

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta strojní

Ústav materiálového inženýrství



3D charakteristiky drsnosti povrchu pro biologické aplikace

3D characteristics of surface roughness for biological applications

Bakalářská práce

Studijní program: B 2343 Výroba a ekonomika ve strojírenství

Studijní obor: 2303R014 Technologie, materiály a ekonomika ve strojírenství

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladimír Starý CSc.

Martin Horák

Praha 2017

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Horák** Jméno: **Martin** Osobní číslo: **411145**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav materiálového inženýrství**
Studijní program: **Výroba a ekonomika ve strojírenství**
Studijní obor: **Technologie, materiály a ekonomika strojírenství**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

3D charakteristiky drsnosti povrchu pro biologické aplikace

Název bakalářské práce anglicky:

3D characteristics of surface roughness for biological applications

Pokyny pro vypracování:

1. Studium literatury, seznámení s programem Gwyddion a SPIP.
2. Snímání povrchu vzorků na konfokálním mikroskopu.
3. Sledování drsnosti povrchu v závislosti na parametrech snímání obrazu.
4. Statistické zpracování výsledků.
5. Zpracování tabulek, grafů a obrazových příloh, sepsání bakalářské práce

Seznam doporučené literatury:

- [1] B. Bumbálek, V. Odvody, B. Ošťádal: Drsnost povrchu. SNTL, Praha 1989
- [2] Program SPIP - Manuál
- [3] Ross, Aftin M.; Jiang, Zhongxiang; Bastmeyer, Martin; et al., Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity, *SMALL* 8 (3) (2012) 336-355.
- [4] Geetha M., Singh AK., Asokamani R., Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science*. 2009, 54: s 397-425.
- [5] Yong Wu, Joseph P. Zitelli, Kevor S. TenHuisen, Xiaojun Yu, Matthew R. Libera, Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials* 32 (2011) 951-960.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. RNDr. Vladimír Starý CSc., ústav materiálového inženýrství FS

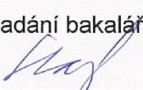
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

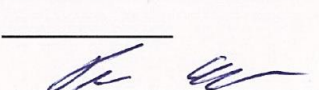
Ing. Zdeněk Tolde, ústav materiálového inženýrství FS

Datum zadání bakalářské práce: **20.10.2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15.01.2017**

Platnost zadání bakalářské práce: _____


Podpis vedoucí(ho) práce


Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

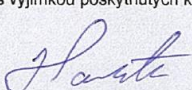

Podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

27-10-2016

Datum převzetí zadání


Podpis studenta

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Horák** Jméno: **Martin** Osobní číslo: **411145**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav materiálového inženýrství**
Studijní program: **Výroba a ekonomika ve strojírenství**
Studijní obor: **Technologie, materiály a ekonomika strojírenství**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

3D charakteristiky drsnosti povrchu pro biologické aplikace

Název bakalářské práce anglicky:

3D characteristics of surface roughness for biological applications

Pokyny pro vypracování:

1. Studium literatury, seznámení s programem Gwyddion a SPIP.
2. Snímání povrchu vzorků na konfokálním mikroskopu.
3. Sledování drsnosti povrchu v závislosti na parametrech snímání obrazu.
4. Statistické zpracování výsledků.
5. Zpracování tabulek, grafů a obrazových příloh, sepsání bakalářské práce

Seznam doporučené literatury:

- [1] B. Bumbálek, V. Odvody, B. Ošťádal: Drsnost povrchu. SNTL, Praha 1989
- [2] Program SPIP - Manuál
- [3] Ross, Aftin M.; Jiang, Zhongxiang; Bastmeyer, Martin; et al., Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity, SMALL 8 (3) (2012) 336-355.
- [4] Geetha M., Singh AK., Asokamani R., Gogia Ak. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Progress in Materials Science. 2009. 54: s 397-425.
- [5] Yong Wu, Joseph P. Zitelli, Kevor S. TenHuisen, Xiaojun Yu, Matthew R. Libera, Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. Biomaterials 32 (2011) 951-960.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. RNDr. Vladimír Starý CSc., ústav materiálového inženýrství FS

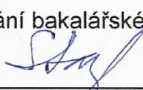
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

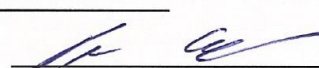
Ing. Zdeněk Tolde, ústav materiálového inženýrství FS

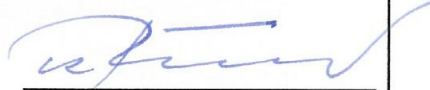
Datum zadání bakalářské práce: **20.10.2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15.01.2017**

Platnost zadání bakalářské práce: _____


Podpis vedoucí(ho) práce


Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


Podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

27-10-2016

Datum převzetí zadání



Podpis studenta

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité informační zdroje v souladu s metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne: 15.01.2017

Martin Horák

Poděkování

Děkuji tímto vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Vladimíru Starému CSc. za odborné vedení, cenné rady a především za jeho vstřícnost a čas. Dále děkuji za poskytnuté podklady i možnost podílet se na výzkumu v rámci grantu vedeného pod číslem GACR15-01558S pod vedením Prof. RNDr. Petra Špatenky, CSc.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá hodnocením topografie vzorků materiálů, užívaných v biomedicině. Byly použity vzorky Ti, TiNb, TiAlV a Fe (austenitická ocel) s odlišnou morfologií materiálu, na které byl nanesen povlak slitiny TiNb. Cílem práce bylo změřit drsnost na jednotlivých vzorcích biomateriálů a z 3D měření morfologie na konfokálním mikroskopu ji následně vyhodnotit. Dále pak pomocí vhodného programu porovnat výsledky snímků topografie materiálů, získané při menším zvětšení (10x) a větším zvětšení (200x). Pro vyhodnocování dat z měření byly využity softwarové programy Spip a Gwyddion. Pro experiment byla zvolena stejná technologie povrchové úpravy, avšak na různých vzorcích, což může vést k odlišným výsledkům. V bakalářské práci jsou zpracovány výsledky měření a popsán postup jejich vyhodnocování. Data získaná z měření topografie jsou stěžejní, avšak jejich formulace či vyhodnocování, může být ovlivněno různými způsoby zpracování. V našem zájmu bylo definovat a zaznamenat teoreticky nejlepší postup pro vyhodnocení naměřených dat a následně se zabývat vizualizací topografie z důvodu přesnějšího porozumění adheze buněk i integrace bakterií.

This thesis deals with the evaluation of the topography of samples of materials used in biomedicine. Those samples were used, TiNb, TiAlV and Fe (steel) with a different morphology of the material on which the coating resides alloy TiNb. The aim of the study was to measure roughness on individual samples of biomaterials and 3D measurements of the morphology confocal microscope then evaluate it. Furthermore, by using a suitable program to compare the results of the image of the topography of materials obtained at lower magnification (10x) and high magnification (200x). For evaluation of measurement data were used software programs Spip and Gwyddion. For the same experiment was selected coating technologies, but on different samples, which can lead to different results. The thesis presents the results of measurements and describes the procedure for their evaluation. Data obtained from measurements of topography are crucial, but their formulations or the evaluation may be influenced by various processing methods. Our goal was to define and record the theoretically best approach for evaluation of measured data and then deal with visualizing topography for a more accurate understanding of cell adhesion and integration bacteria.

Klíčová slova

Biomateriály, drsnost, titanové slitiny, TiNb povlak, adheze buněk

Keywords

Biomaterials, roughness, titanium alloy, TiNb coating, cell adhesion

HORÁK, Martin. 2017. *3D charakteristiky drsnosti povrchu pro biologické aplikace*. Praha. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze. Vedoucí práce doc. RNDr. Vladimír Starý CSc.

| | |
|---|-----------|
| 1 ÚVOD | 9 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1 BIOMEDICÍNA..... | 10 |
| 2.1.1 Biokompatibilita materiálu - kontakt s tkání | 10 |
| 2.1.2 Tkáňové buňky..... | 11 |
| 2.1.3 Bakterie | 11 |
| 2.2 MATERIÁL | 11 |
| 2.2.1 Vlastnosti materiálů..... | 11 |
| 2.2.2 Volba biomateriálu pro kloubní náhradu | 12 |
| 2.2.3 Vlastnosti slitin titanu..... | 14 |
| 2.2.4 Použití titanu a jeho slitin v biomedicíně..... | 15 |
| 2.3 ÚPRAVA A TOPOGRAFIE POVRCHU | 17 |
| 2.3.1 Povrchová úprava biomateriálů..... | 17 |
| 2.3.2 Drsnost biomateriálu..... | 18 |
| 2.3.3 Závislost buněčné adheze na drsnosti biomateriálu | 19 |
| 2.3.4 Parametry povrchové drsnosti: | 21 |
| 2.3.5 Měření plošné drsnosti – 3D (S-parametry)..... | 22 |
| 2.4 ZAŘÍZENÍ PRO MĚŘENÍ DRSNOSTI | 23 |
| 2.4.1 SEM..... | 24 |
| 2.4.2 Konfokální mikroskopie..... | 25 |
| 2.4.3 Princip konfokálního mikroskopu..... | 25 |
| 2.4.4 Využití konfokální mikroskopie v biologii..... | 26 |
| 2.5 METODY VYHODNOCOVÁNÍ POVRCHOVÉ DRSNOSTI..... | 28 |
| 2.5.1 Vyhodnocovací software SPIP™..... | 28 |
| 2.6 KULTIVACE BUNĚK | 30 |
| 2.6.1 Bakteriální a buněční kultivace na povrchu implantátu:..... | 30 |
| 2.6.2 Vyhodnocení adheze buněk..... | 31 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 32 |
| 3.1 EXPERIMENTÁLNÍ MATERIÁL A PŘÍPRAVA VZORKŮ..... | 32 |
| 3.1.1 Charakterizace vzorků..... | 32 |
| 3.1.2 Příprava povrchové vrstvy..... | 33 |
| 3.2 EXPERIMENTÁLNÍ VYHODNOCENÍ TOPOGRAFIE VZORKŮ..... | 33 |
| 3.2.1 Měření drsnosti vzorků | 33 |
| 3.2.2 Vyhodnocování snímků z mikroskopu..... | 33 |
| 3.2.3 Závislost parametrů topografie na frekvenčním rozsahu | 38 |
| 4 VÝSLEDKY | 39 |
| 5 DISKUZE | 43 |
| 6 ZÁVĚR | 46 |
| 7 LITERATURA..... | 47 |

1 ÚVOD

Poptávka po ortopedických implantátech v posledních letech vzrůstá a odhaduje se i nadále velký růst a vývoj v oblasti biokompatibilních implantátů. Pro aplikace implantátů je velmi často využíván titan a titanové slitiny. Vzhledem k výborným vlastnostech a biokompatibilitě titanu tento materiál dosáhl velkého úspěchu, avšak při aplikaci implantátu se objevují dva hlavní problémy: nedostatečná integrace s kostní tkání a implementace infekce. Rozhodující pro použití implantátu je povrch materiálu, interakce proteinů, eliminování výskytu bakterií, podpora výskytu tkáňových buněk [1]. Povrchová úprava může mít na adhezi buněk zásadní vliv. Je proto snaha, dosáhnou co nejefektivnějšího povrchu materiálu, vhodného pro správné fungování implantátu, který musí být také biokompatibilní a bude dobře epitelizovat lidskou tělní tkání [1].

Materiál, který je možno využít pro biologické použití, musí být jak chemicky netoxický vzhledem k tkáni a přijatelný pro buňky (biokompatibilní), tak povrchově chemicky odolný. Dále by měl implantát splňovat specifické požadavky ohledně mechanických vlastností (pevnost, pružnost, tažnost) a korozní odolnost. Z hlediska výroby určuje volbu materiálu jeho zpracovatelnost do požadovaného tvaru (slévatelnost, tvářitelnost, obrobitelnost atd.). Těmto požadavkům a ekonomickým podmínkám vyhovují v současnosti hlavně následující tři skupiny materiálů: austenitické korozivzdorné oceli (FeCrNiMo, FeCrNiMo – ortopedie), kobaltové slitiny (CoCrMo, CoCrNiMo – ortopedie, stomatologie), titan a jeho slitiny (TiAlV, TiAlNb – ortopedie, stomatologie) [2]. Zvláštní pozornost je třeba věnovat povrchové drsnosti materiálu určeného pro biologické použití. Povrchová topografie implantátu se pohybuje v rozsahu od milimetrů po nanometry. Vytvoření správné drsnosti povrchu a její určení je pro biologickou aplikaci materiálu velmi významné, protože např. růst tkáňových buněk na povrchu je touto drsností silně ovlivněn. Je třeba i vzít v úvahu, že specifické vlastnosti materiálů při stejné technologii mohou silně tuto morfologii a tím i růst živočišných buněk na povrchu biomateriálu ovlivnit. Proto je potřeba určit morfologii a následně i správně změřit drsnost, která je pro charakterizaci povrchu extrémně důležitá. Úvaha, kterou jsem se zabýval, byla, zda při užití konfokálního mikroskopu, zvolením vhodného rozsahu vlnových délek, lze dosáhnout stejných hodnot drsnosti u snímků s různým zvětšením na mikroskopu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biomedicína

2.1.1 Biokompatibilita materiálu - kontakt s tkání

V moderní medicíně se využívají kloubní protézy a náhrady už celkem běžně. Operace takového rozsahu, kdy je pacientovi nahrazen celý kloub (kolenní kloub, kyčelní kloub) jsou dnes rutinní. Operace implantátu má zajistit pacientovi zmírnění bolestí, podpořit mobilitu jedince a přispět ke zlepšení kvality života. Přesto jsou implantáty náchylné na nesprávné působení v těle a hrozí riziko případné infekce. Infekce v důsledku operace kloubní náhrady se vyskytuje v asi 1,5 – 2,5% všech operací kolenního a kyčelního kloubu. V důsledku selhání implantovaného zařízení je třeba podstoupit další revizní operace [3].

Léčba infekce a následná rehabilitace je finančně náročná. Literatura uvádí, že léčba infekce vyjde na cca 50 000 dolarů, přitom úmrtnost spojená s infekcí je i při rehabilitaci kolem 2,5%. Přetrvá-li infekce a dostane se i do hlubokých měkkých tkání, je nutná amputace [3]. Dále je uvedeno, že léčba infekce se týká jen cca 1,21 – 1,23% operovaných pacientů [4]. Avšak i toto množství selhání kloubního implantátu je nežádoucí. Léčba infekce, či mikrobiální adheze k implantátu bez použití léčiv, by mohla být účinná a atraktivní metoda. Proto je snaha upravit povrch biomateriálu, který je implantován do těla pacienta. Změnou drsnosti povrchu materiálu, či aplikací vhodné povrchové úpravy je možné dosáhnout lepších výsledků při zahojování a epitelizaci implantátu na tělní tkáň. Buňky osteoblastů je třeba získat – je nutná adheze na povrch implantátu, či jimi obalit umělý kloub. Naopak je vysoce nežádoucí navázání bakterií na aplikovaný implantát. Bakterie typu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) jsou velmi nepříznivé. Jakmile se bakterie naváže na povrch biomateriálu, dojde ke změně funkčních vlastností materiálu a vznikají komplikace, ty mohou vyvolat infekci tělní tkáně a brání integraci implantátu do okolní tkáně, tudíž nedochází k adhezi biomateriálu [1].

