

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



# FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

# KOMPOZITNÍ STOMATOLOGICKÉ MATERIÁLY -STRUKTURA, ANALÝZA A VLASTNOSTI

COMPOSITE DENTAL BIOMATERIALS - STRUCTURE, ANALYSIS AND PROPERTIES

DIZERTAČNÍ PRÁCE DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

Ing. ALEŠ MATOUŠEK

VEDOUCÍ PRÁCE SUPERVISOR Prof. RNDr. JAROSLAV CIHLÁŘ, CSc.

BRNO 2012

# ABSTRAKT

V této práci byl zkoumán vliv velikosti zrn na bioaktivitu oxidových keramik ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a HA. Biologická aktivita byla porovnána u keramik od velikosti zrn 100 nm až po 10 µm a různou povrchovou drsností. K přesnému popsání testovaných materiálů byly provedeny keramografické analýzy. K hodnocení biologických vlastností keramik byly použity dilatační testy in-vitro výluhové a přímé. Byly použité buněčné testovací linie osteoblastoidní MG63, fibroblastoidní L929 a epiteliální HeLa. Vliv velikosti zrn na biologickou odezvu keramik se projevil pouze u těles s tepelně zvýrazněným reliéfem. U tepelně leptaných nanokrystalických vzorků byla zjištěna vyšší plocha pokryvu buněk než u keramik s hrubší mikrostrukturou. Biologické testy na vrstevnatých kompozitech Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>×ZrO<sub>2</sub> ukázaly selekci buněk podle typu s preferenčním pokrytím povrchu ZrO<sub>2</sub>. Zvýšená materiálu. biologická odezva nanokrystalického ZrO<sub>2</sub> byla detailně ověřena na keramických substrátech ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O3 a SiO<sub>2</sub> s nanokrystalickým povlakem ZrO<sub>2</sub>. Byl nalezen optimální technologický postup pro vytvoření nedefektních povlaků. Slinuté povlaky byly testovány in-vitro buněčnými liniemi HeLa, L929 a MG63 po dobu až 72 hodin. Výsledky biologických testů nanokrystalických výsledkům objemových nanokrystalických keramik ZrO<sub>2</sub> se povlaků odpovídaly zvýrazněným reliéfem.

## ABSTRACT

The aim of this work is to define relations between grain size and bioaktivity of oxide ceramics, specifically ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and HA. Ceramic materials with grain size from 100 nm up to 10 µm, with various surface roughness, were tested for its bioactivity. Ceramography 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 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>×ZrO<sub>2</sub> showed the cell selection determined by the type of material, where ZrO<sub>2</sub> surfaces were preferably covered. Improved biological response of nanocrystalline ZrO<sub>2</sub> was demonstrated on ceramic ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> substrates with nanocrystalline coating of ZrO<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub> ceramics.

# KLÍČOVÁ SLOVA

stomatologické materiály, nanostrukturní biopovlaky, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA, SiO<sub>2</sub>, velikost zrn, povrchová drsnost, bioaktivita, biokompatibilita, buněčná dilatace, HeLa, L929, MG63, buněčná selekce, světelná mikroskopie, AFM, REM

### KEY WORDS

dental materials, nanostructured bio-coating, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA, SiO<sub>2</sub>, grain size, surface roughness, bioactivity, biocompatibility, cell dilatation, HeLa, L929, MG63, cell selection, light microscopy, AFM, SEM

MATOUŠEK, A. Kompozitní stomatologické materiály - struktura analýza a vlastnosti, 2012. 122s Disertační práce na Fakultě strojní, Vysokého učení technického v Brně, Ústavu Materiálových věd a inženýrství.

Vedoucí dizertační práce: Prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc.

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty strojní VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FSI VUT.

podpis doktoranda

# Poděkování

Chtěl bych tímto poděkovat mému školiteli Prof. RNDr. Jaroslavovi Cihlářovi, CSc. za odborné vedení a připomínkování mé dizertační práce. Dále pak Prof. MUDr. Martině Kukletové, CSc. za vedení a konzultace ve stomatologické problematice, Ing. Vítězslavovi Březinovi za vedení při biologických testech a všem ostatním, kteří mi svými vědomostmi a nezištnou pomocí pomohli vypracovat tuto dizertační práci.

# OBSAH

1.	Úvod.		1
2.	Souča	sný stav řešení problematiky	3
3.	Cíl pra	áce	8
4.	Exper	imentální část	9
	4.1	Materiály	9
	4.1.1	Objemové keramiky a kompozity	9
	4.1.2	Povlakované materiály	10
	4.1.3	Buněčné linie použité pro in vitro testy	10
	4.2	Postupy	10
	4.2.1	Příprava objemových keramik a kompozitů	10
	4.2.2	Příprava povlakovaných materiálů	12
	4.2.3	Analytické metody k určení mechanických vlastností	14
	4.2.4	Biologické dilatační testy in-vitro cytotoxicity	15
5.	Výsle	dky a diskuze	18
	5.1	Objemové keramiky a kompozity	18
	5.1.1	Příprava a charakterizace objemových keramik a kompozitů	18
	5.1.2	Matematický model kinetiky dilatace buněk v přítomnosti keramických materia	álů. 47
	5.1.3	Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik a kompozitů ve výluhu	. 48
	5.1.4	Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik v přímém kontaktu	55
	5.2	Povlakované materiály	80
	5.2.1	Studium technologie přípravy povlakovaných materiálů	80
	5.2.2.	Hodnocení povrchových vlastností keramických substrátů a povlaků	90
	5.2.3.	Testování soudržnosti povlaku a substrátu indentační zkouškou	92
	5.2.4.	Biologické dilatační in-vitro testy povlakovaných materiálů ve výluhu	98
6.	Závěr		108
7.	Literá	rní odkazy	110
8.	Příloh	у	114

# 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 [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. Většinou však za nějaký čas dochází k zapouzdření implantátu měkkou tkání [5, 6]. Jako bioinertní se například chovají například uhlíkaté materiály, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ZrO<sub>2</sub> a TiO<sub>2</sub>. Bioaktivní keramiky [7] které aktivují vznik přímé vazby s obklopujícími tkáněmi [8]. Většinu takových keramik není možné přímo zatěžovat vzhledem k jejich nízké mechanické pevnosti a lomové houževnatosti. Tyto keramiky jsou proto často užívány jako povlak kovových implantátů nebo výplně kostí [9]. Klasickým příkladem bioaktivních materiálů [4, 7, 10] je hydroxyapatit (HA) Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH. Může být také používán v porézní formě (pórovitost 55 - 70 %), která umožňuje prorůstání kostních tkání do struktury HA. Tak dochází k dokonalému spojení tkání s keramikou. 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 [11]. Vstřebatelné keramiky [7] jsou postupně rozloženy tělem a vstřebány. Tyto materiály neprodukují během rozkladného procesu žádné škodliviny [3]. Biokeramický implantát zůstává v těle jen po dobu potřebnou k vytvoření nové tkáně a ta jej postupně nahrazuje. Tyto materiály se dnes běžně používají k rekonstrukcím kostí. Vstřebatelnou biokeramikou je např.  $Ca_3(PO_4)_2$  - (TCP) [4].

Kromě monolitických keramických materiálů existují materiály také keramické kompozity. Většina keramických materiálů vykazuje v mikrostruktuře jistý stupeň heterogenity a neuniformity. Ale existují také keramiky, u nichž je mikrostrukturní heterogenita a neuniformita vytvářena záměrně. Jedná se o kompozity a funkčně gradientní materiály [12]. Důvodem pro výrobu keramických kompozitů je zlepšení fyzikálních, mechanických a biologických vlastností implantátů.

Kompozitní biomateriály vznikají kombinacemi dvou nebo více makroskopicky odlišných biomateriálů. Přenos sil přes fázové rozhraní makroskopicky odlišných biomateriálů rozhoduje o celkových mechanických a fyzikálních vlastnostech kompozitů. Biokompozity mohou být připraveny jako: Částicové kompozity, ve kterých je matrice vyztužena částicemi plniva (ZrO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>,...) [3]. Obvykle mají aspoň jednu nespojitou fázi (plnivo) ve spojité fázi (matrici). Tyto jsou obvykle izotropní a mají dobrou houževnatost. Příkladem jsou polymerní kompozity plněné SiO<sub>2</sub>. Vláknové kompozity jsou kompozity, u kterých je výztuha ve formě vláken v matrici (např. uhlíkové vlákna v matrici z polyetylénu - PE). Vrstevnaté kompozity na, kterých je vrstva matrice střídána vrstvou výztuhy [10, 13] (např. keramické kompozity vrstva Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - vrstva ZrO<sub>2</sub>). Zvláštní skupinou vrstevnatých kompozitů jsou biokeramické povlaky [8]. Jejích cílem je gradovat mechanické, fyzikální a biologické vlastnosti implantátu (substrátu) ať už kovového (např. slitiny Ti-12Mo-6Zr-2Fe, Ti-15Mo-5Zr-3Al,...) [15], či keramického (např. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>,...) [16]. Někdy je obtížné vyrobit těleso z objemové nanostrukturní keramiky a schůdnější cestou je vytvoření nanokrystalického keramického povlaku na materiálech s hrubší mikrostrukturou.

K využití nových implantačních materiálů je třeba, aby splňovaly základní bioaktivní požadavky. Biokompatibilita (tkáňová kompatibilita) popisuje odezvu biologické tkáně na přítomnost cizorodého tělesa (například implantátu).

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. [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. 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 ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY

V průběhu posledních 30 let byla zkoumána řada keramik použitelných pro implantáty, ale jen málo z nich bylo pro klinické aplikace vhodné. Aby byly keramické implantáty klinicky úspěšné, je třeba současně dosáhnout stabilní spojení s okolní tkání a mechanickou funkčnost implantátu odpovídající nahrazené hostitelské tkáni.

Jedním z hlavních důvodů rostoucí popularity keramických implantátů je jejich zanedbatelná toxicita.

Nejběžnější odezvou organismu na implantát je jeho zapouzdření nepřilnavým vláknitým pouzdrem. Tato vazivová tkáň izoluje implantát od těla hostitele. Jedná se o ochranný mechanismus. Tuto mezifázovou odezvu organizmu hostitele [25] způsobují kovy, keramiky a většina polymerů.

I u biologicky netečných keramik, jako jsou oxid zirkoničitý nebo hlinitý, organismus na jejich rozhraní také vytvoří tato pouzdra. Tloušťka vazivové vrstvy závisí na faktorech uvedených v tabulce 2.1.

Strana tkáně	Strana implantátu	
Druh tkáně	Složení implantátu	
Zdraví tkáně	Fáze v implantátu	
Stáří tkáně	Fáze hranic	
Cirkulace krve ve tkáni	Povrchová morfologie	
Cirkulace krve na rozhraní	Porozita povrchu	
Pohyb na rozhraní	Chemické reakce	
Mechanické zatížení	Mechanické zatížení	

Tabulka 2. 1 Faktory ovlivňující odezvu na rozhraní implantát - tkáň [25]

Chemická stabilita oxidů hlinitého a zirkoničitého způsobuje, že mezifázová vazivová vrstva je velmi slabá. Materiály chemicky reaktivnější, jako kovy vytvářejí mnohem silnější mezifázové vrstvy než keramiky.

Mechanismus připojení tkáně k implantátu, přímo souvisí s odezvou tkáně na implantačním rozhraní. Podle typu odezvy dělíme biokeramické materiály do čtyř skupin uvedených v tabulce 2.2.

Tabulka 2.2 Typy tkáňových připojení k biokeramickým implantátům [25]

Druh implantátu	Druh připojení	Příklad
(1) Téměř inertní	Mechanické spojení	$Al_2O_3$ , $ZrO_2$
(2) Porézní	Vrůstání tkáně do pórů	HA, HA povlakované
( )	(Biologicka fixace)	porezní kovy
(3) Bioaktivní	Mezifázová vazba s tkáněmi	Bioaktivní skla
(3) BIOAKIIVIII	(Bioaktivní fixace)	Bioaktivní sklokeramika
(4) Vstřebatelné	Nahrazeny tkáněmi	TCP, Bioaktivní skla



Obr. 2.1 Spektrum bioaktivit pro různé biokeramické implantáty: relativní poměr bioreaktivity a časové závislosti formace vazby kosti na rozhraní implantátu.((A) 45S5 Bioglass<sup>®</sup>, (B) KGS Cerevital<sup>®</sup>, (C) 55S4.3 Bioglass<sup>®</sup>, (D) A/W sklokeramika, (E) HA, (F) KGX Cerevital<sup>®</sup> and (G) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) (Převzato z L. L. Hench, "Bioceramic: From Concept to Clinic,"J. Amer. Ceram. Soc., 74 (1991) 1487-570)

Relativní chemická aktivita různých keramik je porovnána na obr. 2.1. Tato aktivita má vztah k tvorbě mezifázové vazby implantátu s kostí. Typ (1) je téměř netečný, implantát netvoří vazbu s kostí (je pouze zapouzdřen). Typ (2) je porézní implantát, který tvoří mechanickou vazbu s kostí vrůstáním do pórů. Typ (3) je bioaktivní implantát, který tvoří vazbu s kostí díky biochemickým reakcím na rozhraní. Typ (4) je vstřebatelný implantát, který je nahrazen kostní tkání. Relativní úroveň reaktivity implantátu také ovlivňuje tloušťku mezifázové vrstvy mezi materiálem a tkání [25].

Implantáty typu (1), (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a ZrO<sub>2</sub>) jsou téměř netečné a tvoří nepřilnavou vláknitou vrstvu na svém rozhraní, která je velmi tenká. Jsou klinicky úspěšné. Protože jsou, však téměř netečné, a vytvořené vazivové pouzdro je pouze několik set mikrometrů tenké a může tak dojít k uvolnění implantátu, které může způsobit frakturu implantátu nebo přiléhající kosti [25].

Typ (2), porézní keramiky a HA povlaky na porézních kovech snižují pravděpodobnost uvolnění implantátu. Vrůstáním kosti do povrchových pórů vzniká velká styčná plocha mezi implantátem a tělem hostitele. Tuto metodu připojení nazýváme *biologická fixace*, která je schopna odolávat komplikovanějším tlakovým stavům než implantáty typu (1). Existuje pouze jedno omezení, a to, že průměr pórů musí být nejméně 100 µm, aby mohla být vrostlá tkáň pojivová zásobena krví. Když není velikost pórů vyšší než 100 µm, nedojde k vytvoření zásobovací cévní tkáně. Pokud se implantát pohybuje vzhledem ke svému umístění, může dojít k odříznutí buněk a tím k jejich smrti, zánětům a zničení mezifázové stability. Když nemá porézní kovový implantát s velkou styčnou plochou s tkání biokeramický povlak (např. HA), může vzniknout ohnisko koroze a uvolňování kovových iontů do tkání. Toto může zapříčinit různé druhy klinických problémů. Povlakovaný porézní kovový materiál HA snižuje toto nebezpečí a zároveň urychluje vrůstání kostí do pórů. Tyto povlaky se však časem v organismu rozpustí a dochází ke snížení meze pevnosti tohoto rozhraní [25].

Vstřebatelné implantáty typu (4) jsou navržené tak, aby se rozpouštěly postupně a nakonec byly nahrazeny přirozenými tkáněmi. U takovýchto implantátů není žádná mezivrstva pojivové tkáně anebo je velmi tenká. Toto je optimální řešení z hlediska mezifázové stability, které vede k regeneraci tkání namísto jejich nahrazení. Problematické je splnit požadavky meze pevnosti, protože některé materiály se rozpouští velmi rychle a jiné naopak velmi pomalu, což závisí na kombinaci vlastností materiálu implantátů a sousedících tkání [25].

#### Teoretický základ práce

Teoretickým základem mé práce je výzkum Thomase J. Webstera, jehož první článek týkající se adheze osteoblastů na nanostrukturní keramice pochází z roku 1999 [26]. Keramické substráty použité v této práci byly tři. První substrátem bylo borosilikátové sklo (referenční vzorek), druhý substrát byl slinutý disk  $\gamma$ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a třetím substrátem byl slinutý disk TiO<sub>2</sub> (10 hm. % rutilu a 90 hm. % anatasu). 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 [27], má název "Specifické proteiny zprostředkující zvýšenou adhezi osteoblastů na nanofázové keramice". Testované materiály (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a TiO<sub>2</sub>), 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zvýšila. Pouze koncentrace proteinu laminin byla vyšší u mikrozrnné keramiky. Porovnání koncentrací proteinů u mikrostrukturního a nanostrukturního hydroxyapatitu dalo obdobné výsledky jako v případě oxidové keramiky Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Mikrostrukturní HA dosahoval vyšší koncentrace pouze u albuminu a lamininu.

Práce publikovaná roku 2000 má název "Rozšířené funkce osteoblastů na nanofázové keramice". [28]. Cílem této práce bylo studium bioaktivity osteoblastické primokultury, která byla získána z neonatální krysí lebky. Testovací vzorky materiálů Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramice.

Další publikace z roku 2001 [29] má název "Rozšířená funkce osteoklastických buněk na nanofázové keramice". Použité testovací materiály jsou totožné jako v předchozích pracích, a to nanočásticové Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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 mikrokrystalických 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 [30] má název "Dělení osteoblastů a chondrocytů za přítomnosti nanočástic  $Al_2O_3$  a TiO<sub>2</sub>" a zabývá se vlivem nanočástic  $Al_2O_3$ , TiO<sub>2</sub> na osteoblastické buňky CRL - 11372. Tyto nanočástice ( $Al_2O_3$ , TiO<sub>2</sub>) mohou vznikat opotřebením při vzájemném kontaktu např. kloubní hlavice a kloubní jamky. K testování byly použity částice  $Al_2O_3$  (23 nm) a TiO2 (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<sub>2</sub> / 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.

Určitou 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 dřeň/dentin určuje kompatibilitu materiálu s dření 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. Tyto zvířecí modely nám poskytují nejlepší možnou simulaci reakce organismu na daný materiál. Pro určení nechtěných reakcí se používají menší laboratorní zvířata - krysy a morčata. Poté se přechází na větší laboratorní zvířata - psy a primáty. Je nutné dosáhnout co nejvyššího počtu podobných reakcí organismu, aby bylo možné tyto výsledky převést na člověka [31].

Následující biologické testy jako jsou ALP, TRAP, a určování množství lamininu a Albuminu a depozice Ca. Tyto metody přesněji popisují probíhající procesy buněčného dělení, dilatace, adheze osteoblastoidních buněk než testy buněčné dilatace a adherence.

Zvýšená hladina *alkalické fosfatázy* (ALP) je vedlejším produktem činnosti osteoblastů, jako je adherence, dilatace či diferenciace.

*TRAP* (Tartare Resistance Acid) umožňuje osteoklastům migraci a další resorpci. Pokud je přítomná, značí to, že probíhá aktivace a množení osteoblastů.

*Lamininy* jsou hlavní bílkoviny v bazální membráně, ovlivňují buněčné dělení, migraci, adhezi buněk.

*Albumin* je protein, který je označován za molekulární taxi, tj. nosič molekul s nízkou rozpustností ve vodě, jako např. Ca. Reguluje také osmotický tlak v krevním oběhu.

Zvýšená *depozice Ca* značí, že probíhá tvorba nových kostních tkání, ve kterých je hojně obsažen.

Byly vybrány testy cytotoxicity in-vitro, které plně dostačují v počáteční fázi biologických testů nových materiálů. Biologické testy byly prováděny dle ČSN EN ISO 10993. Všechny provedené kultivace buněk in-vitro probíhaly v MEM (Minimum Essential Medium) mediu.

Tyto testy se dělí [31]:

*a) Test inhibice růstu buněk* 

Provádí se na heteroploidních (tj. pasážovatelných bez omezení) buňkách buněčných liniích, účelem je zjistit toxicitu výluhu testovaného materiálu. Pokud je zjištěna toxicita materiálu a pak je materiál z dalšího testování vyloučen.

- b) Test dilatace růstu buněk Hodnotí se míra ovlivnění schopnosti buněk adherovat k testovanému materiálu výluhem. Což znamená uchytit se na povrchu a rozšířit své membrány. Tento test vypovídá o schopnosti buněk tolerovat výluh z testovaného materiálu.
- c) Test adherence růstu buněk k testovanému materiálu Srovnává se adherence buněk na testovaném materiálu a na kontrolním sklíčku. To že je adherence na materiálu nižší než na kontrole, neznamená toxicitu testovaného materiálu. Srovnají se hustoty adherovaných buněk na testovaném materiálu a kontrolním sklíčku, které je umístěno ve stejné kultivační misce jako vzorek.
- d) Test tolerance materiálu buňkami Hodnotí se mezera mezi dilatovanými buňkami a testovaným materiálem po 5 dnech kultivace (vznik toxické zóny). Pokud je větší než stonásobek velikosti dilatované buňky, je materiál hodnocen jako netolerantní.

# 3. CÍL PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na přípravu a studium bioaktivních keramických materiálů a povlaků. Jejím hlavním cílem je prostudovat a popsat vliv chemického složení a morfologie objemových keramik na bázi Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, HA a povrchu povlaků a 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; ZrO<sub>2</sub>; vrstevnatý kompozit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> × ZrO<sub>2</sub>
- b) biologické in-vitro testy cytokompatibility připravených objemových keramik, vrstevnatých kompozitů a lepených keramických kompozitů
- c) vytvoření stabilní suspenze z nanočásticového práškového t-ZrO<sub>2</sub>
- d) optimalizace technologie nanášení vodní suspenze na substrát pomocí ultrazvukové sprejovací hlavice
- e) optimalizace podmínek slinovacího procesu nanočásticového ZrO<sub>2</sub> povlaku v závislosti na použitém substrátu
- f) biologické in-vitro testy cytokompatibility nanostrukturních povlaků
- g) korelace bioaktivního chování se strukturou a chemickým složením

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část práce byla realizována na Ústavu materiálových věd a inženýrství na FSI VUT v Brně, ve Stomatologickém výzkumném centru - Biologické laboratoři Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, v Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzitě v Brně, Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, v.v.i. Nové Hrady a u společnosti TESCAN a.s. se sídlem v Brně.

