ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Analýza adhezních zkoušek kolagenní nanovrstvy

Praha 2017

Kováříková Adéla

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kováříková** Jméno: **Adéla** Osobní číslo: **437083**

Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**

Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**

Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**

Studijní obor: **bez oboru**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Analýza adhezních zkoušek kolagenní nanovrstvy

Název bakalářské práce anglicky:

Analysis of collagen nanolayer adhesion experiments

Pokyny pro vypracování:

(1) Vysvětlete motivaci k vývoji povrchových vrstev na implantátech
(2) Zmapujte morfologii povrchu modelových vzorků před nanesením a po nanesení osteointegrační vrstvy
(3) Zhodnoťte důsledky provedení protlačovacího experimentu na morfologii povrchu vzorku
(4) Na základě pozorování se pokuste zformulovat závěry o adhezi osteointegrační vrstvy

Seznam doporučené literatury:

(1) Fratzl P. (2008) Collagen: Structure and Mechanics. Springer Scinece and Business Media, New York
(2) Heimann, R. B. (2016). Plasma-sprayed hydroxylapatite-based coatings: Chemical, mechanical, microstructural, and biomedical properties.
Journal of Thermal Spray Technology, 25(5), 827-850.
(3) Kirmanidou, Y. et al. (2016). New ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: A review
(4) Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. Biomaterials, 84, 301-314.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. Ing. Lukáš Horný Ph.D., ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky FS

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

Ing. Tomáš Suchý Ph.D., ústav mechaniky, biomech.a mechatr. FS

Datum zadání bakalářské práce: **28.04.2017** Termín odevzdání bakalářské práce: **18.08.2017**

Platnost zadání bakalářské práce: _____

Podpis vedoucí(ho) práce | Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry | Podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Studentka bere na vědomí, že je povinna 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.

3.5.2017

Datum převzetí zadání | Podpis studentky

© ČVUT v Praze, Design: ČVUT v Praze, VIC

Anotační list

Jméno autora: Adéla Kováříková

Fakulta: Fakulta strojní

Zadávající ústav: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Studijní program: Teoretický základ strojního inženýrství

Studijní obor: bez oboru

Rok: 2017

Název bakalářské práce: Analýza adhezních zkoušek kolagenní nanovrstvy

Název bakalářské práce anglicky: Analysis of collagen nanolayer adhesion experiments

Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Bibliografické údaje: počet stran 51

počet obrázků 40

počet tabulek 1

Klíčová slova: kolagen, implantát, vrstva, povrchové úpravy, adheze

Key words: collagen, implant, layer, surface treatment, adhesion

Anotace:

Bakalářská práce se zaměřuje na analýzu adhezních zkoušek kolagenové nanovrstvy na implantátu. Jsou v ní uvedeny potřebné informace o kolagenu a povrchových úpravách implantátů. V praktické části jsou porovnány morfologie povrchu vzorku před nanesením kolagenové vrstvy, po nanesení a po protlačení. Dále jsou zde prezentovány výsledky adhezních zkoušek.

Abstract:

The aim of this bachelor thesis is to analyse adhesive tests of a collagen nanolayer on an implant. It includes necessary information about collagen and surface treatment. Morphologies of the model implant before and after the collagen layer is applied are described in the practical part, as well as the morphology after the adhesive test. The results of the adhesive test are presented later on.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v přiloženém seznamu.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne 9. 6. 2017 .....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. Ing. Lukáši Hornému, Ph.D. za odbornou pomoc při vypracování a také panu Ing. Tomášovi Suchému, Ph.D. za konzultace. Jemu a také Ing. Lucii Vištejnové, Ph.D. z Biomedicínského centra v Plzni bych také chtěla poděkovat za možnost osobně se účastnit implantací. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu během zpracování mé práce.