2.1.2 Tkáňové buňky

Pro správné fungování implantátu je žádoucí adheze tkáňových buněk tzv. osteoblastů. Osteoblasty jsou buňky kubického tvaru s podlouhlými výběžky. Jedná se o kostní buňku, která je jednou ze základních složek kosti. Pomocí výběžků se osteoblasty pojí dohromady a shlukují. Pomocí tohoto kontaktu se realizuje tvorba kosti. [5]. Osteoblasty mají jako většina tkáňových buněk velikost kolem desítek mikronů v průměru. Osteoblasty vynikají relativně pružnou membránou, proto mohou měnit svůj tvar v závislosti na jejich životním prostředí.

2.1.3 Bakterie

Mezi široce rozšířené bakterie, které jsou běžně používány pro výzkumy v oboru biomedicíny, se řadí typ *Staphylococcus*. „Stafylokoky“ patří do velké skupiny grampozitivních koků [6]. Jedná se o skupinu nežádoucích bakterií, které při nasedání na aplikovaný implantát brání integraci okolní tělní tkáně. Kůži nejčastěji osidluje *Staphylococcus epidermidis*, který dává přednost vlhkým místům s vyšším obsahem živin na lidské kůži [7]. Dalším typem je tzv. „Zlatý stafylokok“ – *Staphylococcus aureus*, který způsobuje kožní infekci. Při napadání implantátu tímto druhem bakterie hrozí riziko velkých komplikací. Zlatý stafylokok způsobuje onemocnění pokožky a sliznice u téměř třetiny lidské populace. Pokud však pronikne do těla přes tělní tkáně, může vyvolat různá onemocnění od lehkých zánětů kůže až po záněty vnitřních orgánů (endokarditida, osteomyelitida, atd.) a pokračovat až po život ohrožující sepse [8]. Osteoblasty a bakterie se liší v mnoha důležitých ohledech, které mohou ovlivnit integraci na povrch implantátu.

2.2 Materiál

2.2.1 Vlastnosti materiálů

Materiál, který je používán pro kloubní a kostní náhrady musí mít vlastnosti co nejvíce podobné přirozené kostní tkáni. Umělé materiály by měly být složením a strukturou co nejpodobnější tělní tkáni, která je jimi nahrazena, jelikož jen tehdy je možná úspěšná aplikace implantátu do těla pacienta. Materiál by měl disponovat houževnatostí, pevností a splňovat mechanické vlastnosti, které jsou nutné pro jeho použití, např. nesmí se odhoyit z místa, kde

byl přišit k živé tkáni. V případě náhrady krevních cév, musí materiál působit jako náhrada cévy – nesmí prasknout nebo se odhojit. V případě kloubní náhrady musí materiál velmi dobře odolávat intenzivní zátěži, avšak musí být dobře použitelný a též pohyblivý [9].

Vznik komplikací je ve většině případů způsoben špatnou integrací implantátu s tělní tkání. Tělo nedokáže vstřebat, či přijmout nový – implantovaný materiál a dochází k nedostatečné adhezi buněk, k poruchám implementace a jiným komplikacím. Důsledkem jsou vnitřní infekce tělní tkáně, bolesti, nehybnost až smrt pacienta. Při použití jakéhokoliv transplantátu, ať už kovového nebo lékového stentu, na podporu zachování průsvitu cévy při jejím zúžení, nebo umělé kloubní náhrady, je třeba docílit toho, aby se materiál následně epitelizoval, což znamená, aby se připojil nebo obalil novou tkání, jinak na něm vzniká nežádoucí imunitní reakce, kterou je nutné snižovat podáváním léku, např. imunosupresivy. To jsou obecně léky, které omezují nebo zabraňují činnosti imunitního systému v místě zánětu a brání následnému odhojování. Proto hlavním cílem je, aby tento materiál byl tzv. inertní, tedy čistý, nezpůsobující nežádoucí reakce organismu.

Druhým cílem je, aby došlo k co možná nejhladšímu a nekomplikovanému připojení a epitelizaci, tedy nasedání žadoucích buněk a vytvoření nové tkáně na tomto materiálu.

Třetím zásadním cílem je, aby na tomto materiálu nedocházelo k akumulaci, tedy k nasedání nežadoucích bakterií. To samotné může opět podnítit imunitní systém, následná rejekce (odmítnutí), sepse (celkový stav organismu, kde dojde k rozšíření bakterií do celého organismu a následnému šoku a selhání orgánů, smrti) nebo jen lokální zánět na konkrétním materiálu. Je tedy snaha o to, aby volený biomateriál byl, kromě toho, že je biokompatibilní, také čistý a nedráždivý, tedy inertní, dostatečně adhezivní a hlavně abakteriální, tedy aby odpuzoval bakterie.

2.2.2 Volba biomateriálu pro kloubní náhradu

Pro správnou interakci buněk na ortopedický implantát hraje klíčovou roli zvolení vhodného biomateriálu. Biomateriály používané pro tělní implantáty mohou být bioinertní nebo bioaktivní. Bioinertní materiály jsou materiály navrženy tak, aby, kromě toho, že odpovídají co nejlépe mechanickým vlastnostem nahrazované tkáně, aby i co nejméně

dovolovaly absorpci proteinů a buněčnou adhezi za účelem omezení nežádoucí imunitní reakce na povrchu implantátu [10]. Tyto bioinertní materiály se označují jako materiály první generace. Přesto nejsou bioinertní materiály dokonale neutrální a dochází u nich k častým interakcím s lidským organismem. Proto je dnes věnována pozornost vývoji a aplikaci tzv. materiálů druhé generace. Ty jsou navrženy tak, aby byly bioaktivní, což znamená, že materiál vyvolává specifické žádoucí buněčné reakce. U bioaktivního materiálu dochází k adhezi buněk k materiálu, proliferaci a diferenciaci buněk. Dochází tak například k tvorbě nových kostních tkání, tedy k integraci implantátu do těla.

V biomedicíně je mnoho druhů materiálů, které se používají pro aplikaci implantátů, či tělní integraci s danou lidskou tkání. Obecně se u biomateriálu považují za nejvýznamnější vlastnosti drsnost, tuhost, pružnost, smáčivost, vodivost, polarita a elektrický náboj. Mezi nejpoužívanější se řadí keramické materiály, polymery a kovy. V mé práci se soustředím na drsnost kovových implantátů a kloubních náhrad. Kovy jsou výhodné pro použití především v ortopedii. Jsou ideální pro ortopedické implantáty - splňují požadované mechanické vlastnosti, jako mechanickou pevnost, tuhost a houževnatost. Mezi negativní vlastnosti však připadá koroze a uvolňování látek, které mohou postupně snižovat tvorbu kostní tkáně [11]. Studie ukazují, že zásadním faktorem pro biomateriál je povrchu materiálu. Změnou drsnosti povrchu biomateriálu ovlivňujeme adhezi jak bakteriální, tak i živočišných buněk. Obvykle lze bakteriální adhezi snížit, pokud je drsnost materiálu vhodně zvolena [12]. V současné době se také využívá tzv. nano-biomateriálů, jedná se o biomateriál, charakteristický povrchovými vlastnostmi. Povrchové parametry jsou v řádu jednotek nanometrů [13].

O dané problematice však nerozhoduje pouze povrchová topografie materiálu, důležité je též možnost ovlivnění složení povrchu, tj. zvolení vhodného povlaku na povrchu materiálu. Vytvořený funkční povlak pomáhá ke zlepšení integrace s kostí. V současné době jsou často používané biokeramické povlaky. Mezi nejrozvinutější patří hydroxyapatit (HAP), který je hlavní neorganickou složkou kostí a zubů. Jak ale ukazují poslední studie, není tento povlak zcela výhodný [14]. Dále je např. využíván titaničitan barnatý - BaTiO_3 , jehož krystaly vykazují piezoelektrické vlastnosti [15].

Nejčastěji užívané materiály po aplikaci náhrad jsou slitiny kobaltu a chromu, korozivzdorná ocel, především pak titan. Pro kloubní implantát se jeví jako nejprestižnější právě titanové slitiny.

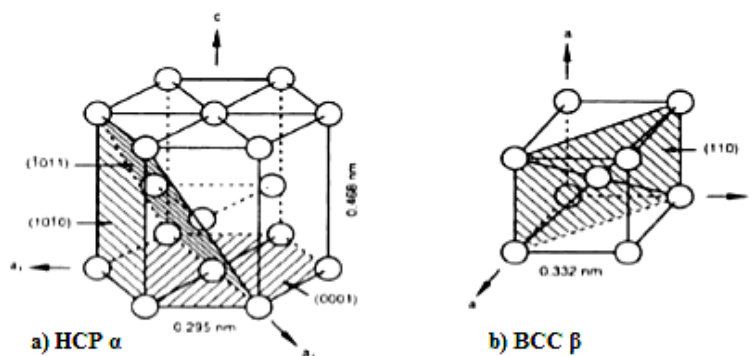
2.2.3 Vlastnosti slitin titanu

Slitin titanu se pro své vynikajících mechanické vlastnosti využívá v mnoha průmyslových odvětvích. Nejčastěji jsou slitiny titanu využívány v leteckém průmyslu, kosmickém průmyslu a ve zdravotním průmyslu. Pro biomedicínu jsou podstatné a výhodné vlastnosti, kterými titanové slitiny disponují jak z hlediska fyzikálně – chemických vlastností a mechanické pevnosti, tak i dobré korozivzdornosti. Titan vysoké čistoty má pevnost v tahu R_m až 250MPa. Příměsi zvyšují pevnost, avšak zároveň snižují jeho tažnost. Jeho výborná odolnost proti korozi jej umožňuje využít v silně korozních prostředích. Je zdravotně nezávadný a proto vhodný k využití v potravinářském průmyslu a k výrobě chirurgických implantátů. Titan je velmi tvrdý, ale lehký kov. Hustota titanu je oproti ostatním ocelím téměř poloviční, avšak pevnost je srovnatelná. [16;17].

Slitiny titanu dosahují výrazně lepších vlastností a vyšší pevnosti než samotný titan. Rozdělení slitin titanu lze provést z různých hledisek. Obvykle se vychází z fázového složení slitin, které je pak možné rozdělit do tří základních skupin: slitiny α , slitiny β , slitiny $\alpha + \beta$.

Cp (commercially pure - komerčně čistý) Ti má dvě krystalografické modifikace:

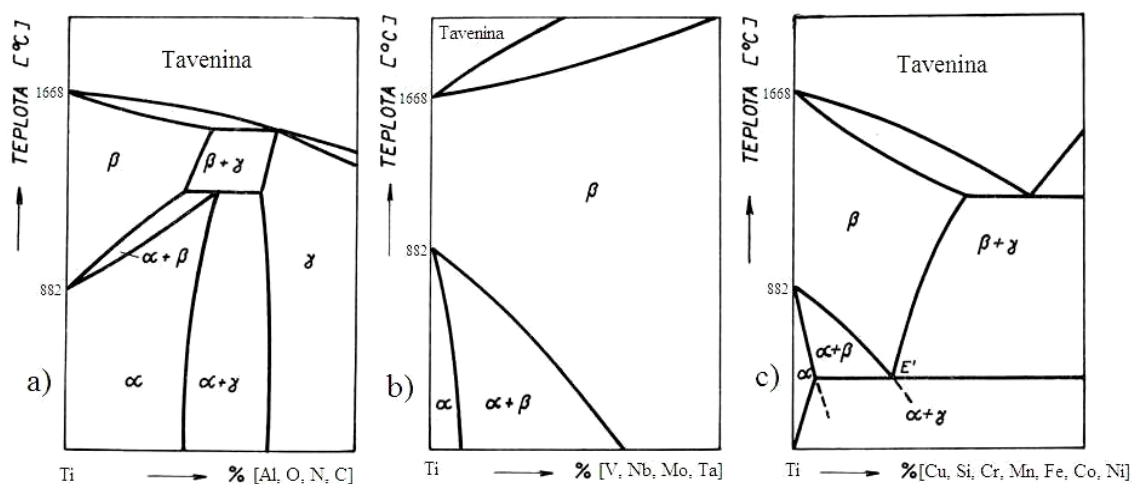
- a) Ti α s hexagonální mřížkou (hcp), stabilní do 882,5°C
- b) Ti β s prostorově centrovanou kubickou mřížkou (bcc), stabilní od 882,5°C do teploty tání 1 668±4°C [16].



Obrázek 1: Základní krystalografické modifikace titanu [18].

Mezi hlavní legující prvky patří Al, V, Sn, Nb, Cr, dále Mo, Zr a další. Legující prvky mají v obou alotropických modifikacích titanu úplnou nebo částečnou rozpustnost. U titanu stabilizují buďto ve fázi α (mřížka hcp) nebo fázi β (mřížka bcc) nebo s titanem mohou tvořit intermetalické sloučeniny, které se označují jako fáze γ .

Na níže uvedených diagramech jsou znázorněny prvky zvyšující stabilitu modifikace α -Ti, sem patří zejména Al a z nečistot N, O a C, viz *Obr. 2a*). Mezi prvky, které zvyšují stabilitu vysokoteplotní modifikace β -Ti, patří např. Mo, V, Nb, Ta, Fe, Mn, Cr a další. Některé z těchto prvků jsou schopny stabilizovat vysokoteplotní modifikaci až do pokojové teploty (V, Nb, Ta), jak je znázorněno na *Obr. 2b*). Jiné prvky (Fe, Cr, Mn) pouze do teploty jejího eutektoidního rozpadu, viz *Obr. 2c*) [19].



Obrázek 2: Vliv legujících prvků a nečistot na typ rovnovážného stavového diagramu titanu a) prvky stabilizující modifikaci α -Ti, b) prvky stabilizující modifikaci β -Ti až do pokojové teploty, c) prvky stabilizující modifikaci β -Ti do eutektoidní teploty [20].

2.2.4 Použití titanu a jeho slitin v biomedicíně

Titan se v biomedicíně využívá již od 60. let minulého století. Titan je dobře přijímán lidskou tkání, např. oproti nerezové oceli nebo slitinám kobaltu a chromu. Titan se také vyznačuje svým skvělým antikoročním chováním. Nevýhodou je, že titan nedisponuje tak dobrými mechanickými vlastnostmi, především se jedná o poměrně nízkou mez kluzu a mez pevnosti. Tribologické vlastnosti komerčně čistého (cp) Ti, může bránit interakci s živou tkání, či použití titanu, jako biomateriálu pro aplikaci na tělní implantát [21]. Proto byl čistý

titan postupně nahrazen titanovými slitinami. Osteoblasty pozitivně reagují, tzn. adherují s jakýmkoliv titanovým materiálem [17].

V lékařských aplikacích se povětšinou setkáváme se slitinami, které jsou tvořeny základním prvkem – titanem (Ti), plus dalšími prvky, které vykazují dobré biologické vlastnosti a pro tělní tkáň jsou vhodné. Mezi takové lze zahrnout tantal (Ta), zirkonium (Zr), nebo niob (Nb). Dále je velmi rozšířená slitina Ti společně s prvky hliníku (Al) a vanadu (V) [15]. Předpokládáme-li, že jsou prvky vázány ve slitině, jsou téměř zdravotně nezávadné. Komplikace však mohou nastat, pokud jsou prvky uvolňovány do těla pacienta, k čemuž dochází v každém případě. V takové situaci jsou známy případy zhoršení zdravotního stavu pacienta. Škodlivé účinky vykazuje např. Al, který způsobuje Alzheimerovu chorobu, či V, který v nepřiměřeném množství v těle může být až toxický a působit potenciálně škodlivě na mozek, játra, ledviny a tvorbu krevních buněk [22].

