů ano. Dále byla srovnávána resorpční aktivita buněk a jako referenční materiál byly použity plátky odumřelé kosti. I při tomto testu bylo dosaženo lepších výsledků u nanostrukturní než u mikrostrukturní keramiky.

Práce z roku 2002 [24] má název „Dělení osteoblastů a chondrocytů za přítomnosti nanočástic Al_2O_3 a TiO_2 “ a zabývá se vlivem nanočástic Al_2O_3 , TiO_2 na osteoblastické buňky CRL - 11372. Tyto nanočástice (Al_2O_3 , TiO_2) mohou vznikat opotřebením při vzájemném kontaktu např. kloubní hlavice a kloubní jamky. K testování byly použity částice Al_2O_3 (23 nm) a TiO_2 (32 nm) na substrátech z borosilikátového skla, které bylo naleptáno na povrchu 1N NaOH po jednu hodinu. Buňky na tomto substrátu byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM mediu) a po 42 hodinách bylo vyměněno kultivační medium a přidány nanočástice v koncentracích 10000, 1000 a 100 μg Al_2O_3 a TiO_2 / ml. Dilatace buněk byla hodnocena po 2 a 6 hodinách. Výsledkem bylo zjištění, že se nepodařilo prokázat negativní vliv nanočástic na dělení buněk.

Výše uvedené informace shrnují dosud publikované informace vlivu velikosti zrn oxidových nanostrukturních keramik na jejich bioaktivitu. Jsou teoretickým základem pro tuto práci, která je zaměřena na získání nových a prohloubení dosud publikovaných poznatků především v oblasti bioaktivity na oxidových nanokeramických materiálech, a to vrstev i objemových materiálů.

Slabinou prací Webstera a spol. je nedostatečně provedená keramografie testovaných keramik tj. nejasně definovaný povrch, morfologie povrchu, povrchová drsnost a velikost slinutých zrn testovaných biokeramik.

Kultivační testy in-vitro (buněčná dilatace a adherence) jsou používány jako počáteční testy biokompatibility materiálů. Nevýhodou je, že každá zkušební metoda in-vitro je použitelná jen pro jeden typ nechtěné reakce. Například test dřev/dentin určuje kompatibilitu materiálu s dřevem a dentinem (místní reakce), nemůže ale vyloučit možnou alergickou reakci organismu. Navíc jednotlivé zkušební metody jen přibližně popisují nebo dokumentují nechtěnou reakci organismu. Podobně kultivační testy buněk jsou schopny zjistit jen vliv materiálu na izolované buňky a tyto výsledky nelze přímo převést na pacienty. Avšak tyto kultivační testy mohou pomoci vysvětlit mechanismy nechtěných reakcí organismu. Proto jsou užívány jako počáteční testy biokompatibility materiálů. Dalším krokem jsou klinické testy, které jsou prováděny na laboratorních zvířatech. Je nutné dosáhnout co nejvyššího počtu podobných reakcí organismu, aby bylo možné tyto výsledky převést na člověka [25].

3. CÍL PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na přípravu a studium biokompatibility /bioaktivity keramických materiálů a povlaků. Jejím hlavním cílem bylo prostudovat a popsat vliv chemického složení a morfologie objemových keramik na bázi Al_2O_3 , ZrO_2 , HA a povrchu povlaků na biologickou aktivitu modelových tkáňových kultur. Hlavní pozornost je zaměřena na interakci tkáňových kultur s mikro- a zejména nanostrukturními keramikami.

Dílčí cíle práce:

- a) příprava objemových keramik s řízenou velikostí zrn (od nano po mikro) z materiálů: Al_2O_3 ; ZrO_2 ; vrstevnatý kompozit $\text{Al}_2\text{O}_3 \times \text{ZrO}_2$
- b) biologické in-vitro testy cytokompatibility připravených objemových keramik, vrstevnatých kompozitů a lepených keramických kompozitů
- c) příprava stabilní suspenze z nanočásticového práškového t- ZrO_2
- d) optimalizace technologie nanášení vodné suspenze ZrO_2 na substráty pomocí ultrazvukovým sprejováním
- e) optimalizace podmínek slinovacího procesu nanočásticového ZrO_2 povlaku v závislosti na použitém substrátu
- f) biologické in-vitro testy cytokompatibility nanostrukturních povlaků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Objemové keramiky a kompozity

Pro testy biologické aktivity byly připraveny keramiky objemové (zahrnující vrstevnaté kompozity) a keramiky s nanostrukturním povlakem. Materiály a jejich specifikace jsou shrnuty v tabulce 4.1.

4.1.2 Povlakované materiály

Materiály, které byly použity pro nanášení povlaků ZrO_2 o rozměrech 6×6 a 10×10 mm:

- Al_2O_3 TM-DAR
 - ZrO_2 TZ-3YB
 - křemičité sklo (15 hm. % Na_2O , 5 hm. % CaO , 80 hm. % SiO_2) (Merci s.r.o. Česká republika), podložní sklíčko pro světelnou mikroskopii
 - křemenné sklo 100 hm. % SiO_2 (STROZA s.r.o., Česká republika)
- Jejich specifikace je uvedena v tabulce 4.1.

Práškový keramický materiál pro výrobu nano povlaků

Byl použit nanočásticový prášek E52 jehož specifikace je uvedena v tabulce 4.1.

4.1.3 Buněčné linie použité pro in vitro testy

K in-vitro biologickým kultivačním testům byly využity tři sbírkové buněčné testovací linie. První buněčná linie byla lidská epiteliální linie *HeLa* (kožní a slizniční buňky), druhá byla myší fibroblastoidní linie [21] *L929* [26] (buňky vazivové tkáně) a třetí byla lidská osteoblastoidní [24, 27] linie *MG63* [21, 22, 23, 24, 27, 28] (kostní buňky).

Tabulka 4.1 Použité keramické prášky pro zhotovení keramických vzorků

Název	Materiál	Výrobce	Velikost částic (metoda)
ZrO ₂ 1,5 mol. % Y ₂ O ₃	ZrO ₂ dopované 1,5 mol. % Y ₂ O ₃	FSI VUT - OkaP - UMVI	7,53nm (BET analýza)
E52	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	FSI VUT - OkaP - UMVI	8,49nm (BET analýza)
TZ-3YB	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)
TZ-8YSB	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Tosoh (Japonsko)	140 nm (neuvedeno)
HWY 5.5SD	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Guang Dong Huawang Zirconium Materials Co. Ltd.	0,5 ± 0,2 μm (BET analýza)
HWY-N-13,5	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Guang Dong Huawang Zirconium Materials Co. Ltd.	8,49nm (BET analýza)
TM-DAR	Al ₂ O ₃	Taimicron (Japonsko)	0,2 ± 0,1 μm (BET analýza)
DS - 90N	Al ₂ O ₃	Taimicron (Japonsko)	0,2 ± 0,05 μm (BET analýza)
MARTOXID KMS 99	Al ₂ O ₃	Martinswerk GmbH (Německo)	velikost granulí 150μm
Hydroxyapatit 21 223	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	FLUKA, SIGMA-ALDRICH (USA)	velikost aglomerátů 11,48 μm (neuvedeno)
Reynolds	Al ₂ O ₃	Reynolds, Malakof Ind.,(USA)	0,55 μm (neuvedeno)
TZ-Y3S-E	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)
Taimicron	Al ₂ O ₃	Taimicron (Japonsko)	0,20 μm (neuvedeno)
TZ-Y3S-E	ZrO ₂ dopované 3 mol. % Y ₂ O ₃	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)

Pozn.:



Microlaminate Oxyde Composite Ceramic - MLOCCv1

Microlaminate Oxyde Composite Ceramic - MLOCCv2

4.2 Postupy

4.2.1 Příprava objemových keramik a kompozitů

Lisování objemových keramik

Zkušební objemové keramiky viz. tabulka 4.1 byly lisovány na uniaxiálním lisu a na biaxiálním lisu CJC 50 (RTS s.r.o., Česká republika).

Elektroforetický proces

Byly zhotoveny vrstevnaté keramické kompozity MLOCCv1, MLOCCv2 a objemová keramika ZrO_2 s 3 mol. % Y_2O_3 - E52 [29].

Slinování tepelné leptání a tepelné leptání objemových keramik

Parametry slinování a tepelného leptání objemových keramik jsou uvedeny v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2 Slinovací cykly objemových keramik

Keramika	Slinovací teplota [°C]	Čas na slinovací teplotě [hod]	Teplota tepelného leptání [°C]	Čas výdrže na teplotě leptání [min]
ZrO_2 1,5 mol % Y_2O_3	1100	4	1100	5
E52	1500	2	1300	
TZ-3YB	1400, 1600	2, 10	1300	
TZ-8YSB	1600	10	1300	
HWY 5,5SD	1600	10	1300	
HWY-N-13,5	1600, 1400-1290	10, 15	1300	
TM-DAR	1350, 1500	1, 10	1300	
DS-90N	1350	1	1300	
MARTOXID KMS 99	1550	2, 10	1300 1450	
HA	1150	2	1100	
MLOCCv1	1500	2	1300	
MLOCCv2	1500	2	1300	

4.2.2 Příprava keramických povlaků

Příprava vodné suspenze nano ZrO_2 - E52

Suspenze 1 - byla složena ze 100 ml destilované vody, 25g nanočásticového prášku ZrO_2 stabilizovaného 3 mol. % Y_2O_3 (syntetizovaný na OKaP, UMVI s označením - E52), 0,25g Dolapixu 64CE. *Suspenze 2* byla složena ze 100 ml destilované vody; 12,5g nanočásticového ZrO_2 (stabilizovaný 3 mol. % Y_2O_3 syntetizovaný na OKaP, UMVI s označením E52); 0,125g Dolapixu 64CE.

Vytváření nano povlaků ZrO_2

Nanokrystalické povlaky byly zhotoveny sprejováním koloidní vodné ZrO_2 suspenze na slinuté keramické substráty.

Slinování nano povlaků ZrO_2

Nanokrystalické povlaky byly slinovány při teplotě 800°C/2h.

Dělení vzorků a úprava povrchu

Slinuté disky Al_2O_3 a ZrO_2 byly rozřezány na čtvercové vzorky 6×6 mm pomoc vysokootáčkové ruční frézky DREMEL 300 (Německo) s diamantovým kotoučkem. Křemičité, křemenné sklo a HA byly řezány pomocí diamantového nože. Elektroforeticky zhotovené kompozity MLOCCv1, MLOCCv2 byly děleny na stroji Accutom 50 (Struers, Dánsko). Nařezané vzorky byly broušeny a leštěny na stroji TegraPol -25 (Struers, Dánsko). Jedna polovina vzorků byla ponechána v leštěném stavu a druhá byla tepelně leptána.