Obsah

Seznam použitých symbolů 7

1 Úvod 8

2 Teoretická část 10

2.1 Kolagen 10

2.1.1 Struktura 11

2.1.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti 13

2.1.3 Mechanické vlastnosti kolagenu 16

2.1.4 Aplikace 19

2.2 Povrchové úpravy implantátu pro zvýšení osseointegrace 20

2.2.1 Fyzikálně – chemické úpravy povrchu 22

2.2.2 Anorganické povlaky 23

2.2.3 Organické povlaky 24

2.2.4 Vrstvy obsahující antibiotika 25

3 Metodika experimentu 27

3.1 Popis vrstvy a její příprava 27

3.2 Průběh experimentu 29

3.3 Statistické vyhodnocení experimentu 31

4 Výsledky experimentu 33

4.1 Srovnání morfologie povrchu před a po nanesení vrstvy 33

4.2 Morfologie povrchu po protlačení 38

5 Diskuze 41

6 Závěr 46

7 Seznam literatury 47

Seznam obrázků 49

Seznam použitých symbolů

T_s	[°C]	Teplota smrštění
T_d	[°C]	Teplota denaturace
E	[Pa]	Modul pružnosti v tahu
η	[Pa.s]	Dynamická viskozita
ε	[–]	Poměrná deformace
σ	[Pa]	Napětí v tahu
τ	[Pa]	Tečné napětí
v	[$m.s^{-1}$]	Rychlost
$\bar{x}$	[–]	Aritmetický průměr
s	[–]	Směrodatná odchylka
r	[–]	Korelační koeficient
$_{\Delta}l$	[m]	Prodloužení tělesa
l_0	[m]	Původní délka
b_1	[–]	Parametr regresní přímky
b_2	[–]	Parametr regresní přímky

1 Úvod

Stále se prodlužující délka života v kombinaci se sedavým životním stylem, obezitou a častým přetěžováním organizmu vede k nárůstu počtu onemocnění a degenerativních poškození. Potíže, které se dříve objevovaly výhradně u pacientů v pokročilém věku, se dnes nezřídka vyskytují u mladých lidí. Tato věková skupina je však mnohem aktivnější a klade na řešení svých problémů vyšší požadavky.

Moderní historie kloubních náhrad, zejména kyčelních kloubů, se začala psát koncem 40. let 20. století ve Spojených státech. Každý obor se vyvíjí a tak i zde došlo za uplynulých 70 let k významnému pokroku, ať už z hlediska materiálového nebo konstrukčního, tak i vyloženě medicínského, ovšem i zde je prostor pro další zlepšení a inovace.

Nejčastější důvody, vedoucí k výměně kloubu, jsou pokročilá artróza, zlomeniny proximální části stehenní kosti či další poúrazová onemocnění, nebo nádorová onemocnění. Operační řešení – tzv. artroplastika je poměrně složitý zákrok, u kterého může dojít k různým komplikacím, proto se toto řešení volí až jako nejzazší možnost. U artrózy se tak v první fázi volí farmakoterapie, která má dopomoct k obnovení opotřebené chrupavky. Jako poslední je operativní řešení, které je poměrně složité a pojí se z dlouhodobější rehabilitací, která může být obzvlášť pro lidi v pokročilém věku velmi náročná.

Nutnost výměny a reoperace bývá způsobena uvolněním kloubní náhrady či její případnou dislokací, infekcí a opotřebením. Průměrná životnost umělého kloubu (obvykle 15 – 20 let) dnes stále není dostačující. S ohledem na to, že dnes narůstá počet mladých lidí s poškozením kloubů a potřebou jejich výměny, je důležité ve výzkumu nových materálů, povrchových vrstev a technik pokračovat.

Cílem mé práce je nejprve seznámit čtenáře s problematikou vývoje nových povrchových vrstev na implantátu. V teoretické části se budu věnovat popisu kolagenu, který tvoří většinu popisované vrstvy, a osseointegraci, včetně možných povrchových úprav pro její zvýšení.

V experimentální části prezentuji zkoumanou kolagenovou nanovrstu a její morfologii na vzorovém válečkovém implantátu. Hlavním cílem je analyzovat povrch této vrstvy pomocí dat získaných z nasnímání vzorků a pokusit se formulovat závěry o její adhezi a důsledcích protlačování. Z hodnot sil získaných během protlačování se pokusím určit jejich možné závislosti na odlišných vlastnostech jednotlivých vzorků.