Použití titanu a jeho slitin v biomedicíně je nejvíce výhodné z hlediska biokompatibility, korozní stálosti, mechanických vlastností, zpracování a dostupnosti titanu [23]. Elastický modul pružnosti u slitin titanu činí asi 110 GPa – 55 GPa, což je téměř modul elasticity kosti. Kost má modul elasticity asi 30 GPa. Vysoký modul elasticity může vést k uvolnění a poškození kloubní protézy, či porušení a fraktury okolní kosti [24]. V medicíně se mezi nejpoužívanější titanové slitiny řadí slitina Ti6Al4V typu $\alpha+\beta$, Ti6Al4V typu β , TiNb typu β a další slitiny.

Slitina Ti6Al4V typu $\alpha+\beta$ je prvním nástupcem čistého titanu, je nejpoužívanější titanovou slitinou. Původně byla tato slitina využívána pro letecký průmysl, později se přešlo k využití i v aplikacích pro biomedicínu. Ti6Al4V poskytuje kombinaci vysoké pevnosti, nízké hmotnosti, tvárnosti a odolnosti proti korozi. Tato slitina také vykazuje dobré mechanické vlastnosti za nízkých teplot a velmi dobrou odolnost proti iniciaci a šíření trhlin (únava). Díky ochranné oxidační vrstvě na povrchu je slitina odolná proti korozi i v agresivních prostředích [25]. Za další pozitivní vlastnost je považována biokompatibilita s lidskou tkání. Vlastnosti této slitiny jsou o mnoho lepší než u obyčejného titanu a biokompatibilita je zajištěna lépe. Teplota fázové přeměny (beta transus) je 980-1011°C. Ti6Al4V je vhodná pro tváření za tepla v oblasti $\alpha+\beta$ v rozmezí teplot 870-980°C. Přestože byla slitina využívána pro lékařské účely, nedávné studie ukázali, že nedokáže

s plnou funkčností reagovat na lidskou tkáň. Proto je tendence tuto slitinu nahradit typem β [5,26].

Slitina Ti6Al4V typu β je slitina s pozměněnou strukturou krystalové mřížky. Oproti původnímu uspořádání, zde atomy tvoří prostorově centrovanou mřížku. Materiál je houževnatější a disponuje vyšším modulem pružnosti. Nevykazuje tak vysokou toxicitu pro lidské tělo, jako tomu bylo u typu $\alpha+\beta$ a má i lepší biokompatibilní vlastnosti. Slitina je výhodná díky vyšší korozní odolnosti, lepší biokompatibilitě s tělní tkání a tvarové paměti [17]. Titanové slitiny Ti6Al4V jsou jedny z nejvíce používaných materiálů pro výrobu implantátů. Jejich použití je významné např. pro celou řadu upevňovacích prvků pro kontakt s kostí [15].

Slitina TiNb typu β je v současné době velmi používaný materiál, též díky svým dobrým biomechanickým a biokompatibilním vlastnostem [27]. Porézní titanové slitiny jako je TiNb, jsou výhodnými implantáty pro biomedicínské aplikace, avšak vyšší existence pórů specifického povrchu slitiny může nepříznivě ovlivnit korozní odolnost materiálu. Dle studie je Ti35Nb vyrobený práškovou metodou, který je porézní, schopný vykazovat dobrou korozní odolnost. Slitina však musí být vhodně povrchově upravena. Je tendence vytvořit na povrchu slitiny porézní vlastnosti, které se nejvíce podobají lidské kosti [24].

2.3 Úprava a topografie povrchu

2.3.1 Povrchová úprava biomateriálů

Obecně platí, že morfologie a struktura biomateriálu je dána způsobem a podmínkami přípravy vrstvy, dále pak povrchovou strukturou a povlakem. K zlepšení interakce buněk s povrchem implantátu se jeví jako příznivá úprava drsnosti povrchu. Jako implantáty se nejčastěji používají zmíněné titanové slitiny, ty jsou nejvýhodnější z hlediska biokompatibility. Úpravy a modifikace povrchu titanových implantátů je zásadní pro další zkoumání a hledání ideální drsnosti pro použití v biomedicíně.

V praxi se můžeme setkat s řadou nepříznivých efektů, které limitují životnost implantovaného materiálu. S odstupem času se mohou objevit nežádoucí problémy jako

infekce, popřípadě záněty různého původu, nedostatečné interakce implantátu a aseptické uvolnění [28,29]. Stav povrchu je významný z hlediska interakce implantátu do tělního prostředí. Vhodnými úpravami povrchu lze urychlit tvorbu funkčního rozhraní mezi kostí a implantátem a tím zvýšit integraci buněk, zredukovat dobu integrace do kosti a umožnit mimo jiné bezpečné zatížení implantátu [2].

Efektivní interakce buněk lze dosáhnout i chemickým ošetřením povrchu. Například u titanu, lze dosáhnout změn struktury povrchu alkalickými úpravami. [2]. Jednou z možností, v současnosti hojně využívanou, je aplikace plazmových nástřiků hydroxyapatitu [30]. Hydroxyapatit, je obsažen v kostech a je nezbytný pro úspěšnou osteointegraci implantátu. Navíc je obsažen v organických povlacích. Povrchové povlaky, které se v současné době používají, obsahují také funkční molekuly, jako jsou proteiny, enzymy a jiné [31]. Precipitace hydroxyapatitu je jedním z nejdůležitějších faktorů, který informuje o úrovni bioaktivity povrchu materiálu. Pro testování *in vitro* se využívají především roztoky napodobující anorganickou část krevní plazmy, např. simulovaná tělní tekutina. Růst hydroxyapatitu lze podpořit vhodnými chemickými úpravami. K nim patří aktivace povrchu alkalickými nebo kyselými roztoky. Použití takovýchto povrchových úprav přináší téměř vždy určité zlepšení povrchových vlastností a prodloužení životnosti implantátu. Zdá se však, že potenciál většiny používaných povrchových úprav je v současné době téměř vyčerpán a jsou hledány další alternativy [2].

2.3.2 Drsnost biomateriálu

Ačkoliv je buněčná kompatibilita a adheze buněk velmi závislá na chemickém složení, topografie povrchu hraje klíčovou roli pro povrchovou interakci buněk [13]. Přílnavost buněk k povrchu biomateriálu je závislá na drsnosti povrchu. Reliéf a profil povrchu je ovlivněn mechanickým zpracováním materiálu při výrobě a především povrchovou úpravou implantátu. Vliv drsnosti povrchu je různý v odlišných řádech struktury drsnosti povrchu, proto je usazování buněk různé.

Zásadní vliv na epitelizaci buněk má drsnost materiálu. Dle nepravidelnosti povrchu materiálu rozlišujeme drsnost na makrodrsnost (nerovnost dosahuje rozměrů 100 μm – 1 mm a více), mikrodrsnost (100 nm – 100 μm) a nanodrsnost (méně než 100 nm). Profil povrchu

materiálu se na adheze buněk projevuje jedinečným způsobem, proto je třeba drsnost konkrétně specifikovat [32].

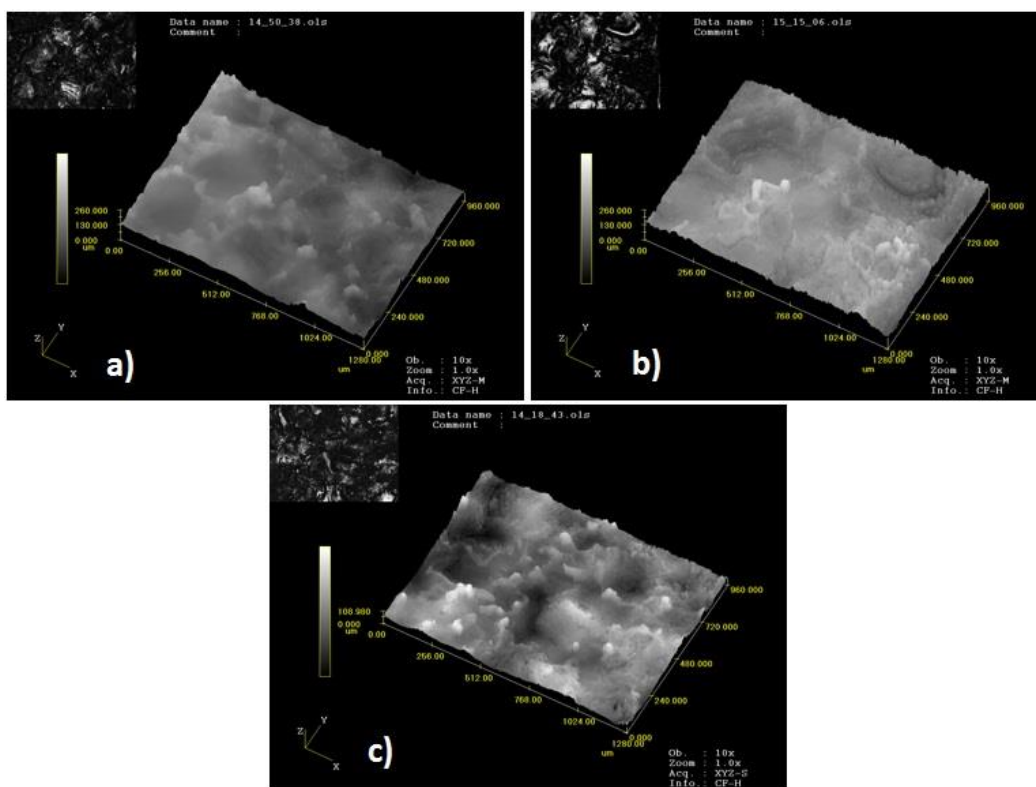
Makrodrsnost na povrchu implantátu je výhodná pro upevnění implantátu v tělní tkáni. Nepůsobí negativně na adhezi ani usedání buněk na povrchu materiálu. Mikrodrsnost se při testech jeví jako výhodná pro nasedání a stimulaci osteoblastů. Buňky osteoblastů jsou stimulovány směrem k diferenciaci, jak ukázala jejich genová exprese a vyšší stupeň mineralizace oproti buněčnému růstu na hladkém povrchu [32,33]. U mikrodrsnosti není adhezní přilnavost tak příznivá, adhezní plocha buňky je limitována reliéfem povrchu materiálu, proto výsledky testování nejsou tak příznivé [32,33]. Nanostruktura povrchu (nanodrsnost) je dle literatury výhodná pro kostní integraci a příznivou adhezi buněk osteoblastů na aplikovaný implantát. Buňky jsou také v rozměrech nanometrů, proto je vývoj a povrchová struktura ortopedických implantátů orientována v řádech nanometrů [13,15].

Buněčné reakce jsou nejčastěji ovlivněny topografií povrchu (velikost, tvar, struktura povrchu). Přestože byly vypracovány rozsáhlé studie zabývající se buněčnou reakcí na různé povrchové struktury, stále není zcela objasněno chování kostních buněk a jejich adheze na materiál. Literatura uvádí, že průměrná velikost zrna zralé kosti je 20 – 50 nm. S ohledem na tyto rozměry, jsou moderní implantáty navrhovány s povrchovou drsností na úrovni nanometrů. Známé jsou různé metody úprav modifikující stupeň drsnosti, stejně tak i povrchovou energii a topografii ortopedických implantátů. Mezi nejvyužívanější patří chemické leptání, anodizace, dále pak pískování a strojní obrábění. Mezi další metody patří např. tryskání, plazmové stříkání částic, nátěrové technologie, matování, depozice par, leštění povrchu.

2.3.3 Závislost buněčné adheze na drsnosti biomateriálu

Důležité je však uvést, že stejný technologický postup přípravy povlaku na odlišných materiálech vykazuje různé výsledky. Každý materiál má jiné složení a tepelně-mechanické vlastnosti, tudíž i při stejné technologii úpravy na jeho povrchu vzniká specifická topografie, viz *Obr. 3*. Na těchto snímcích jsou zobrazeny tři různé materiály a) Ti, b) TiAlFe, c) TiAlV, které byly povrchově upraveny elektroerozí. Přestože technologický postup probíhal u všech vzorků stejně, výsledná drsnost vzorků se liší. Použité metody mohou produkovat různé

povrchové topografie povrchu i chemicky různě ovlivňovat povrch implantátu [5]. Vhodnou povrchovou úpravou a technologickým postupem lze docílit zvýšení, či snížení drsnosti povrchu implantátu a tím podpořit integraci a kolonizaci osteoblastů [13]. Běžně se povrch materiálu pro některé bioaplikace zdrsňuje. Podle řady studií bylo zjištěno, že výskyt osteoblastů je maximalizován na drsnějším povrchu materiálu. Buňky podobné osteoblastům upřednostňují mikrostrukturovaný povrch. Zdrsňený povrch je výhodný pro vznik membrány receptorů buněk. Dnes se již studie zabývají zkoumáním nanostruktury povrchu a výsledky jsou pozitivní. Avšak i zdrsňený povrch biomateriálu, např. slitin titanu, pozitivně ovlivňuje adhezi a diferenciaci osteoblastů na povrch. Výsledky testů, které byly experimentálně provedeny *in vitro* pro mikrostrukturovaný povrch titanu, vykazují podporu vstřebávání fibronektinu a albuminu, což jsou důležité faktory pro buněčnou adhezi [5]. Nicméně zvýšení drsnosti povrchu způsobuje vyšší akumulaci infekčních bakterií, než u povrchů hladkých. Byly vyvinuty různé metody k vytvoření co nejlepší a nejvýhodnější drsnosti povrchu implantátu s různou úrovní drsnosti [5].



Obrázek 3: Na snímcích jsou zobrazeny tři různé materiály, povrchově upraveny stejným technologickým postupem - metodou elektroeroze. Při porovnání snímků je zřejmá odlišná morfologie vzorků: a)Ti; b)TiAlFe; c)TiAlV.

Není jednoduché jednoznačně definovat ideální povrch pro integraci osteoblastů. Především pro náročnost technologie výroby. Komerčně vyráběné slitiny titanu, určené pro lékařský průmysl tyto požadavky v mnoha případech splňují, avšak nový vývoj bioaktivních materiálů je náročný. Jde především o fakt, že odlišnosti, byť malé, při úpravě drsnosti materiálu nebo povlakování, ovlivní výslednou topografii biomateriálu. K tomuto problému dochází především z hlediska odlišných struktur materiálů a působením teploty. Např. stejná povrchová úprava, provedená stejnou technologií na odlišných materiálech, vykazuje odlišnou topografii, jak je blíže zmíněno v experimentu.

Chování buněk, ale i bakterií na mikrostrukturovaném povrchu je určováno nejen velikostí nerovností, ale také tvarem a vzdáleností. Například oblé nerovnosti s velkými mezerami mezi sebou spíše podporují adhezi buněk než nerovnosti hustě rozložené, ostré a špičaté. Výsledky však mohou vycházet ze zkreslených údajů, jelikož je jako hlavní nosný parametr uváděna střední aritmetická hodnota drsnosti – R_a [17]. Při plošném (trojrozměrném) snímání povrchu materiálu se jedná o parametr uvádějící aritmetický průměr absolutních výšek – S_a [13].

2.3.4 Parametry povrchové drsnosti:

Pro hodnocení výsledků měření je důležité definovat hodnoty drsnosti. Dle platných norem ISO a DIN lze sledovat a vyhodnocovat naměřené parametry. Díky tomu lze vyhodnotit, porovnávat a stanovit výsledky měření. Snahou výzkumu bylo také to, definovat povrch vzorků pomocí různých měřících zařízení, avšak dojít ke stejným, či velmi obdobným výsledkům. Každé zařízení může výsledky nepatrně zkreslit a tím přímo změnit výsledky měření. Výsledky je možné následně upravovat nebo filtrovat díky softwarovým programům.