Vytvoření keramických lepených kompozitů

Lepené keramické kompozity byly vytvořeny slepením dvojic keramik ZrO_2 a Al_2O_3 samopolymeryující adhezivní pryskyřicí SPOFACRYL[®] (SpofaDental a.s., Česká republika), která je samo bioinertní a odolává teplotě 150°C při níž jsou vzorky před každými biologickými testy sterilizovány.

4.2.3 Analytické metody k určení mechanických vlastností

Stanovení hustoty

Hustota keramických vzorků byla stanovena pomocí Archimedovy metody vážením ve vodě ČSN EN 993-1. Pro výpočet byly použity následující teoretické hustoty. ZrO_2 6,08 g/cm³; Al_2O_3 3,99 g/cm³; HA 3,16 g/cm³.

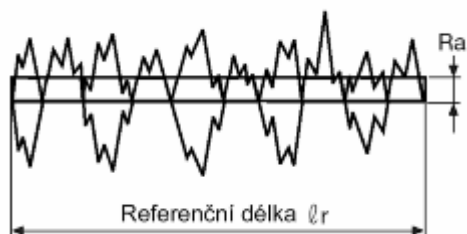
Stanovení povrchové drsnosti keramických substrátů

Plošná povrchová drsnost Ra (aritmetická střední výška) keramických substrátů byla určena analýzou výškového obrazu získaného na laserovém konfokálním mikroskopu Olympus LEXT OLS 3100 (Japonsko). SRa aritmetická střední výška drsnosti, SPa aritmetická střední výška zakřivené plochy profilu, střední absolutní hodnota $f(x, y)$ v obrysové zakřivené ploše.

Střední aritmetická drsnost plochy byla určena výpočtem z rovnice (1)

$$SRa, SPa = \frac{1}{LM} \int_0^M \int_0^L |f(x, y)| dx dy \quad (1)$$

kde L je délka ve směru X obrysové zakřivené plochy, M je délka ve směru Y obrysové zakřivené plochy a zakřivená plocha profilu $y = f(x, y)$.



Obr. 4.2 Aritmetická střední výška křivky drsnosti [58]

Povrchová analýza neslinutých a slinutých nanokrystalických povlaků a slinutých objemových keramik

Byla provedena na mikrofotografiích zhotovených pomocí světelného mikroskopu Nikon 102 (Nikon, Japonsko) a REM Tescan VEGA TS 5136XM (Tescan, Česká republika) a REM Tescan MIRA LMU (Tescan, Česká republika). Charakterizace velikosti zrn slinutých keramických materiálů byla provedena pomocí mikrosnímků REM Tescan MIRA 3 LMU a o AFM NT-MDT Prima (Ruská federace). Distribuce velikosti zrn byla provedena pomocí software obrazové analýzy od firmy Olympus.

Test soudržnosti nanostrukturního povlaku se substrátem

Soudržnost slinutého nanostrukturního povlaku se substrátem byla hodnocena pomocí indentačních zkoušek na tvrdoměru Vickers Leco LV 700L (USA). Zkouška tvrdosti byla provedena v souladu s ČSN - EN ISO 6507-1. Nehodnotila se však délka uhlopříček vtisku indentačního tělesa potřebná k určení HV tvrdosti materiálu, ale pomocí REM byly zhotoveny mikrofotografie vtisků indentoru do nanokrystalického povlaku, na kterých se hodnotila soudržnost nanostrukturního povlaku s keramickým substrátem.

4.2.4 Biologické dilatační testy in-vitro cytotoxicity

Biologické testy byly prováděny dle ČSN EN ISO 10993. Všechny provedené kultivace buněk in-vitro probíhaly v MEM (Minimum Essential Medium) mediu. K hodnocení biologických vlastností keramiky byly vybrány testy dilatace buněk a adherence buněk. Z testů dilatace buněk lze určit jak inhibici růstu, tak toleranci materiálu buňkami, tj. zdali vzniká toxická zóna, nebo ne. Pomocí testů adherence neboli hustoty pokryvu materiálů buňkami byla určována plocha pokryvu materiálu dilatovanými buňkami. Jako srovnávací materiál byla použita keramika známá svými bioaktivními vlastnostmi HA.

24 hodinová kultivace buněk in-vitro (kvantitativní test dilatace buněk)

Zkoušky na cytotoxicitu extraktu během 24 hodinové kultivace byly prováděny v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-3 článek 8.2. Na počátku kultivace in-vitro byla dle T. J. Webstera [22] zvolena hustota buněk 2500 na cm^2 . Během 24 hodin kultivace in-vitro bylo snímáno v dvouminutových intervalech rozhraní testovaný materiál - EMEM. Buněčná dilatace byla vyhodnocena ze snímků získaných pomocí světelného mikroskopu Nikon

Eclipse TE-200 (Nikon, Japonsko) a softwaru NIS Elements AR (Laboratory Imaging, s.r.o., Česká republika). Dilatované buňky byly pevně uchyceny a rozprostřeny na povrchu polystyrenové (PS) kultivační misky. Nedilatované buňky byly sbalené a nepřichycené k povrchu kultivační misky. Hodnotu dilatace určuje procentuální podíl počtu dilatovaných buněk ze všech buněk podle rovnice (3).

$$\text{Dilatace buněk} = \frac{100 \times \text{počet dilatovaných buněk na snímku}}{\text{Celkový počet buněk na snímku}} [\%] \quad (3)$$

Hodnocení dilatačního testu buněk in-vitro bylo následující:

- a) buněčná dilatace po 24 hodinách do 50 % materiál je *cytotoxický*
- b) buněčná dilatace po 24 hodinách od 50 % do 90 % materiál je *cytotolerantní*
- c) buněčná dilatace po 24 hodinách od 90 % do 100 % materiál je *cytocompatibilní*

72 hodinová kultivace buněk in-vitro - kvalitativní test dilatace buněk

Zkoušky na cytotoxicitu extraktu během 72 hodinové kultivace byly prováděny v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-3 článek 8.2. Stejný počet buněk tj. 2500 na cm² byl použit u 72 hodinové kultivace in-vitro buněčných linií HeLa, L929 a MG63. Vysušené vzorky byly vyfotografovány REM Tescan VEGA TS 5136XM, který pracoval při nízkém vakuu, a proto nebylo třeba vzorky naprašovat zlatem.

Hodnocení plochy pokryté dilatovanými buňkami

Zkoušky na cytotoxicitu přímým kontaktem byly prováděny v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-3 článek 8.3. Pro in-vitro kultivaci osteoblastoidních buněk na povrchu objemových keramik bylo použito stejného počtu buněk, tj. 2500 na cm² [28]. Doba kultivace osteoblastoidní line MG63 byla 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 hodin.

Obarvené buňky byly vyfotografovány na každém vzorku na pěti místech světelným mikroskopem s osvětlením objektivem Padim RTL (Intraco Micro spol. s.r.o., Česká republika). Na snímcích byla provedena obrazová analýza v programu NIS Elements Ar. Při známém rozlišení snímků z mikroskopu Padim RTL byl celkový počet pixelů vzat jako 100 % plochy. Ručně byly označeny plochy všech dilatovaných buněk, ty byly sečteny a tak byla získána její celková plocha v pixelech. Výpočet plochy pokrytí povrchu keramického substrátu dilatovanými buňkami byl proveden podle rovnice (4).

$$\text{Plocha pokryvu buněk} = \frac{100 \times \text{plocha dilatovaných buněk}}{\text{Celková plocha snímku}} [\%] \quad (4)$$

Chyba stanovení velikosti pokryvu povrchu dilatovanými buňkami byla stanovena z 5 opakovaných měření a směrodatná odchylka byla 4,5.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Objemové keramiky a kompozity

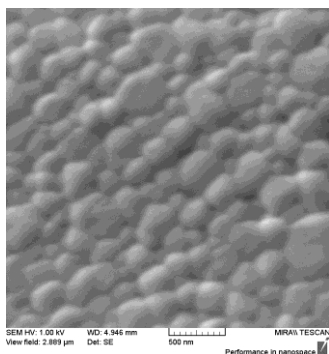
5.1.1 Příprava a charakterizace objemových keramik a kompozitů

Objemová keramika je složená ze slinutých zrn, jejichž morfologie (velikost, rozložení, tvar,...) je stejná uvnitř keramického tělesa i na jeho povrchu. Struktura keramiky i morfologie závisí především na vlastnostech vstupních surovin, konsolidaci keramických částic před tvarováním, technologických podmínkách tvarování a slinování. Prvním cílem práce byla příprava objemových keramik z Al_2O_3 , ZrO_2 a HA s požadovanou velikostí zrn a to: Keramiky složené z nanozrn (velikostí $10 \div 100$ nm), submikrozrn (velikost $100 \div 500$ nm) a mikrozrn (o velikosti 500 nm $\div 15$ μm). V průběhu slinování však dochází nejen k zhutnění keramických částic a k vzniku zrnité keramické struktury, ale současně i k růstu velikosti částic, resp. zrn. Rychlost růstu velikosti zrn závisí nejen na teplotě a době slinování, ale také (výrazně) na chemickém složení keramického prášku [30]. Rychlost růstu zrn Al_2O_3 je obvykle větší než rychlost růstu zrn ZrO_2 [30]. U všech připravených objemových keramik byla studována morfologie jejich povrchů, drsnost povrchů a velikost zrn v tabulce 5.1 je uvedeno označení vzorků. Následně byly provedeny biologické in-vitro testy adherence buněk epiteliální, fibroblastoidní a osteoblastoidní linie na površích studovaných keramik

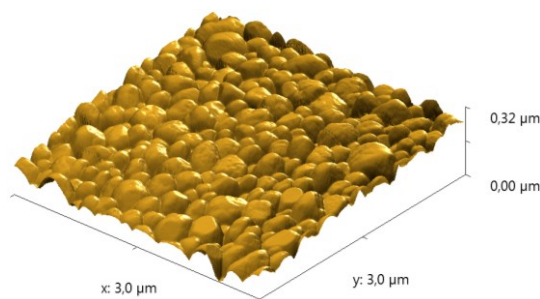
Objemové ZrO_2 a Al_2O_3 keramiky

Keramika Z1 dopovaná 3 mol. % Y_2O_3

Slinutím „syrového tělesa“ při teplotě $1400^\circ\text{C}/2\text{hod.}$ byla připravena a měla relativní hustotu 99,6 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky po tepelném leptání je uvedena na obrázku 5.1 a 5.2. Velikost zrn je 0,5 nm až 244 nm, zrna jsou pravidelná, hranice zrn jsou výrazné a póry nezřetelné.