Cíle mé bakalářské práce bych shrnula do následujících bodů:

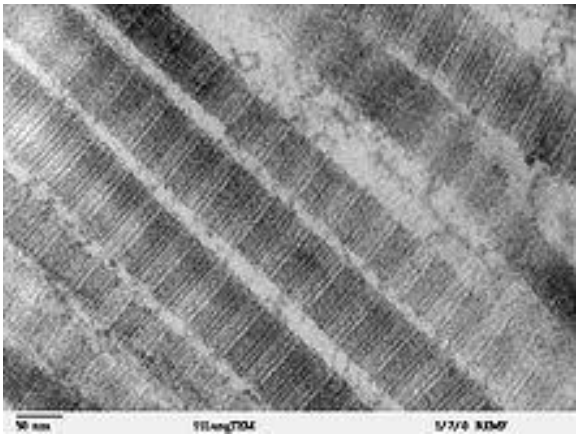
- objasnění motivace pro vývoj nové povrchové vrstvy
- porovnání morfologie povrchu před a po nanesení kolagenové vrstvy
- popis morfologie po protlačení
- zhodnocení důsledků protlačování.

2 Teoretická část

2.1 Kolagen

Kolagen je ve vodě nerozpustná bílkovina, která tvoří přibližně třetinu všech proteinů v těle savců. Molekula kolagenu se skládá především z glycinu, prolinu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Poslední dvě aminokyseliny vznikají během posttranslačního procesu za přítomnosti kyseliny askorbové [1].

Lidské tělo je složeno z 60 % vody a zbylých 40 % je tvořeno polysacharidy, lipidy, minerály a právě proteiny. Proteiny jsou makromolekulární látky, které se skládají z aminokyselin, což jsou z chemického hlediska substituční deriváty karboxylových kyselin. Aminokyseliny jsou spojeny do dlouhých řetězců pomocí peptidové vazby -CO-NH, kdy se aminoskupina $-NH_2$ váže na kyslík karboxylové skupiny -COOH. U bílkovin můžeme rozlišit čtyři struktury. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin, kterých se v lidském organismu vyskytuje 21 různých a mohou se mezi sebou kombinovat. Na jejich uspořádání je závislá biologická funkce a jejich vlastnosti. Sekundární struktura popisuje geometrické uspořádání bílkovin, může být buď ve formě skládaného listu, nebo jako pravotočivá šroubovice. Terciární struktura je ovlivněna konečným prostorovým uspořádáním předchozí struktury a může být buď fibrilární nebo globulární. Prostorové rozložení je ovlivněno vodíkovými vazbami, působením iontů nebo van der Waalsovými silami. Kvartérní strukturu nalezneme pouze u bílkovin, které se skládají ze dvou a více polypeptidových řetězců. Vzájemné extramolekulární vazebné interakce pak zajišťují spojení těchto polypeptidových řetězců [1].



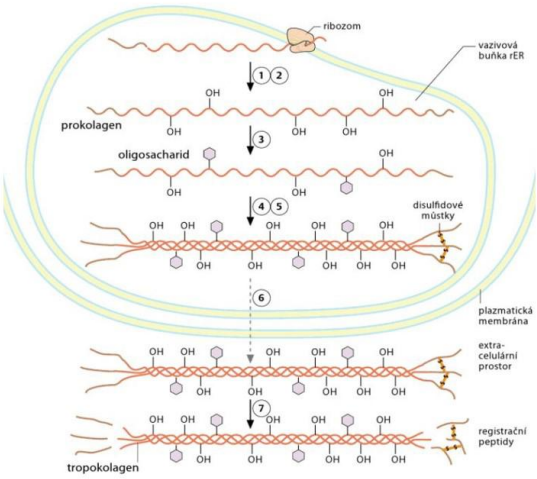
Obrázek 1 - Vlákna kolagenového typu I [2]

Kolagen patří mezi fibrilární bílkoviny, které se také nazývají skleroproteiny, stejně jako keratin, elastin či fibroin. Skleroproteiny v těle tvoří například vlasy, nehty nebo pokožku. Je popsáno 28 typů kolagenu, které se označují římskými číslicemi, ovšem jen některé z nich, konkrétně I, II, III, V a XI, jsou fibrilární. Izomery jsou sloučeniny se stejným sumárním vzorce, obsahují stejný počet stejných prvků, které se liší pouze strukturním uspořádáním atomů v molekule. Molekulární hmotnost kolagenu typu I je 140 – 210 kDa [3].

Kolagen tvoří přibližně třetinu všech bílkovin v těle, z toho skoro polovina se nachází v pokožce, 10 – 20 % v kostech a zubech a dalších 8 % v cévách. Největší podíl kolagenu najdeme ve šlachách, ale vyskytuje se také v chrupavkách, vazech, svalech či vnitřních orgánech. Dodává jím pevnost a formu a zaručuje flexibilitu a možný pohyb. Je hlavní složkou tkání, které přenáší napětí. Propůjčuje základnu pro mineralizaci v tkáních tvrdých, které podléhají nejčastěji kompresi [4].