# 4.1 Materiály

# 4.1.1 Objemové keramiky a kompozity

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

Název	Materiál	Výrobce	Velikost částic (metoda)
ZrO <sub>2</sub> 1,5 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ZrO <sub>2</sub> dopované 1,5 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	FSI VUT - OkaP - UMVI	7,53 nm (BET analýza)
E52	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	FSI VUT - OkaP - UMVI	8,49 nm (BET analýza)
TZ-3YB	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)
TZ-8YSB	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tosoh (Japonsko)	140 nm (neuvedeno)
HWY 5.5SD	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Guang Dong Huawang Zirconium Materials Co. Ltd.	$0,5 \pm 0,2 \ \mu m$ (BET analýza)
HWY-N-13,5	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Guang Dong Huawang Zirconium Materials Co. Ltd.	8,49 nm (BET analýza)
TM-DAR	$Al_2O_3$	Taimicron (Japonsko)	$0,2 \pm 0,1 \ \mu m$ (BET analýza)
DS - 90N	$Al_2O_3$	Taimicron (Japonsko)	$0,2 \pm 0,05 \ \mu m$ (BET analýza)
MARTOXID KMS 99	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Martinswerk GmbH (Německo)	velikost granulí 150µm
Hydroxyapatit 21 223	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH	FLUKA, SIGMA- ALDRICH (USA)	velikost aglomerátů 11,48 µm (neuvedeno)
Reynolds	$Al_2O_3$	Reynolds, Malakof Ind., (USA)	0,55 μm (neuvedeno)
TZ-Y3S-E	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)
Taimicron	$Al_2O_3$	Taimicron (Japonsko)	0,20 μm (neuvedeno)
ТΖ-ҰЗЅ-Е	ZrO <sub>2</sub> dopované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tosoh (Japonsko)	60 nm (neuvedeno)

Tabulka 4.1 Použité keramické prášky pro zhotovení keramických vzorků

Pozn.:

Microlaminate Oxyde Composite Ceramic - MLOCCv1

Microlaminate Oxyde Composite Ceramic - MLOCCv2

## 4.1.2 Povlakované materiály

Materiály, které byly použity pro nanesení povlaků ZrO<sub>2</sub> o rozměrech 6×6 a 10×10 mm:

- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> TM-DAR
- ZrO<sub>2</sub> TZ-3YB

Jejich specifikace je uvedena v tabulce 4.1.

Zkušební materiály pro optimalizaci technologie tvorby nanokrystalického povlaku ZrO<sub>2</sub> byly použity tyto materiály:

- křemičité sklo (15 hm. % Na<sub>2</sub>O, 5 hm. % CaO, 80 hm. % SiO<sub>2</sub>) (Merci s.r.o. Česká republika), podložní sklíčko pro světelnou mikroskopii
- křemenné sklo 100 hm. % SiO<sub>2</sub> (STROZA s.r.o., Česká republika)

# 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 [27, 33, 34, 35, 36] *L929* [37, 38](buňky vazivové tkáně) a třetí byla lidská osteoblastoidní [27, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,49, 50, 52, 53, 54, 55] linie *MG63* [27, 28, 29, 30, 39,40,41,42,43,44, 56, 57](kostní buňky).

## 4.2 Postupy

## 4.2.1 Příprava objemových keramik a kompozitů

#### Lisování objemových keramik

Zkušební objemové keramiky TZ-3YB, TZ-8YSB (navážka 8g, lisovací tlak 30 MPa <sup>†</sup>) a TM-DAR, KMS99 (navážka 6g, lisovací tlak 25 MPa <sup>†</sup>) byly lisovány na uniaxiálním lisu a na biaxiálním lisu CJC 50 (Rakovnické Tvářecí Stroje, s.r.o., Česká republika). Keramiky ZrO<sub>2</sub> TZ-3YB; ZrO<sub>2</sub> HWY-N-13,5; ZrO<sub>2</sub> HWY 5,55SD; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> KMS 99 a HA FLUKA byly lisovány tlakem 5MPa <sup>‡†</sup> (násypná výška 5.9 mm).

#### Elektroforetický proces

Elektroforetickým procesem, který využívá schopnosti nabitých keramických částic v koloidní suspenzi usazovat se na elektrodě za působení elektrického pole. Byly zhotoveny vrstevnaté keramické kompozity MLOCCv1, MLOOCv2 a objemová keramika  $ZrO_2$  s 3 mol. %  $Y_2O_3$  - E52 [32].

#### Slinování objemových keramik

Všechny objemové keramiky byly slinovány v superkantalové peci Nabertherm HT08/17 slinovacími procesy které jsou uvedeny v tabulce 4.2. Rychlost ohřevu keramik byla u všech keramik stejná 5°C/min a stejně tak rychlost chladnutí v peci 25°C.

Keramika	Teplota [°C]	Výdrž na teplotě [hod]
ZrO <sub>2</sub> 1,5 mol % Y <sub>2</sub> O	1100	4
E52	1500	2
TZ-3YB	1400, 1600	2, 10
TZ-8YSB	1600	10
HWY 5,5SD	1600	10
HWY-N-13,5	1600, 1400-1290	10, 15
TM-DAR	1350, 1500	1, 10
DS-90N	1350	1
MARTOXID KMS 99	1550	2, 10
HA	1150	2
MLOCCv1	1500	2
MLOCCv2	1500	2

Tabulka 4.2 Slinovací cykly objemových keramik

# Tepelné leptání objemových keramik

Objemové keramiky byly leptány ke zvýraznění hranic zrn. Teploty tepelného leptání a výdrže na teplotě jednotlivých keramik jsou uvedeny v tabulce 4.3. Rychlost nárůstu teploty u vzorků a její pokles byl stejný jako u slinovacího procesu.

Tabulka 4.3 Teploty tepelného leptání a doba výdrže objemových keramik na teplotě

Keramika	Teplota [°C]	Výdrž na teplotě [min]
ZrO <sub>2</sub> 1,5 mol % Y <sub>2</sub> O	1100	5
E52	1300	5
TZ-3YB	1300	5
TZ-8YSB	1300	5
HWY 5,5SD	1300	5
HWY-N-13,5	1300	5
TM-DAR	1300	5
DS-90N	1300	5
MARTOXID KMS 99	1300, 1450	5
HA	1100	5
MLOCCv1	1300	5
MLOCCv2	1300	5

## 4.2.2 Příprava povlakovaných materiálů

#### Příprava vodné suspenze nano ZrO<sub>2</sub> - E52

K vytváření nanokrystalických povlaků byly použity dvě koloidní vodné suspenze, které se jednu hodinu mlely v kulovém mlýně (Fritsch, Německo) se zirkoniovými koulemi. *Suspenze 1* - byla složena ze 100 ml destilované vody, 25g nanočásticového prášku ZrO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> (stabilizovaný 3 mol. %  $Y_2O_3$  syntetizovaný na OKaP, UMVI s označením E52); 0,125g Dolapixu 64CE.

## Vytváření nano povlaků ZrO<sub>2</sub>

Nanokrystalické povlaky byly zhotoveny sprejováním koloidní vodné ZrO<sub>2</sub> suspenze na slinuté keramické substráty. K tomuto sprejování bylo použito zařízení pro 3D depozici GFM 4433 i-sel (Německo), které bylo vybaveno ultrazvukovou sprejovací hlavicí vytvářející spray s velikostí kapek 18 až 68 µm. K hlavici byl připojen širokopásmový ultrazvukový generátor SONO-TEK (USA).

#### Slinování nano povlaků ZrO<sub>2</sub>

Substráty pro nanokrystalické povlaky byly žíhány v peci při teplotě 800°C s výdrží 2 hodiny na teplotě ( $\uparrow$  3°C/min., ochlazení v peci) a poté byly slinuty při teplotách 1400°C (Z1)/2 hod.), 1350°C (A1)/1 hod. ( $\uparrow$  5°C/min, ochlazení v peci  $\downarrow$  10°C/min.

Nanokrystalické povlaky byly v muflové peci LM 212.11 slinovány při teplotě 800°C/2h († 3°C/min, ochlazení v peci).

Přehled všech zhotovených nanokrystalických povlaků  $ZrO_2$  je uveden na obrázku (Obr. 4.1).



Obr. 4.1 Přehled všech zhotovených povlakovaných materiálů

# 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). Poté byly rozděleny na dvě poloviny a jedna polovina byla ponechána v leštěném stavu a druhá byla tepelně leptána.

#### Vytvoření keramických lepených kompozitů

Lepené keramické kompozity byly vytvořeny slepením dvojic keramik ZrO<sub>2</sub> a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> samopolymerující adhezivní pryskyřicí SPOFACRYL<sup>®</sup> (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<sub>2</sub> 6,08 g/cm<sup>3</sup>; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3,99 g/cm<sup>3</sup>; HA 3,16 g/cm<sup>3</sup>.

#### 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). U analýzy drsnosti mikroskopické oblasti s použitím výškového obrazu laserového mikroskopu je obtížné dodržovat požadavky stanovené ISO ČSN 1302:1992 [58]. Proto se provádí výpočet parametrů níže popsaným způsobem (Obr. 4.2). Mezní vlnová délka je nastavená jako 1/3 až 1/50 šířky zorného pole obrazu. Vyhodnocovaná délka je šířka zorného pole obrazu. Referenční délka *lr* je 1/3 oblasti daného středu řezu (ale v případě křivky profilu shodná s vyhodnocovanou délkou). Označení aritmetické střední výšky: *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 je potom určena výpočtem z rovnice (1)

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

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

Po nástřiku byly povlaky hodnoceny na stereomikroskopu Nikon 102 (Nikon, Japonsko) vybaveném digitálním fotoaparátem Nikon D50. Nanokrystalické povlaky byly slinuty a znovu zkontrolovány na stereomikroskopu. Slinuté vyhovující povlaky byly hodnoceny na REM Tescan VEGA TS 5136XM (Tescan, Česká republika) (vybaven wolframovým vláknem) a REM Tescan MIRA LMU (Tescan, Česká republika) (vybaven Schottkyho katodou).

Charakterizace velikosti zrn slinutých keramických materiálů byla provedena pomocí mikrosnímků REM Tescan MIRA 3 LMU(vybaven Schottkyho katodou) 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) provedenými zátěžnými silami 1, 5, 10, 20 a 30 kg s dobou zatížení 15 vteřin. 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 soudržnosti 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 [28] zvolena hustota buněk 2500 na cm<sup>2</sup>. Tento počet byl určen pomocí Bürkerovy komůrky (Obr. 4.3). Určení celkového počtu buněk bylo určeno podle rovnice (2).

Počet buněk v 1  $ml = (N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_{23}) \times 10000$  (2) Kde N<sub>1</sub>-N<sub>23</sub> je počet buněk ve velkém čtverci 1 - 23.



Obr. 4.3 Velké čtverce s buňkami osteoblastoidní linie MG63 v Bürkerově komůrce

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 Elemets 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. Na snímku ze světelného mikroskopu modré body označovaly dilatované buňky a růžové body ty, které nebyly

dilatovány (Obr. 4.4). Hodnota dilatace určuje procentuální podíl počtu dilatovaných buněk ze všech buněk podle rovnice (3).



br. 4.4 Software obrazové analýzy ImageJ s pluginem Cell Counter k výpočtu buněčné dilatace Type 2 – dilatované buňky

Type 4 – nedilatované buňky

$$Dilatace \ bun\check{e}k = \frac{100 \times po\check{c}et \ dilatovan\acute{y}ch \ bun\check{e}k \ na \ snímku}{Celkov\acute{y} \ po\check{c}et \ bun\check{e}k \ na \ snímku} \ [\%] \ (3)$$

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 cytokompatibilní

#### 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 cm<sup>2</sup> byl použit u 72 hodinové kultivace in-vitro buněčných linií HeLa, L929 a MG63. Po dokončení 72 hodinové kultivace in-vitro bylo kultivační EMEM médium od vzorku odsáto vodní pipetou a vzorky opláchnuty v PBS pufru. Poté byly vzorky vloženy do 50 obj. % etanolu, kde byly ponechány 10 minut. Tento krok se opakoval s ethanolem o koncentraci 60 obj. %; 70 obj. %; 80 obj. %; 96 obj. %; 99,5 obj. %. Vzorky v absolutním alkoholu byly vysušeny pomocí metody Critical Point Drying (CPD) v přístroji Balzers CPD 030 (BalTec Maschinenbau AG., Švýcarsko), ve kterém byl za zvýšeného tlaku a snížené teploty etanol nahrazen tekutým CO<sub>2</sub>, který byl následně zvýšením teploty zplyněn. Takto 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 cm<sup>2</sup> [28]. Doba kultivace

osteoblastoidní line MG63 byla 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 hodin. Poté byly vzorky opláchnuty v PBS pufru a třikrát v 0,1 M fosfátovém pufru a následovalo dvoustupňové obarvení buněk dilatovaných na povrchu pro potřeby světelné mikroskopie. Toto barvení bylo prováděno ve dvou krocích. Prvním krokem bylo barvení buněk May-Grünwaldem (M-G). Druhým krokem bylo barvení buněk Giemsa-Romanovskim (G-R).

Takto 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 jejích celková plocha v pixelech. Výpočet plochy pokrytí povrchu keramického substrátu dilatovanými buňkami byl proveden podle rovnice (4).

$$Plocha \ pokryvu \ bun\check{e}k = \frac{100 \times plocha \ dilatovaných \ bun\check{e}k}{Celková \ plocha \ snímku} \ [\%]$$
(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. Příprava keramiky složené z nanozrn (velikostí  $10 \div 100$  nm), submikrozn (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 [59]. Rychlost růstu zrn  $Al_2O_3$  je větší než rychlost růstu zrn ZrO<sub>2</sub> [59]. Růst zrn způsobuje problémy především při přípravě nanostrukturní (nanozrnné) keramiky, protože musí být k její přípravě použity nanočástice o velikosti kolem 10 nm. Tvarování tak malých nanočástic i jejich slinování na hutnou keramiku s minimálním obsahem defektů je velmi obtížné a nanostrukturní keramiky pak obsahuje i submikrometrová zrna.

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.

# Keramika Z1 dopovaná 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1400°C/2hod. byla dosažena relativní hustota 99,6 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky po tepelném leptání je uvedená 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. %  $\rm Y_2O_3$ 

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. % Y2O3

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 dva následující ZrO<sub>2</sub> prášky o střední velikosti částic 7,5 nm a 8,5 nm. Tvar slinutých zrn byl kulovitý a hranice zrn neobsahovaly žádné póry.

Na ZrO<sub>2</sub> keramice byla určena plošná aritmetická povrchová drsnost SRa a to jak na leštěném tak i na leptaném vzorku. U leštěného vzorku byla naměřena hodnota SRa 0,036  $\mu$ m a u tepelně leptaného 0,086  $\mu$ m. Tepelným leptáním se tedy drsnost povrchu ZrO<sub>2</sub> zvýšila více než 2.5×. Profil drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.4 a 5.5.



Obr. 5.4 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné ZrO<sub>2</sub> keramiky

Obr. 5.5 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané  $ZrO_2$ 

#### Keramika Z2 dopovaná 1,5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí " syrového tělesa" při teplotě 1100°C/4hod. byla dosažena relativní hustota 99 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (zvýrazněné tepelným leptáním) je vidět na obrázku 5.6 a 5.7. Obě mikrofotografie (REM i AFM) dobře dokumentují morfologii povrchu  $ZrO_2$  keramiky - velikost zrn 2 nm až 350 nm, pravidelný tvar zrn, výrazné hranic zrn a málo zřetelné póry.



Obr. 5.6 Mikrofotografie REM povrchu Z2 keramiky stabilizované 1.5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



Obr. 5.7 Mikrofotografie AFM povrchu Z2 keramiky stabilizované 1.5 mol. %  $Y_2O_3$ 

Pomocí těchto mikrofotografií 5.6 a 5.7 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikosti zrn uvedenou na obrázku 5.8.



Obr. 5.8 Distribuce střední velikosti zrn Z2 keramiky dopované 1,5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Distribuce velikosti zrn má bimodální charakter. Maxima leží při 7,6 nm a 244,1 nm. Je vidět, že 16,7 % zrn leží v oblasti "nano" a 83,3 % jsou zrna submikrometrová, jejich část má tvar kulovitý a zbytek polygonální. Výchozí průměrná velikost částic keramického prášku byla 7,5 nm, velikost částic (zrn) se tedy slinováním zvětšila asi 30×.

#### Keramika Z3 dopovaná 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1500°C/2hod. byla dosažena relativní hustota 99,3 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky po tepelném leptání dokumentují dvě mikrofotografie (REM a AFM) uvedené na obrázku 5.9 a 5.10. Zrna jsou oproti předchozí keramice větší, což je způsobeno vyšší slinovací teplotou a možná i vyšším obsahem  $Y_2O_3$ . Zrna jsou po tepelném leptání polygonální a mají výrazné hranice bez defektů a pórů.



Obr. 5.9 Mikrofotografie REM povrchu Z3 keramiky stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Obr. 5.10 Mikrofotografie AFM povrchu Z3 keramiky ZrO<sub>2</sub> stabilizované 3mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Pomocí mikrofotografií 5.9 a 5.10 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.11.



Obr. 5.11 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z3 dopované 3 mol. % Y2O3

Distribuce velikosti zrn objemové  $ZrO_2$  keramiky dopované 3 mol. %  $Y_2O_3$  má bimodální charakter. Maxima leží při 7,6 nm a 345,3 nm. 13,7 % zrn leží v oblasti "nano" a 86,3 % jsou zrna submikrometrová. Výchozí velikost částic keramického prášku byla 7,53 nm. Velikost zrn se v důsledku vyššího obsahu dopantu  $Y_2O_3$  a vyšší slinovací teploty zvýšila asi o třetinu oproti  $ZrO_2$  keramice dopované 1,5 mol. %  $Y_2O_3$  slinuté při 1100°C/4hod.

Na této keramice byla určena aritmetická střední výška drsnosti SRa a to jak na leštěném, tak i na tepelně leptaném vzorku. Dosažená povrchová plošná drsnost je stejná jako u

předchozích keramik Z1, Z2 a Z3, zřejmě díky stejnému technologickému postupu při leštění a tepelnému leptání. Záznamy aritmetické střední výšky drsnosti jsou uvedeny na obrázcích 5.4 a 5.5.

# Keramika Z4 dopovaná 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1600°C/10hod. byla dosažena relativní hustota 99,1 % t.h.. Tvar zrn je polygonální a hranice zrn jsou celistvé bez pórů a ředin (viz obr. 5.12).



Obr. 5.12 Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z4 dopovaná 3 mol. %  $\rm Y_2O_3$ 

Pomocí mikrofotografie 5.12 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.13.



Obr. 5.13 Distribuce střední velikosti zrn Z4 keramiky dopovaná 3 mol. % Y2O3

Distribuce střední velikost zrn má trimodální charakter. Maxima leží při 15,3 nm; 86,3 nm a 976,6 nm. 44,4 % zrn je nanometrových, 47,6 % zrn je submikrometrových a 8 % mikrometrových.

Naměřená plošná povrchová drsnost byla stejná jako u předchozích keramik ZrO<sub>2</sub>. Naměřená aritmetická střední výška drsnosti je uvedena na obrázcích 5.4 a 5.5.

#### Keramika Z5 dopovaná 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Při dvoustupňovém slinování "syrového tělesa" při teplotách 1440°C/1290°C /15hod. byla dosažena relativní hustota 95,4 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je uvedená na obrázku 5.14. U této kubické keramiky jsou zřetelné póry uvnitř zrn, které nezanikly během slinování, neboť teplota slinování i homogenita syrového tělesa byly nízké. Zrna ve struktuře keramiky byla kulovitá a polygonální.



Obr. 5.14 Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z5 stabilizované 8 mol. % Y2O3

Pomocí mikrofotografie 5.14 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.15.



Obr. 5.15 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z5 dopované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Distribuce střední velikosti zrn má trimodální charakter. Maxima leží při 15,3 nm; 86.3 nm a 690,5 nm. 38,1 % zrn je nanometrových, 57,9 % submikrometrových a 4,0 % jsou zrna mikrometrová.

Na rozložení distribuce zrn této keramiky má zřejmě vliv vysoký obsah dopantu 8 mol. %  $Y_2O_3$ , který způsobil vyšší růst velikosti zrn. Velký rozdíl velikostí zrn mohlo zapříčinit dvoustupňové slinování keramiky.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určená na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. Vzhledem ke stejné technologii přípravy bylo dosaženo stejných drsností povrchů jako u předchozích keramik. Profily aritmetické střední výšky drsnosti jsou uvedené na obrázcích 5.4 a 5.5.

#### Keramika Z6 dopovaná 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Při slinování "syrového tělesa" při teplotě 1600°C/10hod. byla dosažena relativní hustota 99,8 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je na obrázku 5.16 a 5.17. Slinutá keramika má polygonální tvar zrn a hranice zrn jsou celistvé bez pórů a ředin.



Obr. 5.16 Mikrototografie REM povrchu keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Obr. 5.17 Mikrofotografie AFM povrchu ZrO<sub>2</sub> keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Pomocí mikrofotografií 5.16 a 5.17 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.18.



Obr. 5.18 Distribuce střední velikosti zrn keramiky Z6 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Distribuce velikosti zrn má bimodální charakter. Maxima leží při 86,3 nm a 1381,1 nm. 9,9 % zrn leží v oblasti nano a 90,1 % jsou především zrna submikrometrová a mikrometrová. Na distribuci velikosti zrn keramiky je, ve srovnání s předchozí keramikou, zřetelný posuv do oblasti mikrometrové keramiky v důsledku vyšší teploty slinování a delší výdrže na teplotě.

U této keramiky byla určena aritmetická střední výška drsnosti SRa a to jak na leštěném tak i na tepelně leptaném vzorku. Naměřené hodnoty byly totožné jako u přechozích  $ZrO_2$  keramik. Tepelným leptáním se drsnost povrchu  $ZrO_2$  zvýšila více než 2,5×.

# Keramika Z7 dopovaná 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1600°C/10hod. byla dosažena relativní hustota 98,12 % t.h.. Tato kubická keramika má polygonální zrna, a ty mají uvnitř zřetelné póry, které vznikly při růstu zrn během slinovacího procesu z pórů na hranicích menších zrn. Ty se zvětšily během slinování v důsledku vysoké slinovací teploty a doby výdrže.



Obr. 5.19 Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z7, stabilizované 8 mol. %  $Y_2O_3$ 



Pomocí mikrofotografie 5.19 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.20.