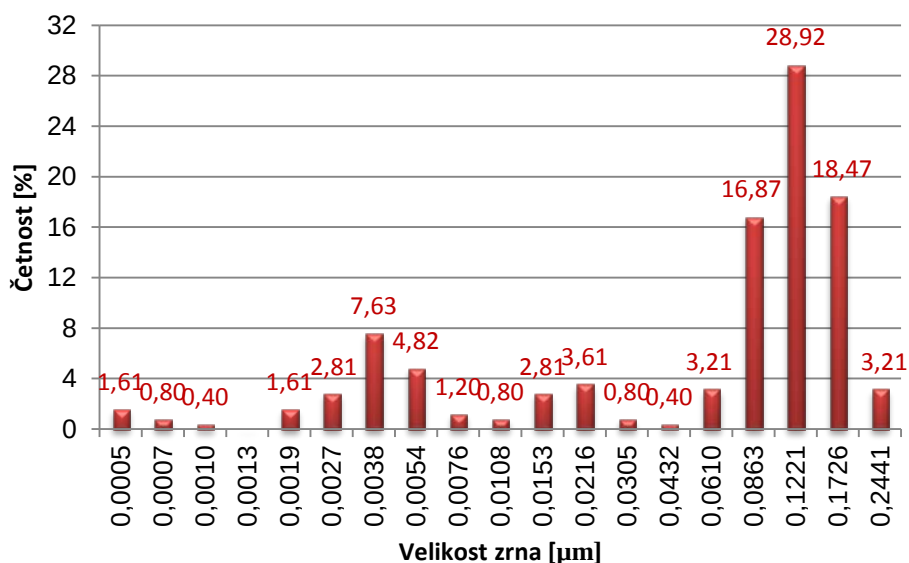


Obr. 5.1 Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z1 stabilizované 3 mol. % Y_2O_3



Obr. 5.2 Mikrofotografie AFM povrchu keramiky Z1 stabilizované 3 mol. % Y_2O_3

Pomocí mikrofotografií 5.1 a 5.2 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.3.



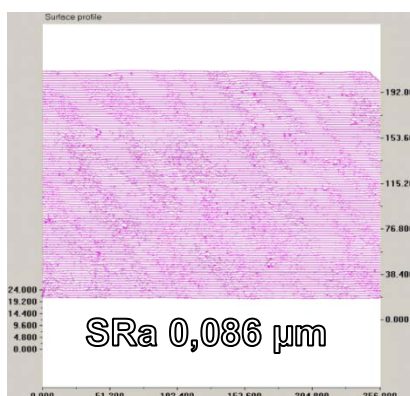
Obr. 5.3 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z1 dopované 3 mol. % Y_2O_3

Distribuce velikost zrn má bimodální charakter. Maxima leží při 3,8 nm a 122,21 nm. Je vidět, že 49,4 % zrn leží v oblasti „nano“ a 50,6 % jsou zrna submikrometrová. Keramika Z1 byla připravena z keramického prášku tvořeného konsolidovanými aglomeráty o velikosti 60 nm. Tyto aglomeráty slinovaly snadněji než nekonsolidované částice a vytvářely jemnozrnější keramiku než nekonsolidované ZrO_2 prášky o střední velikosti částic 7,5 nm a 8,5 nm.

Na ZrO_2 keramice byla určena střední aritmetická povrchová drsnost SRa a to jak na leštěném tak i na leptaném vzorku. U leštěného vzorku byla naměřena hodnota SRa 0,036 μm a u tepelně leptaného 0,086 μm . Tepelným leptáním se tedy drsnost povrchu ZrO_2 zvýšila více než 2,5 $\times$. Profil drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.4 a 5.5.



Obr. 5.4 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné ZrO_2 keramiky

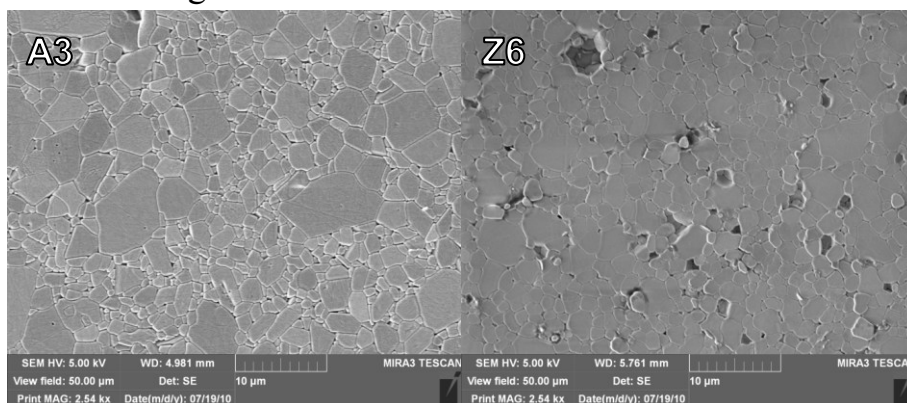


Obr. 5.5 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané ZrO_2

Stejným keramografickým postupem byly zpracovány všechny objemové keramiky Z1-Z8, A1-A5, HA i vrstevnaté kompozity MLOCCv1, MLOOCv2. Výsledky distribucí zrn jsou uvedeny v tabulce 5.1. Z této tabulky vyplývá, že se podařilo připravit řadu ZrO_2 keramik se vzestupnou velikostí zrn od nejmenších velikostí zrn Z1 (obsah zrn ve struktuře nanometrová: submikrometrová cca 1:1), která byla nejbližší objemové nanometrové keramice, až po Z8 se zrny velkými až 11 μm . Keramika, u které se předpokládala nanometrová struktura Z2 měla pouze 16,7 % zrn nanometrových a 83,3 % zrn submikrometrových i když na počátku slinování měly částice 7 nm. Většina ZrO_2 keramik má velký podíl submikrometrových zrn. Také u Al_2O_3 byla připravena řada keramik se vzestupnou velikostí zrn. U keramik Al_2O_3 se projevila vysoká rychlost růstu zrn na teplotě v závislosti na slinovací teplotě a době výdrže. Nejnižších velikostí zrn dosáhly keramiky A1 a A2. Bioaktivní keramika HA měla největší podíl zrn submikrometrových a u jejího slinování bylo důležité optimalizovat lisovací tlak při zhutnění a teplotu slinování a dobu výdrže, aby nedošlo k rozkladu HA na TCP, při snaze o dosažení co nejvyšší relativní hustoty. U kompozitů připravených elektroforetickou depozicí se projevila chemická odlišnost obou oxidových keramik, která byla spojena s odlišnou rychlostí růstu zrn při slinování. ZrO_2 byl většinou tvořen submikrometrovými zrny a Al_2O_3 zrny mikrometrovými zrny.

Lepené vrstevnaté oxidové kompozity

Slinování vrstevnatých „elektroforetických“ kompozitů je v důsledku chemicky odlišných keramických prášků, provázeno nestejnou rychlostí růstu zrn obou oxidových keramik. Proto je velmi obtížné dosáhnout statisticky nevýznamného rozdílu velikosti zrn mezi oběma keramikami [29], který je požadován při hodnocení buněčné aktivity. Proto byly vytvořeny lepené oxidové kompozity, kdy každá keramika byla slinována zvlášť za odlišných podmínek. ZrO_2 bylo slinováno při vyšší teplotě, delším čase a Al_2O_3 při nižší teplotě a kratším čase. Tak mohlo být dosaženo statisticky nevýznamného rozdílu velikosti zrn mezi oběma oxidovými keramikami. Vytvořený lepený kompozit byl z dvojice keramik Z6 a A3. Velikost zrn obou keramik je vidět z mikrofotografie na obrázku 5.11.