U měřeného povrchu implantátu je pro výsledky charakteristický parametr střední aritmetické odchylky R_a (dle DIN EN ISO 4287), nebo v případě trojrozměrného měření povrchu parametr S_a (dle normy ISO 25 178-2). Pokud však hodnotíme povrchovou drsnost biomateriálů, či vzorků hodnocených pro biomedicínské využití, je nutné zahrnout i parametry ostatní. Stále častěji se objevují teze, že ostatní parametry jsou neméně důležité. Následující část popisuje parametry drsnosti povrchu, jež jsou zavedeny v programu SPIP™. Všechny dané parametry jsou doporučeny dle evropských metod mikroskopie pro měření

drsnosti a mikro tvrdosti. Uvedené parametry drsnosti povrchu by měly patřit mezi ty, které nejlépe charakterizují topografii vzorků vhodných pro biologické účely [34].

2.3.5 Měření plošné drsnosti – 3D (S-parametry)

Plošné neboli trojrozměrné měření a snímání struktury povrchu vzorku představuje kvalitnější snímání povrchu na vyšší úrovni posouzení drsnosti povrchu. Pokud se provede měření několika stovek řezů vedle sebe, získá se komplexní informace o průběhu drsnosti na celé měřené ploše. Toto technicky náročné snímání dat pro hodnocení struktury povrchu vede k velkému množství informací pro realistické představení povrchu. Analýzy struktury povrchu kromě početního hodnocení většinou nabízejí i grafické zobrazení ve formě axonometrického pohledu, nebo topografické mapy. Domnívám se, že pro jednoznačné určení drsnosti měřené plochy je potřeba znát více parametrů, k tomu může pomoci právě plošné sledování struktury povrchu. Všechny tyto termíny a definice jsou sepsány v normě ISO 25 178-2 [35], viz *Tab. 1*.

Tabulka 1: Přehled výškových parametrů plošného snímání drsnosti.

| Označení | Název | Jednotky | 2D standard | 3D reference | Vzorec |
|------------|----------------------------------|-----------------------|-------------|-----------------|--|
| <u>Sa</u> | Aritmetický průměr | [μm] | DIN 4768 | ISO/DIS 25178-2 | $\frac{1}{A} \int_A Z(x,y) dx dy$ |
| <u>Sq</u> | Kvadratický průměr | [μm] | ISO 4287/1 | ISO/DIS 25178-2 | $\sqrt{\frac{1}{A} \iint_A Z^2(x,y) dx dy}$ |
| <u>Ssk</u> | Šikmost | [-] | ISO 4287/1 | ISO/DIS 25178-2 | $\frac{1}{Sq^3} \left[\frac{1}{A} \iint_A Z^3(x,y) dx dy \right]$ |
| <u>Sku</u> | Špičatost | [-] | ISO 4287/1 | ISO/DIS 25178-2 | $\frac{1}{Sq^4} \left[\frac{1}{A} \iint_A Z^4(x,y) dx dy \right]$ |
| <u>Sz</u> | Maximální výška | [μm] | ISO 4287/1 | ISO/DIS 25178-2 | $z_{max} - z_{min}$ |
| <u>Sds</u> | Hustota vrcholků | [$1/\mu\text{m}^2$] | x | ASME B46.1 | x |
| <u>Sdr</u> | Poměrná rozvinutá styková plocha | [%] | x | ISO/DIS 25178-2 | x |

- *Sa*: Aritmetický průměr posuzovaného topografického povrchu.
- *Sq*: Kvadratický průměr posuzovaného topografického povrchu.
- *Ssk*: Šikmost topografického povrchu na omezené ploše - popisuje asymetrii výšek histogramu. V případě, že $Ssk = 0$, je rozdělení výšek symetrické. Pokud je $Ssk < 0$, může být povrch tvořen z děr, prohlubin. V případě $Ssk > 0$, může se jednat o plochý povrch s vrcholy. Číselné hodnoty vyšší než 1 můžou znamenat extrémní otvory nebo vrcholy na povrchu.
- *Sku*: Špičatost topografického povrchu na omezené ploše. Popisuje tvar vrcholů, jestli jsou ostré a prudké směrem nahoru, nebo široké a nevysoké.
- *Sz*: Maximální výška topografického povrchu na definované oblasti.
- *Sds*: Hustota vrcholů na definované ploše.
- *Sdr*: Poměrná rozvinutá styková plocha, zvlnění.

2.4 Zařízení pro měření drsnosti

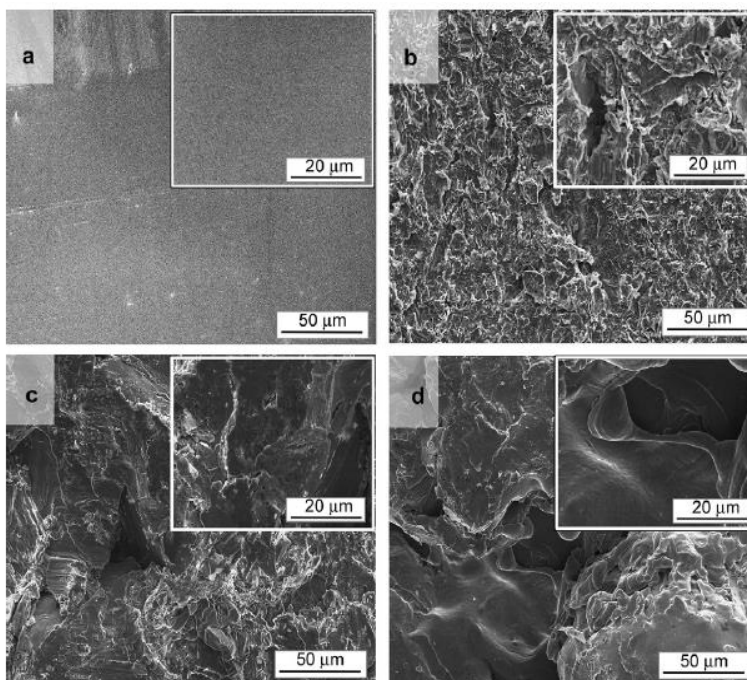
Měření drsnosti probíhá na speciálních metrologických zařízeních, které mají příslušnou citlivost pro měření drsnosti v potřebných řádech. Měření na takových přístrojích – mikroskopech jsou podrobena přísným technologickým požadavkům, i nutným hygienickým a teplotním pravidlům [36].

Moderní technologie, dokáže velmi přesně zobrazit povrchovou topografii povrchu materiálu a to i pro tak malé drsnosti, jaké jsou dosahovány u kloubních implantátů. Jako nejpoužívanější zobrazovací zařízení jsou využívány optické mikroskopy. Mezi speciální optické mikroskopy patří fluorescenční mikroskopy [37]. Pro měření při větším zvětšení se často můžeme setkat s odlišnými metodami měření. Mezi nejužívanější patří např. skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM) nebo konfokální mikroskopie (CLSM). Právě konfokální mikroskopy patří mezi zařízení, jenž mohou zobrazit povrch materiálu velmi přesně a též charakterizovat jeho topografii trojrozměrně. Zároveň dokáží nedestruktivním způsobem zobrazovat struktury buněk a tkání.

2.4.1 SEM

Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie, zkráceně SEM, je typem mikroskopie, která je široce využívána ve studiích povrchové topografie. V materiálovém inženýrství našla tato technologie mnoho uplatnění. Jelikož je možné po vhodné úpravě vzorků SE mikroskopií zkoumat i vlastnosti biologických materiálů, je také využívána v biologickém výzkumu. Kromě topografie a morfologie vzorků je možné zkoumat i živé organismy. Po chemické úpravě a stabilizaci povrchu biologického vzorku lze detailně studovat i např. adheze buněk a struktury tkání, či jiné integraci živých organismů [38,39]. Výhodné je také použití technologie SE mikroskopu pro sledování povrchu tenkých filmů na implantátech. Příprava vzorků pro SEM je všeobecně známá a vychází ze stejných kritérií, jako pro jiná mikroskopická měření podobného charakteru. Avšak lze zmínit pár důležitých požadavků na přípravu vzorku:

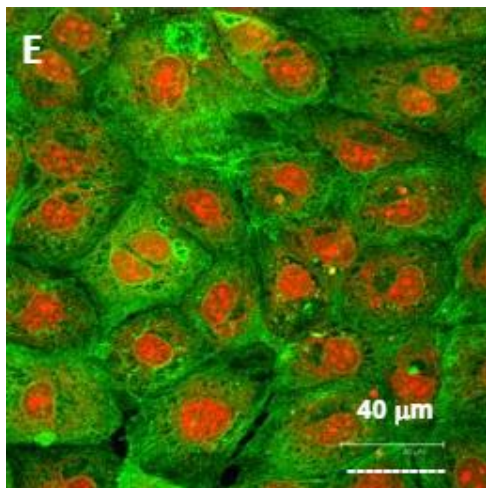
- vzorek musí být zbaven cizorodých částic (např. prach) a musí být suchý
- nemělo by docházet k nabíjení
- prostředí vzorku musí být stabilní – ve vakuu z důvodu ozařování povrchu vzorku pomocí svazku elektronů



Obrázek 4: Fotografie pořízena technologií SEM (LEO 982) při 10 kV urychlující napětí. Zobrazeny 4 různé povrchové úpravy: a) leštěný Ti, b) saténový Ti, c) částicemi ostřelovaný Ti, d) plazmou stříkaný Ti. [5].

2.4.2 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopii rozumíme sledování a měření drsnosti povrchu pomocí konfokálního mikroskopu. Konfokální mikroskop je druhem optického mikroskopu, jehož výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Základním prvkem konfokálního skenovacího laserového mikroskopu je skenovací mechanismus. Při pozorování silných transparentních vzorků, jako např. tkání nebo velkých buněk, je prakticky nemožné využít rozlišovací schopnosti optického mikroskopu. To



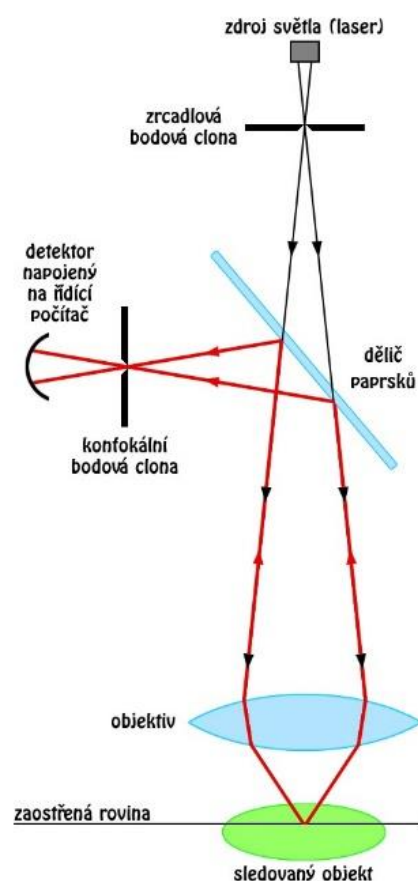
je způsobeno snížením obrazového kontrastu a následujícím potlačením nejjemnějších obrazových detailů v důsledku překrývání se zaostřeného obrazu s rozmazanými obrazy struktur, které se nacházejí mimo zaostřenou rovinu [36]. S tímto jevem se můžeme setkat při fluorescenční mikroskopii, viz *Obr. 5*, problém s nepřesným a nečitelným zpracováním obrazu lze eliminovat instrumentálním způsobem, pomocí konfokální mikroskopie [36].

Obrázek 5: Detail endotelových buněk. Zobrazeno pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 AOBS, zvětšení 60x. [36].

2.4.3 Princip konfokálního mikroskopu

Princip konfokálního mikroskopu je založen na skenovacím mechanismu, který skenuje laserové záření po ploše vzorku (skrz osvětlovací clonku). Fotodetektor detekuje buď odražené, nebo fluorescenční světlo [37]. Proces zobrazení je znázorněn na *Obr. 6*.

Pozorovaný vzorek je osvětlen bodovým zdrojem světla. Nejčastěji k tomu slouží laserový paprsek fokusovaný na clonku, která je pak objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek do bodu o průměru rovnajícím se difrakční mezi, dané numerickou aperturou objektivu. Stejný objektiv pak sbírá světlo vzorkem odrazené a rozptýlené, případně fluorescenci. Při zpětném průchodu tohoto záření objektivem vznikne další obraz bodové clonky, který je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobičem. V místě tohoto obrazu se nachází druhá, konfokální bodová clonka (dírkka v nepropustné masce), která blokuje detekci záření pocházejícího z míst vzorku mimo rovinu, do které je mikroskop právě zaostřen. Obraz celé této roviny získáme jejím rastrováním bod po bodu [36]. Zvláště v případě sledování buněčných struktur je požadované obarvení fluorochromem. Laserový paprsek je pak zaostřen do zvolené roviny, která buňkou prochází jako imaginární řez. V této zvolené rovině dojde k osvětlení preparátu laserovým paprskem a fluorochrom emituje viditelné záření. Získaný obraz je zaznamenán počítačem. Postupnou změnou zaostření je možné získat obraz z více rovin (imaginárních řezů) – od vršku až ke spodu buňky [37]. Tyto obrazy se pak složí v počítači do trojrozměrného obrazu prosvětlitelného biologického objektu nebo trojrozměrného obrazu povrchu u neprosvětlitelného objektu.



Obrázek 6: Princip fungování konfokálního mikroskopu [36].

2.4.4 Využití konfokální mikroskopie v biologii

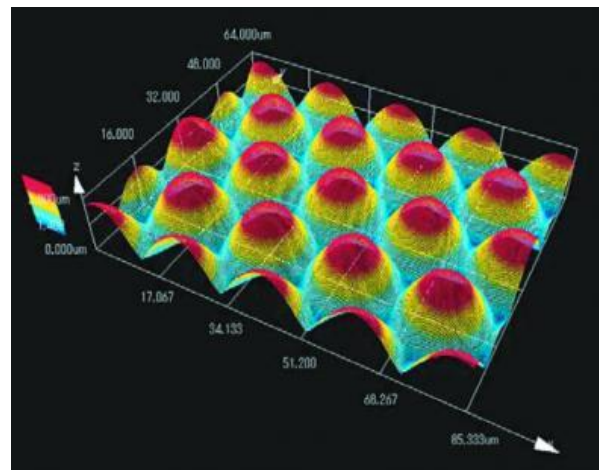
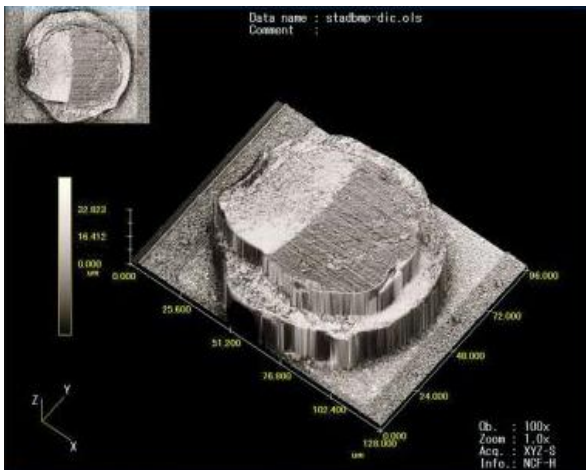
Konfokální mikroskop disponuje schopností zobrazovat prvky v trojrozměrném rozlišení, toho se využívá při studiu povrchových vlastností materiálů. Detekování topografie povrchu je možné až v řádu nanometrů, i proto má konfokální mikroskop široké využití v biologii a při sledování struktury biomateriálů. Využití v biologickém a lékařském výzkumu

je výhodné také tím, že konfokální mikroskopie je ve své podstatě neinvazivním a nedestruktivním způsobem studia prostorové struktury buněk a tkání. Příkladem, kdy konfokální mikroskopie bezesporu převyšuje možnosti metod klasické mikroskopie, může být studium složité architektury neuronových sítí v mozkové tkáni, či zkoumání adheze buněčných kolonií na biologických implantátech. Přínos konfokální mikroskopie spočívá také v možnosti vzájemně odlišit fluorescenci z molekul nacházejících se uvnitř a vně buněk. Uvádí se, že v mnoha případech je zlepšení kontrastu tak vysoké, že se vyjeví buněčné struktury, které při použití klasického mikroskopu nejsou vůbec pozorovatelné [36].