Obr. 5.20 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z7 dopované 8 mol. % Y2O3

Z distribuce střední velikost zrn je patrné, že má trimodální charakter. Maxima leží při 61,0 nm; 488,3 nm a 7812,5 nm. Je vidět, že 8,3 % zrn jsou nanometrová, 64,3 % submikrometrová a 27,4 % jsou zrna mikrometrová.

Na rozložení distribuce zrn této keramiky měl vliv vysoký obsah Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který způsobil vyšší nárůst velikosti zrn, související s přítomnosti kubické fáze.

Na této keramice byla určena aritmetická střední výška drsnosti SRa, a to jak na leštěném, tak i tepelně leptaném vzorku. Vzhledem ke stejné technologii přípravy bylo dosaženo stejných aritmetických středních výšek drsností. Jejich profily jsou uvedeny na obrázcích 5.4 a 5.5.

#### Keramika Z8 dopovaná 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1600°C/10h byla dosažena relativní hustota 99,5 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je uvedená na obrázku 5.21 a 5.22. U této kubické keramiky jsou zřetelné póry uvnitř polygonálních zrn, které vznikly z pórů na hranicích menších zrn. Ty zanikly během slinování díky vysoké slinovací teplotě a dlouhé době výdrže.





Obr. 5.21 Mikrofotografie REM keramiky Z8 stabilizované 8 mol. %  $Y_2O_3$ 

Obr. 5.22 Mikrofotografie AFM povrchu keramiky Z8 stabilizované 8 mol. %  $Y_2O_3$ 

Pomocí mikrofotografií 5.21a 5.22 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.23.



Obr. 5.23 Distribuce střední velikosti zrn keramiky Z8 dopované 8 mol. % Y2O3 slinuté

Distribuce střední velikost zrn má téměř unimodální charakter s malou příměsí nanozrn. Maxima leží při 8,63 nm a 3906,3 nm. Je vidět, že 11,1 % zrn je nanometrových a 89,9 % je zrn mikrometrových.

Na této keramice byla určena plošná aritmetická střední výška drsnosti SRa a to na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. Vzhledem ke stejné technologii přípravy bylo dosaženo stejných drsností povrchů, jako u předchozích keramik Profily plošné drsnosti jsou uvedeny na obrázcích 5.4 a 5.5.

### Keramika A1

Po slinování "syrového tělesa" při teplotě 1350°C/1hod. byla dosažena relativní hustota 97,4 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) jsou uvedeny na obrázcích 5.24 a 5.25. Tvar zrn je polygonální a na hranicích zrn jsou póry. Nízká relativní hustota a vyšší obsah pórů ukazují, že slinovací teplota u této Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramiky byla nízká.



Pomocí mikrofotografií 5.24 a 5.25 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.26.



Obr. 5.26 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A1

Distribuce střední velikosti zrn má bimodální charakter. Maxima leží při 15,3 nm a 690,5 nm. 12,4 % zrn je nanometrových a 87,6 % je zrn submikrometrových a mikrometrových. Aritmetická střední výška drsnosti SRa na leštěném i na tepelně leptaném vzorku je uvedena na obrázcích 5.27 a 5.28. U leštěného povrchu byla naměřena hodnota 0,037  $\mu$ m a u tepelně leptaného 0,098  $\mu$ m. Tepelným leptáním se drsnost povrchu ZrO<sub>2</sub> zvýšila více než 2.6×. Aritmetická střední výška drsnosti je uvedena na obrázcích 5.27 a 5.28.



Obr. 5.27 Aritmetická střední výška drsnost leštěné keramiky Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - leštěný povrch

Obr. 5.28 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky  $Al_2O_3$  - tepelně leptaný povrch

# Keramika A2

Při slinování "syrového tělesa" při teplotě 1350°C/1hod. byla dosažena relativní hustota 99,5 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) jsou uvedeny na obrázku 5.29. Zrna jsou polygonální a jejich velikost je mezi 0,1 až 0,3 μm, hranice zrn jsou celistvé bez pórů.



Obr. 5.29 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A2

Pomocí mikrofotografie 5.29 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.30.



Obr. 5.30 Distribuce střední velikosti zrn keramiky A2

Distribuce střední velikosti zrn má bimodální charakter. Maxima leží při 244,1 nm a 1381,1 nm. 2,5 % zrn je nanometrových; 77,8 % je zrn submikrometrových a 19,7 % mikrometrových. Na rozložení distribuce zrn této keramiky má vliv vyšší rychlost růstu velikosti zrn při slinovacím procesu než u  $ZrO_2$ , jakož i výchozí velikost částic keramického prášku 200 nm ± 50.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určena jak na leštěném, tak i na tepelně leptaném vzorku. Bylo dosaženo stejných hodnot jako u předchozí keramiky A1. Profily povrchových drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.27 a 5.28.

#### Keramika A3

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1550°C/2 hod. byla dosažena relativní hustota 99,7 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je uvedena na obrázku 5.31. Zrna mají heterogenní tvar s různým poměrem šířky a délky, na povrchu jsou vidět prohlubně po vylomených zrnech.



Obr. 5.31 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A3



Pomocí mikrofotografie 5.31 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.32.

Obr. 5.32 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A3

Distribuce střední velikosti zrn má unimodální charakter. Maximum leží při 244,1 nm. 4,5 % je zrn nanometrových a 77,1 % je zrn submikrometrových a mikrometrových 18,4 %. Na rozložení distribuce zrn této keramiky měla zřetelný vliv vysoká teplota slinování a doba výdrže na teplotě.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určena na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. Byla stejná jako u předchozích keramik A1 a A2. Profily plošných povrchových drsností jsou uvedeny na obrázcích 5.27 a 5.28.

#### Keramika A4

Při slinování "syrového tělesa" při teplotě 1500°C/10hod. byla dosažena relativní hustota 98,3 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) jsou uvedeny na obrázku 5.33 a 5.34. Tvar zrn je polygonální a na hranicích i uvnitř zrn občas jsou póry.


Obr 5.33Mikrofotografie REM povrchu keramiky A4

Obr 5.34 Mikrofotografie AFM povrchu keramiky A4

Pomocí mikrofotografií 5.33 a 5.34 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.35.



Obr. 5.35 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A4

Distribuce střední velikost zrn má trimodální charakter. Maxima leží při 43,2 nm; 345,3 nm a 3906,3 nm. 20 % zrn je nanometrových, 20 % je zrn submikrometrových a 60 % mikrometrových. Na rozložení distribuce zrn této keramiky má zřetelný vliv vysoká teplota

slinování, doba výdrže na teplotě a výchozí velikost částic keramického prášku, která byla kolem 100 nm.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa na leštěném i na tepelně leptaném vzorku byla stejná jako u předchozích keramik A1, A2 a A3. Profily plošné povrchové drsnosti jsou uvedeny na obrázcích 5.27 a 5.28.

# Keramika A5

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1550°C/10 hod. byla dosažena relativní hustota 98,5 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) jsou uvedeny na obrázku 5.36. Tvar zrn je polygonální, velikost zrn leží v širokém rozsahu 50 nm až 10  $\mu$ m. Na hranicích zrn jsou zřetelné póry.



Obr. 5.36 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A5

Pomocí mikrofotografie 5.36 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.37.



Obr. 5.37 Distribuce střední velikosti zrn keramiky A5

Distribuce střední velikost zrn má unimodální charakter. Maximum leží při 1381,1 nm. 0,7 % jsou zrna nanometrová, 23,7 % zrna submikrometrová a 75,6 % mikrometrová. Na distribuci velikosti zrn této keramiky měla vliv vysoká teplota slinování a delší doba výdrže na teplotě než u předchozí keramiky. Ze submikrometrové keramiky se v důsledku delší výdrže na teplotě stala keramika mikrometrová.

Byla určena plošná Aritmetická střední výška drsnosti SRa na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. Hodnoty aritmetické střední výšky drsnosti jsou stejné jako u předchozích keramik A1 - A4. Profil SRa je uveden na obrázcích 5.27 a 5.28.

## Keramika HA

Po slinutí "syrového tělesa" při teplotě 1150°C/2hod. byla dosažena relativní hustota 96,2 % t.h.. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je vidět na obrázku 5.38. Slinováním vznikla podlouhlá zrna a póry na jejich hranicích. Útvary na povrchu se vytvořily při tepelném leptání částečným rozkladem hydroxyapatitu. Po teplotě slinutí 1150°C/2hod. je tvar zrn polygonální, protáhlý a na hranicích zrn jsou póry.



Obr. 5.38 Mikrofotografie REM povrchu keramiky HA

Pomocí mikrofotografie 5.38 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.39.



Obr. 5.39 Distribuce střední velikosti zrn keramiky HA

Distribuce střední velikosti zrn HA má unimodální charakter. Maximum leží při 690,5 nm, 6 % zrn je nanometrových; 73,8 % je zrn submikrometrových a 21,6 % mikrometrových.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určena na leštěném i tepelně leptaném vzorku. U leštěného povrchu byla naměřena hodnota 0,037  $\mu$ m a u tepelně leptaného 0,102  $\mu$ m. Tepelným leptáním se drsnost povrchu HA zvýšila více než 2,7×. Profil drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.40 a 5.41.



Obr. 5.40 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky HA

Obr. 5.41 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané keramiky HA

## Keramický kompozit MLOCCv1 (KA1 x KZ1)

Elektroforetickou depozicí připravené "syrové těleso" bylo slinuto při teplotě 1500°C/2hod. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je uvedená na obrázku 5.42 a 5.43. Mikrofotografie REM a AFM dobře dokumentují morfologii povrchu vrstevnatého kompozitu  $Al_2O_3 \times ZrO_2$ . Zrna  $Al_2O_3$  jsou větší než zrna  $ZrO_2$ , tvar zrn je pravidelný polygonální. Hranice zrn stejně jako hranice mezi  $Al_2O_3$  a  $ZrO_2$  obsahují málo defektů.



Obr. 5.42 Mikrofotografie REM povrchu MLOCCv1

Obr. 5.43 Mikrofotografie AFM povrchu MLOCCv1

Z mikrofotografie 5.42 je patrné, že šířka jednotlivých vrstev elektroforetického vrstevnatého kompozitu MLOCCv1 je 40 µm. Pomocí mikrofotografií na obrázcích 5.42 a 5.43 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.44.



Obr. 5.44 Distribuce střední velikosti zrn KZ1 a KA kompozitu MLOCCv1

Distribuce střední velikost zrn KA1 má bimodální charakter. Maxima leží při 61,0 a 1381,1 nm. 69,5 % zrn je nanometrových, 19,5 % je zrn submikrometrových a 11 % zrn mikrometrových. Distribuce střední velikost zrn Zr<sub>2</sub>O má také bimodální charakter. Maxima leží při 43,2 a 488,3 nm. 62.8 % zrn je nanometrových a 37,2 % je zrn submikrometrových. Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určena na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. U leštěného povrchu byla naměřena hodnota 0,037 µm a u tepelně leptaného 0,094 µm. Tepelným leptáním se drsnost povrchu ZrO<sub>2</sub> zvýšila více než 2,5×. Profil drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.45 a 5.46.



Obr. 5.45 Aritmetická střední výška drsnosti leštěného MLOCCv1

Obr. 5.46 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptaného MLOCCv1

# Keramický kompozit MLOCCv2 (KA2 x KZ2)

Elektroforeticky připravené "syrové těleso" bylo slinuto při teplotě 1500°C/2hod. Morfologie povrchu keramiky (po tepelném leptání) je uvedená na obrázku 5.47 a 5.48. Obě mikrofotografie AFM dobře dokumentují morfologii povrchu vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2. Výchozí velikost částic KA2 byla 200 nm a z mikrofotografií je vidět velký nárůst velikosti částic během slinovacího procesu. U KZ2 byl nárůst velikosti částic podstatně nižší.



leptaného MLOCCv2

Obr. 5.48 Mikrofotografie AFM povrchu keramického kompozitu MLOCCv2

Pomocí mikrofotografií na obrázcích 5.47 a 5.48 byla provedena obrazová analýza, která poskytla distribuci velikostí zrn uvedenou na obrázku 5.49.



Obr. 5.49 Distribuce střední velikosti zrn keramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv2 KZ2 × KA2

Distribuce střední velikost zrn KA2 má trimodální charakter. Maxima leží při 86,3 nm, 345,3 nm a 976,6 nm. 67,7 % zrn je nanometrových a 32,3 % je zrn submikrometrových a mikrometrových. Distribuce střední velikosti zrn  $Zr_2O$  má unimodální charakter. Maximum leží při 345,3 nm. 5,5 % zrn je nanometrových a 94,5 % zrn submikrometrových.

Aritmetická střední výška drsnosti SRa byla určena na leštěném i na tepelně leptaném vzorku. U leštěného povrchu byla naměřena hodnota  $0,037\mu$ m a u tepelně leptaného 0,094 µm. Tepelným leptáním se drsnost povrchu ZrO<sub>2</sub> zvýšila více než 2,5×. Profil drsností povrchů je uveden na obrázcích 5.50 a 5.51.



Obr. 5.50 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky na kompozitu MLOCCv2

Obr. 5.51 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané keramiky na kompozitu MLOOCv2

Shrnutí výsledků stanovení distribucí velikostí zrn objemových keramik je uvedeno v tabulce 5.1. Z této tabulky vyplývá, že se podařilo připravit vzestupnou řadu velikostí zrn ZrO<sub>2</sub> keramik od nejmenších velikostí zrn Z1 (obsah zrn ve struktuře nanometrová: submikrometrová cca 1:1), která byla nejblíže objemové nanometrové keramice, až po Z8 s částí zrn o velikosti 11µm. Keramika, u které se předpokládala nanometrová struktura Z2 má pouze 16,7 % zrn nanometrových a 83,3 % zrn submikrometrových i když na počátku slinování měly částice 7 nm. Většina ZrO<sub>2</sub> keramik má velký podíl submikrometrových zrn.

Také u  $Al_2O_3$  byla sestavena řada keramik se vzestupnou velikostí zrn. U keramik  $Al_2O_3$  se projevila vysoká rychlost růstu zrn v závislosti na slinovací teplotě a době výdrže. Nejnižších hodnot velikostí zrn dosáhly 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. Z toho vyplývá, že ZrO<sub>2</sub> byl většinou tvořen submikrometrovými zrny a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mikrometrovými zrny.

						1															
Průměrná	Velikost	zrn [nm]	-	100,2	118,9	371,3	517,2	517,8	923,1	1442,6	2739,8	519,8	753,9	1146,2	1261,6	1832,9	613,9	456,1	333,1	729,1	341,1
Podíly zm [%] ¢ velikost zm [nm]	"Mikro"	zrna $0.5 \div 15$	μm	·		12,5 833,6	24,4 1250,3	20,5 1250,3	80,2 2456,29	46,8 4006,1	89,9 5405,8	53,3 1250,3	37,3 1944,9	37,8 3125,8	65 3473,7	95,2 5168	57,6 1552,7	25 1016,1	4,3 690,5	25,7 1768,2	4,8 690,5
	"Submikro"	zrna $100 \div 500$	nm	50,1 180.8	83,3 221	75 274,5	31,2 274,5	41,4 274,5	9,9 274,5	44,9 274,5	1	34,3 274,5	60,2 274,5	57,7 274,5	15 <mark>259</mark>	4,2 274,5	37,8 274,5	5,6 304,8	32,9 <mark>274,5</mark>	6,5 345,3	92,6 274,5
	"Nano"	zrna $10 \div 100$	nm	49,4 19.5	16,7 16,7	12,5 5,72	44,4 26,9	38,1 28,6	9,9 38,4	8,3 47,2	11,1 73,7	12,4 34,6	2,5 42,3	4,5 38,4	20 <mark>52,1</mark>	0,7 56,3	4,6 14,4	69,4 47,3	62,8 34,3	67,8 73,7	2,6 5,4
í křivky		3		ı	ı	ı	976,6	690,5	ı	7812,5			·		3960,3	ı	-	-	-	976,6	ı
ı distribučn [nm]	2		122,2	244,1	345,3	86,3	86,3	1381,1	488,3	3906,3	690,5	1381,1		244,1	,		1381,1	488,3	345,3		
Maxima 1		1		3,8	7,6	7,6	15,3	15,3	86,3	61	8,6	1,3	244,1	244,1	43,2	1953,1	690,5	61,0	43,2	86,3	345,3
	Rozmezí velikostí zm	[nm]		5 ÷ 244	$19 \div 345$	$1 \div 977$	$4 \div 1953$	8 ÷ 1953	$11 \div 5524$	31 ÷ 11049	61 ÷ 11049	11 ÷ 1953	$31 \div 3906$	$11 \div 7813$	$43 \div 7813$	61 ÷ 15625	$122 \div 2762$	$15 \div 1381$	31 ÷ 691	61 ÷ 2762	$86 \div 488$
	Typ	distribuce		bimodální	bimodální	bimodální	trimodální	trimodální	bimodální	trimodální	bimodální	bimodální	bimodální	unimodální	trimodální	unimodální	unimodální	bimodální	bimodální	trimodální	unimodální
Čas	výdrže	na teplotě	1	2	4	2	10	15	10	10	10	1	1	2	10	10	2		2		7
Teplota slinování			1400	1100	1500	1600	1440/1290	1600	1600	1600	1350	1350	1550	1500	1550	1150		1500	1500		
Množství a druh dopantu [mol. %]			$3 Y_2 O_3$	$1,5 Y_2O_3$	$3 Y_2O_3$	$3 Y_2 O_3$	$8 Y_2 O_3$	$3 Y_2O_3$	$8 Y_2 O_3$	$8 Y_2 O_3$			ı	I	ı			$3 Y_2 O_3$	ı	$3 \text{ Y}_2 \text{O}_3$	
Velikost částic dle výrobce		60 nm	7,5 nm	8,5 nm	500±200 nm	200±100 nm	60 nm	200±100 nm	140 nm	100 nm	200±50 nm	granule 150 μm	100 nm	granule 150 μm	aglomeráty 11,40 μm	550 µm	60 nm	200 µm	60 nm		
Označení dle výrobce			TOSOH TZ3YB	1,5 mol. % ZrO2	E52	HWY 5,5SD	ZrO <sub>2</sub> HWY- N-13,5	TOSOH TZ3YB	ZrO <sub>2</sub> HWY- N-13,5	TOSOH TZ8YSB	TM-DAR	N06-SQ	KMS 99	TM-DAR	KMS 99	Fluka	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Reynolds	ZrO <sub>2</sub> TOSOH TZ3YS-E	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Taimicron	ZrO <sub>2</sub> TOSOH TZ3YS-E	
	Označení	vzorku		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Al	A2	A3	A4	A5	HA	KAI	KZ1	KA2	KZ2
Keramika		$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$ZrO_2$	$Al_2O_3$	$Al_2O_3$	$Al_2O_3$	$Al_2O_3$	$Al_2O_3$	НА	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ×ZrO	MLOCCv1	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ×ZrO	MLOCCv2		

Tabulka 5.1 Tabulka distribucí zrn objemových keramik

Na následujícím obrázku 5.52 jsou schematicky zobrazeny dosažené distribuce velikostí a střední velikost zrn a obsah dopantu  $Y_2O_3$  keramik  $ZrO_2$  připravených pro biologické testování.



Obr. 5.52 Zhotovené zkušební keramiky ZrO2 pro biologické testy

Následující obrázek 5.53 schematicky ukazuje dosažené distribuce velikostí zrn a střední velikost zrn keramik Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



Obr. 5.53 Zhotovené zkušební keramiky Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pro biologické testy

Podařilo se připravit sadu keramik ZrO<sub>2</sub> (Obr. 5.52) s velikostí zrn od nano po deset mikrometrů, která by měla umožnit zjistit vliv velikosti zrn, obsahu dopantu  $Y_2O_3$  a drsnosti povrchu na biologickou aktivitu. Připravené zkušební keramiky  $Al_2O_3$  (Obr. 5.53) měly mikrometrové zrna a nebylo možné na nich studovat vliv velikosti nano zrn a byly tedy použity jako zkušení keramiky bez vlivu obsahu dopantu  $Y_2O_3$ 

# 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 [32], který je požadován při hodnocení buněčné aktivity. Proto byly vytvořeny lepené oxidové kompozity, kdy každá keramika byla slinována zvlášť za odlišných podmínek. ZrO<sub>2</sub> bylo slinováno při vyšší teplotě, delším čase a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> při nižší teplotě a kratším čase. Tak mohlo být dosaženo statisticky nevýznamného rozdílu velikosti zrn mezi oběma oxidovými

První vytvořený lepený kompozit byl z dvojice keramik Z7 a A5. Velikost zrn obou keramik je patrná z mikrofotografie na obrázku 5.54.



Obr. 5.54 Mikrofotografie REM keramického lepeného kompozitu Z7 × A5

Srovnání distribučních křivek velikosti zrn je uvedeno na obrázku 5.55, ze kterého je vidět částečný překryv distribucí zrn obou keramik v oblasti 0,5 μm - 10 μm.





Druhý vytvořený lepený kompozit byl z dvojice keramik Z6 a A3. Velikost zrn obou keramik je vidět z mikrofotografie na obrázku 5.56.



Obr. 5.56 Mikrofotografie REM dvojice keramického lepeného kompozitu Z6 × A3

Srovnání distribučních křivek velikosti zrn je uvedeno na obrázku 5.57, ze kterého je vidět významný překryv distribucí A3 a Z6 v oblasti 0,2 µm až 5 µm.



Obr. 5.57 Distribuce střední velikosti zrn dvojice lepeného keramického kompozitu Z6  $\times$  A3

Třetí vytvořený lepený kompozit byl z dvojice keramik Z4 a A2. Velikost zrn je patrná z mikrofotografie na obrázku 5.58.



Obr. 5.58 Mikrofotografie REM dvojice lepeného keramického kompozitu  $Z4 \times A2$ 

Srovnání distribučních křivek velikosti zrn je uvedeno na obrázku 5.59, ze kterého je vidět významný překryv velikosti zrn v oblasti 0,2 µm až 2 µm.



Obr. 5.59 Distribuce střední velikosti zrn dvojice lepeného keramického kompozitu Z4 × A2

# Statistické hodnocení velikostí zrn objemových keramik

Srovnání distribucí bylo hodnoceno neparametrickým Kruskal-Wallis testem a parametrickým Tukeyho mnohonásobným porovnáním distribucí.

Bylo uděláno porovnání distribucí pomocí "Tukeyho metody "mnohonásobného porovnání. Výsledné p-hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 5.2. Zvýrazněny jsou p-hodnoty větší jak 0,05, které značí, že mezi danými skupinami není statisticky významný rozdíl.