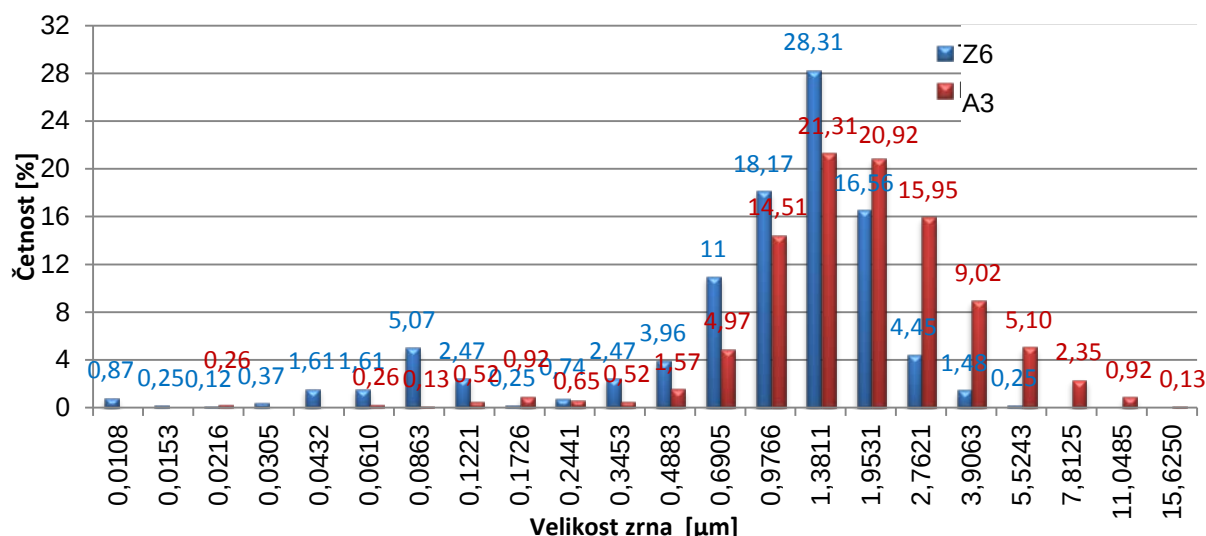


Obr. 5.11 Mikrofotografie REM dvojice keramického lepeného kompozitu Z6 × A3

Tabulka 5.1 Tabulka distribucí zrn objemových keramik

Keramika	Označení vzorku	Označení dle výrobce	Velikost částic dle výrobce	Množství a druh dopantu [mol. %]	Teplota slinování	Čas výdrže na teplotě	Typ distribuce	Rozmezí velikostí zrn [nm]	Maxima distribuční křivky [nm]			Podíly zrn [%] φ velikost zrn [nm]			Průměrná Velikost zrn [nm]
									1	2	3	„Nano“ zrna 10 ÷ 100 nm	„Submikro“ zrna 100 ÷ 500 nm	„Mikro“ zrna 0,5 ÷ 15 μm	
ZrO ₂	Z1	TOSOH TZ3YB	60 nm	3 Y ₂ O ₃	1400	2	bimodální	5 ÷ 244	3,8	122,2	-	49,4 19,5	50,1 180,8	-	100,2
ZrO ₂	Z2	1,5 mol. % ZrO ₂	7,5 nm	1,5 Y ₂ O ₃	1100	4	bimodální	19 ÷ 345	7,6	244,1	-	16,7 16,7	83,3 221	-	118,9
ZrO ₂	Z3	E52	8,5 nm	3 Y ₂ O ₃	1500	2	bimodální	1 ÷ 977	7,6	345,3	-	12,5 5,72	75 274,5	12,5 833,6	371,3
ZrO ₂	Z4	HWY 5,5SD	500±200 nm	3 Y ₂ O ₃	1600	10	trimodální	4 ÷ 1953	15,3	86,3	976,6	44,4 26,9	31,2 274,5	24,4 1250,3	517,2
ZrO ₂	Z5	ZrO ₂ HWY-N-13,5	200±100 nm	8 Y ₂ O ₃	1440/1290	15	trimodální	8 ÷ 1953	15,3	86,3	690,5	38,1 28,6	41,4 274,5	20,5 1250,3	517,8
ZrO ₂	Z6	TOSOH TZ3YB	60 nm	3 Y ₂ O ₃	1600	10	bimodální	11 ÷ 5524	86,3	1381,1	-	9,9 38,4	9,9 274,5	80,2 2456,29	923,1
ZrO ₂	Z7	ZrO ₂ HWY-N-13,5	200±100 nm	8 Y ₂ O ₃	1600	10	trimodální	31 ÷ 11049	61	488,3	7812,5	8,3 47,2	44,9 274,5	46,8 4006,1	1442,6
ZrO ₂	Z8	TOSOH TZ8YSB	140 nm	8 Y ₂ O ₃	1600	10	bimodální	61 ÷ 11049	8,6	3906,3	-	11,1 73,7	-	89,9 5405,8	2739,8
Al ₂ O ₃	A1	TM-DAR	100 nm	-	1350	1	bimodální	11 ÷ 1953	1,3	690,5	-	12,4 34,6	34,3 274,5	53,3 1250,3	519,8
Al ₂ O ₃	A2	DS-90N	200±50 nm	-	1350	1	bimodální	31 ÷ 3906	244,1	1381,1	-	2,5 42,3	60,2 274,5	37,3 1944,9	753,9
Al ₂ O ₃	A3	KMS 99	granule 150 μm	-	1550	2	unimodální	11 ÷ 7813	244,1	-	-	4,5 38,4	57,7 274,5	37,8 3125,8	1146,2
Al ₂ O ₃	A4	TM-DAR	100 nm	-	1500	10	trimodální	43 ÷ 7813	43,2	244,1	3960,3	20 52,1	15 259	65 3473,7	1261,6
Al ₂ O ₃	A5	KMS 99	granule 150 μm	-	1550	10	unimodální	61 ÷ 15625	1953,1	-	-	0,7 56,3	4,2 274,5	95,2 5168	1832,9
HA	HA	Fluka	aglomeráty 11,40 μm	-	1150	2	unimodální	122 ÷ 2762	690,5	-	-	4,6 14,4	37,8 274,5	57,6 1552,7	613,9
Al ₂ O ₃ ×ZrO ₂ MLOCCv1	KA1	Al ₂ O ₃ Reynolds	550 μm	-	1500	2	bimodální	15 ÷ 1381	61,0	1381,1	-	69,4 47,3	5,6 304,8	25 1016,1	456,1
	KZ1	ZrO ₂ TOSOH TZ3YS-E	60 nm	3 Y ₂ O ₃			bimodální	31 ÷ 691	43,2	488,3	-	62,8 34,3	32,9 274,5	4,3 690,5	333,1
Al ₂ O ₃ ×ZrO ₂ MLOCCv2	KA2	Al ₂ O ₃ Taimicron	200 μm	-	1500	2	trimodální	61 ÷ 2762	86,3	345,3	976,6	67,8 73,7	6,5 345,3	25,7 1768,2	729,1
	KZ2	ZrO ₂ TOSOH TZ3YS-E	60 nm	3 Y ₂ O ₃			unimodální	86 ÷ 488	345,3	-	-	2,6 5,4	92,6 274,5	4,8 690,5	341,1

Srovnání distribučních křivek velikosti zrn je uvedeno na obrázku 4.12, ze kterého je vidět významný překryv distribucí A3 a Z6 v oblasti 0,2 µm až 5 µm.



Obr. 4.12 Distribuce střední velikosti zrn dvojice lepeného keramického kompozitu Z6 × A3

5.1.2 Matematický model kinetiky dilatace buněk v přítomnosti keramických materiálů

Model kinetiky dilatace buněk po (linií HeLa, L929, MG63) (biologických dilatačních výluhových in-vitro testů) v přítomnosti keramických (bio) materiálů nebyla dosud přiměřeně popsána vhodným matematickým modelem. Náš návrh nejjednoduššího modelu vychází z předpokladu, že během dilatace buněk nedochází k jejich umírání ani dělení. Potom je možné kinetiku dilatace popsat nevratnou rovnicí:

$$A_N \rightarrow A_D \quad (5)$$

kde, A_N jsou buňky nedilatované a A_D buňky dilatované. Pro kinetiku dilatace potom platí diferenciální rovnice prvního řádu (6):

$$-\frac{dA_N}{dt} = +\frac{dA_D}{dt} = k \times A_N \quad (6)$$

Řešením rovnice (6) dostaneme integrální tvar závislosti relativního množství dilatovaných buněk A_D na čase t (7)

$$A_D = A_{Dm}(1 - \exp(-kt)) \quad (7)$$

kde A_{Dm} je maximální relativní množství dilatovaných buněk, k je rychlostní konstanta dilatace (9)

$$k = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{A_D}{A_{Dm}} - 1 \right) \quad (8)$$

Základní model předpokládající kinetiku dilatace prvního řádu je možné upřesnit předpokladem kinetiky n-tého řádu, probíhající dle rovnice (9)

$$nA_N \rightarrow A_D \quad (9)$$

Pak platí diferenciální rovnice (10)

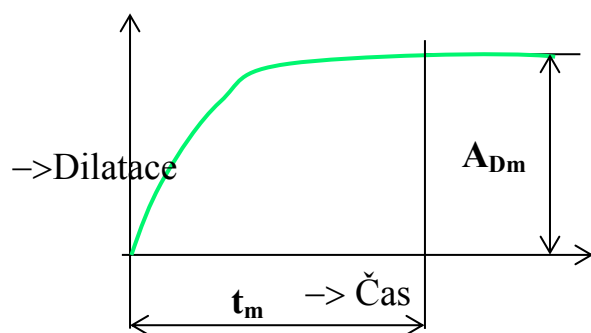
$$\frac{dA_D}{dt} = k \times A_N^n \quad (10)$$

Po integraci dostaneme rovnici kinetiky dilatace n-tého řádu ve tvaru (11)

$$A_D = A_{Dm} \times (A_{Dm}^{1-n} + k \times n \times t - k \times t)^{\frac{1}{1-n}} \quad (11)$$

kde n je řád dilatačního děje.

Oba modely, pro první řád a n -tý řád dilatace byly použity k popisu experimentálních dat získaných pro 3 typy tkáňových buněčných linií a pro 3 typy keramik s různou povrchovou morfologií. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.3 Porovnáním regresních koeficientů získaných pro rovnici 1. řádu a n -tého řádu vidíme, že rovnice n -tého řádu poskytovala poněkud vyšší hodnoty r^2 . U modelu popsaného rovnicí n -tého řádu je však z biologického hlediska nejasná role řádu dilatace a s ním spojené rychlostní konstanty. Proto byla pro interpretaci dilatačních křivek zvolena kinetická rovnice 1. řádu. Tato rovnice poskytuje dva, z biologického hlediska, snadno interpretovatelné parametry: parametr A_{Dm} představuje maximální relativní množství dilatovaných buněk, parametr k představuje rychlost dilatace buněk v počáteční periodě růstu, v oblasti $t = 0$ až t_m (obr. 4.13).



Obr. 5.13 Schematický graf buněčné dilatace popsaný kinetickou rovnicí 1. Řádu

5.1.3 Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik a kompozitů ve výluhu

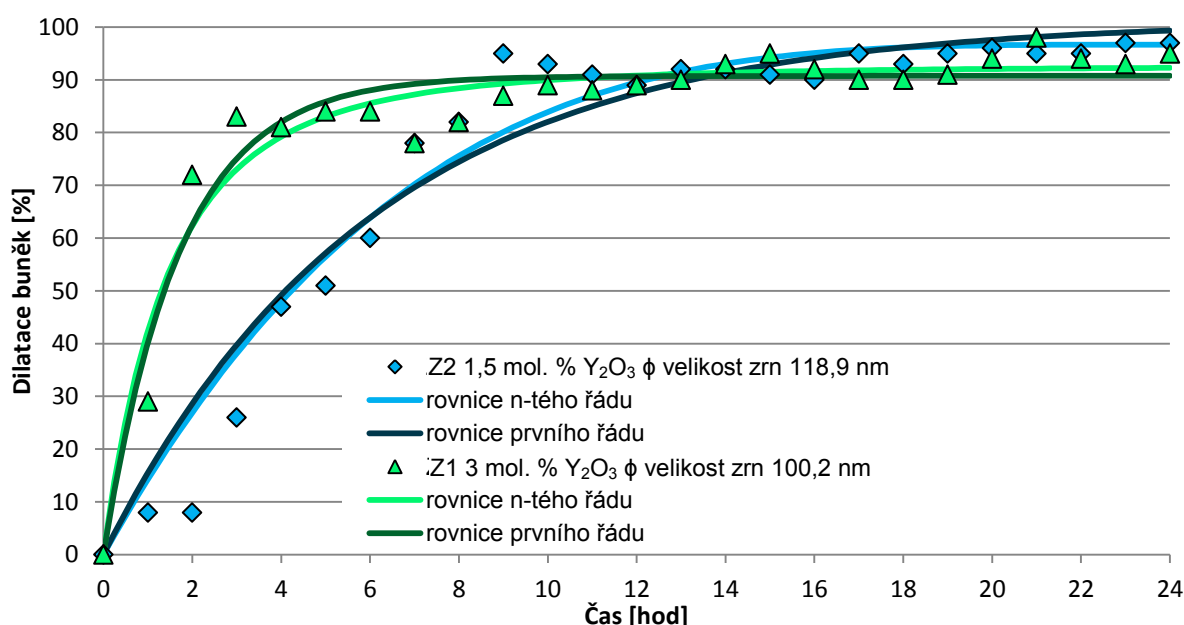
Biologická interakce ZrO_2 keramik byla studována pomocí 24 hodinových dilatačních výluhových testů in-vitro s buněčnými liniemi osteoblastoidní MG63, fibroblastoidní L929 a epitelální HeLa. Byly testovány dvě submikrometrové keramiky s různým obsahem nanozrn a křemenné sklo. První oxidová keramika byl Z2 dopovaný 1,5 mol. % Y_2O_3 , který měl bimodální distribuci zrn s maximy 7,6 a 244,1 nm, střední velikost zrn byla tedy 118,9 nm. Procentuální podíl nanometrových zrn byl 16,7 % a zrn submikrometrových 83,3 %. Druhá keramika byl Z1 dopovaný 3 mol. % Y_2O_3 , bimodální distribucí zrn s maximy 3,8 nm a 122,1 nm, střední velikost zrn byla 100,2 nm. Podíl nanometrových zrn byl 49,4 % a submikrometrových zrn 50,1 %. Povrch obou keramik byl tepelně leptán a získal tak stejnou aritmetická střední výšku drsnosti $SRa = 0,086 \mu m$. Biologická interakce Al_2O_3 keramik byla studována na objemové A1 pomocí stejných testů jako ZrO_2 keramika. Keramika A1 měla bimodální distribuci s maximy 15,3 nm a 690,5 nm, střední velikost zrn tedy byla 519,8 nm. Procentuální podíl nanometrových zrn byl 12,4 %, zrn