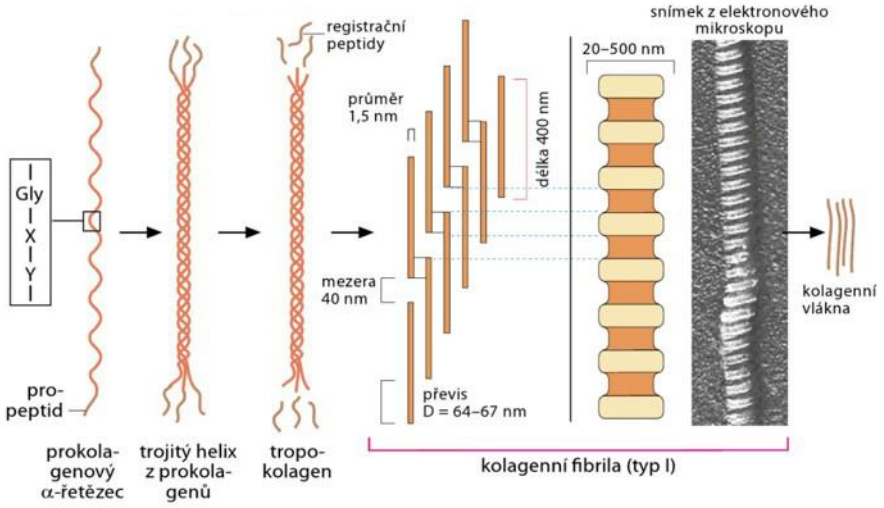
2.1.1 Struktura

Velikost a tvar kolagenových molekul byla zkoumána posledních 70 let nejrůznějšími metodami od těch experimentálních po vědecky podložené. Jako první bylo použito metody krystalografie a rentgenových paprsků, což je elektromagnetické záření o krátké vlnové délce zhruba 10^{-8} až 10^{-12} m, které vzniká v rentgenkách zabrzděním rychlých elektronů v těžkých kovech [5].



Obrázek 2 - Biosyntéza kolagenu typu I [6]

Kolagenová vlákna se skládají z drobnějších vláken o tloušťce 0,3 – 0,5 µm a ty mají ještě jako podjednotku mikrofibrily s rozměrem 20 – 100 nm, které jsou příčně pruhované s periodicitou 64 nm. Mikrofibrily jsou sestaveny ze souběžných řetězců lineárně spojených molekul tropokolagenu. Tímto posunutím jednotlivých tropokolagenů vůči sobě se vysvětluje příčné pruhování mikrofibril. Tropokolagen je tvarově protáhlá tyčka o rozměrech 250 x 1,5 nm, složená ze trojšroubovice – tří stočených polypeptidických řetězců [7].



Obrázek 3 - Struktura kolagenu typu I [6]

Kolagen vzniká polysyntézou jak extracelulárně, tak i uvnitř buněk. U fibroblastů, chondroblastů, osetoblastů a odontoblastů probíhá na ribozomech navázaných na membráně drsného endoplazmatického retikula. Nejdříve dochází k hydroxylaci a glykosylaci aminokyselinových zbytků lysinu a prolinu za vzniku hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Jejich syntézou získáme prokolagen, který přejde do Golgiho aparátu a následně do sekrečních vakuol, ze kterých je vyvržen do extracelulárních prostor. Enzym prokolagenpeptidáza odštěpí v extracelulárním prostoru z prokolagenu jeho koncové části a vznikne tak tropokolagen. Molekuly tropokolagenu pak za pomoci enzymu lysyloxidázy linerně polymerují a tvoří mikrofibrily [7].

Kolagen jakožto protein je tedy složen z aminokyselin, které obsahují aminoskupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu -COOH, spojených peptidovou vazbou do dlouhého řetězce.

Jedinou výjimku tvoří prolin, který má iminoskupinu -NH a s 22 % je druhou nejvíce zastoupenou složkou v kolagenu. Primární struktura, pořadí jednotlivých aminokyselin za sebou, se určuje od aminoskupin na začátku po karboxylové skupiny na konci, orientace je tedy od dusíku N k uhlíku C. Kolagen můžeme od ostatních odlišit díky četnosti jednotlivých aminokyselin a jejich pozici ve vzorci. Například glycin představuje 1/3 všech aminokyselin v řetězci, 10 % pak zaujímají prolin a stejně velkou část také hydroxyprolin, který se sám o sobě v bílkovinách nevyskytuje, ale vzniká hydroxylací, přidáním jedné nebo více hydroxy skupin, prolinu. Stejný proces pak probíhá u lysinu a hydroxylysinu [1].