Tabulka 5.2 Test Tukeyho mnohonásobného porovnání

	MLOCC v2-ZrO2	E62	MLOCC v1-ZrO2	DS-90M AI2O3	MLOCC v1- AI203	HWY13, 6 1440- 1290- 16h	TM-DAR 1350-1h	HWY5,5 SD 1600- 10h	KMS 99 1550-2h	MLOCC v2- AI203	ZrO2 Y3B 1600-	ZrO2 TZ3YB 1600-	KMS 99 1550- 10h	TM-DAR 1500- 10h	ZrO2 TZ3YB 1400-2h	Zr02 Y88 160-	HWY13, 5 1600- 10h	zrO2 1,5mol %
MLOCCV2-ZrO2	1.000	0.025	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E52	0.025	1.000	1.000	0.271	0.956	0.108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MLOCCV1-ZrO2	0.000	1.000	1.000	0.150	0.984	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0,000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DS-90M AI2O3	0.000	0.271	0.150	1.000	1.000	1.000	0.018	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MLOCCV1-AI2O3	0.002	0.956	0.984	1.000	1.000	1.000	0.960	0.076	0.000	0.112	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HWY13,51440-1290-15h	0.000	0.108	0.042	1.000	1.000	1.000	0.132	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TM-DAR 1350-1h	0.000	0.000	0.000	0.018	0.960	0.132	1.000	0.598	0.000	0.658	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HWY5,5SD 1600-10h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076	0.000	0.598	1.000	0.008	0.998	0.130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
KMS 99 1550-2h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MLOCCV2-AI2O3	0.000	0.000	0.000	0.003	0.112	0.010	0.658	0.998	1.000	1.000	1.000	10.997	0.059	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
ZrO2 Y3B 1600-10h	0.000	0.000	0,000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.130	1.000	1.000	1.000	0.951	0,000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
ZrO2 TZ3YB1600-10h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.997	0.951	1.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
KMS 99 1550-10h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	1.000	0.801	0.000	0.000	0.000	0.000
TM-DAR 1500-10h	0.000	0.000	0,000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.001	900.0	0.801	1.000	0.409	0.065	0.000	0.000
ZrO2 TZ3YB 1400-2h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.409	1.000	0.932	0.000	0.000
ZrO2 Y8B 1600-10h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.065	0.932	1.000	0.999	0.316
HWY13,51600-10h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.999	1.000	0.654
ZrO2 1,5mol%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.316	0.654	1.000

# 5.1.2 Matematický model kinetiky dilatace buněk v přítomnosti keramických materiálů

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

$$A_N \to A_D \tag{5}$$

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

$$-\frac{dA_N}{dt} = +\frac{dA_D}{dt} = k \times A_N \tag{6}$$

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

$$A_D = A_{Dm} \left( 1 - exp(-kt) \right) \tag{7}$$

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

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

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

$$nA_N \to A_D$$
 (9)

Pak platí diferenciální rovnice (10)

$$\frac{dA_D}{dt} = k \times A_N^n \tag{10}$$

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

$$A_D = A_{Dm} \times (A_{Dm}^{1-n} + k \times n \times t - k \times t)^{\frac{1}{1-n}}$$
(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<sup>2</sup>. 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<sub>m</sub> (obr. 5.60)



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

Biologická interakce ZrO<sub>2</sub> keramik byla studována pomocí 24 hodinových dilatačních výluhových testů in-vitro s buněčnými liniemi osteoblastoidní MG63, fibroblastoidní L929 a epiteliální 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 µm.

Biologická interakce Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramik byla studována na objemové A1 pomocí stejných testů jako ZrO<sub>2</sub> 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 výšky drsnosti SRa = 0,098 µm.

#### Buněčná linie MG63 [38, 60-64]

Testování buněčné dilatace in-vitro na ZrO<sub>2</sub> keramikách.



Obr. 5.61 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na ZrO2 keramikách

Z časového průběhu záznamu dilatace na obrázku 5.61 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. %  $Y_2O_3$  bylo dosaženo 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 (submikrozrná keramika) by mohla souviset s negativním vlivem  $Y_2O_3$  na biologickou aktivitu buněk [46, 69] při dlouhých dobách kontaktu keramiky Z1 s dilatovanými buňkami. Přestože nanozrná  $ZrO_2$  keramika pozitivně ovlivnila počáteční fázi dilatace buněk, pravděpodobně rostoucí koncentrace  $Y_2O_3$ , která se do kultivačního média uvolňovala, s rostoucím časem testu mohla být příčinou mírně snížené maximální dilatace po 24 hodinách testování.



Testování buněčné dilatace in vitro na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramice

Obr. 5.62 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na submikrometrovém Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Z obrázku 5.62 je patrné, že u submikrometrové keramiky A1 byla dosažena dilatace 92 % po 8 hodinách. Regresní křivky dilatací osteoblastoidní linie MG63 popisuje rovnice (7) a (11). Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnic jsou uvedeny v tabulce 5.3. Maximální dilatace osteoblastoidních buněk MG63 ve výluhu na A1 po 24 hodinách byla 98 % je obdobná jako materiálu Z2.





Obr. 5.63 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na křemenném skle

Časový průběh dilatace buněk na křemenném skle ukazuje obrázek 5.63. Po 7 hodinách dilatace dosáhla maximální hodnoty 100 %. Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnic (7) a (11) jsou uvedeny v tabulce 5.3. Počáteční rychlost (k = 0,86 vs. 0,68) dilatace u SiO<sub>2</sub> byla obdobná jako u keramiky  $Al_2O_3$ . Biomateriál SiO<sub>2</sub> zkoumal také Nakamura [70] a také u něho zjistil příznivý vliv na proliferaci buněk.

## Buněčná linie L929 [38, 60-64]

Testování buněčné dilatace in vitro na ZrO<sub>2</sub> keramikách.



Obr. 5.64 Dilatace buněk fibroblastoidní linie L929 ve výluhu in-vitro na keramikách ZrO2

Dilatace buněk fibroblastoidní linie L929 byla rychlejší než linie osteoblastoidní, jak je možné zjistit porovnáním rychlostních konstant dilatace uvedených v tabulce 5.3 (k = 2,92 a 0,59 resp. k = 0,41 vs. 0,17). Také v případě testů s linií L929 se ukázalo, že v přítomnosti nano/submikrometrové ZrO<sub>2</sub> keramiky Z1 rostly na počátku (0 - 10 hodin) buňky rychleji než u submikrometrové ZrO<sub>2</sub> keramiky Z2. Vliv obsahu  $Y_2O_3$  v obou keramikách však nebyl průkazný. Maximální dilatace buněk linie L929 dosáhla v přítomnosti obou keramik hodnoty 98 - 100 %. Obě keramiky jsou cytokompatibilní.

*Buněčná linie HeLa* [38, 60-64] Testování buněčné dilatace in vitro na ZrO<sub>2</sub> keramikách



Obr. 5.65 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na ZrO2 keramikách

Z průběhu grafů na obrázku 5.65 je patrné, že rychleji proběhla dilatace buněk v přítomnosti keramiky Z1 s větším podílem nanometrových zrn. Po 3 hodinách trvání dilatačního testu in-vitro dosáhla dilatace 91 %. U keramiky Z2 dopované 1,5 mol. %  $Y_2O_3$  byla dosažena 95 % dilatace po 10 hodinách kultivace. Obě keramiky jsou cytokompatibilní. Tyto výsledky biologických testů souhlasí se závěry práce Hwanga [61], který uvádí, že biokeramika ZrO<sub>2</sub> při kultivací osteoblastoidní linie MG63 dosáhla vyšších hodnot aktivity alkalické fosfatázy než ostatní běžné keramiky. Interakce buněk epiteliální linie HeLa se ZrO<sub>2</sub> keramikou probíhala podobně jako interakce s linií MG63. Vyšší rychlost dilatace buněk v počáteční fázi testu u nano/submikrometrové keramiky by mohla ukazovat na příznivý vliv nanostrukturních zrn. Nižší maximální dilatace u testu s keramikou Z1 - obsahující 3 mol. %  $Y_2O_3$  je možné vysvětlit vyšší koncentrací  $Y_2O_3$  [48, 66] než byla u keramiky Z2. Biologické vlastnosti konvenční ZrO<sub>2</sub> hodnotil ve své práci Yamashita [43], který testoval TOSOH ZrO<sub>2</sub> 3Y-TZP. Tato keramika dosáhla nejlepších výsledků při biotestech množení buněk během kultivačních testů trvajících 1, 3, 6 a 9 dní.



Obr. 5.66 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na submikrometrové keramice A3

Dilatace buněk při testu submikrometrové A1 keramiky dosáhla po 8 hodinách kultivace buněk 84 %. Regresní křivky dilatací epiteloidní linie HeLa popisuje rovnice (7) a (11). Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.3. V porovnání s osteoblastoidní buněčnou linií bylo dosaženo nižší buněčné dilatace. Maximální dilatace u in-vitro testů fibroblastoidní buněčné linie L929 na mikrometrovém Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jsou zhruba o 10 % nižší než u ZrO<sub>2</sub> keramik. Tuto skutečnost také zjistil Affatato [47], který se ve své práci zabýval částicovým keramickým kompozitem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s malým procentem ZrO<sub>2</sub>, jenž se projevil zlepšením biologických vlastností oproti čistému Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

			F	Rovnice	1. řád	u		Rovnice	Rovnice n-tého řádu					
Linie	Keram.	Distribuce velikosti	Hodno koeficie	oty entů	t <sub>m</sub>	Regres. koef.	Hodr	10ty koeficie	entů	Regres. koef.	t <sub>m</sub>			
	Illateriai	zrn [nm]	$A_{Dm}$	k	[11]	r <sup>2</sup>	а	b	c	$r^2$	[11]			
	A1	Bimodální 15.3; 690.5	92.91	0.68	13	0.96	95.99	0.07	1,57	0.97	18			
MG63	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 <sub>2</sub>		94.92	0.86	12	0.96	95.99	0.07	1,57	0.96	24			
1 020	Z2	Bimodální 3.8;122.21	95.56	2.92	4	0.59	105.8	3.1.10 <sup>-5</sup>	4.18	0.98	11			
L929	Z1	Bimodální 7.6; 244.1	96.88	0.41	13	0.92	96.52	0.63	0.89	0.93	11			
	A1	Bimodální 15.3; 690.5	77.24	1.08	8	0.76	83.53	0.06	1.49	0.82	23			
HeLa	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			

Tabulka 5.3 Hodnoty koeficientů  $A_{\text{Dm}},\,k,\,t_{\text{m}},\,a,\,b,\,c$  regresních křivek buněčné dilatace na objemových keramikách

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× 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, nebo to je jen vliv drsnosti povrchu. Tímto problémem se zabývá tato kapitola.

## ZrO<sub>2</sub> 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 5.67 a 5.68 uvedeny keramiky ZrO<sub>2</sub> s velikostí zrn od stovek nanometrů po desítky mikrometrů. Délka trvání testu byla na základě Webstera zvolena 0,5; 1; 2 a 4 hodiny [28].



Obr. 5.67 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu tepelně leptaných ZrO2 biokeramik



Obr. 5.68 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěných ZrO<sub>2</sub> biokeramik

Po uplynutí čtyř hodin testu byla největší plocha 15,18 % pokrytá dilatovanými buňkami zjištěna u vzorku tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 s aritmetická střední výškou drsnosti SRa = 0,086  $\mu$ m ZrO<sub>2</sub> stabilizované 1,5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Obr. 5.67). Tento výsledek odpovídá výsledkům biologických testů Webstera [28], při kterých bylo dosaženo bioaktivní chování na nanometrové keramice Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Nižší plocha pokryvu povrchu buňkami u keramik Z3 a Z1, Z5, Z6 s obsahem Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3 mol. % a Z8 s 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mohla být způsobena nepříznivým vlivem obsahu dopantu (Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na životaschopnost buněk [48, 66]. Plocha dilatovaných buněk u keramik dopovaných 1,5 a 3 mol % 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 mitózy a 4 hodinový test byl příliš krátký. Pro buňky osteoblastoidní linie byl vhodnější drsnější povrch což potvrzuje i práce Bächlea [49].

U leštěných keramik (obrázek 5.68) SRa = 0,036 µm 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<sub>2</sub> nebyl zaznamenán nepříznivý vliv dopantu  $Y_2O_3$  na testovací buněčnou linii MG63, který je popsán v pracích [48, 66]. Byl však zaznamenán vliv drsnosti povrchu, kde u

Z výsledků dilatačních testů na  $ZrO_2$  keramikách je vidět vyšší bioaktivitu submikrometrové keramiky  $ZrO_2$  na tepelně leptaném povrchu keramik než na leštěném. Podobných výsledků dosáhli ve svých pracích s nanostrukturními objemovými keramikami  $Al_2O_3$  a TiO<sub>2</sub> Webster, Dulgar-Tuloch a Luo. [27, 28, 29, 34, 68]

Mikrofotografie na obrázcích 5.69, 5.71 a 5.73 ukazují maximální plochy pokryvu povrchu na tepelně leptaných SRa 0,086 µm keramikách dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63. Na obrázcích 5.70, 5.72 a 5.74 jsou mikrofotografie maximálního pokryvu povrchu dilatovanými buňkami a detail jejich velikosti na tepelně leptaných keramikách.



Obr. 5.69 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z1 stabilizované 3 mol. %  $Y_2O_3$  s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn zrna 100,2 nm



Obr. 5.70 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z1 stabilizované 3 mol. %  $Y_2O_3$  s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace střední velikost zrn střední velikost zrn zrna 100,2 nm



Obr. 5.71 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 stabilizované 1,5 mol. %  $Y_2O_3$  s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrn střední velikost zrn zrna 118,9 nm



Obr. 5.72Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 stabilizované 1,5 mol. %  $Y_2O_3$  s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 118,9 nm



Obr. 5.73 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z3 stabilizované 3 mol. %  $Y_2O_3$  s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrn 371,3 nm



Obr. 5.74 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z3 stabilizované 3 mol. % s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro, střední velikost zrn 371,3 nm

Následující obrázky dokumentují výsledky biologických testů na leštěných keramikách (SRa =  $0,036 \mu m$ ) obsahují mikrofotografie maximálního pokryvu (Obr. 5.75, 5.77 a 5.79) a detaily velikosti dilatovaných buněk (Obr. 5.76, 5.78 a 5.80).



Obr. 5.75 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky Z5 in-vitro s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrna 517,2 nm



Obr. 5.76 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z5 invitro s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrna 517,2 nm

Na obrázku 5.76 je uvedena mikrofotografie REM, kde je vidět dilatovaná buňka na povrchu tepelně leptané keramiky. Obrázek umožňuje srovnání velikosti buňky osteoblastoidní linie MG63 (velikost cca 50 µm) a střední velikosti zrn keramiky (517,8 nm).



Obr. 5.77 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné SRa = 0,036  $\mu$ m mikrometrové keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrn 923,1 nm



Obr. 5.78 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné SRa = 0,036  $\mu$ m mikrometrové keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro, střední velikost zrn 923,1 nm



Obr. 5.79 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné SRa = 0,036  $\mu$ m mikrometrové keramiky Z8 stabilizované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrn 2739,8 nm



Obr. 5.80 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné SRa = 0,036  $\mu$ m mikrometrové keramiky Z8stabilizované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 2739,8 nm

Z mikrofotografií REM je vidět, že velikost dilatované buňky linie MG63 se pohybuje okolo 50 μm.

Z výsledků přímých testů na  $ZrO_2$  keramikách je patrný vliv kombinace velikosti zrn a obsahu dopantu  $Y_2O_3$ .Nejvyšší plocha pokrytá dilatovanými buňkami na tepelně leptaných keramikách byla dosažena na keramice Z2. U leštěných keramik se tento jev neprojevil, což mohlo být způsobeno nedostatečnou povrchovou drsností keramik, při které se nemohla projevit velikost slinutých zrn.

#### Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramiky

U žádné z Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramik nebyla střední velikost zrn v nanometrové oblasti. Nejmenší průměrnou velikost zrn (519,8 nm) měla submikrozrná keramika A1, nejvyšší velikost (1261,6 nm) měla keramika A4. Výsledky ukázaly nejvyšší biologickou aktivitu u mikrozrné leštěné keramiky (SRa = 0,037  $\mu$ m) A4 (14,55 % pokrytí povrchu).



Obr. 5.81 Plocha dilatovaných buněk oste<br/>oblastoidní linie MG63 na povrchu leštěných a tepelně leptaných <br/>  $\rm Al_2O_3$  keramik

Z toho je vidět, že vliv velikosti zrn v submikrozrné a mikrozrné oblasti na biologickou aktivitu buněk linie MG63 nebyl dominantní. Testy dilatace buněk MG63 na povrchu mikrometrových  $Al_2O_3$  keramik nemohou tedy potvrdit chování buněk na nanometrových površích publikované Websterem a spol. [27, 28, 29, 34, 68]. Přímý test keramik  $Al_2O_3$  nebyl ovlivněn přítomností dopantu  $Y_2O_3$ , jednalo se tedy pouze o vliv velikosti zrn a povrchové morfologie keramiky.

Na obrázcích 5.82 a 5.84 jsou mikrofotografie maximálního pokryvu a mikrofotografie s velikostmi dilatovaných buněk na leštěné keramice jsou na obrázcích 5.83 a 5.85.





Obr. 5.82 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky A4 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace, střední velikost zrn 1261,6 nm

Obr. 5.83 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné mikrometrové keramiky A4 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 1261,6 nm

Na obrázku 5.84 je mikrofotografie maximálního pokryvu tepelně leptaného povrchu dilatovanými buňkami MG63. A na obrázku 5.85 je detail velikosti dilatovaných buněk MG63 na tepelně leptané keramice. Ta je okolo 50 µm.



Obr. 5.84 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky A1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 519,8 nm



Obr. 5.85 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky A1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 519,8 nm

## Keramika HA

Nejvyšší plochy pokryvu 14,02 % bylo dosaženo na povrchu leštěného vzorku SRa =  $0,086 \mu m$  submikrometrové keramiky HA s velikostí zrn 613,9 nm dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace.



Obr. 5.86 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěné a tepelně leptané mikrometrové bioaktivní keramiky HA

Tyto výsledky jsou v souladu se známou bioaktivitou HA, která je popsána také v těchto pracích [50, 51, 52, 53, 54, 64, 67, 69, 70]. Dle literatury [73] se buňky osteoblastoidních linií lépe množí na materiálech s vyšší drsností povrchu. Větší plocha dilatovaných buněk na povrchu leštěného HA než tepelně leptaného HA může být způsobena přítomností produktů rozkladů na povrchu zrn HA vzniklých při tepelném leptání.



Obr. 5.87 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky HA s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace

Obr. 5.88 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky HA s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

Na mikrofotografii ze světelného mikroskopu Obr. 5.87 je vidět plocha pokrytí povrchu keramik dilatovanými buňkami MG63. Na mikrofotografii ze REM Obr. 5.88 lze vidět, že velikost nedilatovaných buněk MG63 na HA byla okolo 20 µm.

# 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 × KZ1 po uplynutí čtyř hodin. Mikrofotografie maximálního pokryvu kompozitu buňkami a velikosti dilatovaných osteoblastoidních buněk linie MG63 jsou uvedeny na obrázcích 5.90 a 5.91.



Obr. 5.89 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového elektroforeticky zhotoveného vrstevnatého keramického kompozitu KA1 × KZ1

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 [43, 47, 48, 55, 56, 57, 71, 72]. Jejich závěry jsou obdobné: kompozitní keramické materiály mají velmi dobré biologické vlastnosti, jsou vhodné jak pro kostní štěpy tak stomatologické implantáty, zaleží však také na jejich povrchové úpravě a drsnosti. Autoři [47, 56, 57] se shodují ve výborné biokompatibilitě částicového keramického kompozitu  $Al_2O_3 \times ZrO_2$ .



Obr. 5.90 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěného mikrometrového vrstevnatého biokeramického kompozitu KA1 × KZ1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Very 102 KV DAVE DOMINE TOPUM Very 6/Tescen VAC Lowinc 50 Ps Devoir 1301305M Digital Michaeopy Imaging

Obr. 5.91 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrového vrstevnatého biokeramického kompozitu KA1 × KZ1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

U keramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv1 se projevilo "selektivní chování" buněk. Ty se přednostně nacházely na vrstvách  $ZrO_2$  (Obr. 5.92, 5.93). V dostupné literatuře tento jev popsaný není, náznakem pro vysvětlení tohoto chování by mohla být práce Affataty [47], který ve svém článku dospěl k závěru, že lepších biologických vlastností dosáhl částicový kompozit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s malým obsahem ZrO<sub>2</sub> než čistý Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



Obr. 5.92 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1  $\times$  KZ1



Obr. 5.93 Graf buněčné selekce na povrchu leštěného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1 × KZ1

Také u kompozitního vrstevnatého leštěného materiálu se projevila "selektivita buněk", které více dilatovaly na  $ZrO_2$  vrstvách (Obr. 5.93). U leštěného vzorku byl poměr po 8 hodinách 53,21 %  $ZrO_2$  a 46,79 %  $Al_2O_3$ . Pro srovnání na tepelně leptaném vzorku se po 8 hodinách dilatovalo 73,94 % buněk na  $ZrO_2$  a 26,06 % buněk na  $Al_2O_3$ .

# Keramický kompozit MLOCCv2 (KA2 × KZ2)

Pro srovnání vlastností bioaktivních keramik byla jako standart použita keramika HA.



Obr. 5.94 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného elektroforeticky zhotoveného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2

Nejvyšší plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami byla dosažena u tepelně leptaného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2 po uplynutí čtyř hodin (11,6 %). Tato hodnota je nižší než u bioaktivní keramiky HA. Mikrofotografie největšího pokryvu materiálu jsou uvedeny na obrázcích 5.95 a 5.96.

I u tohoto biokeramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv2 se projevila "selektivita buněk". Ty se přednostně nacházely na vrstvách  $ZrO_2$  jak je vidět z obrázků 5.97 a 5.98.



Obr. 5.95 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.96 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného keramického vrstevnatého kompozitu KA2  $\times$  KZ2 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

I u tohoto biokeramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv2 se projevila "selektivita buněk". Ty se přednostně nacházely na vrstvách  $ZrO_2$  jak je vidět z obrázků 5.97 a 5.98.