submikrometrových 83,8 % a zrn mikrometrových 3,8 %. Povrch keramiky byl tepelně leptán a dosáhl aritmetické střední výška drsnosti $SRa = 0,098 \mu m$.

Buněčná linie MG63 [38, 60-64]

Testování buněčné dilatace in-vitro na ZrO_2 keramikách

Z časového průběhu záznamu dilatace na obrázku 5.14 je vidět, že ve výluhu z keramiky Z1 dopované 3 mol. % Y_2O_3 bylo dosaženo 95 % dilatace po 15 hodinách kultivace a u Z2 dopované 1,5 mol. % Y_2O_3 95 % dilatace až po 19 hodinách kultivace. Regresní křivky dilatací osteoblastoidní linie MG63 jsou popsány rovnicemi (7) a (11). Při testech trvajících 14 hodin byla dilatace u obou keramik stejná (93 %). Oba materiály jsou cytokompatibilní. Hodnoty koeficientů rovnic jsou uvedeny v tabulce 5.3. Na keramice Z2 dopované 1,5 mol. % Y_2O_3 dilatovaly buňky oproti Z1 pomaleji. Nižší hodnota dilatace zjištěná při testech delších než 13 hodin u ZrO_2 keramiky s vyšším obsahem Y_2O_3 nano (submikrozná keramika) by mohla souviset s negativním vlivem Y_2O_3 na biologickou aktivitu buněk [33, 34] při dlouhých dobách kontaktu keramiky Z1 s dilatovanými buňkami. Přestože nanozná ZrO_2 keramika pozitivně ovlivnila počáteční fázi dilatace buněk, rostoucí koncentrace Y_2O_3 , která se do kultivačního média uvolňovala, s rostoucím časem testu mohla být příčinou snížené maximální dilatace po 24 hodinách.



Obr. 5.14 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na ZrO_2 keramikách

K dilatačním testům byly použity linie MG63, L929 a HeLa na substrátech Z1, A1 a SiO_2 . Hodnoty koeficientů regresních křivek dilatačních testů buněk jsou uvedeny v tabulce 5.2

Tabulka 5.2 Hodnoty koeficientů A_{Dm} , k , t_m , a , b , c regresních křivek buněčné dilatace na objemových keramikách

Linie	Keram. materiál	Distribuce velikosti zrn [nm]	Rovnice 1. řádu				Rovnice n-tého řádu				
			Hodnoty koeficientů		t_m [h]	Regres. koef. r^2	Hodnoty koeficientů			Regres. koef. r^2	t_m [h]
			A_{Dm}	k			a	b	c		
MG63	A1	Bimodální 15.3; 690.5	92.91	0.68	13	0.96	95.99	0.07	1,57	0.97	18
	Z1	Bimodální 3.8; 122.21	90.74	0.59	15	0.94	92.62	0.15	1.34	0.95	21
	Z2	Bimodální 7.6; 244.1	101.21	0.17	24	0.94	96.65	0.53	0.73	0.96	23
	SiO ₂	-	94.92	0.86	12	0.96	95.99	0.07	1,57	0.96	24
L929	Z2	Bimodální 3.8; 122.21	95.56	2.92	4	0.59	105.8	$3.1 \cdot 10^{-5}$	4.18	0.98	11
	Z1	Bimodální 7.6; 244.1	96.88	0.41	13	0.92	96.52	0.63	0.89	0.93	11
HeLa	A1	Bimodální 15.3; 690.5	77.24	1.08	8	0.76	83.53	0.06	1.49	0.82	23
	Z2	Bimodální 7.6; 244.1	92.23	0.53	11	0.95	92.03	0.73	0.92	0.95	12
	Z1	Bimodální 3.8; 122.21	86.26	2.24	5	0.96	86.10	1.3	1.08	0.95	20

Pozn.:

provedeny testy dilatace buněk i testy plochy pokryvu

HeLa - epiteloidní buněčná kultura (pokožka)

L929 - fibroblastoidní buněčná kultura (chrupavky)

MG63 - osteoblastoidní buněčná kultura (kosti)

5.1.4 Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik v přímém kontaktu

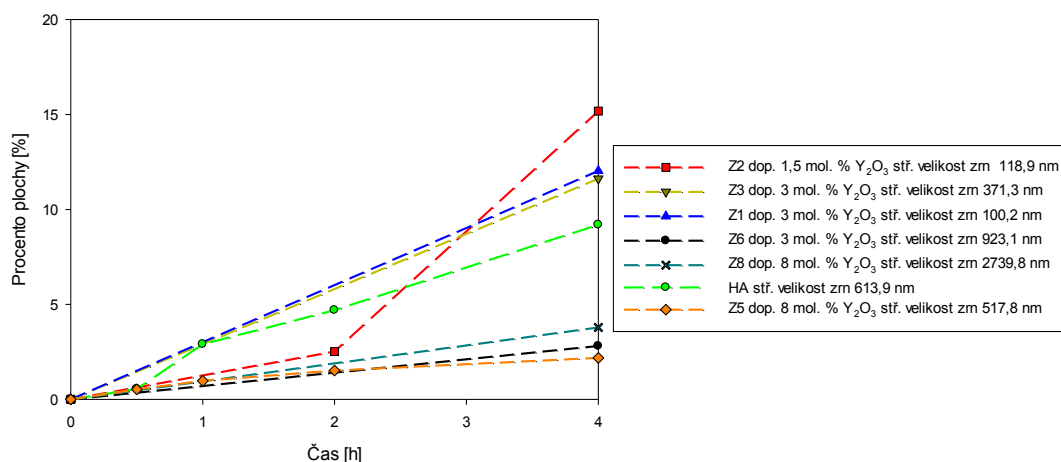
Buňky ulpívají na keramickém materiálu pomocí 4 až 5 enzymatických výběžků. Velikost dilatované buňky osteoblastoidní linie MG63 se pohybuje okolo 30 až 50 μm . Vzhledem k tomu, že velikost slinutých zrn keramik leží v oblasti nanometrů až jednotek mikrometrů, je dilatovaná buňka minimálně 10 až 500 $\times$ větší. Proto buňky překrývají jak zrna, tak i hranice zrn. Aby se materiál implantátu včlenil do hostitelské tkáně a nedošlo jen k jeho zapouzdření, musí mít materiál porézní strukturu a průměr pórů musí být od 100 do 500 μm , aby byla možná výživa buněk, které prorostly materiálem. Přiměřený model uchycení buněk uvnitř makropórů k mikro- resp. nanostrukturnímu povrchu materiálu jsme však v literatuře nenalezli. Je otázkou zda mají hranice zrn na uchycení buňky nějaký vliv. Tímto problémem se zabývá tato kapitola.

ZrO₂ sada keramik

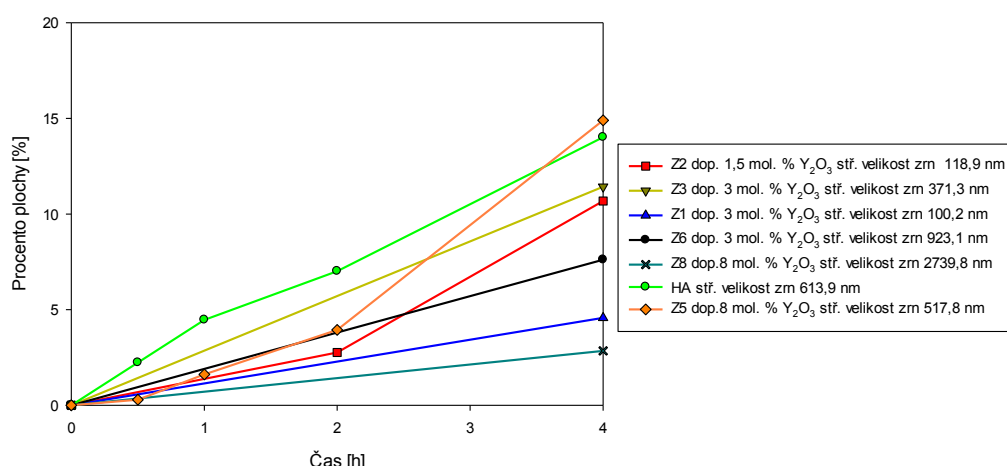
Zkoušky adherence buněk ke keramickému povrchu byly provedeny dle ČSN ISO 10993. Pomocí nich byla zjištěna plocha pokrytí keramiky dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63. Jako kontrola byla použita hydroxyapatitová keramika známá svým bioaktivním chováním (HA). Pro

srovnání jsou na obrázcích 4.15 a 4.16 uvedeny keramiky ZrO_2 s velikostí zrn od stovek nanometrů po desítky mikrometrů. Délka trvání testu byla na základě práce Webstera zvolena 0,5; 1; 2 a 4 hodiny [22].