Kolagen je produkován různými buňkami a díky tomu se i jednotlivé typy od sebe liší. Rozdělují se do tříd podle drobných odchylek v chemickém složení a také na základě jejich funkce v tkáni [1].

Třída 1 zahrnuje kolageny I, II, III, V a XI, které všechny mají formu vláken, jsou přibližně stejně dlouhé a mají delší nepřerušovanou kolagenovou oblast se třemi α řetězci ve formě trojité šroubovice. Například typ I je hlavní kolagenovou složkou kůže, šlach, kostí či menisků a jeho mutace způsobují onemocnění osetogenesis imperfecta, což je genetické onemocnění pojivové tkáně, které ve svých 4 formách, rozlišených podle místa mutace, způsobuje například zvýšenou lámavost a deformovanost kostí. Druhá třída je složena z typů IX, XII a XIV, které jsou vláknité s přerušovanou trojšroubovicí. Do třetí třídy řadíme pouze jeden kolagen a to VI, který tvoří korálková vlákna. Nachází se ve většině intersticiální tkáně, krevních cévách a svalech. Podílí se také na migraci buněk a pravděpodobně také ovlivňuje vývoj srdce. Kolageny tvořící pláty řadíme do třídy čtvrté a jsou to IV, VII a X. Třída pět je tvořena opět jen jedním typem VII a všechny ostatní druhy, například XVII nebo XIII, patří do skupiny šesté, u kterých často jejich přesná funkce zatím nebyla objasněna [1].

2.1.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu hrají důležitou roli při jeho zpracování, od izolace po přípravu různých forem aplikací – hydrogelů, vláken, pěn apod. Sledování jeho vlastností je důležité také z pohledu zachování jeho přirozené struktury a zamezení degradace.

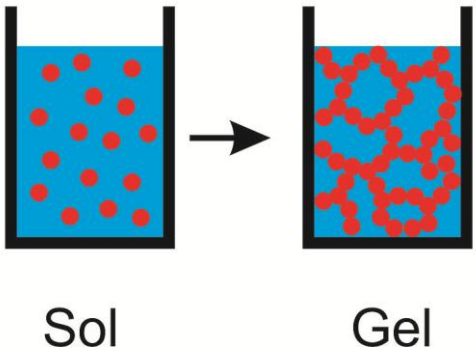
2.1.2.1 Botnání

Z fyzikálně chemického pohledu se kolagen řadí mezi gely a má také jednu z jejich základních vlastností – botná. Při ponoření kolagenového vlákna do vody v určitém rozsahu váže vodu a zvětšuje tak svůj objem, což je zároveň spojeno i se změnou pružnosti vlákna. Voda, která je obsažena v nabotnalém kolagenu, má dvojí charakter. Botnací vodu lze odstranit mechanicky, zatímco hydratační vody se lze zbavit pouze sušením. Můžeme rozlišit botnání osmotické a lyotropní. Při osmotickém proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem díky rozdílné koncentraci obou těchto složek. Po určitém čase dojde k ustanovení rovnováhy a průnik vody ustane. Při rozrušení těchto stabilizujících vazeb se sníží protitlak pevné složky proti průniku vody. Sloučeniny způsobující tento druh botání mohou štěpit vodíkové vazby a v extrémním případě i štěpit kolagen [8].