Obr. 5.97 Graf buněčné selekce na povrchu leštěného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2



Obr. 5.98 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2

Po osmi hodinách byla dilatace buněk na leštěném povrchu 30,73 % na  $Al_2O_3$  a 69,27 % na  $ZrO_2$ . U kompozitu jehož povrch byl leštěn a poté tepelně leptán, byla plocha dilatovaných buněk 24,90 % na  $Al_2O_3$  a 75,10 % na  $ZrO_2$ .

Výsledky biologických dilatačních in-vitro testů vrstevnatých biokeramických kompozitů MLOCCv1 a MLOCCv2 potvrdily závislost buněčné aktivity na typu materiálu. Zrna ZrO<sub>2</sub> jsou asi 2,1 × menší než zrna Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Proto vzhledem k rozdílné velikosti slinutých zrn keramik je možné se domnívat, že vyšší buněčná selektivita ZrO<sub>2</sub> nemusí být způsobena jen chemickým složením keramiky, ale i vlivem velikosti slinutých zrn oxidových keramik. Proto byly zhotoveny lepené keramických kompozity, které byly připraveny z dvojic slinutých keramik Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a ZrO<sub>2</sub> se stejnou velikostí slinutých zrn.

# Biologické dilatační in-vitro testy lepených keramických kompozitů

## Lepený keramický kompozit Z7 × A5

Nejvyšší plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami osteoblastoidní buněčné linie MG63 33,87 % bylo dosaženo na mikrometrové keramice Z7 (Obr. 5.99) dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$  se střední velikostí zrn 1442,6 nm po 4 hodinách na tepelně leptaném povrchu SRa = 0,086 µm. Nejvyšší plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami na mikrometrové keramice Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> A5 (Obr. 5.100, 5.101) se střední velikostí zrn 1823,9 nm bylo dosaženo po 4 hodinách na tepelně leptaném povrchu SRa = 0,098 µm (10,63 %). Velikost dilatovaných buněk a velikostí zrn keramik Z7 a A5 je porovnávána na obrázcích 5.102 a 5.103.



Obr. 5.99 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozitu Z7 × A5

Nejvyšší plochy pokryvu povrchu buňkami bylo dosaženo na površích keramik, které byly tepelně leptány, a měly proto vyšší povrchovou drsnost než u leštěné keramiky. K obdobnému závěru biotestů dospěl i Bächle [49], kdy k největší proliferaci buněk docházelo na opískovaném povrchu ZrO<sub>2</sub> keramiky s Ra 0,85  $\mu$ m. Podobné výsledky jsou uvedeny také v pracích Affataty [47], Kima [72], kteří hodnotili alkalickou fosfatázu a proliferaci buněk na ZrO<sub>2</sub> keramikách. Podle nich by mělo být dosaženo vyšší proliferace na ZrO<sub>2</sub> keramice s drsnějším povrchem. Negativní vliv obsahu dopantu Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na životaschopnost buněk, který je popsán v práci [48, 66], nebyl u ZrO<sub>2</sub> keramiky potvrzen.

Plocha pokryvu ZrO<sub>2</sub> byla po 4 hodinách trojnásobná oproti Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a vzhledem ke stejné velikosti zrn keramik závisela selekce na chemickém složení keramického substrátu.


Obr. 5.100 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z7 dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$ , střední velikost zrna 1442,6 nm SRa = 0,086 µm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace



Obr. 5.101 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A5, střední velikost zrna 1823,9 nm SRa = 0,098  $\mu$ m s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.102 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky Z7 dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$ , střední velikost zrna 1442,6 nm SRa = 0,086 µm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.103 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky  $Al_2O_3$  A5, střední velikost zrna 1823, nm SRa = 0,098 µm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

Na snímcích ze světelného mikroskopu Obr. 5.100 a 5.101 je vidět celková plocha pokryvu povrchu keramik. Na mikrofotografiích REM 5.102 a 5.103 je vidět dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63, jejichž velikost se pohybuje okolo 30 - 40  $\mu$ m a velikost podkladových zrn keramických substrátů, která je podstatně menší (Z7 stř. vel. zrn 1442,6 nm a A5 stř. vel. zrn 1823,9 nm).



Obr. 5.104 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném kompozitu Z7 dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$  (střední velikost zrn 1442,6 nm) × A5 (střední velikost zrn 1832,9 nm)



Obr. 5.105 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném kompozitu Z7 dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$  (střední velikost zrn 1442,6 nm) × A5 (střední velikost zrn 1832,9 nm)

Dosažené výsledky buněčné selekce osteoblastoidní linie MG63 na leštěném povrchu lepeného kompozitu Z7 × A5 byly po osmi hodinách na Z7 58,32 % a na A5 41,68 %. U tepelně leptaného lepeného kompozitu byla buněčná selekce dosažena po 8 hodinách na Z7 77,63 % a na A5 22,37 %. Biologickými kultivačními in-vitro testy byly potvrzeny výsledky buněčné selekce zjištěné na elektroforeticky zhotovených vrstevnatých kompozitech MLOCCv1 a MLOCCv2, kde také byla vyšší selekce dosahována na ZrO<sub>2</sub>.

## Lepený keramický kompozit Z6 × A3

Vyšší plochy pokrytí dilatovanými buňkami u obou keramik bylo dosaženo na tepelně leptaných keramikách SRa = 0,086  $\mu$ m (ZrO<sub>2</sub>) a SRa = 0,098  $\mu$ m (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), než u keramik leštěných. Maximální plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami osteoblastoidní buněčné linie MG63 (26,20 %) bylo dosaženo na tepelně leptané (SRa = 0,086  $\mu$ m) mikrometrové keramice Z6 se střední velikostí zrn 923,1 nm po 4 hodinách.



Obr. 5.106 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozitu  $Z6 \times A3$ 

Na tepelně leptaném povrchu keramiky A3 (SRa =  $0,098 \mu m$ ) byla dosažena po 4 hodinách nejvyšší plocha pokryvu povrchu (17,53 %) dilatovanými buňkami MG63 u mikrometrové keramiky A3 se střední velikosti zrna 1146,2 nm.

Vyšší pokryv povrchu keramik  $ZrO_2$ , který měl vyšší plošnou povrchovou drsnost, je v souladu s dostupnými pracemi Affatata [47], Bächlea [49], Kima [72], přestože závěry prací [48, 66] poukazují na negativní vliv obsahu dopantu  $Y_2O_3$ .

Na obrázcích 5.107 a 5.108 jsou uvedeny mikrofotografie ze světelného mikroskopu pokryvu povrchu keramik Z6 a A3 buňkami. Na obrázcích 5.109 a 5.110 mikrofotografie z REM dokumentující velikost buněk versus velikost slinutých zrn.



Obr. 5.107 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z6 se střední velikostí zrna 923,1 nm (SRa = 0,086  $\mu$ m) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.108 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A3 se střední velikostí zrna 1146,2 (SRa = 0,098  $\mu$ m) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.109 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky Z6 (SRa = 0,086  $\mu$ m) se střední velikostí zrna 923,1 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách invitro kultivace



Obr. 5.110 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky A3 (SRa =  $0.098 \mu m$ ) se střední velikostí zrna 1146,2 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

Na snímcích ze světelného mikroskopu Obr. 5.107 a 5.108 je vidět celková plocha pokryvu povrchů  $Al_2O_3$  (A3) a  $ZrO_2$  (Z6) lepeného keramického kompozitu. Na mikrofotografiích REM 5.109 a 5.110 je vidět, že velikost dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63, která se pohybuje okolo 30 - 40 µm na keramickém substrátu s velikostí podkladových zrn, která se pohybuje kolem 1 µm.



Obr. 5.111 Graf buněčné selekce buněk oste<br/>oblastoidní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném kompozitu Z<br/>6 $\times A3$ 



Obr. 5.112 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném kompozitu Z6  $\times$  A3

Také u tohoto lepeného kompozitu byla potvrzena selekce buněk podle druhu podkladového materiálu. U leštěného kompozitu byla největší hodnota plochy selektovaných buněk dosažena na keramice Z6 po 8 hodinách 63,63 % u tepelně leptaného kompozitu byla maximální hodnota selekce buněk 81,93 % dosažena po 8 hodinách na keramice Z6. U tohoto lepeného kompozitu se projevila výrazná selekce buněk na materiálu Z6.

## Lepený keramický kompozit Z4 × A2

Nejvyšší plochy pokryvu povrchu (8,65 % dilatovanými buňkami osteoblastoidní buněčné linie MG63 bylo dosaženo na mikrometrové keramice Z4 (Obr. 5.113) se střední velikostí zrn 517,2 nm po 4 hodinách kultivace in-vitro na tepelně leptaném povrchu SRa = 0,086  $\mu$ m. Nejvyšší plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami (7,53 %) bylo dosaženo po 4 hodinách na tepelně leptaném povrchu SRa = 0,098  $\mu$ m mikrometrové keramiky A2 (Obr. 5.113) se střední velikostí zrn 753,9 nm.



Obr. 5.113 Plocha dilatovaných buněk osteoblasto<br/>idní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozit<br/>u $\rm Z4\times A2$ 

Také u tohoto lepeného kompozitu buňky více dilatovaly na tepelně leptaném povrchu materiálu ZrO<sub>2</sub>. Tyto výsledky jsou v souladu s pracemi Affataty [47], Bächleho [49] a Kima [72], podle nichž by mělo být dosaženo vyšší proliferace na ZrO<sub>2</sub> keramice s drsnějším povrchem. Vzhledem k předchozím testům, které potvrzovaly kladný vliv menších zrn keramik a i přes menší množství dopantu  $Y_2O_3$  u ZrO<sub>2</sub> keramiky s popisovaným negativním vlivem na životaschopnost buněk [48, 66], byla dosažená plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňka nejnižší ze všech testovaných kompozitů. Podobný rozdíl rychlostí dilatace buněk byl zaznamenán u ZrO<sub>2</sub> s 1,5 mol. % a 3 mol. %  $Y_2O_3$ . Při delší době kultivace se rychlost dilatace srovnala a maximální dilatace buněk byla vyšší u keramik s nižším obsahem dopantu  $Y_2O_3$ . Toto se potvrdilo i u 8 hodinového testu selekce buněk, jak je vidět z mikrofotografie na obrázku 5.114.



Obr. 5.114 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z4 se střední velikostí zrn 517,2 nm (SRa = 0,086 µm) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 8 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.115 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky A2 se střední velikostí zrna 753,9 nm (SRa = 0,098  $\mu$ m) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 8 hodinách in-vitro kultivace



Obr. 5.116 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z4 se střední velikostí zrn 517,2 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro



Obr. 5.117 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A2 se střední velikostí zrn 753,9 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

Na mikrofotografiích ze světelného mikroskopu obr. 5.114 a 5.115 je vidět celková plocha pokryvu povrchů Z4 a A2 lepeného keramického kompozitu. Na mikrofotografiích REM 5.116 a 5.117 je uvedená velikost dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63, která se pohybuje okolo 30 - 40 µm a velikost podkladových zrn keramického substrátu pohybující se mezi 0,5 až 0,75 µm.



Obr. 5.118 Graf buněčné selekce buněk osteoblasto<br/>idní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném keramickém kompozitu Z<br/>4  $\times$  A2



Obr. 5.119 Graf buněčné selekce buněk osteoblasto<br/>idní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném keramickém kompozit<br/>u $\rm Z4\times A2$ 

Maximální hodnota selekce buněk na Z4 (73,10 %) byla u leštěného keramického kompozitu dosažena po 8 hodině kultivace. U tepelně leptaného lepeného kompozitu bylo nejvyšší hodnoty selekce (92,57%) dosaženo po 8 hodinách.

## Shrnutí výsledků biologických testů

## a) Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik ve výluhu

Výsledky biologických dilatačních testů osteoblastoidní buněčné linie MG63 na keramikách Z1 a Z2 ukázaly, že keramika s menším zrnem Z1 (100,2 nm) způsobuje vyšší rychlosti dilatace než keramika Z2 se zrnem větším (118,9 nm). Maximální dilatace byla však vyšší u materiálu Z2 s nižším obsahem dopantu  $Y_2O_3$ , který podle článků [48, 66] má negativní vliv na životaschopnost buněk. Při testování materiálu A1 (střední velikost zrn 519,8 nm) touto buněčnou linií, byla rychlost dilatace podobná jako u keramiky Z1, přestože je velikost zrn A1 zhruba 5× větší než u Z1. Z toho vyplývá, že obsah dopantu  $Y_2O_3$  mohl mít větší negativní vliv na dilataci buněk osteoblastoidní linie MG63 než velikost jejich zrn. Nejvyšší procento dilatace u této linie bylo zaznamenáno u SiO<sub>2</sub>, který podle [13] má příznivý vliv na proliferaci buněk, kdy rychlost dilatace byla podobná jako u keramiky Z1.

Při testování fibroblastoidní buněčnou linií L929 byl vliv obsahu dopantu  $Y_2O_3$  nižší než u osteoblastoidní linie MG63. Hlavní vliv měla velikost zrn, kdy u keramiky Z1 (střední velikost zrn 100,2 nm) byla zjištěna vyšší rychlost dilatace i konečné procento dilatovaných buněk než u keramiky Z2 (střední velikost zrn 118,9 nm).

Dilatační testy epiteliální buněčnou linií HeLa ukázaly, že u keramiky Z1 byla rychlost dilatace stejná jako u linií MG63 a L929, avšak s maximálním procentem dilatace nižším asi o 10 %. Také u keramiky Z2 byla rychlost dilatace vyšší než u linií MG63 s L929, ale maximální dilatace byla menší asi o 5 %, přesto však dosáhla vyšší dilatace než u keramiky Z1. Také u této linie má zřejmě vyšší vliv obsah dopantu  $Y_2O_3$  než vliv velikosti zrn. U keramiky A1 byla rychlost dilatace menší než u linie MG63 a také maximální dilatace byla menší o cca 15 % než to u linie MG63. Z těchto výsledků vyplývá, že u linie HeLa byla zaznamenána vyšší citlivost na velikost zrn než u linie MG63.

#### b) Biologické dilatační in-vitro testy objemových keramik v přímém kontaktu

## ZrO<sub>2</sub> sada keramik:

Plocha dilatace buněk dosažená na tepelně leptaných površích keramik s SRa = 0,086 µm byla nejvyšší na keramice Z2 (střední velikost zrn 118,9 nm) s obsahem dopantu  $Y_2O_3$  1,5 mol. % poté následovaly keramiky Z1 (3 mol. %  $Y_2O_3$ , stř. velikost zrn 100,2 nm), Z3 (3 mol. %  $Y_2O_3$ , stř. velikost zrn 371,3 nm), HA (stř. velikost zrn 613,9 nm), Z8 (8 mol. %  $Y_2O_3$ , stř. velikost zrn 2739,8 nm), Z6 (3 mol. %  $Y_2O_3$ , stř. velikost zrn 923,1 nm) a Z5 (8 mol. %  $Y_2O_3$ , stř. velikost zrn 517,8 nm). Z tohoto výsledného pořadí lze uvažovat, že na plochu dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 měl spíše vliv obsah dopantu  $Y_2O_3$  než velikost slinutých zrn keramik.

Na leštěných površích keramik ZrO<sub>2</sub> (SRa = 0,036  $\mu$ m) tento vliv dopantu Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> není patrný. Nejvyšší plochy pokryvu bylo dosaženo na keramice Z5 (8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, stř. velikost zrn 517,8 nm), poté následovaly HA (stř. velikost zrn 613,9 nm), Z3 (3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, stř. velikost zrn 371,3 nm), Z2 (střední velikost zrn 118,9 nm), Z6 (3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, stř. velikost zrn 923,1 nm), Z1 (3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, stř. velikost zrn 100,2 nm) a nejmenší plochy dilatovaných buněk dosáhla keramika Z8 (8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, stř. velikost zrn 2739,8 nm). Z výsledků vyplývá, že vyšší plochy pokryvu dilatovanými buňkami bylo dosaženo na površích tepelně leptaných keramik s výjimkou keramiky Z5. Z výsledků nelze určit, zda byl převládající vliv velikosti zrn či obsahu dopantu. Dle literatury [49] dosahují vyšší biologické aktivity osteoblastoidních linií keramiky ZrO<sub>2</sub> s vyšší drsností.

# Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sada keramik:

Ani jedna z testovaných keramik neměla nanometrová zrna, a proto nelze potvrdit ani vyvrátit výsledky Webstera [26, 27, 28, 29, 46]. Maximální dosažená plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami byla dosažena u leštěné (SRa = 0,037  $\mu$ m) keramiky A4 (stř. velikost zrna 1216.6 nm). Dosažená plocha byla vyšší než u leštěné keramiky HA (stř. velikost zrna 613.6 nm), která byla použita k porovnání biologických vlastností.

# HA

Vyšší plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 byla dosažena na leštěném povrchu (SRa = 0,037  $\mu$ m) HA (stř. velikost zrna 613,9 nm) 17,9 % než na tepelně leptaném drsnějším povrchu (SRa = 0,098  $\mu$ m). Vyšší plocha dilatovaných buněk na povrchu leštěného HA než tepelně leptaného HA může být způsobena přítomností rozkladných produktů na povrchu zrn HA vzniklých při tepelném leptání.

# Keramický kompozit MLOCCv1 KZ1 × KA1:

Vyšší plochy pokryvu povrchu buňkami osteoblastoidní linie MG63 (13,16 %) bylo dosaženo na tepelně leptaném povrchu keramického vrstevnatého kompozitu KZ1 (stř. velikost zrn 333,1 nm) × KA1 (stř. velikost zrn 456,1 nm). Při vyhodnocování biologických testů byla zaznamenána vyšší selektivita buněk k ZrO<sub>2</sub>. Obrazová analýza povrchu NIS Elements AR keramického vrstevnatého kompozitu toto potvrdila. Maximální dosažená selekce buněk na tepelně leptaném KZ1 byla po 8 hodinách 73,94 %. Na leštěném povrchu bylo dosaženo selekce buněk po 8 hodinách na KZ1 61,94 %. Z výsledků selekce vyplývá, že kromě typu materiálu má na selekci buněk také vliv drsnosti povrchu.

# Keramický kompozit MLOCCv2 KZ2 × KA2:

Potvrdily se výsledky zvýšené selektivity buněk osteoblastoidní linie MG63 k materiálu ZrO<sub>2</sub> na KZ2 zjištěné u předchozího keramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv1. Vyšší hodnoty selekce buněk (75,90 %) bylo opět dosaženo na tepelně leptaném povrchu keramického kompozitu MLOCCv2.

Protože u druhého kompozitu byl poměr velikosti zrn KZ1 (stř. velikost zrn 341,1 nm) : KA1 (stř. velikost zrn 729,1 nm) okolo 1:2, nebylo možné s určitostí určit, zda je to vlivem druhu materiálu nebo velikostí zrn. Proto byly zhotoveny dvojice objemových keramik  $Al_2O_3$  a  $ZrO_2$  se stejnými velikostmi slinutých zrn a ty byly následně slepeny. A tak byl vyloučen vliv velikosti zrn.

# Lepený keramický kompozit Z7 × A5:

Tento lepený kompozit byl zhotoven z keramiky Z7 dopované 8 mol. %  $Y_2O_3$  se střední velikostí zrn 1442 nm a A5 se střední velikostí zrn 1832,9 nm. Nejvyšší plocha pokryvu byla dosažena na tepelně leptané keramice Z7 (SRa = 0,086 µm) 33,87 % po 4 hodinách in-vitro kultivace. Plocha dilatovaných buněk na tepelně leptané keramice A5 (SRa = 0,098 µm) po 4 hodinách byla 10,63 %. Z hodnot plochy pokryvu jednotlivých keramik byla určená selektivita buněk k ZrO<sub>2</sub>, která po 8 hodinách dosahovala na leštěném keramickém kompozitu 74,47 %. U tepelně leptaného kompozitu tato hodnota byla ještě vyšší a to 77,63%. Biologické testy ukázaly vyšší selektivitu k ZrO<sub>2</sub> na površích obou drsností i přes obsah dopantu  $Y_2O_3$  8 mol. %. I zde se potvrdilo, že povrch ZrO<sub>2</sub> z vyšší povrchovou drsností je pro osteoblastoidní buňky linie MG63 vhodnější [47, 49, 55].

## Lepený keramický kompozit Z6 × A3:

Lepený kompozit byl zhotovený z keramiky Z6 dopované 3 mol. %  $Y_2O_3$  se střední velikostí zrna 923,1 nm a keramiky A3 se střední velikostí zrn 1146,2 nm. Maximální plocha pokrytí povrchu dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 (26,20 %) byla dosažena na tepelně leptané (SRa = 0,086 µm) keramice Z6 po 4 hodinách kultivace. Nejvyšší plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami (17,53 nm) byla na keramice A3 byla po 4 hodinách kultivace. Přepočtem plochy pokryvu ke zjištění hodnot selektivity k ZrO<sub>2</sub> byly zjištěny hodnoty 63,37 % na leštěném povrchu keramiky (SRa = 0,036 µm) a 81,93 % na povrchu tepelně leptaném (SRa = 0,086 µm). Byly dosaženy menší plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami i přes menší velikost zrn obou keramik a menší obsah dopantu  $Y_2O_3$  v ZrO<sub>2</sub>. Ten tedy neměl výraznější vliv na buněčnou životaschopnost [48, 66].

# Lepený keramický kompozit Z4 × A2:

Byl vytvořen z keramiky Z4 dopované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se střední velikostí zrn 517,2 nm a se střední velikostí zrn 753,9 nm. Nejvyšší plocha pokryvu povrchu keramiky A2 dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 (8,56 %) byla dosažena na tepelně leptané keramice (SRa = 0,086 µm) Z4 po 4 hodinách. Maximální plocha pokryvu povrchu dilatovanými buňkami (7,53 %) byla zjištěna na tepelně leptané keramice (SRa = 0,098  $\mu$ m) A2. Přepočtem ploch pokryvu keramik dilatovanými buňkami 8 hodinové kultivace in-vitro byla zjištěna selektivita k ZrO<sub>2</sub> o hodnotě 73,10 % na leštěném povrchu a 92,57 % na povrchu tepelně leptaném. Keramiky tohoto kompozitu měly nejmenší střední velikost zrn a Z4 keramika měla i nejmenší obsah dopantu Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mezi lepenými kompozity a přesto byla pokrytá plocha dilatovanými buňkami po 4 hodinách nejnižší. Předchozí výsledky biologických testů naznačovaly, že právě tyto výsledky pokryvu plochy by měly patřit k nejvyšším. Při delší době kultivace a to 8 hodin došlo k nárůstu rychlosti dilatace a konečná dosažená dilatace buněk u Z4 keramiky byla vyšší než u keramik s vyšším obsahem dopantu Y2O3 a většími zrny. Výsledek pokryvu povrchu buňkami u 8 hodinového testu a selekce buněk, je vidět z mikrofotografie na obrázku 5.114.