Po uplynutí čtyř hodin testu byla největší plocha (15,18 %) pokrytá dilatovanými buňkami zjištěna u vzorku tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 s aritmetickou střední výškou drsnosti $\text{SRa} = 0,086 \mu\text{m}$ ZrO_2 stabilizované 1,5 mol. % Y_2O_3 (Obr. 5.67). Tento výsledek odpovídá výsledkům biologických testů Webstera [22], při kterých bylo zjištěno bioaktivní chování na nanometrové keramice Al_2O_3 . Nižší plocha pokryvu povrchu buňkami u keramik Z3 a Z1, Z5, Z6 s obsahem Y_2O_3 3 mol. % a Z8 s 8 mol. % Y_2O_3 mohla být způsobena nepříznivým vlivem obsahu dopantu (Y_2O_3) na životaschopnost buněk [35, 36]. Plocha dilatovaných buněk u keramik dopovaných 1,5 a 3 mol. % však byla vyšší než u bioaktivní keramiky HA a oxidové keramiky Z1. Tento výsledek biologického testu mohl být způsoben tím, že se buňky testovací osteoblastoidní linie MG63 na počátku testu nacházely v různých stupních



Obr. 5.15 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu tepelně leptaných ZrO_2 biokeramik



Obr. 5.16 Plocha dilatovaných buněk linie MG63 na povrchu leštěných ZrO_2 biokeramik

mitózy a 4 hodinový test byl příliš krátký. Pro buňky osteoblastoidní linie vhodnější drsnější povrch potvrzuje i práce Bächlea [37].

U leštěných keramik $SRa = 0,036 \mu m$ dosáhla nejvyšší plochy (14,90 %) dilatovaných buněk submikrometrová keramika Z5 stabilizovaná 8 mol. % Y_2O_3 , která měla velký obsah nanometrových zrn (28,6 %) a submikrometrových (41,4 %). Mikrometrová keramika HA dosáhla 14,0 %. Submikrometrová keramika Z3 dosáhla plochy pokryvu 12,40 %. Podobné plochy pokryvu plochy dosáhly také keramiky submikrometrová Z2 dopovaná 1,5 mol. % Y_2O_3 , mikrometrová keramika Z6 dopovaná 3 mol. % Y_2O_3 a mikrometrová keramika Z8 dopovaná 8 mol. % Y_2O_3 . U biologických testů na leštěných keramikách ZrO_2 nebyl zaznamenán nepříznivý vliv dopantu Y_2O_3 na testovací buněčnou linii MG63, který je popsán v pracích [35, 36]. Byl však zaznamenán vliv drsnosti povrchu, kde u všech tetovaných keramik na leštěném povrchu $SRa = 0,036 \mu m$ bylo dosaženo nižší plochy pokryvu povrchu.

Z výsledků dilatačních testů na ZrO_2 keramikách je možné usuzovat na vyšší bioaktivitu submikrometrové keramiky ZrO_2 s tepelně leptaným povrchem než s povrchem leštěným. Podobných výsledků dosáhli ve svých pracích s nanostrukturními objemovými keramikami Al_2O_3 a TiO_2 Webster, Dulgar-Tuloch a Luo. [21, 22, 23, 38, 39]

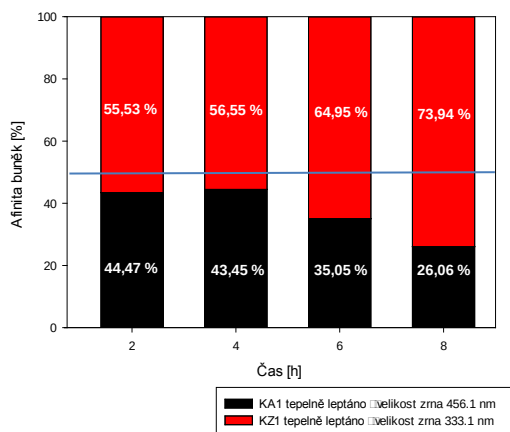
Al_2O_3 keramiky

U žádné z Al_2O_3 keramik nebyla střední velikost zrn v nanometrové oblasti. Nejmenší průměrnou velikost zrn (519,8 nm) měla submikrozná keramika A1, nejvyšší velikost (1261,6 nm) měla keramika A4. Výsledky ukázaly nejvyšší biologickou aktivitu u mikrozné leštěné keramiky A4 ($SRa = 0,037 \mu m$; 14,55 % pokrytí povrchu). Z toho je vidět, že vliv velikosti zrn v submikrozné a mikrozné oblasti na biologickou aktivitu buněk linie MG63 není dominantní. Testy dilatace buněk MG63 na povrchu mikrometrových Al_2O_3 keramik nemohou tedy potvrdit chování buněk na nanometrových površích publikované Websterem a spol. [21, 22, 23, 38, 39]. Přímý test keramik Al_2O_3 nebyl ovlivněn přítomností dopantu Y_2O_3 , jednalo se tedy pouze o vliv velikosti zrn a povrchové morfologie.

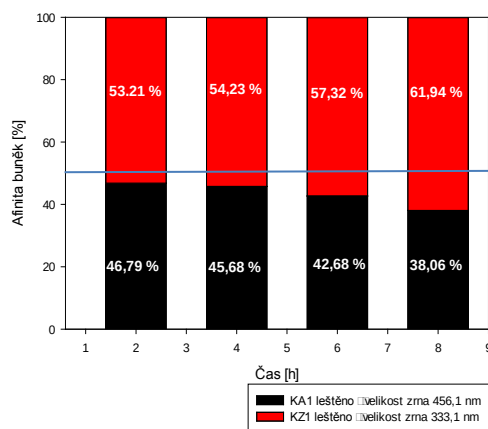
Keramický kompozit MLOCCv1 (KA1 x KZ1)

Nejvyšší plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 13,16 % byla dosažena na vrstevnatém tepelně leptaném keramickém kompozitu KA1 x KZ1 po uplynutí čtyř hodin. Na materiálu se projevila vyšší selektivita dilatovaných buněk k materiálu ZrO_2 (Obr. 5.17, 5.18).

Podobný vrstevnatý kompozit dosud nebyl biologicky testován, výsledky lze srovnat pouze s biologickými testy částicových kompozitů $Al_2O_3 \times ZrO_2$ od různých autorů [35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. Jejich závěry jsou obdobné: kompozitní keramické materiály mají velmi dobré biologické vlastnosti, jsou vhodné jak pro kostní štěpy tak stomatologické implantáty, velmi také záleží na jejich povrchové úpravě a drsnosti. Autoři [41, 43, 44] se shodují ve výborné biokompatibilitě částicového keramického kompozitu $Al_2O_3 \times ZrO_2$.



Obr. 5.17 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1 × KZ1



Obr. 5.18 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1 × KZ1

Obdobných výsledků biologických testů bylo dosaženo i u vrstevnatého kompozitu MLOCCv2.

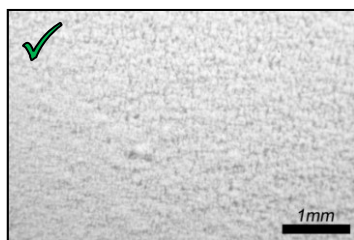
Výsledky biologických testů lepených keramických kompozitů Z7×A5, Z6×A3, a Z4 ×A2 potvrdily selektivitu buněk osteoblastoidní linie MG63 ke keramice ZrO₂.

5.2 Keramické povlaky

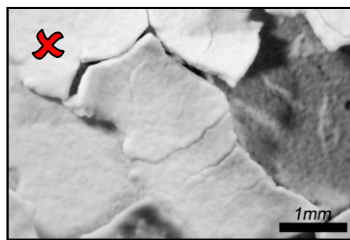
Keramický povlak se nanáší na podkladový materiál s cílem zlepšit fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti ortopedických a stomatologických implantátů (např. povlak HA na ocelové totální endoprotéze). Struktura a velikost zrn povlaku závisí nejvíce na velikosti částic keramického prášku, technologii přípravy a teplotě slinování. Cílem této části byla příprava celistvého nanometrového ZrO₂ povlaku (velikost zrn 10 ÷ 100 nm) na oxidových keramických substrátech (Al₂O₃, ZrO₂), křemičitém a křemenném skle. V průběhu slinování keramického povlaku dochází ke vzniku zrnité keramické struktury a současně probíhá růst zrn povlaků na substrátu.

U všech vybraných bezdefektních keramických povlaků byla studována morfologie a soudržnost. U neslinutých povlaků se vizuálně hodnotila celistvost povlaku a přítomnost pórů a ředin pomocí stereomikroskopu. Vyhovující povlaky byly podrobeny biologickým dilatačním in-vitro testům s buněčnými liniemi: epitelální (HeLa), fibroblastoidní (L929) a osteoblastoidní (MG63).

Keramické povlaky byly nanášeny sprejováním koloidní suspenze na zahřátý keramický substrát. Byly zkoušeny kombinace teploty substrátu, počtu nanesených vrstev a druhu suspenze. Zhotovené keramické povlaky byly rozděleny na „vyhovující“ (Obr. 5.19) celistvé bez defektů či ředin a „nevyhovující“ (Obr. 5.20) povlaky, které obsahovaly bubliny či řediny.



Obr. 5.19 Vyhovující povlak - neslinutý nanometrový ZrO_2 povlak nanesený na křemičitém skle



Obr. 5.20 Nevyhovující povlak - neslinutý nanometrový ZrO_2 povlak nanesený na křemičitém skle

5.2.1. Hodnocení povrchových vlastností keramických substrátů a povlaků

Hodnocení povrchové drsnosti nanometrového povlaku bylo vzhledem k velké členitosti, která neumožňovala použití AFM mikroskopu bylo provedeno vizuálně z mikrofotografií slinutých povlaků ZrO_2 . Střední drsnost povlaku se pohybovala mezi 10 a 20 μm . Drsnost povlaků Z1 vyhodnocená vizuálním porovnáním REM mikrofotografií byla srovnána s drsností tepelně leptaných objemových keramik ZrO_2 vyhodnocených pomocí AFM mikrofotografií. Keramika E52 ZrO_2 měla hodnotu drsnosti asi 0,13 μm , keramika Z1 asi 0,14 μm a keramika Z6 asi 0,19 μm , což jsou hodnoty asi 100 $\times$ menší než hodnoty drsnosti ZrO_2 povlaků. Vzhledem k velikosti buněk je okolo 50 μm by mohl povlak při biologických testech přinést pozitivní biologickou aktivitu.

Protože se osvědčila pouze jedna kombinace technologických parametrů pro přípravu povlaků, byla zjišťována pouze drsnost takto připraveného povlaku.

5.2.2. Testování soudržnosti povlaku a substrátu indentační zkouškou

Pro hodnocení vzájemné soudržnosti slinutých povlaků a substrátů před biologickými testy byly u každého typu vzorku provedeny indentační testy. Tyto indentační testy ukázaly velmi dobrou soudržnost povlaku se substráty Z1 a A1 s aritmetickou střední výškou drsnosti $\text{SRA} = 0,174$ a 0,258 μm . Díky odlišným teplotním roztažnostem se v povlacích tvořily drobné praskliny, které by mít vliv na biologické testy keramik. Na SiO_2 vznikaly velké praskliny, které lze zdůvodnit zhruba 20 $\times$ nižším koeficientem teplotní roztažnosti SiO_2 než má ZrO_2 .