Mezi přednosti konfokální mikroskopie v rámci sledování topografie biologických vzorků a biologického sledování adheze buněk je možno zmínit např.:

- Možnost optických řezů a pozorování průhledných vzorků i pod povrchem
- Konstrukce trojrozměrných obrazců
- Bezkontaktní povrchová profilometrie (i málo odrazivých materiálů)
- Možnost pozorování nevodivých materiálů
- Možnost pozorování živých exemplářů bez nutnosti jejich usmrcení.
- Nedochází k degradaci vzorku

Konfokální obrazy optických řezů vznikají v číselné (digitální) formě a lze je proto dále vyhodnocovat a upravovat pomocí softwarových programů. Tyto programy (např. SPIP, Gwyddion, atd.) nabízejí běžné i detailnější zpracování získaných obrazů. Výhodou konfokální mikroskopie je možnost prostorové rekonstrukce mikroskopických objektů, opírající se o několik desítek až stovek optických řezů jedním objektem, postupně snímaných při plynule se měnící hloubce zaostření. Ze souboru optických řezů lze mimo jiné generovat obrazy celého trojrozměrného objektu. Na obrázcích - *Obr. 7 a 8* uvedených níže, jsou zobrazeny snímky z konfokálního rastrovacího mikroskopu LEXT 3000. Na zmíněném zařízení byly snímány vzorky uvedené v experimentální části bakalářské práce. Tímto mikroskopem disponuje Fakulta FS ČVUT.



Obrázek 7: 3D snímek z konfokálního mikroskopu [40]. Obrázek 8: Snímek 3D struktury vzorku s funkcí měření profilů [40].

Další využití konfokální mikroskopie spočívá v metodě snímání fluorescenčních obrazů pomocí tří fotonásobičů se spektrálními filtry pro modrou, zelenou a červenou barvu. Rekombinací dílčích obrazů v základních barvách získáme optický řez v reálných barvách emitované fluorescence [37].

2.5 Metody vyhodnocování povrchové drsnosti

Pro zobrazování povrchu materiálu a měření drsnosti se stále častěji využívá analýzy 3D topografie povrchu. Moderní programy na vyhodnocování naměřených dat umožňují zobrazovat a vyhodnocovat topografii materiálu přesněji a uživateli nabízejí širokou škálu možných úprav pro požadované konstrukce. U moderních programů jsou procesy koordinace a redukce dat v mnoha případech založeny na teorii náhodných funkcí, teorii Fourierovy transformace a teorii zpracování signálu [41].

2.5.1 Vyhodnocovací software SPIP™

Jedná se o program pro zpracování obrazu a dat, získaných ze snímání topografie materiálu vzorků, atd. Vstupní hodnoty se dají formulovat dle požadavků uživatele, či omezit. Pro tuto práci byl využit vyhodnocovací software především k prezentaci výchozích dat a jejich korekci, či úpravě. Program Spip pracuje se spektrální analýzou 3D topografie povrchu, díky čemuž je možné výsledné hodnoty zpracovat s důrazem na přesnost, kterou uživatel

požaduje. Dále pak je možné na základě náhodných funkcí – teorii Fourierovy transformace a teorie zpracování signálu, zpracovávat a formulovat přesněji data, užívané při spektrální analýze topografie povrchů [41].

Z hlediska hodnocení drsnosti povrchu jsou pro nás důležité výškové parametry plošného snímání, a to především parametry S_a , S_q , S_z , S_{sk} a S_{ku} . Tyto parametry jsou stěžejními indikátory drsnosti biomateriálu, která je žádoucí pro hodnocení interakce buněk s povrchem. Samozřejmě je, že nejen pomocí těchto parametrů se dá shrnout topografie biomateriálů. Na vliv buněčné integrace a adheze buněk má zřejmě vliv mnoho faktorů, avšak mezi hlavní indikátory jsou považovány zmíněné parametry.

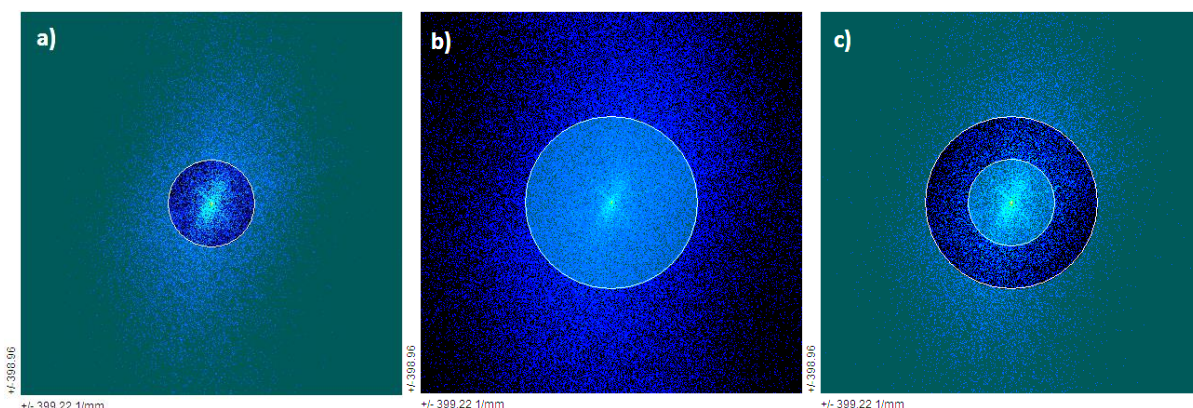
Jednou z možností, jak vyhodnocovat vstupní data, je možnost omezení vlnových délek původního snímku a vyhodnocení tzv. inverzních dat. Pro tuto operaci slouží FFT analýza, nebo-li již zmíněná, Fourierova transformace, které obsahuje funkci pásmového omezení (filtrování) hodnot. Je možnost omezit rozsahy vlnových délek, pixelů nebo Hz, to má za následek filtraci nevhodných jevů, ke kterým došlo při měření drsnosti (např. vysoká citlivost – šum, atd.). Tato filtrace ovlivní hodnoty a výsledný snímek, který získáme po provedení úprav a následném převodu dat do inverzního snímku. Operace vychází z Fourierovy transformace a následného vyhodnocení pomocí inverze FFT hodnot. To znamená, že lze filtrovat naměřená data analýzy drsnosti, pokud chceme vyhodnocovat drsnost v určitém pásmu (frekvencích). Zde jsou uvedeny základní modifikace pro vyhodnocování dat, chceme-li omezit rozsah snímání v určitých frekvencích [42].

Low Pass (nízká mez frekvence) – Jedná se o funkci, která je definována nejnižší frekvencí, všechny nižší frekvence jsou omezeny, nebo vyřazeny. To má za následek vyhlazení prostorového obrazu. V konečném důsledku se jedná o omezení šumu. Obraz se jeví jako neostrý, zastřený, uhlazený. Nejsou viditelné přesné detaily. Jsou definovány spíše jen celkové nerovnosti povrchu – vlnitost povrchu. Tato funkce zahrnuje pouze vnitřní frekvence kruhu; současně nejvyšší vlnovou délku, danou rozměrem obrázku, viz *Obr. 9a*).

High Pass (vysoká mez frekvence) – Jedná se o opak funkce Low Pass, zde je definována nejvyšší frekvence, všechny vyšší frekvence jsou vyřazeny, viz *Obr. 9b*). Tato funkce omezuje vysoké frekvence, jasné jsou jen detaily, šum, zrnitost. Zachyceny jsou jen

drobné informace. Výsledný obraz je ostrý, až zrnitý s vysokým kontrastem. Tato funkce zahrnuje frekvence okolo (vně) kruhu; současně nejvyšší vlnovou délku, danou vzdáleností bodů - velikostí pixelů.

Band Pass (mezikruhový výběr frekvencí) – Omezení jak nízkých frekvencí (nerovnosti, křivost celého povrchu), tak vysokých frekvencí (šumu, detailů). Vyhodnocované parametry jsou mezikružími mezi vnitřní kružnicí a vnější kružnicí. Vnitřní kružnice – definována pomocí nejvyšší frekvence (High Pass). Vnější kružnice – definována pomocí nejvyšší frekvence (High Pass), viz *Obr. 9c*). Band Pass je nastaven pomocí parametrů Low Pass a High Pass. Tento typ filtru může být využit pro porovnání drsnosti získané na odlišných zařízeních, či snímcích pořízených při jiném zvětšení. Nastavením hodnot filtru lze původní data ořezat dle vlastních potřeb, tím dostáváme požadovaný obraz a hodnoty, které mohou být zbaveny nežádoucích vlivů (šum/zrnitost, křivost roviny vzorku).



Obrázek 9: Frekvenční rozmezí definované pomocí vlnových délek. Hodnoceny jsou komponenty v tmavším odstínu.: a) Low Pass – frekvence uvnitř kruhu; b) High Pass – frekvence vně kruhu; c) Band Pass – hodnoceny frekvence v mezikruží.

2.6 Kultivace buněk

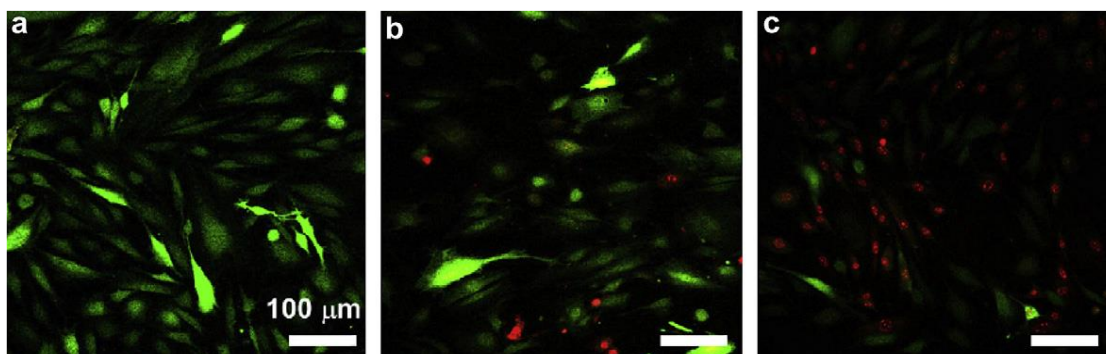
2.6.1 Bakteriální a buněčná kultivace na povrchu implantátu:

Vlastní kultivace buněk a bakterií je pro každé testování specifická. Záleží na konkrétní povrchové úpravě implantátu (povrchová drsnost, povrchové nátěry) a na aplikaci osteoblastů. Výsledky každého měření jsou individuální. Snahou je volit takovou povrchovou úpravu, která je biokompatibilní s lidskou tkání a zároveň splňuje požadavky pacienta.

V případě kovových implantátů to znamená volit pevný, nekorodující materiál, který bude mít vhodnou povrchovou úpravu. Za vhodnou povrchovou úpravu lze považovat tu, na které se maximalizuje výskyt osteoblastů - buněk žádoucích pro přirozené fungování implantátu a přijetí cizího materiálu lidskou tkání. Naopak minimalizovat výskyt bakterií, které brání epitelizaci implantátu a způsobují komplikace – vznik infekcí, hnisání, zastavení adheze žádoucích buněk na implantát.

2.6.2 Vyhodnocení adheze buněk

Pro vizuální sledování životaschopnosti buněk a následnému počítání buněk, složí metoda CFU (Colony Forming Units) v češtině KTJ (Kolonii Tvořící Jednotka). Touto metodou lze zhruba odhadnout počet životaschopných buněk ve vzorku. CFU/ml nebo KTJ/ml znamená počet kolonií na 1 milimetr. Mikrobiologové při zjišťování počtu bakterií nebo jiných mikrobiálních buněk vycházejí z předpokladu, že jedna buňka se může na pevném médiu namnožit na kolonii buněk [43].



Obrázek 10; Fluorescenční obrázky osteoblastů potřísněné barvou PI po kultivační době 25 hodin společně v koncentraci s naočkovanými bakteriemi *S. epidermidis*. a) 0 CFU/ml, b) 10^2 CFU/ml, c) 10^5 CFU/ml. [43].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Experimentální materiál a příprava vzorků

3.1.1 Charakterizace vzorků

Stěžejním prvkem experimentu byla slitina β -Ti39Nb, dodána společností UJP Praha a.s. (Praha, ČR). Slitina byla připravena obloukovým tavením v poměru 61% hmot. Ti a 39% hmot. Nb. Po obloukovém tavení následovala homogenizace slitiny při teplotě 850 °C po dobu 30 minut a následně byla slitina kalena do vody pro dosažení požadované homogenity. Výsledná slitina byla použita pro povrchovou úpravu určených substrátů. Jedná se o substráty čtyř materiálů s identickou morfologií, které byly využity jako podklad pro nanesení vrstvy TiNb. Tyto materiály byly dodané firmou Beznoska s.r.o. (Kladno, ČR). Substráty splňují vlastnosti standartních obchodních materiálů, jenž jsou charakterizovány dodavatelem [15]. Substráty byly odřezány z válcové tyče ve formě válečků od tloušťce 1-2 mm. Poté byly vybroušeny a vyleštěny. Jedná se o substráty:

- **β -Ti39Nb**
- **cp Ti grade 2 ISO 5832-2** (komerčně čistý titan jakosti 2)
- slitina titanu **Ti6Al4V grade 5 ISO 5832-3**
- **austenitická korozivzdorná ocel AISI 316l ISO 5832-1.**

Dále jsou substráty označeny jako TiNb, Ti, TiAlV a Fe (ocel), v daném pořadí. Seznam všech vzorků je uveden v *Tab. 2*, [15].

Tabulka 2: Seznam vzorků použitých pro experiment.

| Substrát | Fáze substrátu | Složení | Číselné označení vzorků | |
|-----------|-------------------------|--|-------------------------|---------------|
| | | | Zvětšení 10x | Zvětšení 200x |
| TiNb | Ti- β | Ti + 39hm.%Nb | 787 | 789 |
| Ti | Ti - α | Ti Grade 2 | 799 | 801 |
| TiAlV | Ti - α + β | Ti + 6hm% Al, 4hm% V | 795 | 797 |
| Fe (ocel) | Austenit | Cr 17-19, Ni 13-15, Mo 2,25-3,0, C 0,03 | 791 | 793 |

3.1.2 Příprava povrchové vrstvy

Vrstva TiNb, byla nanášena na uvedené vzorky čtyř identických materiálů. Nejprve byly vzorky iontově leptány v Ar pod dobu 15 min. Nanášení povlaku bylo připraveno magnetonovým naprašováním pomocí nanášecího stroje Flexicoat 850 (Hauzer, Nizozemsko). Doba nanášení byla 2,5 hodiny, teplota vzorků byla 350 °C a pracovní tlak cca 0,2 Pa. Vzorky byly umístěny na rotačním válci. Tloušťka nanášené vrstvy TiNb byla měřena na přístroji Calotest (CSM, Švýcarsko) [15]. Hodnota tloušťky povlaku je uvedena v *Tab. 3*.