# 5.2 Povlakované materiály

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 ZrO<sub>2</sub> povlaku (velikost zrn 10  $\div$  100 nm) na oxidových keramických substrátech (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>), 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. Byly vybrány vizuálně bezdefektní povlaky a ty byly slinuty při 800°C/2hod. Znovu byla provedena vizuální kontrola na stereomikroskopu a na bezdefektních byly provedeny indentační testy soudržnosti se substrátem. Vyhovující povlaky byly podrobeny biologickým dilatačním in-vitro testům s buněčnými liniemi: epiteliální (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. 5.120) celistvé bez defektů či ředin a "nevyhovující" (Obr. 5.121) povlaky, které obsahovaly bubliny či řediny.



Obr. 5.120 Vyhovující povlak - neslinutý nanometrový  $ZrO_2$  povlak nanesený na křemičitém skle



Obr. 5.121 Nevyhovující povlak - neslinutý nanometrový  $\rm ZrO_2$  povlak nanesený na křemičitém skle

## 5.2.1 Studium technologie přípravy povlakovaných materiálů

Ke zjištění optimálního počtu nanesených vrstev pro celistvé pokrytí substrátu, bylo použito křemičité sklo. Zkušební počet nanesených vrstev povlaku byl 2, 4, 6, 8 a teploty předehřevu substrátu byly 200, 250, 300°C. K nanášení byla použita Suspenze 1 (viz. strana 12). Kvalita nanesených povlaků se zhoršovala s rostoucí teplotou a počtem vrstev jak je vidět na obrázku 5.122. Při větším počtu vrstev než 2 docházelo k praskání a loupání povlaků. To mohlo být způsobeno tepelným pnutím v silné vysušené vrstvě na substrátu. Vyhovující povlak byl získán při nanesení dvou vrstev při teplotě substrátu 200°C.



Obr. 5.122 Vizuální test závislosti počtu nanesených vrstev povlaku  $ZrO_2$  a potřebného předehřevu křemičitého skla při sprejování koloidní Suspenze 1

# Studium technologických parametrů (teploty substrátu × průtoku koloidní suspenze) při nanášení koloidní Suspenze 1 sprejováním na podložku z křemičitého skla

Pro test vhodné kombinace teploty substrátu a průtoku koloidní suspenze bylo jako substrát zvoleno křemičité sklo. Testovány byly průtoky 100, 200, 300 µl/min a teploty substrátu 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500°C. K testu byla použita Suspenze 1 a dvě vrstvy, což byl optimální počet nanesených vrstev zjištěný v předchozím testu. "Vyhovujících" povlaků, jak je z obrázku 5.123 patrné, bylo dosaženo pří průtoku suspenze 100 µl/min a teplotách 200 a 250°C. Při ostatních kombinacích průtoku suspenze a teploty substrátu vznikaly pouze "defektní" vrstvy. I u tohoto testu se jako vhodná ukázala teplota substrátu 200°C, stejně jako u předchozího testu.



Obr. 5.123 Výsledky vizuálního hodnocení vrstev  $ZrO_2$  nanesených ultrazvukovým sprejováním koloidní Suspenze 1 na povrch křemičitého skla při rychlosti průtoku koloidní suspenze 100 - 300  $\mu$ l/min a teplot substrátu 200 - 500°C

## Stanovení povrchové drsnosti keramických substrátů

Pro stanovení povrchové drsnosti substrátů byly hotové substráty rozděleny na tři skupiny. První skupina byla ponechána v původním stavu po slinutí, kdy střední aritmetická střední výška drsnosti původního povrchu byla SRa = 0,174 µm. Profil povrchu je uveden na obrázku 5.124. Druhá skupina byla vyleštěna a aritmetická střední výška drsnosti SRa = 0,036 µm, profil povrchu je na obrázku 5.125. Třetí skupina byla zdrsněna diamantovým hrubovacím kotoučem Piano MD 120 (STRUERS, Dánsko) a byla poté dosažena aritmetická střední výška drsnosti SRa = 0,258. Tento profil je uveden na obrázku 5.126.



## Povlak dvouvrstvý na substrátu Z1 s původním povrchem

Ke sprejování povlaků byla použita Suspenze 1. Vyhovující neslinuté povlaky (Obr. 5.127) byly získány při průtoku suspenze 80  $\mu$ l/min a při teplotách substrátu 200, 250 a 300°C, dále pak při průtoku 100  $\mu$ l/min a teplotách substrátu 250 a 450°C a u průtoku suspenze 200  $\mu$ l/min a teplotách substrátu 300, 400°C. Vzorky zhotovené ostatními kombinacemi průtoku a teploty byly popraskané, odlupující se nebo s bublinami. Výsledky sprejování substrátu Z1 potvrdily zkušební výsledky získané na substrátu z křemičitého skla. Celistvé povlaky byly slinuty a výsledky jsou uvedeny na obrázku 5.128. Po slinutí zůstaly celistvé povlaky zhotovené při průtoku suspenze 80  $\mu$ l/min a teplotách substrátu 200, 250, 300°C a při průtoku suspenze 100  $\mu$ l/min při teplotě substrátu 450°C. Po slinutí povlaků se opět potvrdila vhodná teplota substrátu 200°C. Dále se ukázalo, že lepší výsledky byly získány s nižšími průtoky suspenze 80 a 100  $\mu$ l/min, kdy bylo dosaženo vyššího počtu dobrých povlaků při různých teplotách substrátu.



Obr. 5.127 Mikrofotografie nanesených dvou vrstev neslinutého povlaku  $ZrO_2$  na lisovaném slinutém substrátu Z1 (závislost na průtoku suspenze a teplotě substrátu s drsností SRa = 0,174  $\mu$ m



Obr. 5.128 Mikrofotografie nanesených dvou vrstev slinutého povlaku  $ZrO_2$  na lisovaném slinutém substrátu Z1 (závislost na průtoku suspenze a teplotě substrátu s drsností  $SRa = 0,174 \ \mu m$ 

#### Testování vlivu povrchové drsnosti substrátu na adhezi povlaku ZrO<sub>2</sub>

Byly připraveny tři skupiny substrátů Z1: leštěný SRa = 0,036  $\mu$ m, původní SRa = 0,174  $\mu$ m a hrubovaný SRa = 0,258  $\mu$ m. Na předehřátý substrát o teplotě 200°C a 250°C byly naneseny 2 vrstvy Suspenze 1. Poté byly povlaky slinuty.

Dobrý povlak byl získán pouze na vzorku s povrchovou drsností SRa = 0,174  $\mu$ m a teplotě substrátu 200°C. Povlaky nanesené na méně drsné (SRa = 0,036  $\mu$ m) a drsnější povrchy substrátů (SRa = 0,036  $\mu$ m) měly praskliny anebo na leštěném povrchu nedržely. (Obr. 5.129). Potvrdil se výsledek předchozích testů o vhodnosti teploty substrátu 200°C a drsnosti povrchu substrátu SRa = 0,174  $\mu$ m.



Obr. 5.129 Mikrofotografie slinutého dvouvrstvého povlaku  $\rm ZrO_2$ na keramickém substrátu Z1 - vliv drsnosti povrchu

Na základě zjištěných technologických výsledků byla pro následující biologické in-vitro testy dilatace buněk zhotovena sada vzorků s parametry: substrát lisovaný Z1, teplota substrátu 200°C, povrch po slinutí původní SRa = 0,174  $\mu$ m, 2 nanesené vrstvy ze Suspenze 1.

# Studium technologických parametrů (teploty a počtu vrstev) při nanášení koloidní Suspenze 2 na substrátu A1 ( $SRa = 0,174 \mu m$ )

K nanášení povlaku byla vybrána Suspenze 2 (viz. strana 12) dávkovaná rychlostí 100µl/min. Při nízké koncentraci keramického prášku ZrO<sub>2</sub> nedošlo po dvou vrstvách k dostatečnému pokrytí povrchu substrátu a k vytvoření celistvého povlaku. Při zvyšujícím se počtu vrstev 4, 6, 8 se zlepšovalo pokrytí, ale také vzrůstalo množství bublin a prasklin což je dokumentováno na obrázku 5.130. Mohlo to být způsobeno rozdílnou tepelnou roztažností ZrO<sub>2</sub> vrstev ( $\beta$  = 10.3 10<sup>-6</sup>/ °C) a substrátu A3 ( $\beta$  = 8.1 10<sup>-6</sup>/ °C) během sušení koloidní suspenze.



Obr. 5.130 Fotografie naneseného neslinutého povlaku ZrO<sub>2</sub> na lisovaném substrátu A1 (test kombinace teploty a počtu nanesených vrstev)

# Studium technologických parametrů (teploty a průtoku koloidní suspenze) při nanášení koloidní Suspenze 2 na substrátu A1 (SRa = 0,174 μm)

Dále byly testovány průtoky 100, 200, 300 µl/min a teploty 200 až 500°C. Ani jedna z kombinací teploty substrátu a průtoku suspenze nevedla k vytvoření dobrého povlaku. Ty nejlepší povlaky, kde bylo nejméně defektů bublin (do 3% celkové plochy určeno pomocí obrazové analýzy NIS AR), byly označeny "√", výsledky jsou uvedeny na obrázku 5.131. Příčinou tvorby nevyhovujících povlaků mohla být příliš silná vrstva povlaku potřebná k celistvému pokrytí substrátu, která měla odlišnou tepelnou roztažnost než substrát, nebo různé chemické složení substrátu a vrstvy.



Obr. 5.131 Mikrofotografie výsledků testu sprejovaného neslinutého povlaku (dvě vrstvy) v závislosti na teplotě povlaku ZrO<sub>2</sub> na keramickém substrátu A1 (závislosti průtoku suspenze a teploty substrátu)

# Studium technologických parametrů (teploty a průtoku koloidní suspenze) při nanášení koloidní Suspenze 1 na substrátu A1 (SRa = 0,174 µm)

K zjištění vhodné kombinace průtoku suspenze a teploty substrátu pro vytvoření dobrého nanometrového povlaku  $ZrO_2$  na substrátu lisovaném A1 pro biologické testy byla použita Suspenze 1. Ta byla sprejována ve dvou vrstvách na předehřátý substrát o teplotách 200 a 250°C při průtocích 80 a 100 µl/min. K vytvoření vyhovujícího povlaku vedla pouze kombinace teploty substrátu 200°C a průtoku suspenze 100 µl/min. Tato kombinace byla potom použita při přípravě vzorků pro biologické dilatační in-vitro testy. Zbylé testované kombinace vytvořily necelistvé povlaky s prasklinami a bublinami. Výsledky testu jsou vyfotografovány na obrázku 5.132.

I při pokryvu A1 substrátů se ukázala být vhodná kombinace parametrů suspenze 1, teplota předehřevu substrátu 200°C, dvě vrstvy povlaku a plošná drsnost povrchu substrátu SRa =  $0,174 \mu m$ , která se osvědčila při předchozích testech na substrátech ZrO<sub>2</sub> a křemičitém skle.



Obr. 5.132 Fotografie dvou vrstev neslinutého nanometrového povlaku  $ZrO_2$  na lisovaném substrátu A1 SRa = 0,174  $\mu$ m (závislost na teplotě substrátu a průtoku suspenze)

## Povlak dvouvrstvý na substrátu SiO<sub>2</sub>

Aby bylo možné vyzkoušet celý technologický proces od nanesení povlaku po jeho slinutí bylo jako substrátu použito křemenné sklo, které během slinování nemění své rozměry. Tento bioinertní substrát je také vhodný pro použití při biologických in-vitro testech jako srovnávací pozitivní kontrola. Dvouvrstvý povlak byl nanášen při teplotě substrátu 200 a 250°C a pro sprejování byla použita Suspenze 1. Zhotovené povlaky jsou vyfotografovány na obrázcích 5.133 a 5.134. Ze snímků je patrné, že pro vytvoření povlaku byla vhodná teplota substrátu 200°C, což je teplota, která se osvědčila i u ostatních materiálů. Vznikaly velké praskliny v objemu povlaku při teplotách substrátu 200 a 250°C. Tyto praskliny mohly být způsobeny  $20 \times$  menším koeficientem tepelné roztažnosti SiO<sub>2</sub>, než má ZrO<sub>2</sub>.



Obr. 5.133 Slinutý dvouvrstvý nanometrový povlak  $ZrO_2$  na substrátu  $SiO_2$ ; teplota předehřevu substrátu při nanášení 200°C



Obr. 5.134 Slinutý dvouvrstvý nanometrový povlak  $ZrO_2$  na substrátu  $SiO_{2;}$  teplota předehřevu substrátu při nanášení 250°C

## 5.2.2. 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<sub>2</sub> uvedených na obrázku 5.135. Střední drsnost povlaku se pohybuje mezi 10 a 20  $\mu$ m. Drsnost povlaků Z1 vyhodnocená vizuálním porovnáním REM mikrofotografií byla srovnána s drsností tepelně leptaných objemových keramik ZrO<sub>2</sub> keramik vyhodnocených pomocí AFM mikrofotografií. Keramika E52 ZrO<sub>2</sub> měla hodnotu drsnosti ~ 0,13  $\mu$ m, keramika Z1 ~ 0,14  $\mu$ m a keramika Z6 ~ 0,19  $\mu$ m, což jsou hodnoty asi 100 × menší než hodnoty drsnosti ZrO<sub>2</sub> povlaků. Vzhledem k velikosti buněk je okolo 50  $\mu$ m 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. Dále je z mikrofotografií na obrázku 5.135 patrné, že i po slinutí byla velikost zrn povlaku pod 100 nm, tedy menší než u objemových keramik.



Obr. 5.135 REM mikrofotografie povrchu dvouvrstvého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na substrátu Z1 (SRa = 0,174  $\mu$ m, teplota substrátu 200°C, průtok suspenze 100  $\mu$ l/min)

#### 5.2.3. 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.

# Leštěný substrát Z1 (SRa = 0,036µm), povlak nano ZrO<sub>2</sub>, 2 vrstvy, 100µl/min, 200°C

Indentační zkoušky ukázaly, že nanometrový povlak  $ZrO_2$  byl dobře spojen s keramickým substrátem Z1 s aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,036 µm. Pro indentaci bylo použito zatížení 1 a 5 kg. Nanometrový povlak neměl tendenci se během indentace olupovat, avšak obsahoval již technologické mikropraskliny, které vznikly při sprejování suspenze 1 na ohřátý substrát povlaku nebo při slinování. Výsledky testu jsou dokumentovány mikrofotografiemi, které jsou uvedeny na obrázcích 5.136, 5.137 a 5.138.



Obr. 5.136 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem Z1s drsností SRa = 0,036  $\mu$ m při zatížení 5 a 1 kg (přehledový snímek)

Obr. 5.137 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem Z1s drsností SRa = 0,036 µm při zatížení 5 kg



Obr. 5.138 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým lisovaným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,036  $\mu$ m při zatížení 1kg

Substrát Z1 původní (SRa = 0,174µm), povlak nano ZrO<sub>2</sub>, 2 vrstvy, 100µl/min, 200°C

Indentační zkoušky ukázaly dobrou adhezi nanometrového  $ZrO_2$  povlaku k substrátu Z1 s aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,174 µm. Bylo použito zatížení 1, 5, 10, 20 a 30 kg. Ani u jednoho ze zatížení nedošlo k odloupnutí povlaku od substrátu, podobně jako u leštěného substrátu Z1. Výsledky testů jsou zachycené na obrázcích 5.139 a 5.140. Na mikrofotografiích jsou patrné praskliny, které však neměly souvislost s provedenou indentační zkouškou. Vznikly nejspíše při vysoušení či slinování nanometrového povlaku, a vzhledem k nízkému rozlišení optického mikroskopu se nedaly zachytit dříve při předchozích vizuálních testech





Obr. 5.139 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem Z1 drsnost SRa = 0,174 µm při zatížení 1, 5, 20 a 30 kg - přehledový snímek

Obr. 5.140 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem Z1 drsnost SRa = 0,174 µm při zatížení 30 kg

## Substrát Z1 hrubovaný (SRa = 0,258 µm) povlak nano ZrO<sub>2</sub> 2 vrstvy 100µl/min, 200°C

Indentační zkoušky ukázaly špatnou soudržnost slinutého nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem Z1, který měl aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,258 µm. Povlak se během indentace celý sloupl, na rozdíl od povlaku na leštěném a původním substrátě  $ZrO_2$  a to u zatížení 30 a 10 kg. Příčinou vzájemné nesoudržnosti by mohla být rozdílná teplotní roztažnost materiálů při slinování povlaku na již slinutém substrátu, spojená se špatným mechanickým ulpěním povlaku na substrátu. Mikrofotografie zhotovené po indentačním testu jsou na obrázcích 5.141, 5.142 a 5.143.



Obr. 5.141 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost  $SRa = 0,258 \ \mu m$  při zatížení 10 a 30 kg – přehledový snímek



Obr. 5.142 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,258 µm při zatížení 30 kg



Obr. 5.143 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,258 µm při zatížení 10kg

### Substrát A1 leštěný (SRa = 0,036 µm) povlak nano ZrO<sub>2</sub>, 2 vrstvy, 100µl/min, 200°C

Indentační zkoušky ukázaly špatnou soudržnost nanometrového povlaku  $ZrO_2$  k leštěnému keramickému substrátu A1 s aritmetickou střední výškou drsnosti  $SRa = 0,036 \mu m$ . Povlak se během indentace 5 kg celý sloupl. Příčinou mohlo být různé chemické složení substrátu a vrstvy nebo narušení jejich soudržnosti vlivem jejich rozdílných tepelných roztažností, podobně jako u hrubovaného  $ZrO_2$  substrátu. Výsledky indentačního testu jsou uvedeny na mikrofotografiích, které jsou na obrázcích 5.144 a 5.145.



Obr. 5.144 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem A1 drsnost SRa = 0,036 µm při zatížení 5 kg – přehledový snímek

Obr. 5.145 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem A1 drsnost SRa = 0,036 µm při zatížení 5 kg

Indentační zkoušky zatížením 1 a 30 kg ukázaly velmi dobrou soudržnost nanometrového povlaku  $ZrO_2$  a materiálu substrátu A1 s aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,174 µm na rozdíl od vzorku s původním povrchem o drsnosti SRa = 0,174 µm. Praskliny v povlaku byly zřejmě způsobeny rozdílnou teplotní roztažností substrátu a povlaku v průběhu slinovacího procesu nebo při sušení naneseného povlaku. Výsledky jsou dokumentovány na obrázcích 5.146, 5.147 a 5.148, které obsahují mikrofotografie povlaku po ukončení indentačního testu.



Obr. 5.146 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost SRa = 0174  $\mu$ m při zatížení 1 a 30 kg – přehledový snímek



 HV
 15.0 kV
 DATE 01/25/11
 100 um
 Vega OTescan

 VAC: LowVac, 10 Pa
 Device: TS0136XM
 Digital Microscopy Imaging



Obr. 5.147 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost SRa = 0,174  $\mu$ m při zatížení 30 kg

Obr. 5.148 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost SRa = 0,174  $\mu$ m při zatížení 1kg

# Substrát A1, hrubovaný SRa = 0,258µm, povlak nano ZrO<sub>2</sub>, 2 vrstvy 100µl/min, 200°C

Indentační zkoušky zatížením 5, 20 a 30 kg ukázaly velmi dobrou soudržnost nanometrového povlaku  $ZrO_2$  k materiálu substrátu A1 s povrchovou plošnou drsností  $SRa = 0,258 \ \mu\text{m}$  stejně jako vzorek s leštěným povrchem a aritmetickou střední výškou drsnosti  $SRa = 0,036 \ \mu\text{m}$ . Praskliny v povlaku byly nejspíše způsobeny rozdílnou teplotní roztažností substrátu a povlaku v průběhu slinovacího procesu nebo při vysušení naneseného povlaku. Výsledky jsou dokumentovány na obrázcích 5.149, 5.150 a 5.151, které obsahují mikrofotografie povlaku po ukončení indentačního testu.





 HV:
 15.0 kV
 DATE:
 01/25/11
 500 um
 Vega ©Tescan
 HV:
 15.0 kV
 DATE:
 01/25/11
 200 u

 VAC:
 LowVac, 10 Pa
 Device:
 TS5136XM
 Digital Microscopy Imagingi
 VAC:
 LowVac, 10 Pa
 Device:
 TS5136XM

Vega ©Tescan Digital Microscopy Imaging

Obr. 5.149 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258  $\mu$ m při zatížení 5, 20 a 30 kg – přehledový snímek

Obr. 5.150 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258 µm při zatížení 30 kg



Obr. 5.151 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258 µm při zatížení 20kg

# Shrnutí výsledků studia technologie přípravy ZrO2 povlaků na keramických substrátech

Při přípravě povlaku ZrO<sub>2</sub> na keramických substrátech Z1, A1 a SiO<sub>2</sub> byla jako nejvhodnější kombinace technologických parametrů: teplota substrátu 200°C, 2 vrstvy, Suspenze 1.

U keramiky Z1 bylo dosaženo vyhovujícího povlaku ZrO<sub>2</sub> na substrátu s aritmetickou střední výškou drsnosti 0,036  $\mu$ m a 0,174  $\mu$ m. U keramiky A3 bylo dosaženo vyhovujícího povlaku ZrO<sub>2</sub> na substrátu s aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,174  $\mu$ m.

Uvedeným slinovacím postupem se podařilo připravit slinutý povlak s nanometrovými zrny ZrO<sub>2</sub>.

Indentační testy ukázaly velmi dobrou soudržnost povlaku se substráty Z1 a A1 s aritmetickou střední výškou drsnosti SRa = 0,174 a 0,258 µm. Díky odlišným teplotním roztažnostem se ve všech povlacích tvoří praskliny, které by vzhledem k materiálům keramik neměly mít vliv na biologické testy keramik. Na SiO<sub>2</sub> vznikaly velké praskliny, které lze zdůvodnit zhruba  $20 \times$  nižším koeficientem teplotní roztažnosti SiO<sub>2</sub> než má ZrO<sub>2</sub>.