5.2.3. Biologické dilatační in-vitro testy keramických povlaků ve výluhu

Byla provedena 24 hodinová kultivace in-vitro na buněčných liniích epiteliální HeLa, fibroblastoidní L929 a osteoblastoidní MG63. Každé dvě minuty byl automaticky zhotoven snímek rozhraní vzorek - kultivační lahev a z těchto snímků byla vypočtena buněčná dilatace v závislosti na čase. Dále byla provedena 72 hodinová kultivace k hodnocení pokryvu povrchu buňkami [38]. Po ukončení kultivace byly vzorky vysušeny pomocí metody CPD a vyfotografovány na REM.

Hodnocení nanokrystalických povlaků biologickými výluhovými in-vitro testy

Nejvyšší rychlost dilatace byla dosažena u epiteliální linie Hela u vzorku, kde byl ZrO_2 povlak nanesen na substrát Z1. Vysoká rychlost dilatace také byla zaznamenána u povlaku ZrO_2 , který byl vytvořen na substrátu SiO_2 . Maximální dilatace byla však nižší u této linie než u linie, L929 a MG63. Toto mohlo být způsobeno vyšší drsností povrchu substrátu (viz. strana 91), na kterou příznivě reagují buňky osteoblastoidní linie MG63 [46], a naopak nepříznivě buňky linií L929 a HeLa. Nejnižší rychlost dilatace byl zaznamenán u linie L929, kde byl povlak nanesen na substrát Z1. Buňky linie Hela naopak měly vysokou rychlost dilatace, ale nižší maximální dosaženou dilataci o cca 10 %. Buňky na nanometrovém povlaku ZrO_2 se nacházely v různých stádiích mitózy a dělily se. Na jejich površích byly výběžky a vesikly, což je pozitivní reakce buňky na materiál. Čím je jich více, tím je materiál pro buňky více aktivní.

V nanokrystalickém povlaku ZrO_2 byly při snímání na SEM objeveny praskliny o šířkách do $10\mu\text{m}$, které neměly viditelný vliv na aktivitu buněk.

Vzhledem k širokému rozpětí výsledků biologických testů není možné jednoznačně potvrdit vyšší bioaktivitu nanometrového povlaku než mikrometrového povrchu. Všechny testované kombinace materiálů jsou biologicky vhodné materiály. Při testování osteoblastoidní linie MG63 bylo dosaženo lepších výsledků na nanopovlaku ZrO_2 dopovaném 3 mol % Y_2O_3 , což naznačuje jeho vhodnost pro použití na kostních implantátech.

6. ZÁVĚR

Nejprve byly uniaxiálním lisováním a elektroforetickou depozicí připravena objemová keramická tělesa. Vhodnými kombinacemi teplot slinování a délky prodlevy byly získány slinuté keramiky s vyšší hustotou než 95,6 % a střední velikostí zrn od 100 do 2740 nm. Povrch těchto vzorků byl upraven leštěním a poté byla ještě navíc polovina vzorků tepelně leptána pro vytvoření povrchového reliéfu zrn. U všech připravených keramik byla provedena keramografická analýza. U takto připravených vzorků byly provedeny biologické testy hodnocení cytotoxicity in-vitro jak ve výluhu (buněčné linie MG63, L929, HeLa) tak přímé (buněčná linie MG63).

Byla navržena a optimalizována technologie přípravy nanokrystalických povlaků ZrO_2 (tj. vytvoření a slnutí) nanosených na keramických substrátech (Al_2O_3 , ZrO_2 a SiO_2). Dále byla otestována soudržnost povlaků s keramickými substráty mikroindentačním testem tvrdosti. Vyhovující povlaky byly biologicky testovány kultivačním testem ve výluhu cytotoxicity in-vitro se třemi buněčnými liniemi MG63, L929 a HeLa. Byl navržen a experimentálně ověřen matematický model dilatace buněk na oxidových keramikách.

Shrnutí výsledků

Objemové keramiky: Dilatační testy výluhové in-vitro

Výsledky biologických dilatačních testů osteoblastoidní buněčné linie MG63 na keramikách Z1 a Z2 ukázaly, že u keramiky s menším zrnem Z1 (100,2 nm) dosáhly buňky vyšší rychlosti dilatace než u keramiky Z2 se zrnem větším (118,9 nm). Maximální dilatace buněk byla poněkud vyšší v přítomnosti materiálu Z2 s nižším obsahem dopantu Y_2O_3 . Při testování materiálu A1 (střední velikost zrn 519,8 nm) touto osteoblastoidní buněčnou linií, byla rychlost dilatace buněk podobná jako v přítomnosti keramiky Z1, i přesto že byla velikost zrn A1 zhruba 5× větší než u Z1. Z toho můžeme usuzovat, že by obsah dopantu Y_2O_3 mohl mít vliv na dilataci buněk osteoblastoidní linie MG63.

Objemové keramiky: Dilatační testy přímé in-vitro

Dilatační testy přímé (plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami) byly zkoušeny na sadách vzorků objemových keramik ZrO_2 , Al_2O_3 , HA, vrstevnaté kompozity (MLOCCv1 a v2) a lepené keramické kompozity $ZrO_2 \times Al_2O_3$. Pro biologické testy byla použita pouze osteoblastoidní buněčná linie MG63. Při testu sady ZrO_2 keramik se projevil u keramik Z2 a Z1 s zvýrazněným reliéfem zrn (tepelně leptané) příznivý vliv obsahu nanozrn na dilataci buněk. Z1 a Z2 keramiky dosáhly nejvyšší plochy pokryvu dilatovanými buňkami. U keramik s leštěným povrchem tento výsledek zaznamenán nebyl. U keramik Al_2O_3 byla maximální plocha dilatace buněk na keramice A4 se střední velikostí zrn větší než 1 μm . Vzhledem k velikosti zrn se nemohl projevit vliv nanozrn na bioaktivitu keramik. Při biologickém testu vrstevnatého kompozitu MLOCCv1 se projevila vyšší selektivita buněk k materiálu ZrO_2 a to jak na keramice

s povrchovým reliéfem tak i bez něj (leštěné), kde byl však efekt nižší. Tato skutečnost byla potvrzena biologickým testem vrstevnatého kompozitu MLOCCv2. Lepený kompozit $Z7 \times A5$ při biologických testech dosáhl maximální plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami po 4 hodinách trvání testu. Opět se výrazněji projevila selektivita buněk k ZrO_2 na tepelně leptaných materiálech s vyšší povrchovou drsností i přes vysoký obsah dopantu Y_2O_3 (8 mol. %) v keramice Z7. Výsledky dalšího lepeného kompozitu $Z6 \times A3$ při biologických testech opět potvrdily vyšší selektivitu buněk k ZrO_2 a nebyl zaznamenán nepříznivý vliv obsahu dopantu Y_2O_3 (3 mol. %) na životaschopnost buněk. Také u tohoto kompozitu byla vyšší selektivita buněk na povrchu tepelně leptaném. Poslední lepený kompozit $Z4 \times A2$ dosáhl nejmenší plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami i přes nejmenší velikosti zrn této dvojice keramik. I zde byla potvrzena selektivita dilatovaných buněk k ZrO_2 keramice.

Většina výsledků biologických testů nepotvrdila negativní vliv Y_2O_3 na životaschopnost buněk.

Nanopovlaky ZrO_2

Byla studována a optimalizována metoda nanášení nanostrukturního povlaku ZrO_2 pomocí sprejování koloidní suspenze na keramické substráty.

U slinutých bezdefektních povlaků ZrO_2 byly provedeny výluhové dilatační in-vitro testy, kde jedním z vlivů v soustavě mohl být i vliv obsahu dopantu Y_2O_3 u keramik ZrO_2 . Pokryv všech povlaků buňkami byl po 72 hodinovém testu celistvý a na povrchu buněk se nacházely výběžky a vesikly, které představovaly pozitivní reakci buněk na nanokrystalický povlak. Vliv obsahu Y_2O_3 na bioaktivitu nebyl prokázán.

7. LITERATURA

- [1] RAVAGLIOLI, A, KRAJEWSKI, A. *Bioceramic : Materials-Properties-Applications*. 1th edition. [s.l.] : Springer, 1991. 444 s. ISBN 0412349604.
- [2] BEST, S.M., et al. Bioceramic: Past present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008, vol. 2008, is. 28, s. 1319-1327.
- [3] *Ceramic and composite materials : New research*. Caruta B.M. 1st edition. Google online book : Nova Publisher, 2006. 245 s. ISBN 1-59454-370-4.
- [4] HEIMANN, Robert B. *Materials science of crystalline bioceramics: A review of basic properties and applications*. CMU Journal. 2002, vol. 1, no. 1, s. 23-46.
- [5] *High-tech ceramics: viewpoints and perspectives : Medical applications of ceramics*. Gernot Kistorz. 1st edition. [s.l.] : Academic Press Limited, 1989. 400 s. ISBN 9780124219502.
- [6] CAO, Wanpeng, HENCH, Larry L. *Bioactive materials*. *Ceramic International*. 1996, no. 22, s. 493-507.
- [7] *Technologie keramiky elektronická učebnice, kap. 13 Biokeramika a biomimetické procesy*,
http://www.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic_Technology/SM-Lect-13-C.pdf
- [8] HENCH, Larry L. *Bioceramics: From concept to clinic* *J. Am. Ceram. Soc.*. 1991, vol. 74, no. 7, s. 1487-1510.
- [9] MENDONCA, Gustavo, et al. *Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography*. *Biomaterials*. 2008, vol. 29, is. 28, s. 3822-3835.
- [10] LIU, Huinan, WEBSTER, Thomas Jay. *Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools : Review*. *Biomaterials*. 2007, vol. 28, is. 2, s. 354-369.
- [11] CARTER, C. Barry, NORTON, M. Grant. *Ceramic materials : Science and engineering*. 1st edition. New York: Springer, 2007. 716 s. ISBN 0-387-46271-6.
- [12] SCHMALZ, Gottfried, ARNEHOLT-BINDSLEV, Dorothea. *Biocompatibility of dental materials*. 1st edition. Berlin: Springer, 2009. 379 s. ISBN 978-3-540-77781
- [13] BANIS, R.: *Energetische Testverfahren und angewandte Kinesiologie - ein kritischer Überblick*. [Energetic test methods and applied kinesiology - a critical review] *Erfahrungsheilkunde* 45. 1996. 245-250.
- [14] FERRACANE, J.L.: *Elution of leachable components from composites*. *J Oral Rehabil* 21, 1994. 441-452.
- [15] FOUAD, A.F., WALTON, R.E., RITTMAN, B.R.: *Healing of induced periapical lesions in ferret canines*. *J Endod* 19, 1993. 123-129.
- [16] FRANKILD, S., VOLUND, A., WAHLBERG, J.E., ANDERSEN, K.E.: *Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy*. *Acta Derm Venereol* 80, 2000. s. 256-262.