Tabulka 3: Tloušťka vrstvy povlaku slitiny TiNb [15].

| Materiál povlaku | Tloušťka povlaku | Jednotky |
|------------------|------------------|----------|
| TiNb | 2,4 ± 0,1 | [μm] |

3.2 Experimentální vyhodnocení topografie vzorků

3.2.1 Měření drsnosti vzorků

Drsnost vzorků byla měřena na konfokálním mikroskopu (CLSM) LEXT OLS3000 (Olympus, Japonsko). Každý vzorek byl měřen jedenkrát při nižším (10x) a vyšším (200x) zvětšení. Vzorky jsou rozděleny dle materiálu a zvětšení na objektivu mikroskopu, při kterém byly snímány.

3.2.2 Vyhodnocování snímků z mikroskopu

Data získaná měřením drsnosti vzorků na mikroskopickém přístroji byla vyhodnocena pomocí programu. Jde o program, který vyhodnotí topografii vzorku i zobrazí povrchovou drsnost (2D vizualizace, 3D vizualizace), následně je tímto programem možné udělat korekci dat pomocí filtrování a omezení frekvencí zkoumaného snímku. Pro tuto práci byl použit

program Gwyddion SPM (Scanning Probe Microscope)¹, program pro datovou vizualizaci a analýzu, což je volně dostupný program, schopen standartních operací s daty. Dále pak byl využit program SPIP™ (The Scanning Probe Image Processor) V. 6.1.1², specializovaný program, jenž je popsán výše, který byl použit po podrobnější studii vzorků. V uvedené práci byla sledována topografie materiálu, s tím spojené 2D vizualizace povrchu vzorku a vyhodnocení plošných parametrů drsnosti.

3.2.2.1 Vstupní parametry pro vyhodnocování dat

Cílem bylo definovat vhodné výchozí nastavení parametrů, které byly použity pro vyhodnocování dat. Postup, jakým způsobem lze vyhodnotit soubor s daty, je uveden v obecném manuálu každého programu, avšak je nutné zaznamenat nastavení několika vstupních hodnot, které mají vliv na výslednou topografii. To je důležité především vzhledem k formulování hodnot drsnosti testovaného substrátu a následnému ověření správnosti měření, dále pak pro získání hodnot drsnosti vzorků, které bude možno reprodukovat znovu. Důležité kroky, které jsou třeba dodržet, jsou uvedeny níže.

Data získaná z mikroskopického měření mohou být zaznamenány v různých typech souboru. Pro tuto studii byly použity soubory s příponou OLS. Postup pro vyhodnocování dat je pro všechno vzorky, uvedené v této bakalářské práci, stejný.

Nastavení parametrů pro vyhodnocování snímaných vzorků:

- Snímací zařízení: CLFM
- Typ souboru (přípona): *ols*
- Program: SPIP V. 6.1.1.

¹ David Nečas, Petr Klapetek, *Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis*, *Cent. Eur. J. Phys.* 10(1) (2012) 11-188, Czech Metrology Institute, Czech republic.

² Jan F. Jørgensen, *The Scanning Probe Image Processor, SPIP™ V. 6.1.1*, *Image Metrology A/S*, Lyngsø Alle 3A, Denmark.

1) Import snímku

Data Type: 16 Bit Integer; Intel Word Format – ANO; Signed - ANO
Structure Information: Auto Guess – ANO; Head Length: 1966554; Number of X,Y Pixels: 1024 x 768; Number of Images: 1
Physical Scaling: X Size [nm]: 1,28E+6; Y Size [nm]: 9,6E+5
Vstupní tabulka je zobrazena viz *Obr. 11.1*).

2) Načtený obrázek

Po nastavení parametrů ve vstupní tabulce se vygeneruje pořízený obraz. Pokud jsou parametry správně nastaveny, je obraz dobře čitelný, v ideálním rozlišení i správném fyzickém měřítku. Obraz lze dále upravovat, např. barvu snímku vzhledem k výškovému profilu drsnosti snímku, viz *Obr. 11.2*).

3) Vlastnosti obrázku – Image Properties

Ověření fyzických vlastností snímku – parametry X, Y a Z souřadnice, pixely, odsazení.

4) Analýza drsnosti – Roughness Analysis

Stěžejní funkcí pro hodnocení drsnosti vzorku je analýza drsnosti (Roughness Analysis). Volbou ikony Roughness Analysis program vyhodnotí parametry drsnosti. Je možné nastavit, které parametry chce uživatel definovat.

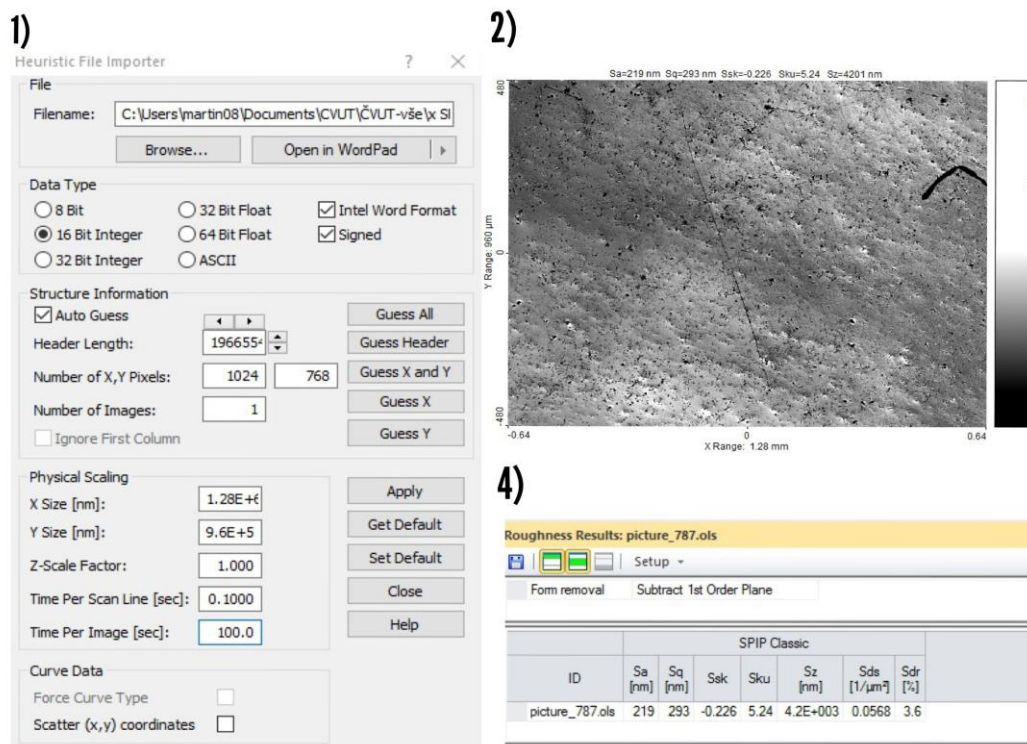
Input window: Volba snímku, který má být definován.

Plane Correction: ANO; Subtract Plane

Parameters: Nastavení parametrů, které mají být vyhodnoceny

Calculate: Stisknout pro potvrzení nastavení a vyhodnocení parametrů.

Po nastavení a potvrzení výchozího okna se zobrazí nové okno s parametry, viz *Obr. 11.4*).



Obrázek 11: Ilustrační snímky z programu Spip - 1) Vstupní tabulka; 2) Vyhodnocený snímek drsnosti; 4) Tabulka s parametry drsnosti.

5) Fourierova transformace – FFT Analysis

Tato funkce se využívá pro definování frekvenčního rozsahu snímku. Slouží především pro omezení vlnových délek (a frekvencí), pokud je uživatelem požadována korekce dat. Nejprve je potřeba nastavit parametry v úvodním okně Fourierova dialogu, viz *Obr. 12.5a*). Je možné volit mezi několika pásmy – low, high, band pass. Pro příklad je uvedena metoda filtrování dat dle Band Pass, která je definována omezením nízkých a vysokých frekvencí. Frekvence jsou nastaveny pomocí pixelů, vlnových délek, poměru a hertzů. Jednotlivé parametry tabulky jsou na sobě závislé.

Band filtering: Butterworth – funkce filtrování

Band Pass (mezikruhové omezení): ANO

Filter Settings: Nedefinováno

Cutoff: Low – definování nízkého pásma (omezení dolních hodnot)

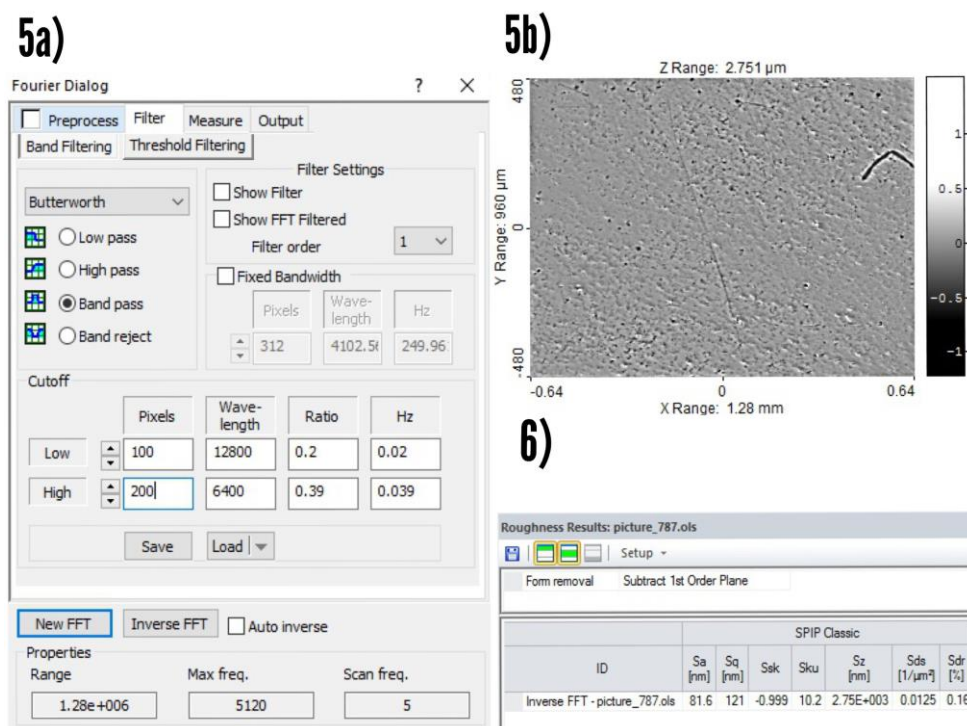
High - definování vysokého pásma (omezení horních hodnot)

New FFT - potvrzení nastavených hodnot a zobrazení snímku převedeného Fourierovo transformací.

Inverse FFT - potvrzení nastavených hodnot a zobrazení inverzního snímku převedeného Fourierovo transformací, viz *Obr. 12.5b*).

6) Inverzní snímek topografie vzorku

Snímek získaný transformací FFT analýzy byl znovu vyhodnocen pomocí parametrů drsnosti, viz *Obr. 12.6*). Výsledné hodnoty jsou zbaveny nežádoucích vlivů a jsou definovány dle určeného frekvenčního rozsahu.



Obrázek 12: Ilustrační snímky z programu Spip - 5a) Vstupní dialog pro nastavení korekce frekvencí; 5b) Vyhodnocený snímek drsnosti po korekci; 6) Tabulka s parametry drsnosti.

3.2.2.2 Porovnání hodnot parametrů při 10x a 200x zvětšení

Hodnocené vzorky byly snímány při nižším zvětšení 10x a vyšším zvětšení 200x. Vyhodnocené parametry pro obě zvětšení byly porovnány mezi sebou. Snahou bylo definovat co nejvíce podobnou hodnotu plošných parametrů drsnosti pro nižší i vyšší zvětšení, tím by se dala snadněji charakterizovat topografie biomateriálu, nezávisle na zvětšení a celkovém nastavení mikroskopu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce, viz *Tab. 5*, kde je rozděleno 10x a 200x zvětšení.

3.2.3 Závislost parametrů topografie na frekvenčním rozsahu

Jedná se o omezení frekvenčního rozsahu dle minimálních a maximálních vlnových délek. Uvedené výsledky vycházejí z naměřených hodnot, ale jsou upraveny dle Fourierovy transformace. Výsledné hodnoty, viz *Tab. 6*, jsou definovány minimálními a maximálními mezními frekvencemi, popřípadě vlnovými délkami, čímž by měl být omezen rozdíl hodnot drsnosti, získaný po měření za různých zvětšení. Pro tuto operaci byla použita funkce Band Pass programu Spip.

4 Výsledky

4.1.1.1 Výsledky získané programem Gwyddion

- Rozlišení snímku: 1024 x 768 px
- Fyzické rozměry snímku: zvětšení **10x** - 1280 x 960 μm
zvětšení **200x** - 64 x 48 μm
- Korekce roviny: NE
- Korekce dat: NE

Tabulka 4: Výsledné hodnoty dle programu Gwyddion.

| Materiál | Parametr | Zvětšení | | Materiál | Parametr | Zvětšení | |
|----------|----------------------|-----------|------------|----------|----------------------|-----------|------------|
| | | 10x (787) | 200x (789) | | | 10x (799) | 200x (801) |
| TiNb | Sa [μm] | 0,226 | 0,142 | Ti | Sa [μm] | 0,177 | 0,159 |
| | Sq [μm] | 0,299 | 0,215 | | Sq [μm] | 0,253 | 0,232 |
| | Ssk [-] | -0,2 | -2,2 | | Ssk [-] | 1,1 | -1,9 |
| | Sku [-] | 2,0 | 8,8 | | Sku [-] | 7,5 | 7,4 |

| Materiál | Parametr | Zvětšení | | Materiál | Parametr | Zvětšení | |
|----------|----------------------|-----------|------------|----------|----------------------|-----------|------------|
| | | 10x (795) | 200x (797) | | | 10x (791) | 200x (793) |
| TiAlV | Sa [μm] | 0,247 | 0,080 | Fe | Sa [μm] | 0,175 | 0,111 |
| | Sq [μm] | 0,325 | 0,102 | | Sq [μm] | 0,230 | 0,165 |
| | Ssk [-] | 0,9 | -0,1 | | Ssk [-] | -0,6 | -2,4 |
| | Sku [-] | 2,2 | 0,5 | | Sku [-] | 3,5 | 14,5 |

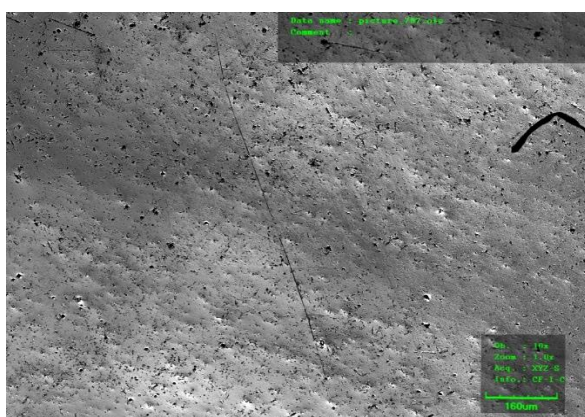
4.1.1.2 Výsledky hodnot a snímků získané programem SPIP 6.1.1