# 5.2.4. Biologické dilatační in-vitro testy povlakovaných materiálů 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.

### Buněčná linie osteoblastoidní linie MG63 [27, 45, 60, 61, 62, 63, 64]

a) Povlak  $ZrO_2$  dopovaný 3 mol. %  $Y_2O_3$  na substrátu Z1dopovaném 3 mol. %  $Y_2O_3$ 

Dilatace buněk linie MG63 rychle rostla s časem (k = 0,76), nejvyšší hodnota dilatace buněk (100 %) byla dosažena po 12 hodinách in-vitro kultivace. Povlak je tedy cvtokompatibilní Regresní křivky dilatací osteoblastoidní linie MG63 popisuií rovnice (7) a (



Obr. 5.152 Dilatace buněk oste<br/>oblastidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém povlak<br/>u $\rm ZrO_2$  naneseném na substrát $\rm Z1$ 

Tyto výsledky biologických testů potvrzují i závěry z práce Hwanga [61], který kultivací osteoblastoidní linie MG63 na ZrO<sub>2</sub> keramikách dosáhl vyšších hodnot aktivity alkalické fosfatázy než na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Příznivě se projevila nanostruktura keramického povlaku i objemové keramiky Z1, což podporuje názor, že nanostrukturní materiály se projevují jako bioaktivní; což popisuje ve svých pracích Webster [26, 27, 28, 29, 30, 46]. Také dilatační testy u

submikrometrové konvenční keramiky Z1 vykazovaly vysoký nárůst dilatace buněk, která byla srovnávána s nanomateriály. Biologické vlastnosti konvenčních ZrO<sub>2</sub> keramik potvrzuje ve své práci např. Yamashita [43], který testoval TOSOH ZrO<sub>2</sub> 3Y-TZP a tento dosáhl nejlepších výsledků při biotestech po kultivaci trvající 1, 3, 6, 9 dní.

Morfologie povlaku je dokumentována mikrofotografií uvedenou na obrázku 5.153 pořízenou před počátkem kultivačního testu in-vitro. Pokryv nanometrového ZrO<sub>2</sub> povlaku buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové in-vitro kultivaci byl celistvý a jednovrstevný. Výsledky testu jsou dokumentovány mikrofotografií na obrázku 5.154. Na površích buněk jsou patrné reakce na povlak – výběžky a vesikly, buňky byly v různých stádiích mitózy.



Obr. 5.153 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními in-vitro testy

Obr. 5.154 Jednovrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na mikrometrovém keramickém substrátu Z1



Obr. 5.155 Dilatace buněk osteoblasto<br/>idní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém  $\rm ZrO_2$  povlaku na<br/>nesené na substrátu A1

Maximální dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 (97 %) byla u nanometrového ZrO<sub>2</sub> povlaku dosažena po 18 hodinách in-vitro kultivace. Maximální dilataci osteoblastoidní linie MG63 popisují rovnice (7) a (11). Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.4 na konci kapitoly. Dosažená maximální hodnota dilatace osteoblastoidních buněk MG63 na povlaku naneseném na A3 je obdobná jako u povlaku naneseného na substrátu Z1.

Morfologie nanometrového povlaku  $ZrO_2$  naneseném na substrátu  $Al_2O_3$  před počátkem kultivačního in-vitro testu je uvedena na obrázku 5.154. Jak je vidět z obrázku 5.155, byl pokryv nanometrového povlaku po 72 hodinové kultivaci celistvý a vícevrstvý. Na površích buněk MG63 jsou vidět jejich reakce na povlak  $ZrO_2$  - výběžky a vesikly, buňky byly v různých stádiích mitózy.



Obr. 5.156 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu A1 před biologickými kultivačními in-vitro testy

Obr. 5.157 Vícevrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na mikrometrovém keramickém substrátu A1

c) Povlak ZrO<sub>2</sub> dopovaný 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na substrátě křemenné sklo



Obr. 5.158 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém  $ZrO_2$  povlaku, substrát je křemenné sklo

Dilatace buněk MG63 na povrchu  $ZrO_2$  naneseném na křemenném skle rostla rychle s časem (k = 0,78). Maximální dosažená dilatace buněk na nanometrovém  $ZrO_2$  povlaku byla po 24 hodinách in-vitro kultivace 97 %. Regresní křivky dilatací osteoblastoidní linie MG63 popisují rovnice (7) a (11). Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.4 na konci kapitoly. Rychlost dilatace na počátku testu byl obdobná jako u povlaků na substrátech  $ZrO_2$  a  $Al_2O_3$ .

Morfologie povlaku naneseného na substrátu "křemenné sklo" je uvedena na mikrofotografii, na obrázku 5.159. Na povlaku jsou zřetelné asi 5 µm široké praskliny vzniklé při slinování nanometrového povlaku na substrátu SiO<sub>2</sub>.

Na obrázku 5.160 je mikrofotografie pořízená po ukončení 72 hodinové kultivace. Pokryv  $ZrO_2$  povlaku byl celistvý a jednovrstvý. Na povrchu buněk jsou vidět výsledky interakce povlaku a buněk osteoblastoidní linie MG63 - výběžky a vesikly, buněk v různých stádiích mitózy.

Z výsledků studia dilatace osteoblastoidní linie MG63 buněk na povrchu nanometrových  $ZrO_2$  povlaků nanesených na substrátech  $ZrO_2$  (Z1),  $Al_2O_3$  (A1) a SiO\_2 je vidět, že o buněčné aktivitě rozhodoval především  $ZrO_2$  povlak, který měl stejné složení u všech studovaných vzorků.



Obr. 5.159 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na substrátu křemenné sklo před biologickými kultivačními in-vitro testy

Obr. 5.160 Jednovrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na křemenném skle

# Buněčná linie L929 [27, 33, 34, 35, 36, 37, 38]

Povlak  $ZrO_2$  dopovaný 3 mol. %  $Y_2O_3$  na substrátě Z1dopovaném 3 mol. %  $Y_2O_3$ 



Obr. 5.161 Dilatace buněk fibroblasto<br/>idní linie L929 ve výluhu in-vitro na nanometrovém  $\rm ZrO_2$  povlaku na<br/>neseném na substrátu Z1

Maximální dilataci dosáhl nanometrový povlak  $ZrO_2$  po 20 hodinách kultivace a to 96 %. Na rozdíl od buněk linie MG63 rostly na počátku testu buňky linie L929 podstatně pomaleji (k = 0.09). Tato pomalejší dilatace by mohla být způsobena velkou drsností povrchu povlaku. Dle Paea [73] je vyšší rychlost množení dosahována na drsném povrchu u buněk osteoblastoidních linií, kdežto buňky fibroblastoidních linií (např. L929) mají vyšší rychlost množení na hladkých površích. Regresní křivky dilatací fibroblastoidní linie L929 popisují rovnice (7) a (11).

Výsledky biologických dilatačních testů ukazovaly pozvolnější růst dilatace buněk oproti osteoblastoidní linii MG63, ale konečná hodnota dilatace byla stejná. Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.4 na konci kapitoly.

Morfologii nanometrového povlaku před kultivačními testy ukazuje mikrofotografie REM na obrázku 5.162. V povlaku byly technologické praskliny o šířce od 2 do 5  $\mu$ m. Nanometrový povlak pokrytý po 72 hodinové kultivaci buňkami fibroblastoidní linie L929 je dokumentován mikrofotografii na obrázku 5.163, byl celistvý a vícevrstevný. Na površích buněk jsou patrné reakce na povlak – výběžky. Buňky se nacházely v různých stádiích mitózy.

Buněčná linie HeLa [27, 45, 60, 61, 62, 63, 64]



Obr. 5.162 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními testy in-vitro

Obr. 5.163 Vícevrstevný pokryv buňkami fibroblastoidní linie L929 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrátě Z1

a) Povlak ZrO<sub>2</sub> dopovaný 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na substrátu Zl dopovaném 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



Obr. 5.164 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na nanometrovém  $ZrO_2$  povlaku naneseném na substrátu Z1
dilatovaných buněk dosáhl nanometrový povlak  $ZrO_2$  po 8 hodinách trvání testu a to 92 %. Buňky epiteliální linie HeLa se už při interakci se  $ZrO_2$  chovaly podobně jako buňky MG63. Hodnoty koeficientů jsou uvedeny v tabulce 5.4 na konci kapitoly.

Morfologie nanometrového povlaku před kultivačními in-vitro testy, je uvedena na mikrofotografii REM (Obr. 5.165). V povlaku jsou technologické praskliny vzniklé při slinování šířky cca 2 µm. Pokryv dokládá obrázek 5.166, ze kterého je patrné, že nanometrový povlak po 72 hodinové kultivace byl celistvý a jednovrstvý. Na povrchu buněk jsou patrné reakce na povlak - výběžky, buňky byly v různých stádiích mitózy.



Obr. 5.165 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními in-vitro testy



Obr. 5.166 Vícevrstevný pokryv buňkami epiteliální linie HeLa po 72 hodinové kultivaci invitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrátě Z1



Obr. 5.167 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na nanometrovém  $\rm ZrO_2$  povlaku naneseném na substrátu A3

Dilatace buněk linie HeLa probíhala rychle (k = 0,88). Na nanometrovém povlaku  $ZrO_2$  bylo dosaženo 90 % dilatovaných buněk po 10 hodinách kultivace in-vitro. Regresní křivky (Obr. 5.167) dilatací epiteloidní linie HeLa popisují rovnice (7) a (11). Hodnoty jednotlivých koeficientů rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.4 na konci kapitoly.

Morfologie nanometrového povlaku  $ZrO_2$  před kultivačními in-vitro testy je dokumentována mikrofotografii REM na obrázku 5.168. V povlaku se nacházely technologické praskliny vzniklé při slinování. Pokryv buňkami epiteliální linie HeLa dokládá obrázek 5.169, ze kterého je patrné, že po 72 hodinové kultivaci byl celistvý a vícevrstvý. Na povrchu buněk byly patrné reakce na povlak - výběžky, buňky byly v různých stádiích mitózy.



Obr. 5.168 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu A1 před biologickými kultivačními testy in-vitro

Obr. 5.169 Vícevrstevný pokryv buňkami epiteliální linie HeLa po 72 hodinové kultivaci invitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrátě A1

pro ou	inceniou in	iciakei s p	JO VIAK		O2 dopovi	inyin 5	11101 /0 1	203		_	
		Rovnice 1, řádu				Rovnice n-tého řádu					
Linie	Podklad, materiál	Hodno koeficie	oty entů t <sub>m</sub>		Regresní	Hodnoty koeficientů			Regresní	Max, dosaž,	t <sub>m</sub>
		$A_{\text{Dm}}$	k	[h]	r <sup>2</sup>	а	b	с	r <sup>2</sup>	dilatace [%]	[h]
MG63	$Al_2O_3$	92,04	0,64	14	0,96	91,93	0,83	0,93	0,96	97	18
	ZrO <sub>2</sub>	92,37	0,76	11	0,91	91,93	0,83	0,93	0,91	100	12
	SiO <sub>2</sub>	96,10	0,78	13	0,95	96,14	0,82	0,98	0,95	97	24
L929	ZrO <sub>2</sub>	110,29	0,09	24	0,98	97,94	0,43	0,67	0,96	96	20
HeLa	$Al_2O_3$	83,95	0,88	6	0,94	94,34	$4,6.10^{-6}$	4,07	0,95	90	10
	7rO.	86.03	1 36	7	0.05	06 13	0.0002	2 2	0.08	02	8

Tabulka 5.4 Hodnoty koeficientů  $A_{Dm}$ , k, t<sub>m</sub>, a, b, c vyjádřené z regresních rovnic (7) a (11) pro buněčnou interakci s povlakem ZrO<sub>2</sub> dopovaným 3 mol % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### Hodnocení nanokrystalických povlaků biologickými výluhovými in-vitro testy

Nejvyšší rychlost dilatace byla dosažena u epiteliální linie Hela u vzorku, kde byl ZrO<sub>2</sub> povlak nanesen na substrát Z1. Vysoká rychlost dilatace také byla zaznamenána u povlaku ZrO<sub>2</sub>, který byl vytvořen na substrátu SiO<sub>2</sub>. 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 [73], 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<sub>2</sub> se nacházely v různých stádiích mitózy a dělily se. Na jejich površích byly výběžky a vesikly, což je reakce buňky na materiál. Čím je jich více, tím je materiál pro buňky více aktivní.

V naneseném nanokrystalickém povlaku ZrO<sub>2</sub> byly při snímání na REM objeveny praskliny o šířkách do 10µm, které neměly viditelný vliv na aktivitu buněk.

Vzhledem k širokému rozpětí výsledků biologických testů není možné jednoznačně potvrdit bioaktivitu nanometrového povlaku. Všechny testované kombinace materiálů jsou biologicky vhodné materiály. Při testování osteoblastoidní linie MG63 bylo dosaženo lepších výsledků na nanopovlaku ZrO<sub>2</sub> dopovaném 3 mol % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 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 keramografické 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<sub>2</sub> (tj. vytvoření a slinutí) nanesených na keramických substrátech (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub> a SiO<sub>2</sub>). Dále byla otestována soudržnost povlaků s keramickými substráty mikroindetačním testem tvrdosti. Vyhovující povlaky byly biologicky testovány kultivačním testem ve výluhu cytotoxicity invitro 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 ZrO2, Al2O3, 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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<sub>2</sub> 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 × A5 při biologických testech dosáhl maximální plochy pokryvu povrchu dilatovanými buňkami po 4 hodinách trvání testu. Opět se výrazněji projevila selektivita buněk k ZrO<sub>2</sub> na tepelně leptaných materiálech s vyšší povrchovou drsností i přes vysoký obsah dopantu Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (8 mol. %) v keramice Z7. Výsledky dalšího lepeného kompozitu Z6  $\times$ A3 při biologických testech opět potvrdily vyšší selektivitu buněk k ZrO<sub>2</sub> a nebyl zaznamenán nepříznivý vliv obsahu dopantu Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3 mol. %) na životaschopnost buněk. Také u tohoto kompozitu byla vyšší selektivita buněk na povrchu tepelně leptaném. Poslední lepený kompozit Z4 × 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<sub>2</sub> keramice.

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

### Nanopovlaky ZrO<sub>2</sub>

Byla studována a optimalizována metoda nanášení nanostrukturního povlaku ZrO<sub>2</sub> pomocí sprejování koloidní suspenze na keramické substráty.

U slinutých bezdefektních povlaků ZrO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>. Pokryv všech povlaků buňkami byl po 72 hodinovém testu celistvý a na površích buněk se nacházely výběžky a vesikly, které představovaly pozitivní reakci buněk na nanokrystalický povlak. Vliv obsahu  $Y_2O_3$  na bioaktivitu nebyl prokázán.

## 7. LITERÁRNÍ ODKAZY

- [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 aplications. CMU Journal. 2002, vol. 1, no. 1, s. 23-46.
- [5] ASHBY, J., TENNANT, R.W.: Definitive relationship among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP, 1991, Mutat. Res. 257, 229-306.
- [6] BACHMANN, A., LUTZ, F.: Schmelzsprünge durch die Sensibilitätsprüfung mit C0<sub>2</sub> Schnee und Dichlor-difluormethan -Eine vergleichende in vivo Untersuchung. [Cracks in the dental enamel caused by sensitivity testing with CO<sub>2</sub> snow and dichlorodifluoromethane - a comparative in vivo study] Schweiz Mschr Zahnheilk 86, 1976, 1042-1059.
- [7] High-tech ceramics: viewpoints and perspectives : Medical applications of ceramics. Gernot Kostorz. 1st edition. [s.l.] : Academic Press Limited, 1989. 400 s. ISBN 9780124219502.
- [8] CAO, Wanpeng, HENCH, Larry L. Bioactive materials. Ceramic International. 1996, no. 22, s. 493-507.
- [9] WAN, Xianghui, et al. Preparation and in vitro bioactivities of calcium silicate nanophase materials. Materials science and engineering C. 2005, no. 25, s. 455-461.
- [10] HENCH, Larry L. Bioceramics: From concept to clinic J. Am. Ceram. Soc. 1991, vol. 74, no. 7, s. 1487-1510.
- [11] Technologie keramiky elektronická učebnice, kap. 13 Biokeramika a biomimetické procesy, <u>http://www.vscht.cz/sil/keramika/Ceramic\_Technology/SM-Lect-13-C.pdf</u>
- [12] THAMARAISELVI, T.V., RAJESWARI, se S. Biological evaluation of bioceramic materials A review. Trends Biomaterial Artif. Organs. 2004, vol. 18, no. 1, s. 9-17.
- [13] MENDONCA, Gustavo, et al. Advancing dental implant surface technology From micron- to nanotopography. Biomaterials. 2008, vol. 29, is. 28, s. 3822-3835.
- [14] CAO, Wanpeng, HENCH, Larry L. Bioactive materials. Ceramic International. 1996, no. 22, s. 493-507.
- [15] 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.
- [16] CARTER, C. Barry, NORTON, M. Grant. Ceramic materials : Science and engineering. 1st edition. New York: Springer, 2007. 716 s. ISBN 0-387-46271-6.
- [17] SCHMALZ, Gottfried, ARNEHOLT-BINDSLEV, Dorothea. Biocompactibility of dental materials. 1st edition. Berlin: Springer, 2009. 379 s. ISBN 978-3-540-77781
- [18] BANIS, R.: Energetische Testverfahren und angewandte Kinesiologie ein kritischer Überblick. [Energetic test methods and applied kinesiology - a critical review] Erfahrungsheilkunde 45. 1996. 245-250.
- [19] FERRACANE, J.L.: Elution of leachable components from composites. J Oral Rehabil 21, 1994. 441-452.
- [20] FOUAD, A.F., WALTON, R.E., RITTMAN, B.R.: Healing of induced periapical lesions in ferret canines. J Endod 19, 1993. 123-129.

- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] HENCH, Larry L. a June WILSON. *An Introduction to bioceramics*. River Edge, N.J.: World Scientific, c1993, c, 386 p. ISBN 98-102-1626-2.
- [26] WEBSTER, Thomas J., SIEGEL, Richard W., BIZIOS, Rena. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. Biomaterials. 1999, vol. 20, is. 13, s. 1221-1227.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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
- [33] ISAAC, J., S. LOTY, A. HAMDAM, T. TOKUBO, H.M. KIM, A. BERDAL a J.M. SAUTIER. In-vitro bone formation on bioactive Titanium. Key Engineering Materials. Schwitzerland: Trans Tech Publication, 2008, 20(361-363), s. 939-942.
- [34] 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*. Schwitzerland: Trans Tech Publications, 2008, 20(361-363), s. 837-840.
- [35] LEWIS, K., S.M. VALENZUELA a B. BEN-NISSAN Changes in the activity of osteoblast like cells with sol-gel derived Hydroxyapatite and Zirconia nonocoatings. *Key En[31]gineering Materials*. Schwitzerland: Trans Tech Publications, 2008, 20(361-363), s. 633-636.
- [36] CAMILO, C. C., C. A. FORTULAN, N. A. PARIZOTTO a B. de M. PURQUERIO. Porous Alumina scaffolds with bioactive coating: Implants in the rat tibia in vitro studies. *Key Engineering Materials*. Schwitzerland: Tran Tech Publications, 2009, 21(396-398), s. 699-702.

- [37] 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*.
- [38] LIN, X.Y., et al., *Evaluation of bioactivity and cytocompatibility of nanohydroxyapatite/collagen composite in vitro*. Bioceramics, Vol 17, 2005. **284-286**: p. 553-556.
- [39] 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*. Schwitzerland: Trans Tech Publications, 2009, 21(396-398), s. 179-182.
- [40] VALERIO, P., et al. Biocompability evaluation of dentine, enamel and bone derived hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications 2004, 18(254-256), s. 837-840.
- [41] MIYAZAKI, A.; AIZAWA, A. Adhesion, proliferation and morphology of osteoblasts cultured on apatite ceramics with preferred orientation to a-plane. *Key Engineering Materials.* Switzerland: Trans Tech Publications 2006, 18(309-311), s. 109-112.
- [42] MESSIAS, André Dutra, Aguedo ARAGONES a Eliana Aparecida DE REZENDE DUEK. PLGA-Hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblastic-like cells. *Key Engineering Materials*. Schwitzerland: Trans Tech Publications, 2009, 21(396-398), s. 461-464.
- [43] 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*. Schwitzerland: Trans Tech Publications, 2007, 20(361-363), s. 1099-1102.
- [44] VALERIO, P., et al. Evaluation of osteoblasts viability, alkaline phosphatase production and collagen secretion in the presence of TiHA. *Key Engineering Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications 2004, 18(254-256), s. 777-780.
- [45] MESSIAS, A.D., A. ARAGONES, and E.A.D. DUEK, *PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells*. Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 461-464.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] ARIN, M., H. YAZICI, and G. GOLLER, *Biocompability Properties of ZrO(2) Ceramics and ZrO(2)-TiN Composites.* Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 51-54.
- [49] 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.
- [50] BEST, S.M., et al., *The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite*. Bioceramics, Vol 20, Pts 1 and 2, 2008. **361-363**: p. 985-988.
- [51] LI, H., et al., *Proteomics study of the osteoblast cells proliferated on nanostructured hydroxyapatite coatings*. Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2, 2007. **330-332**: p. 381-384.
- [52] LU, B., et al., *Effect of HA/TCP biphasic ceramic on osteoinduction*. Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2, 2007. **330-332**: p. 1083-1086.
- [53] VALERIO, P., et al., Evaluation of osteoblasts viability, alkaline phosphatase production and collagen secretion in the presence of TiHA. Bioceramics, Vol 16, 2004.
  254-2: p. 777-780.