- [17] FRIEDL, K.-H., SCHMALZ, G., HILLER, K.-A., SHAMS, M.: Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur J Oral Sei* 105, 1997. s. 81-85.
- [18] FUSS, Z., TROWBRIDGE, H., BENDER, LB., RICKOFF, B., SORIN, S.: Assessment of reliability of electrical and thermal pulp testing agents. *J Endod* 12, 1986, s. 301-305.
- [19] GARHAMMER P., SCHMALZ G., HILLER KA., REITINGER T., STOLZ W.: Patients with local adverse effects from dental alloys: frequency, complaints, symptoms, allergy. *Clin Oral Investig* 5, 2001. s. 240-249.
- [20] WEBSTER, Thomas J., SIEGEL, Richard W., BIZIOS, Rena. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999, vol. 20, is. 13, s. 1221-1227.
- [21] WEBSTER, Thomas J., Caleletdin ERGUN, Robert H. DOREMUS a Rena BIZIOS. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Research*. 2000, **51**(3), 475-483.
- [22] WEBSTER, Thomas J., Caleletdin ERGUN, Robert H. DOREMUS, Richard W. SIEGEL a Rena BIZIOS Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. Elsevier, 2000, **21**, 1803-1810.
- [23] WEBSTER, Thomas J., Celaletdin ERGUN, Robert H. DOREMUS a Richard W. SIEGEL. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2001, **22**(11), 1327-1333.
- [24] GUTWEIN, Luke G. a Thomas J. WEBSTER. Osteoblast and chondrocyte proliferation in the presence of Alumina and Titania nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 2002(**4**), 231-238.
- [25] PRACHÁR, Patrik. *Povrchová úprava chromkobaltové slitiny nitridem titanu nebo nitridem zirconia pro užití v orální implantologii*. Brno, 2007. Doktorská disertační práce. Lékařská Fakulta, Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. MUDr. Jiří Vaněk, CSc.
- [26] CAMILO, C. C., C. A. FORTULAN, R. A. IKEGAMI, A. R. SANTOS Jr. a B. de M. PURQUERIO. Manufacturing of porous Alumina scaffolds with bio-glass and HAp coating: Mechanical and in-vitro evaluation. *Key Engineering Materials*.
- [27] MACHADO, Anna Cristina P., Marize V. OLIVEIRA, Robson P. PEREIRA, Yasmin R. CARVALHO a Carlos Alberto A. CAIRO. In vivo evaluation of porous Titanium implants with biomimetic coating. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications, 2009, **21**(396-398), s. 179-182.
- [28] VALERIO, P., et al. Biocompatibility evaluation of dentine, enamel and bone derived hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications 2004, **18**(254-256), s. 837-840.

- [29] HADRABA, H. DRDLIK, D. CHLUP, Z. MACA, K. DLOUHY, CIHLAR, J.: J. Eur. Ceram. Soc. (in press) doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2011.09.004
- [30] RAHAMAN, Mohamed N. *Sintering of ceramics*. Boca Raton: CRC Press, 2007, 388 s. ISBN 08-493-7286-0.
- [31] LIN, X.Y., et al., *Evaluation of bioactivity and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite/collagen composite in vitro*. Bioceramics, Vol 17, 2005. **284-286**: p. 553-556.
- [32] PAE, Ahran, Lee HESSU, Kim HYEONG-SEOB, Baik JIN a Yi-Hyung WOO. Cellular attachment and gene expression of osteoblast-like cells on zirconia ceramic surfaces. *J Kor Acad Prosthodont*. 2008, roč. 43, č. 3, s. 227-237.
- [33] WEBSTER, T.J., E.L. HELLENMEYER, and R.L. PRICE, *Increased osteoblast functions on theta plus delta nanofiber alumina*. Biomaterials, 2005. **26**(9): p. 953-960.
- [34] CAMILO, C.C., et al., *Manufacturing of Porous Alumina Scaffolds with Bio-glass and HAp Coating: Mechanical and In vitro Evaluation*. Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 679-682.
- [35] ARIN, M., H. YAZICI, and G. GOLLER, *Biocompatibility Properties of ZrO(2) Ceramics and ZrO(2)-TiN Composites*. Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 51-54.
- [36] LEE, Sungho, Toshihoro KASUGA a Katsuya KATO. Effects of Y₂O₃ particle size on cytotoxicity and cell morphology. *Journal of the ceramic society of Japan*. 2010, roč. 6, č. 118, s. 428-433.
- [37] BÄCHLE, M., BUTZ, F., HÜBNER, U., BAKALINIS, E., KOHAL, R., J., *Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies*. Clinical Oral Implants Research, 2006. **18**(1): p. 7.
- [38] LUO, Xiaoting, Zheng GAO, Shigui YAN, Wei DENG, Wenshu ZHANG a Weigi YAN. Functional behaviour of human periodontal ligament cells around various dental implants. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications, 2008, **20**(361-363), s. 837-840.
- [39] DULGAR-TULLOCH, A.J., R. BIZIOS, and R.W. SIEGEL, *Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **90A**(2): p. 586-594.
- [40] YAMASHITA, Daisuke, Kenji KANBARA, Miho MACHIGASHIRA, Motoharu MIYAMOTO, Hideo SATO, Yuchi IZUMI a Seiji BAN. Proliferation of osteoblast-like cells on Zirconia/Alumina nanocomposite. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications, 2007, **20**(361-363), s. 1099-1102.

- [41] AFFATATO, S.T., R.; TADDEI, P.; ROCCHI, M.; FAGNANO, C.; CIAPETTI, G.; TONI, A., *Advanced Nanocomposite Materials for Orthopaedic Applications. I. A Long-Term In Vitro Wear Study of Zirconia-Toughened Alumina*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. **78 B**(1): p. 7.
- [42] KIM, D.J., et al., *Cellular response assessment to zirconia-alumina composite: An in vitro experimental study*. Bioceramics 18, Pts 1 and 2, 2006. **309-311**: p. 433-436.
- [43] HE, X., et al., *Zirconia toughened alumina ceramic foams for potential bone graft applications: fabrication, bioactivation, and cellular responses*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2008. **19**(7): p. 2743-2749.
- [44] ROUALDES, O., et al., *In vitro and in vivo evaluation of an alumina-zirconia composite for arthroplasty applications*. Biomaterials, 2010. **31**(8): p. 2043-2054.
- [45] HASHIGUCHI, M., et al., *Effect of surface treatments on bonding strength of zirconia to dental cements*. Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 575-578.
- [46] KIM, D.J., et al., *Zirconia/alumina composite dental implant abutments*. Bioceramics, Vol 16, 2004. **254-2**: p. 699-702.

8. CURICULUM VITAE

Aleš Matoušek

Osobní údaje

Datum a místo narození: 5.5 1978, Zlín

Adresa trvalého bydliště: Březnice 496, 760 01 Zlín

Dosažené vzdělání:

V roce 1997 jsem ukončil středoškolské vzdělání na SPŠ Zlín Třída T. Bati 4187 obor strojírenství

V roce 2003 jsem ukončil bakalářské studium na Fakultě Strojního Inženýrství VUT v Brně, obor Materiálové inženýrství. Téma bakalářské práce bylo: Mechanické vlastnosti ADI litin

V roce 2006 jsem ukončil magisterské studium na Fakultě Strojního Inženýrství VUT v Brně, obor Materiálové inženýrství. Téma diplomové práce bylo: Keramografická analýza dentálních materiálů a její aplikace ve stomatologii.

V letech 2006 - 2012 jsem absolvoval postgraduální doktorské studium na Ústavu materiálových věd a inženýrství, Odboru keramiky a polymerů. V roce 2009 jsem úspěšně složil státní doktorskou zkoušku

Zaměstnání a pedagogická praxe

Od června roku 2005 do července 2011 jsem pracoval jako technický pracovník na UMVI - OKaP

Od roku 2006 do prosince 2011 jsem pracoval jako výzkumný pracovník ve Stomatologickém Výzkumném Centru LF MU Brno

Od srpna 2011 jsem zaměstnán jako mladý vědecký pracovník ve Středoevropském Technologickém Institutu Brno obor Pokročilé Materiály

2006 - 2012 výuka cvičení Některých materiálů

Další projekty a zkušenosti

2006 dvoutýdenní intenzivní kurz Základy Biologického Experimentu v Ústavu nanobiologie a strukturní biologie AVČR v.v.i. Nové Hradce

2009 týdenní intenzivní kurz COST of Training school v Thunu, Švýcarsko

Jazykové znalosti

Anglický jazyk - aktivní znalost

Německý jazyk - mírně pokročilý

Ruský jazyk - mírně pokročilý

Odborné znalosti

Oxidové keramiky, keramografie, SEM, LM, biologické kultivační testy.

9. ABSTRACT

The aim of this work is to study of relations between grain size and bioactivity of oxide ceramics, specifically ZrO_2 , Al_2O_3 and HA. Ceramic materials with grain size from 100 nm up to 10 μm , with various surface roughness, were tested for its biocompatibility/bioactivity. Ceramographic analysis was performed for all tested materials to precisely describe microstructures. Biological properties of the ceramic materials were tested via dilation tests directly in-vitro and by in-vitro extraction. Three cell culturing lines: osteoblast MG63, fibroblast L929, and epithelioid HeLa, were used for our testing. An influence of the grain size on the biological response was only found for the ceramic materials which had been thermally etched. The thermally etched nanocrystalline samples had larger areas covered by cells than ceramics with coarse grain microstructure. Biological tests on layered composites $\text{Al}_2\text{O}_3 \times \text{ZrO}_2$ showed the cell selection determined by the type of material, where ZrO_2 surfaces were preferably covered. Improved biological response of nanocrystalline ZrO_2 was demonstrated on ceramic ZrO_2 , Al_2O_3 and SiO_2 substrates with nanocrystalline coating of ZrO_2 . In this work a novel technological process for the formation of defect-free coatings was developed. Sintered coatings were tested using in-vitro technique with cell line HeLa, L929 and MG63 for up to 72 hours. The results of the biological tests of nanocrystalline coatings were consistent with results from the bulk nanocrystalline thermally etched ZrO_2 ceramics.