- Rozlišení snímku: 1024 x 768 px
- Fyzické rozměry snímku: zvětšení **10x** - 1280 x 960 μm
zvětšení **200x** - 64 x 48 μm
- Korekce roviny: ANO
- Korekce dat: NE

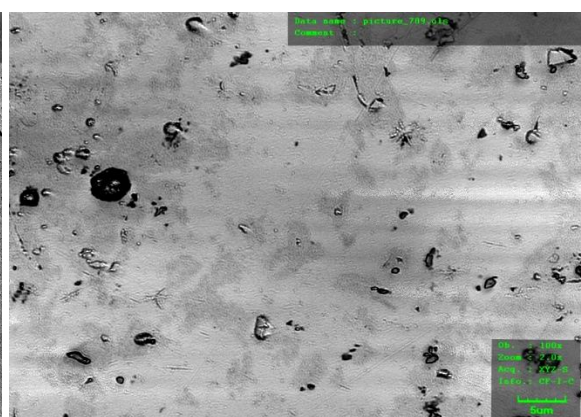
Tabulka 5: Výsledné hodnoty dle programu Spip.

| Materiál | Parametr | Zvětšení | | Materiál | Parametr | Zvětšení | |
|----------|---------------------------|-----------|------------|----------|---------------------------|-----------|------------|
| | | 10x (787) | 200x (789) | | | 10x (799) | 200x (801) |
| TiNb | Sa [μm] | 0,219 | 0,133 | Ti | Sa [μm] | 0,174 | 0,159 |
| | Sq [μm] | 0,293 | 0,207 | | Sq [μm] | 0,248 | 0,231 |
| | Ssk [-] | -0,23 | -2,50 | | Ssk [-] | 1,06 | -1,89 |
| | Sku [-] | 5,24 | 13,30 | | Sku [-] | 10,90 | 10,30 |
| | Sz [μm] | 4,20 | 2,78 | | Sz [μm] | 4,18 | 3,06 |
| | Sds [$1/\mu\text{m}^2$] | 0,06 | 0,04 | | Sds [$1/\mu\text{m}^2$] | 0,06 | 0,03 |
| | Sdr [%] | 4 | 1 | | Sdr [%] | 4 | 1 |

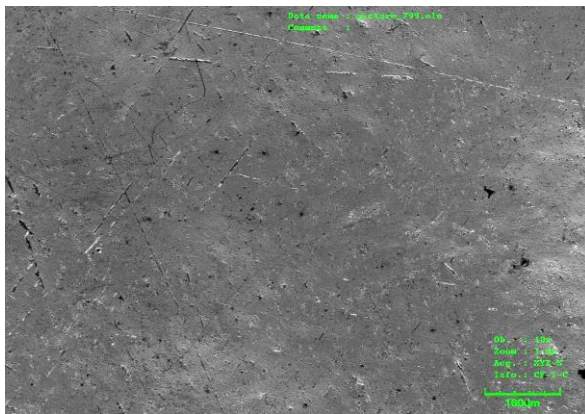
| Materiál | Parametr | Zvětšení | | Materiál | Parametr | Zvětšení | |
|----------|---------------------------|-----------|------------|----------|---------------------------|-----------|------------|
| | | 10x (795) | 200x (797) | | | 10x (791) | 200x (793) |
| TiAlV | Sa [μm] | 0,244 | 0,080 | Fe | Sa [μm] | 0,170 | 0,099 |
| | Sq [μm] | 0,323 | 0,101 | | Sq [μm] | 0,223 | 0,153 |
| | Ssk [-] | 0,96 | -0,10 | | Ssk [-] | -0,80 | -2,97 |
| | Sku [-] | 5,33 | 3,55 | | Sku [-] | 7,00 | 21,20 |
| | Sz [μm] | 4,19 | 1,45 | | Sz [μm] | 4,15 | 2,42 |
| | Sds [$1/\mu\text{m}^2$] | 0,05 | 0,04 | | Sds [$1/\mu\text{m}^2$] | 0,06 | 0,05 |
| | Sdr [%] | 8 | 0 | | Sdr [%] | 1 | 0 |



TiNb/TiNb (787), 10x zvětšeno



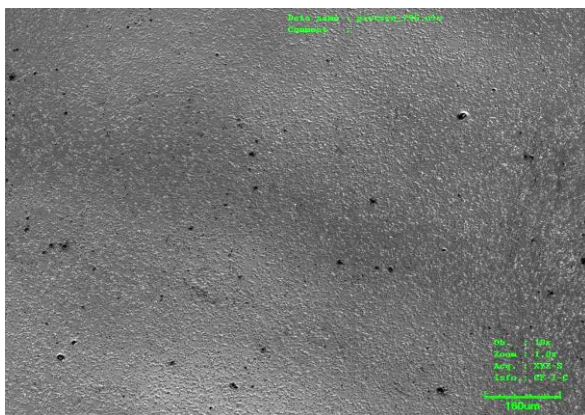
TiNb/TiNb (789), 200x



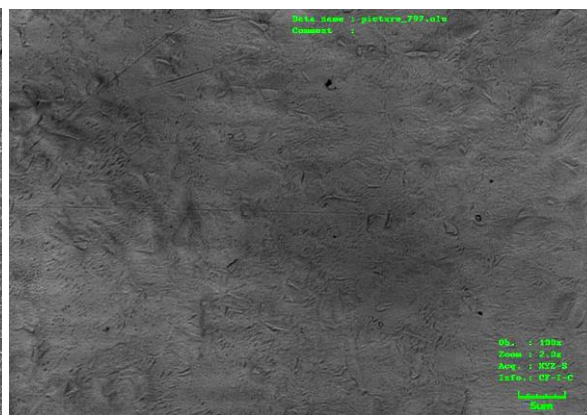
Ti/TiNb (799), 10x zvětšeno



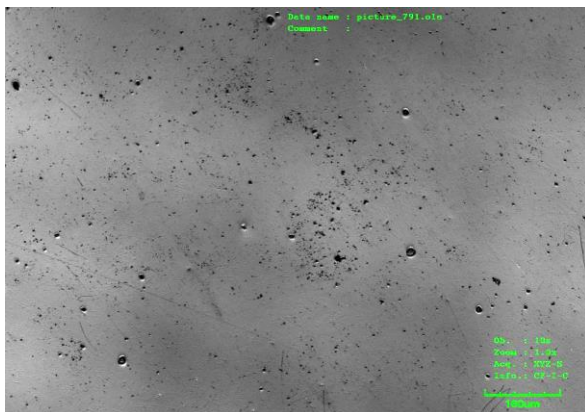
Ti/TiNb (801), 200x zvětšeno



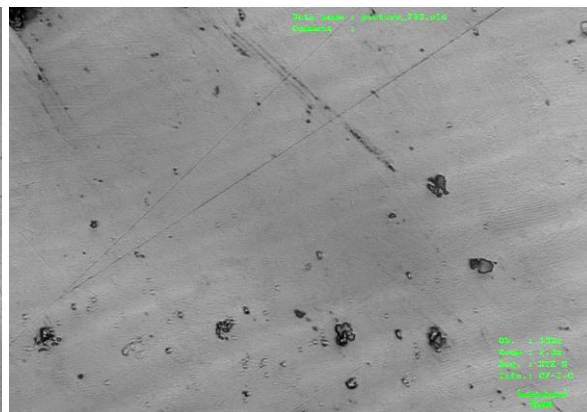
TiAlV/TiNb (795), 10x zvětšeno



TiAlV/TiNb (797), 200x zvětšeno



Fe/TiNb (791), 10x zvětšeno



Fe/TiNb (793), 200x zvětšeno

Výše zobrazené snímky se vztahují k hodnotám uvedeným v *Tab. 5*.

4.1.1.3 Korekce dat: Omezení min. a max. vlnovou délkou (Band Pass)

- Rozlišení snímku: 1024 x 768 px
- Fyzické rozměry snímku: zvětšení **10x** - 1280 x 960 μm
zvětšení **200x** - 64 x 48 μm
- Korekce roviny: ANO
- Korekce dat: FFT analýza - Band Pass

Tabulka 6: Mezních hodnoty korekce

| Meze | Relativní vlnočít [-] | Vln. délka λ [nm] | Poměr | Hz |
|-----------|-----------------------|---------------------------|-------|-------|
| Low Pass | 10 | 128 000 | 0,02 | 0,002 |
| High Pass | 100 | 12800 | 0,2 | 0,02 |

Tabulka 7: Získané hodnoty

| Vzorky | Sa [μm] | Sq [μm] | Ssk [-] | Sku [-] | Sz [μm] | Sds [$1/\mu\text{m}^2$] | Sdr [%] |
|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|----------------------|---------------------------|---------|
| TiNb 10x (787) | 0,082 | 0,121 | -1,00 | 10,20 | 2,75 | 0,01 | 0,2 |
| TiNb 200x (789) | 0,048 | 0,090 | -2,20 | 19,90 | 1,88 | 0,01 | 0,1 |
| Ti 10x (799) | 0,060 | 0,091 | 0,27 | 13,60 | 2,15 | 0,02 | 0,1 |
| Ti 200x (801) | 0,070 | 0,110 | -1,61 | 14,40 | 2,06 | 0,01 | 0,1 |
| TiAlV 10x (795) | 0,082 | 0,110 | 0,35 | 7,78 | 2,91 | 0,02 | 0,2 |
| TiAlV 200x (797) | 0,032 | 0,043 | -0,54 | 6,67 | 0,86 | 0,01 | 0,0 |
| Fe 10x (791) | 0,039 | 0,077 | -4,18 | 48,10 | 2,75 | 0,02 | 0,1 |
| Fe 200x (793) | 0,033 | 0,063 | -3,30 | 36,30 | 1,93 | 0,01 | 0,0 |

5 Diskuze

Porovnáme-li získané hodnoty parametrů u dvou různých programů (Gwyddion a Spip) lze soudit, že výsledné hodnoty drsnosti se téměř neliší. Odchylky parametrů mohou být zapříčiněny jiným způsobem vyhodnocování programů, či mírou specializace programu. Naopak pozitivním výsledkem je, že hodnoty parametrů Sa a Sq jsou u obou programů vyhodnoceny téměř stejně. Např. u vzorků Ti (801) nebo Fe (791), viz *Tab. 8*. Drobné odchylky jsou více zaznamenány u vzorků TiNb a TiAlV. To může být způsobeno složitějším profilem a drsností povrchu vzorků. Vyhodnocení pak může být ovlivněno korekcí dat, nebo plochy. V každém případě dochází k závislosti parametrů drsnosti (Sa) na zvětšení jak u programu Gwyddion, tak i programu Spip.

Tabulka 8: Porovnání vybraných parametrů v závislosti na typu programu

| Program | Ti (801) | | Fe (791) | |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Sa [μm] | Sq [μm] | Sa [μm] | Sq [μm] |
| Gwyddion | 0,159 | 0,232 | 0,175 | 0,230 |
| Spip | 0,159 | 0,231 | 0,170 | 0,223 |

Parametry vyhodnocené při zvětšení 10x vykazují jiné hodnoty, než parametry zvětšené 200x, proto byly použity korekce a omezení vlnových délek snímků, z důvodu definování vhodného poměru mezi oběma zvětšeními. Již podle nefiltrovaných a neupravovaných výsledků lze tvrdit, že topografie všech vzorků je odlišná, přestože všechny vzorky byly povrchově upraveny stejnou technologií. Zajímavé je, že nejvíce podobné topografie a i výsledky drsnosti se projevují u vzorků slitin TiNb a TiAlV. Povrchová drsnost zde vykazuje vyšší hodnoty parametrů, než u vzorků Ti a oceli Fe, které mají naopak hladší povrch. Např. u komerčně čistého (cp) Ti se tolik výrazná topografie nevytvořila a to i přesto, že uvedená drsnost podložky u Ti, před nanesením povlaku, byla vyšší než u TiAlV, viz *Tab.9*, získaná z měření liniového parametru Ra, dle studie [2]. Je možné, že výsledek topografie povlaku (slitina TiNb) byl ovlivněn legujícími prvky obsažených ve slitinách substrátů. Pro experiment byla zvolena stejná technologie povrchové úpravy, avšak různá morfologie vzorků zřejmě vede k odlišným výsledkům.

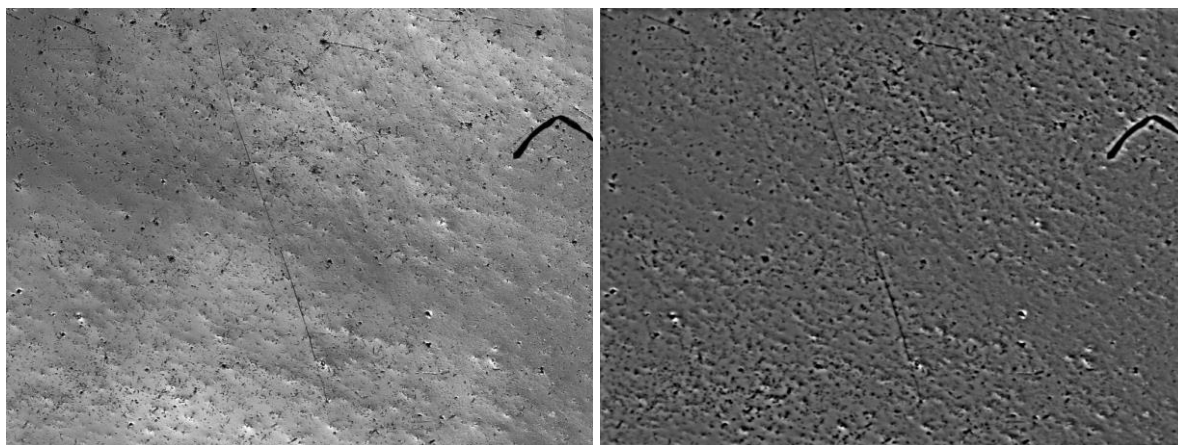
Tabulka 9: Aritmetická odchylka drsnosti Ra u podložky (substrátu) [15].

| Substrát | Drsnost podkladu |
|-----------|----------------------|
| | Ra [μm] |
| TiNb | 0,058 \pm 0,006 |
| Ti | 0,047 \pm 0,005 |
| TiAlV | 0,035 \pm 0,003 |
| Fe (ocel) | 0,013 \pm 0,005 |

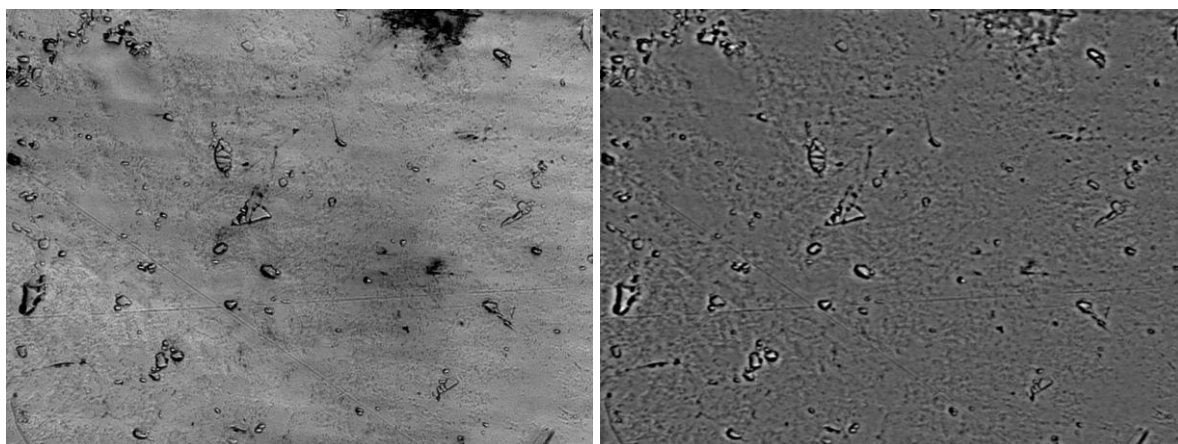
Výsledný parametr drsnosti, změřený bez filtrace, či dodatečné korekce je u 200x zvětšení vždy významně menší, než u zvětšení 10x. To je viditelné i na snímcích topografie vzorků. Např. drsnost vzorku TiNb (787) při zvětšení 200x je pravidelně zvlněný přes celý snímek, také je povrch velmi pórovitý. U vzorku TiAlV (797; 200x zvětšení) není zvlnění tolik zásadní, ale celkový povrch je velmi nesourodý a kopcovitý. Topografie vzorků Ti a austenitické oceli Fe mají podobnou strukturu, je viditelné pravidelné zvlnění povrchu, které více převažuje u vzorku Fe (793). Vzorky Ti a Fe jsou hladší, než vzorky TiNb a TiAlV.