- [54] VALERIO, P., et al., *Biocompatibility evaluation of dentine, enamel and bone derived hydroxyapatite.* Bioceramics, Vol 16, 2004. **254-2**: p. 837-840.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] OLYMPUS. Konfokální rastrovací laserový mikroskop LEXT OLS 3000: Návod k obsluze. 3.0. 2010.
- [59] RAHAMAN, Mohamed N. *Sintering of ceramics*. Boca Raton: CRC Press, 2007, 388 s. ISBN 08-493-7286-0.
- [60] FENG, J., et al., In vitro investigation of mesenchymal stem cells with nanophase *PLGA/HA composite*. Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2, 2007. **330-332**: p. 1153-1156.
- [61] HWANG, M., et al., Osteoblast-like cell behaviors on non-woven silica fabric. Bioceramics 18, Pts 1 and 2, 2006. **309-311**: p. 469-472.
- [62] LUO, X.T., et al., *Functional behaviour of human periodontal ligament cells around various dental implants*. Bioceramics, Vol 20, Pts 1 and 2, 2008. **361-363**: p. 837-840.
- [63] POPAT, K.C., et al., Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007.
   80A(4): p. 955-964.
- [64] SANTOS, S.R.A., et al., *In vitro evaluation of porous biphasic scaffolds*. Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2, 2007. **330-332**: p. 935-937.
- [65] WANG, G.C., et al., *Nanostructured glass-ceramic coatings for orthopaedic applications*. Journal of the Royal Society Interface, 2011. **8**(61): p. 1192-1203.
- [66] LEE, Sungho, Toshihoro KASUGA a Katsuya KATO. Effects of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particle size on cytotoxicity and cell morphology. *Journal of the ceramic society of Japan*. 2010, roč. 6, č. 118, s. 428-433.
- [67] NAKAMURA, M., et al., Regulation of osteoblast-like cell Behaviors on hydroxyapatite by electrical polarization. Bioceramics, Vol 20, Pts 1 and 2, 2008. 361-363: p. 1055-1058.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] CAMILO, C.C., et al., *Porous Alumina Scaffolds with Bioactive Coating: Implants in the Rat Tibia and In vitro Studies*. Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 699-702.
- [71] HASHIGUCHI, M., et al., *Effect of surface treatments on bonding strength of zirconia to dental cements.* Bioceramics 21, 2009. **396-398**: p. 575-578.
- [72] KIM, D.J., et al., *Zirconia/alumina composite dental implant abutments*. Bioceramics, Vol 16, 2004. **254-2**: p. 699-702.
- [73] PAE, Ahran, Lee HESSU, Kim HYEONG-SEOB, Baik JIN a Yi-Hyung WOO. Cellular attachement and gene expression of osteoblast-like cells on zirconia ceramic surfaces. J Kor Acad Prosthodont. 2008, roč. 43, č. 3, s. 227-237.

# 8. PŘÍLOHY

### SEZNAM TABULEK

- Tabulka 2.1Faktory ovlivňující odezvu na rozhraní implantát tkáň
- Tabulka 2.2Typy tkáňových připojení k biokeramickým implantátům
- Tabulka 4.1Použité keramické prášky pro zhotovení keramických vzorků
- Tabulka 4.2Slinovací cykly objemových keramik
- Tabulka 4.3Teploty tepelného leptání a doba výdrže objemových keramik na<br/>teplotě
- Tabulka 5.1Tabulka distribucí zrn objemových keramik
- Tabulka 5.2Test Tukeyho mnohonásobného porovnání
- Tabulka 5.3Hodnoty koeficientů A<sub>Dm</sub>, k, t<sub>m</sub>, a, b, c regresních křivek buněčné<br/>dilatace na objemových keramikách

### Tabulka 5.4 Hodnoty koeficientů $A_{Dm}$ , k, t<sub>m</sub>, a, b, c vyjádřené z regresních rovnic (7) a (11) pro buněčnou interakci s povlakem ZrO<sub>2</sub> dopovaným 3 mol % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 2.1	Spektrum bioaktivit pro různé biokeramické implantáty: relativní poměr bioreaktivity a časové závislosti formace vazby kosti na rozhraní implantátu.((A) 45S5 Bioglass <sup>®</sup> , (B) KGS Cerevital <sup>®</sup> , (C) 55S4.3 Bioglass <sup>®</sup> , (D) A/W sklokeramika, (E) HA, (F) KGX Cerevital <sup>®</sup> and (G) Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ) (Převzato z L. L. Hench, "Bioceramic: From Concept to Clinic," J. Amer. Ceram. Soc., 74 (1991) 1487-570)
Obr. 4.1	Přehled všech zhotovených povlakovaných materiálů
Obr. 4.2	Aritmetická střední výška křivky drsnosti
Obr. 4.3	Velké čtverce s buňkami osteoblastoidní linie MG63 v Bürkerově komůrce
Obr. 4.4	Software obrazové analýzy ImageJ s pluginem Cell Counter k výpočtu buněčné dilatace Type 2. dilatované buňky
	Type 2 – uliatovalie bulky
Ohr 51	1 ype 4 – neunatovane bunky Obr. 5.1 Mikrofotografia DEM novrahu koromiku 71 stabilizovaná 2 mal. 9/
Obr. 5.1	$V_2O_3$
Obr. 5.2	Obr. 5.2 Mikrofotografie AFM povrchu keramiky Z1 stabilizované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.3	Obr. 5.3 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z1 dopované 3 mol. $%$ Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.4	Aritmetická střední výška drsnosti leštěné ZrO <sub>2</sub> keramiky
Obr. 5.5	Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané na ZrO <sub>2</sub>
Obr. 5.6	Mikrofotografie REM povrchu Z2 keramiky stabilizované 1.5 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.7	Mikrofotografie AFM povrchu Z2 keramiky stabilizované 1.5 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.8	Distribuce střední velikosti zrn Z2 keramiky dopované 1.5 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.9	Mikrofotografie REM povrchu Z3 keramiky stabilizované 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.10	Mikrofotografie AFM povrchu Z3 keramiky ZrO <sub>2</sub> stabilizované 3mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.11	Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z3 dopované 3 mol. % $Y_2O_3$
Obr. 5.12	Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z4 dopovaná 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.13	Distribuce střední velikosti zrn Z4 keramiky dopovaná 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.14	Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z5 stabilizované 8 mol. $\%$ Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.15	Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z5 dopované 8 mol. %
Ohr 5 16	Y 203 Milrafatagrafia DEM navrahu karamily, 76 stabilizayaná 2 mal. 9/ V. O
Obr. 5.10	Mikroiolografie REM povičnu keramiky Zo stabilizovane 5 mol. $\%$ Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.17	Obr. 5.17 Mikrofotografie AFM povrchu $ZrO_2$ keramiky Z6 stabilizovane 3 mol. % $Y_2O_3$
Obr. 5.18	Distribuce střední velikosti zrn keramiky Z6 3 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.19	Mikrofotografie REM povrchu keramiky Z7, stabilizované 8 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.20	Obr. 5.20 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky Z7 dopované 8 mol. % $Y_2O_3$
Obr. 5.21	Mikrofotografie REM keramiky Z8 stabilizované 8 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.22	Mikrofotografie AFM povrchu keramiky Z8 stabilizované 8 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Obr. 5.23	Distribuce střední velikosti zrn keramiky Z8 dopované 8 mol. % Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> slinuté
Obr. 5.24	Mikrofotografie REM povrchu keramiky A1
Obr. 5.25	Mikrofotografie AFM povrchu keramiky A1
Obr. 5.26	Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A1
Obr. 5.27	Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> - leštěný povrch

Obr. 5.29 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A2 Distribuce střední velikosti zrn keramiky A2 Obr. 5.30 Obr. 5.31 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A3 Obr. 5.32 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A3 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A4 Obr. 5.33 Obr. 5.34 Mikrofotografie AFM povrchu keramiky A4 Obr. 5.35 Distribuce střední velikosti zrn objemové keramiky A4 Obr. 5.36 Mikrofotografie REM povrchu keramiky A5 Distribuce střední velikosti zrn keramiky A5 Obr. 5.37 Obr. 5.38 Mikrofotografie REM povrchu keramiky HA Distribuce střední velikosti zrn keramiky HA Obr. 5.39 Obr. 5.40 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky HA Obr. 5.41 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané keramiky HA Obr. 5.42 Mikrofotografie REM povrchu MLOCCv1 Obr. 5.43 Mikrofotografie AFM povrchu MLOCCv1 Obr. 5.44 Distribuce střední velikosti zrn KZ1 a KA kompozitu MLOCCv1 Aritmetická střední výška drsnosti drsnost leštěného MLOCCv1 Obr. 5.45 Obr. 5.46 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptaného MLOCCv1 Plošná povrchová drsnost tepelně leptaného MLOCCv2 Obr. 5.47 Mikrofotografie AFM povrchu keramického kompozitu MLOCCv2 Obr. 5.48 Obr. 5.49 Distribuce střední velikosti zrn keramického vrstevnatého kompozitu MLOCCv2 KZ2 × KA2 Obr. 5.50 Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky na kompozitu MLOCCv2 Obr. 5.51 Aritmetická střední výška drsnosti tepelně leptané keramiky na kompozitu MLOOCv2 Obr. 5.52 Zhotovené zkušební keramiky ZrO<sub>2</sub> pro biologické testy Obr. 5.53 Zhotovené zkušební keramiky Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pro biologické testy Mikrofotografie REM keramického lepeného kompozitu Z7 × A5 Obr. 5.54 Obr. 5.55 Distribuce střední velikosti zrn dvojice keramického lepeného kompozitu Z7 × A5 Obr. 5.56 Mikrofotografie REM dvojice keramického lepeného kompozitu Z6 × A3 Obr. 5.57 Distribuce střední velikosti zrn dvojice lepeného keramického kompozitu Z6 a A3 Obr. 5.58 Mikrofotografie REM dvojice lepeného keramického kompozitu Z4 × A2 Obr. 5.59 Distribuce střední velikosti zrn dvojice lepeného keramického kompozitu Z4 × A2 Schematický graf buněčné dilatace popsaný kinetickou rovnicí 1. řádu Obr. 5.60 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na ZrO<sub>2</sub> Obr. 5.61 keramikách Obr. 5.62 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na submikrometrovém Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Obr. 5.63 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na křemenném skle Obr. 5.64 Dilatace buněk fibroblastoidní linie L929 ve výluhu in-vitro na keramikách  $ZrO_2$ Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na ZrO<sub>2</sub> keramikách Obr. 5.65 Obr. 5.66 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na submikrometrové keramice A1

Aritmetická střední výška drsnosti leštěné keramiky Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - tepelně leptaný

Obr. 5.28

povrch

- Obr. 5.67 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu tepelně leptaných ZrO<sub>2</sub> biokeramik
- Obr. 5.68 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěných ZrO<sub>2</sub> biokeramik
- Obr. 5.69 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z1 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn zrna 100,2 nm
- Obr. 5.70 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z1 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace střední velikost zrn střední velikost zrn zrna 100,2 nm
- Obr. 5.71 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 stabilizované 1,5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn střední velikost zrn zrna 118,9 nm
- Obr. 5.72 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z2 stabilizované 1,5 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 118,9 nm
- Obr. 5.73 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z3 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 371,3 nm
- Obr. 5.74 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky Z3 stabilizované 3 mol. % s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro, střední velikost zrn 371,3 nm
- Obr. 5.75 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky Z5 in-vitro s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrna 517,2 nm
- Obr. 5.76 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky ZrO<sub>2</sub> Z5 in-vitro s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrna 517,2 nm
- Obr. 5.77 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné SRa =  $0,036 \mu m$ mikrometrové keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 923,1 nm
- Obr. 5.78 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné SRa =  $0,036 \mu m$  mikrometrové keramiky Z6 stabilizované 3 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro, střední velikost zrn 923,1 nm
- Obr. 5.79 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné SRa =  $0,036 \mu m$ mikrometrové keramiky Z8 stabilizované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 2739,8 nm
- Obr. 5.80 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné SRa =  $0,036 \mu m$  mikrometrové keramiky Z8 stabilizované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 2739,8 nm
- Obr. 5.81 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěných a tepelně leptaných Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> keramik

- Obr. 5.82 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky A4 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 1261,6 nm
- Obr. 5.83 Mikrofotografie z REM povrchu leštěné mikrometrové keramiky A4 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 1261,6 nm
- Obr. 5.84 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky A1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 519,8 nm
- Obr. 5.85 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané submikrometrové keramiky A1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace, střední velikost zrn 519,8 nm
- Obr. 5.86 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěné a tepelně leptané mikrometrové bioaktivní keramiky HA
- Obr. 5.87 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěné mikrometrové keramiky HA s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.88 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky HA s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.89 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového elektroforeticky zhotoveného vrstevnatého keramického kompozitu KA1 × KZ1
- Obr. 5.90 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěného mikrometrového vrstevnatého biokeramického kompozitu KA1 × KZ1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.91 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrového vrstevnatého biokeramického kompozitu KA1 × KZ1 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.92 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1 × KZ1
- Obr. 5.93 Graf buněčné selekce na povrchu leštěného mikrometrového keramického vrstevnatého kompozitu KA1 × KZ1
- Obr. 5.94 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného elektroforeticky zhotoveného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2
- Obr. 5.95 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu leštěného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.96 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2 s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.97 Graf buněčné selekce na povrchu leštěného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2
- Obr. 5.98 Graf buněčné selekce na povrchu tepelně leptaného keramického vrstevnatého kompozitu KA2 × KZ2
- Obr. 5.99 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozitu Z7 × A5
- Obr. 5.100 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z7 dopované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, střední velikost zrna

1442,6 nm SRa = 0,086  $\mu$ m s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace

- Obr. 5.101 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A5, střední velikost zrna 1823,9 nm SRa = 0,098 μm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.102 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky Z7 dopované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, střední velikost zrna 1442,6 nm SRa = 0,086 μm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.103 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky  $Al_2O_3$  A5, střední velikost zrna 1823,9 nm SRa = 0,098 µm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.104 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném kompozitu Z7 dopované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (střední velikost zrn 1442,6 nm) × A5 (střední velikost zrn 1832,9 nm)
- Obr. 5.105 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném kompozitu Z7 dopované 8 mol. % Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (střední velikost zrn 1442,6 nm) × A5 (střední velikost zrn 1832,9 nm)
- Obr. 5.106 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozitu Z6 × A3
- Obr. 5.107 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z6 se střední velikostí zrna 923,1 nm (SRa = 0,086 μm) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.108 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A3 se střední velikostí zrna 1146,2 (SRa = 0,098 μm) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.109 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky Z6 (SRa = 0,086 μm) se střední velikostí zrna 923,1 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.110 Mikrofotografie z REM povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky A3 (SRa = 0,098 μm) se střední velikostí zrna 1146,2 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.111 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném kompozitu Z6 ×A3
- Obr. 5.112 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném kompozitu Z6 × A3
- Obr. 5.113 Plocha dilatovaných buněk osteoblastoidní linie MG63 na povrchu leštěného a tepelně leptaného mikrometrového keramického lepeného kompozitu Z4 × A2
- Obr. 5.114 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z4 se střední velikostí zrn 517,2 nm (SRa = 0,086 μm) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 8 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.115 Mikrofotografie ze světelného mikroskopu povrchu tepelně leptaného mikrometrové keramiky A2 se střední velikostí zrna 753,9 nm (SRa = 0,098 μm) s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 8 hodinách invitro kultivace

- Obr. 5.116 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky Z4 se střední velikostí zrn 517,2 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách kultivace in-vitro
- Obr. 5.117 Mikrofotografie REM povrchu tepelně leptané mikrometrové keramiky A2 se střední velikostí zrn 753,9 nm s dilatovanými buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 4 hodinách in-vitro kultivace
- Obr. 5.118 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na leštěném lepeném keramickém kompozitu Z4 × A2
- Obr. 5.119 Graf buněčné selekce buněk osteoblastoidní buněčné linie MG63 na tepelně leptaném lepeném keramickém kompozitu Z4 × A2
- Obr. 5.120 Vyhovující povlak neslinutý nanometrový ZrO<sub>2</sub> povlak nanesený na křemičitém skle
- Obr. 5.121 Nevyhovující povlak neslinutý nanometrový ZrO<sub>2</sub> povlak nanesený na křemičitém skle
- Obr. 5.122 Vizuální test závislosti počtu nanesených vrstev povlaku ZrO<sub>2</sub> a potřebného předehřevu křemičitého skla při sprejování koloidní Suspenze 1
- Obr. 5.123 Výsledky vizuálního hodnocení vrstev ZrO<sub>2</sub> nanesených ultrazvukovým sprejováním koloidní Suspenze 1 na povrch křemičitého skla při rychlosti průtoku koloidní suspenze 100 300 μl/min a teplot substrátu 200 500°C
- Obr. 5.124 Aritmetická střední výška drsnosti původního povrchu keramického substrátu  $SRa = 0,174 \ \mu m$
- Obr. 5.125 Aritmetická střední výška drsnosti leštěného povrchu keramického substrátu  $SRa = 0,036 \ \mu m$
- Obr. 5.126 Aritmetická střední výška drsnosti hrubovaného povrchu keramického substrátu SRa = 0,258 μm
- Obr. 5.127 Mikrofotografie nanesených dvou vrstev neslinutého povlaku  $ZrO_2$  na lisovaném slinutém substrátu Z1 (závislost na průtoku suspenze a teplotě substrátu s drsností SRa = 0,174  $\mu$ m
- Obr. 5.128 Mikrofotografie slinutého dvouvrstvého povlaku na lisovaném substrátu Z1 (závislost na průtoku suspenze a teplotě substrátu s drsností povrchu SRa = 0,174 μm)
- Obr. 5.129 Mikrofotografie slinutého dvouvrstvého povlaku ZrO<sub>2</sub> na keramickém substrátu Z1 vliv drsnosti povrchu
- Obr. 5.130 Fotografie naneseného neslinutého povlaku ZrO<sub>2</sub> na lisovaném substrátu A3 (test kombinace teploty a počtu nanesených vrstev)
- Obr. 5.131 Mikrofotografie výsledků testu sprejovaného neslinutého povlaku (dvě vrstvy) v závislosti na teplotě povlaku ZrO<sub>2</sub> na keramickém substrátu A3 (závislosti průtoku suspenze a teploty substrátu)
- Obr. 5.132 Fotografie dvou vrstev neslinutého nanometrového povlaku  $ZrO_2$  na lisovaném substrátu A3 SRa = 0,174 µm (závislost na teplotě substrátu a průtoku suspenze)
- Obr. 5.133 Slinutý dvouvrstvý nanometrový povlak ZrO<sub>2</sub> na substrátu SiO<sub>2</sub>; teplota předehřevu substrátu při nanášení 200°C
- Obr. 5.134 Slinutý dvouvrstvý nanometrový povlak ZrO<sub>2</sub> na substrátu SiO<sub>2</sub>; teplota předehřevu substrátu při nanášení 250°C
- Obr. 5.135 REM mikrofotografie povrchu dvouvrstvého nanometrového povlaku  $ZrO_2$  na substrátu Z1 (SRa = 0,174 µm, teplota substrátu 200°C, průtok suspenze 100 µl/min)

- Obr. 5.136 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým leštěným substrátem Z1s drsností SRa = 0,036 µm při zatížení 5 a 1 kg (přehledový snímek)
- Obr. 5.137 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým leštěným substrátem Z1s drsností SRa = 0,036 μm při zatížení 5 kg
- Obr. 5.138 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým lisovaným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,036 μm při zatížení 1kg
- Obr. 5.139 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým substrátem Z1 drsnost SRa = 0,174 μm při zatížení 1, 5, 20 a 30 kg přehledový snímek
- Obr. 5.140 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým substrátem Z1 drsnost SRa = 0,174 μm při zatížení 30 kg
- Obr. 5.141 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,258 µm při zatížení 10 a 30 kg – přehledový snímek
- Obr. 5.142 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,258 μm při zatížení 30 kg
- Obr. 5.143 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem Z1 drsnost SRa = 0,258 μm při zatížení 10kg
- Obr. 5.144 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým substrátem A1 drsnost SRa = 0,036 µm při zatížení 5 kg přehledový snímek
- Obr. 5.145 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým substrátem A1 drsnost  $SRa = 0,036 \mu m$  při zatížení 5 kg
- Obr. 5.146 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost SRa = 0174 μm při zatížení 1 a 30 kg přehledový snímek
- Obr. 5.147 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku  $ZrO_2$  s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost  $SRa = 0,174 \mu m$  při zatížení 30 kg
- Obr. 5.148 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým leštěným substrátem A1 drsnost SRa = 0,174 μm při zatížení 1kg
- Obr. 5.149 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258 μm při zatížení 5, 20 a 30 kg přehledový snímek
- Obr. 5.150 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258 μm při zatížení 30 kg
- Obr. 5.151 Indentační zkouška soudržnosti nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> s keramickým zdrsněným substrátem A1 drsnost SRa = 0,258 μm při zatížení 20kg
- Obr. 5.152 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrát Z1
- Obr. 5.153 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními in-vitro testy
- Obr. 5.154 Jednovrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na mikrometrovém keramickém substrátu Z1
- Obr. 5.155 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém ZrO<sub>2</sub> povlaku nanesené na substrátu A1
- Obr. 5.156 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu A1 před biologickými kultivačními in-vitro testy

- Obr. 5.157 Vícevrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na mikrometrovém keramickém substrátu A1
- Obr. 5.158 Dilatace buněk osteoblastoidní linie MG63 ve výluhu in-vitro na nanometrovém ZrO<sub>2</sub> povlaku, substrát je křemenné sklo
- Obr. 5.159 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na substrátu křemenné sklo před biologickými kultivačními in-vitro testy
- Obr. 5.160 Jednovrstevný pokryv buňkami osteoblastoidní linie MG63 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na křemenném skle
- Obr. 5.161 Dilatace buněk fibroblastoidní linie L929 ve výluhu in-vitro na nanometrovém ZrO<sub>2</sub> povlaku naneseném na substrátu Z1
- Obr. 5.162 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními in-vitro testy
- Obr. 5.163 Vícevrstevný pokryv buňkami fibroblastoidní linie L929 po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrátě Z1
- Obr. 5.164 Dilatace buněk epiteliální linie Hela ve výluhu in-vitro na nanometrovém ZrO<sub>2</sub> povlaku naneseném na substrátu Z1
- Obr. 5.165 Mikrofotografie morfologie povrchu slinutého nanometrového povlaku ZrO<sub>2</sub> na mikrostrukturním keramickém substrátu Z1 před biologickými kultivačními in-vitro testy
- Obr. 5.166 Vícevrstevný pokryv buňkami epiteliální linie HeLa po 72 hodinové kultivaci in-vitro na slinutém nanometrovém povlaku ZrO<sub>2</sub> naneseném na substrátě Z1