Naměřené hodnoty topografie, byly po vyhodnocení upraveny filtrováním. Snahou bylo najít mezi snímky pořízenými v různých zvětšeních shodu, kdy by bylo možné pomocí korekce dle minimální a maximální meze vlnových délek a frekvencí sjednotit výsledné parametry topografie všech snímků. Pro vyhodnocení topografie vzorku je možno určit takové meze, které jsou pro danou operaci nejvýhodnější.

Výsledné hodnoty parametrů Sa a Sq se omezením vlnových délek u totožného vzorku neshodují. Nebylo tedy dosaženo předpokládaného výsledku. Avšak hodnoty u vzorků Ti a Fe jsou u 10x i 200x zvětšeného vzorku velmi podobné. Z výsledných hodnot vyplývá, že povrchy vzorků byly více hladké, tj. s nižší výchozí drsností, než u zbylých dvou vzorků TiNb a TiAlV. Bylo by možná dobré vzorky důsledněji přeměřit a soustředit se na změření totožného úseku povrchu vzorku. Výsledky by však neměly být nesmyslné, pouze nejsou zcela vypovídající o možnostech filtrování pomocí Fourierovy transformační analýzy. Lze tak soudit i ze snímků, získaných po měření uvedených vzorků mikroskopem, viz *Obr. 13* a *14*. V každém případě se shoda parametrů drsnosti po filtraci poněkud zlepšila - více u hladkých vzorků.



Obrázek 13: Porovnání snímků TiNb (787): Vlevo - bez korekce dat; Vpravo - po korekci dat (Band Pass)



Obrázek 14: Porovnání snímků Ti (801): Vlevo - bez korekce; Vpravo - po korekci dat (Band Pass)

Na snímcích získaných po korekci dat je jasně zřetelné, že povrch vzorků je ořezán o horní a dolní frekvence. Vytvořený snímek je tedy více mdlý a nevykazuje tak přesné struktury drsnosti. Korekce dat u vzorků, měřených za různých zvětšení, tedy může sloužit k obecnějšímu hodnocení výsledků drsnosti vzorků, ale není tak přesná.

6 Závěr

Z naměřených hodnot a provedeného experimentu lze učinit následující závěry:

- 1) Jsou-li materiály (substráty) různé morfologie upraveny povrchovým povlakováním, výsledná topografie povlaku vykazuje odlišné hodnoty parametrů drsnosti, třebaže technologický postup povlakování i přípravy povlaku je pro všechny vzorky stejný.
- 2) Legované oceli titanu mají po nanesení povlaku drsnější topografii, než ostatní materiály. Slitiny Ti také vykazují vyšší hodnoty drsnosti naneseného povlaku.
- 3) Topografii biomateriálu je třeba hodnotit dle více parametrů drsnosti. Celkový tvar topografie nelze zaznamenat pouze parametrem aritmetické odchylky (S_a), ale je třeba použít více parametrů - výškové (S_q , S_{sk} , S_{ku}) i např. hybridní (S_{dr}) parametry drsnosti.
- 4) Pro kompletní charakteristiku topografie je nutné použít více metod vyhodnocování.
- 5) Snímky pořízené při zvětšení 200x mají výrazně nižší hodnoty drsnosti, než snímky zvětšené 10x.
- 6) Korekce hodnot parametrů drsnosti, snímaných při různém zvětšení, je u všech materiálů obdobná. Lepších výsledků bylo dosaženo u vzorků s hladším povrchem.

Vzorky použité v experimentální části bakalářské práce byly též použity pro výzkum vědecké práce v rámci grantu, uvedeného pod číslem GACR15-01558S pod vedením Prof. RNDr. Petra Špatenky, CSc. Testované vzorky jsou dále určeny pro biologické zkoumání a testování buněčné adheze. Budoucím cílem je aplikovat na tyto biologické vzorky buněčné kolonie a sledovat jejich integraci ve spolupráci s Fakultou biomedicínského inženýrství na ČVUT v Praze a Fyziologickým ústavem AV ČR.

7 Literatura

- [1] NEOH, Koon Gee, Xuefeng HU, Dong ZHENG a En Tang KANG. Leading opinion: Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(10), 2813-2822 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.018. ISSN 01429612.
- [2] FILOVA E, FOJT J, KRYSLOVA M, MORAVEC H, JOSKA L a BACAKOVA L. The diameter of nanotubes formed on Ti-6Al-4V alloy controls the adhesion and differentiation of Saos-2 cells. *International Journal of Nanomedicine, Vol 2015, Iss default, Pp 7145-7163 (2015)* [online]. 2015, **2015**(default), 7145-7163 [cit. 2017-01-14]. ISSN 11782013.
- [3] PUCKETT SD, TAYLOR E, RAIMONDO T a WEBSTER TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(4), 706-13 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.081. ISSN 18785905.
- [4] KURTZ SM, LAU E, SCHMIER J, ONG KL, ZHAO K a PARVIZI J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *The Journal Of Arthroplasty* [online]. 2008, **23**(7), 984-91 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.arth.2007.10.017. ISSN 15328406.
- [5] WU, Yong, Joseph P. ZITELLI, Kevor S. TENHUISEN, Xiaojun YU a Matthew R. LIBERA. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(4), 951-960 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.001. ISSN 01429612.
- [6] SEDLÁČEK, Vladimír. Titan a jeho slitiny: výroba, zpracování a použití. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1963, 205 s.
- [7] SCHLEIFER KH a KLOOS WE. A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *Journal Of Clinical Microbiology* [online]. 1975, **1**(3), 337-8 [cit. 2017-01-14]. ISSN 00951137.
- [8] BECKER K, FRIEDRICH AW, LUBRITZ G, WEILERT M, PETERS G a VON EIFF C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *Journal Of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(4), 1434-9 [cit. 2017-01-14]. ISSN 00951137.

- [9] Corrosion of Porous TiNb Alloy and Its Effects on Mechanical Properties -Dostupné na:<http://www.research-degree-thesis.com/medicine-public-health/biomedicine-engineering/516207.html#sthash.L5sqDqee.dpuf>
- [10] HENCH LL a POLAK JM. Third-generation biomedical materials. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2002, **295**(5557), 1014-7 [cit. 2017-01-14]. ISSN 10959203.
- [11] MASTERS, Barry R. Book review: The biomedical engineering handbook, 2nd Edition, Joseph D. Bronzino (Editor in chief); CRC Press in cooperation with IEEE Press, Boca Raton, FL 2000, Vol. I, ISBN 0-8493-0461-x, Vol. II, ISBN 0-8493-0462-8. *Computers in Biology and Medicine* [online]. 2001, **31**(6), 525-525 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/S0010-4825(01)00023-3. ISSN 00104825.
- [12] COLON G, WARD BC a WEBSTER TJ. Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* [online]. 2006, **78**(3), 595-604 [cit. 2017-01-14]. ISSN 15493296.
- [13] M. JÄGER, C. ZILKENS, K. ZANGER a R. KRAUSPE. Significance of Nano- and Microtopography for Cell-Surface Interactions in Orthopaedic Implants. *Journal of Biomedicine and Biotechnology, Vol 2007 (2007)* [online]. 2007, **2007** [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1155/2007/69036. ISSN 11107243.
- [14] ZAKARIA, Siti Maisurah, Sharif Hussein SHARIF ZEIN, Mohd. Roslee OTHMAN, Fang YANG a John A. JANSEN. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Engineering, Part B: Reviews* [online]. 2013, **19**(5), 431-441 [cit. 2017-01-14]. ISSN 19373368.
- [15] STARÝ V., TOLDE Z., A KOL. *Growth of TiNb adhesion interlayer for bioactive coatings. (zasláno do tisku)*. Praha 2016.
- [16] REICHMAN, L. Využití slitin titanu v cyklistickém průmyslu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 29 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Němec, Ph.D.
- [17] KRÝSLOVÁ, Markéta. Růst lidských osteoblastů SaOS2 na titanu modifikovaném nanotubami. *Růst lidských osteoblastů SaOS2 na titanu modifikovaném nanotubami. / Markéta Krýslová ; vedoucí práce Elena Filová ; oponent práce Barbora Volfová ; konzultant práce Jitka Žurmanová* [online]. 2013 [cit. 2017-01-14].

- [18] LÜTJERING G., WILLIAMS J. C. Titanium [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007 [cit. 2017-01-14]. ISBN 978-3-540-71397-5.
- [19] VOJTĚCH, Dalibor. Kovové materiály. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-600-1.
- [20] Steels: Microstructure and Properties. *Steels: Microstructure and Properties*. 2006. ISBN 9780750680844. Dostupné na:
<http://books.google.cz/books?id=4c31Fipmc5AC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [21] OLIVEIRA V., CHAVES R.R., BERTAZZOLI R. a CARAM R. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF Ti-Al-Nb ALLOYS FOR ORTHOPEDIC IMPLANTS. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol 15, Iss 4, Pp 326-333 (1998)* [online]. 1998, **15**(4), 326-333 [cit. 2017-01-14]. ISSN 01046632.
- [22] PORTAN DV, KROUSTALLI AA, DELIGIANNI DD a PAPANICOLAOU GC. On the biocompatibility between TiO₂ nanotubes layer and human osteoblasts. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* [online]. 2012, **100**(10), 2546-53 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1002/jbm.a.34188. ISSN 15524965.
- [23] KATTI K. S. Biomaterials in total joint replacement. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2004, **39**(3), 133-142 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2003.12.002. ISSN 09277765.
- [24] GEETHA M., SINGH AK., ASOKAMANI R., GOGIA AK. *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants*. A review. *Progress in Materials Science*. 2009. 54: s 397-425
- [25] FIŠARA, Š. *Vliv tepelného zpracování na mikrostrukturu Ti6Al4V*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016. 43 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Rudolf Foret, CSc.
- [26] WANG K. *The use of titanium for medical applications in the USA*. *Materials Science and Engineering A*. 1996. 213A: s 134-137.
- [27] BENEŠ L., *Slitiny titanu.*, Presentace, Dostupné na:
http://users.fs.cvut.cz/libor.benes/vyuka/matlet/05_Slitiny%20Ti.ppt

- [28] ANINWENE G. E., YAO C., WEBSTER T. J.: *Int. J. Nanomed.* 3, 257 (2008)
- [29] BJURSTEN LM, RASMUSSEN L, OH S, SMITH GC, BRAMMER KS a JIN S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* [online]. 2010, **92**(3), 1218-24 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1002/jbm.a.32463. ISSN 15524965.
- [30] NARAYANAN, R., S.K. SESHADRI, T.Y. KWON a K.H. KIM. Electrochemical nano-grained calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V for biomaterial applications. *Scripta Materialia* [online]. 2007, **56**(3), 229-232 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.scriptamat.2006.10.004. ISSN 13596462.
- [31] GURAPPA, I. Degradation of Ti-24Al-15Nb alloys under different environmental conditions. *Intermetallics* [online]. 2003, **11**(8), 867-871 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/S0966-9795(03)00094-3. ISSN 09669795.
- [32] LOSSDÖRFER S, SCHWARTZ Z, WANG L, LOHMANN CH, TURNER JD, WIELAND M, COCHRAN DL a BOYAN BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* [online]. 2004, **70**(3), 361-9 [cit. 2017-01-14]. ISSN 15493296.
- [33] SCHNEIDER. GB. A KOL. *Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. Journal of Dental Research.* 2003. vol. 82, no. 5, p. 372-376.
- [34] SPIP Manual, pdf, Dostupné na:
http://www.imagemet.com/WebHelp6/Content/RoughnessParameters/Roughness_Parameter_s.htm
- [35] HOLADA J., *Manufacturing Processes - Technology of Metal Cutting.*, Plzeň. 2013. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni. Vedoucí práce: Ing. Ivana Česáková.
- [36] WHITE, J. G., W. B. AMOS a M. FORDHAM. An Evaluation of Confocal versus Conventional Imaging of Biological Structures by Fluorescence Light Microscopy. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1987, **105**(1), 41-46 [cit. 2017-01-14]. ISSN 00219525.
- [37] *Konfokální mikroskopie - Confocal microscopy.* Věřejně dostupný dokument. Dostupné na:
<https://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/30/public/Amikroskop.pdf>

- [38] CONRAD, CYLER; JONES, EMILY LENA; NEWSOME, SETH D.; SCHWARTZ, DOUGLAS W. *Bone isotopes, eggshell and turkey husbandry at Arroyo Hondo Pueblo*. 2016. Journal of Archaeological Science: Reports. DOI:10.1016/j.jasrep.2016.06.016
- [39] RUSSELL, S. D.; DAGHLIAN, C. P. *Scanning electron microscopic observations on deembedded biological tissue sections: Comparison of different fixatives and embedding materials*. 1985. Journal of Electron Microscopy Technique. 2 (5): 489–495. DOI:10.1002/jemt.1060020511
- [40] *Laserový konfokální řádkovací mikroskop*. Veřejně dostupné. Kód článku: 070443 Vyšlo v MM : 2007 / 4, 25.04.2007 v rubrice Automobilový průmysl / Automobilový průmysl, Strana 77. Dostupné na: <http://www.mmspektrum.com/clanek/laserovy-konfokalni-radkovaci-mikroskop.html>
- [41] BRILLOVÁ, K. *Aplikace spektrální analýzy v 3d hodnocení povrchů*: Doktorská práce. Brno: Vysoký učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství, 2011. 99 s. Vedoucí práce doc. RNDr. Miroslav Ohlídal, CSc.
- [42] JAN F. JØRGENSEN, *Manual: The Scanning Probe Image Processor, SPIP™ V. 6.1.1, Image Metrology A/S, Lyngsø Alle 3A, Denmark*.
- [43] LEE. J., WANG. H., KAPLAN. JB., LEE. WY., *Effects of Staphylococcus epidermidis on osteoblast cell adhesion and viability on a Ti alloy surface in a microfluidic co-culture environment*. 2010 Nov;6(11):4422-9. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.05.021