2.1.2.2 Fázové přeměny kolagenu a jeho roztoků (denaturace obecně)

Bílkoviny vlivem některých vnějších tepelných nebo chemických vlivů denaturují, ztrácí své přirozené vlastnosti a dojde k jejich přeměně na želatinu. Denaturace způsobí rozpad prostorové sekundární struktury bílkovin a vznikne neupořádané klubko. Tuto změnu může zapříčinit překročení určité teploty, změna pH nebo působení chemikálií. Při denaturační reakci vodného roztoku tropokolagenu vznikají dva štěpy, které se navzájem liší molekulovou hmotností, což je poměr mezi klidovou hmotností dané molekuly a atomové hmotnostní konstanty. Tyto štěpy lze označit jako složky α a β, přičemž řetězec β je možné dál rozdělit na další dva komponenty, díky kterým získáme tři části odpovídající trojité šroubovici molekuly kolagenu. K denaturaci tropokolagenu dochází ve dvou stupních. Nejprve dojde ke zborcení trojité šroubovice a celá makromolekula se smotá do klubka, ovšem jednotlivé řetězce zůstávají i nadále spojeny. V další fázi se pak klubko rozpadne na tři části: jeden polypeptidický řetězec části α, frakci β, která je prozatím tvořena dvěma spojenými řetězci, a frakci γ, kterou tvoří tři řetězce v původní formě klubka. Pokud zůstane denaturovaný roztok po delší dobu stát v prostředí s nízkou teplotou, může dojít k částečné renaturaci, tedy zpětné rekonstrukci molekuly kolagenu [8].

Charakteristickou vlastností želatiny je přechod mezi gelem a solem (koloidní suspenzí). Při určité teplotě želatina ve formě gelu taje a přechází na sol, což je změna inverzní, ale není vratná. Gel přechází na sol při teplotě zhruba 34°C a sol na gel při 29°C [8].



Obrázek 4 - Přeměna solu na gel [9]

2.1.2.3 Smrštění kolagenových vláken

Dalším důsledkem zahřívání kolagenu je zkrácení jeho vláken o 1/3 ve směru osy. K tomuto jevu dochází při teplotě smrštění T_s. Ke smrštění dojde v důsledku štěpení intermolekulárních vazeb, které udržují jednotlivé části kolagenu v jeho trojité struktuře v nataženém stavu. Teplota smrštění odpovídá teplotě tání kolagenu v krystalické oblasti. Její hodnotu mohou snížit další činidla – např. lyotropní, které způsobují kontrakci vláken. Pro určení stability trojšroubovice je důležitá hodnota teploty denaturace kolagenu T_d. Hodnoty obou výše uvedených přechodových teplot lze zvýšit zesíťováním kolagenu. Pro příklad kolagen vyčiněný glutaraldehydem má T_s přibližně 70°C, zatímco nativní kolagen jen kolem 37°C [8].

2.1.2.4 Hydratace kolagenu

Na bílkovinách najdeme dvě místa, která jsou schopna vázat vodu elektrostatickými silami: 1. dusík a kyslík v rámci peptidové vazby, 2. polární skupiny v bočních řetězcích. Pro zachování požadovaných fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého množství vody, v tomto případě to bývá 20 % hmotnosti molekuly. Při plné hydrataci se uvolní pohybová omezení polypeptidického řetězce, ke kterému dochází v suchém stavu.

Vzdálenost mezi sousedními řetězci v suchém stavu jsou 1 nm, zatímco v plně hydratovaném stavu je to až 1,6 nm [8].

2.1.2.5 Roztok kolagenu

Některé typy kolagenu lze rozpustit ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové. Rozpustnost je vlastnost látky, která umožňuje tvořit s rozpouštědlem homogenní směs – roztok. Při dostatečně nízké koncentraci se vyskytuje rozpustný kolagen ve zředěných roztocích organických kyselin ve formě protáhlých tenkých tyčinek o délce 280 nm. Dále byla popsána třída rozpustných kolagenů získaných ze studených, slabě alkalických roztoků soli nebo neutrálních roztoků soli s hypertonickou nebo fyziologickou silou. Pro použití kolagenu jako biomateriálu je podle posledních výzkumů vhodnější alkalická úprava než kyselá, jelikož podporuje jeho termální stabilitu [8].

2.1.3 Mechanické vlastnosti kolagenu

Mechanické vlastnosti materiálů jsou závislé především na jejich primární struktuře a prostorovém uspořádání. Z mechanického hlediska nás zajímá reakce dané látky při namáhání různými způsoby: tahem, tlakem, krutem, střihem či ohybem, přičemž tyto složky většinou působí v určité kombinaci, ne samostatně. Aby materiál těmto námahám odolal, musí mít vhodné mechanické vlastnosti, jako jsou pevnost, pružnost nebo tvrdost. Mechanické zkoušky materiálů můžeme obecně rozdělit na statické, dynamické a cyklické. Při statickém zatěžování je síla zvyšována pozvolna a působí delší dobu, od několika minut po hodiny, nebo i dny. Staticky se zkouší pevnost v tahu materiálu při tahové zkoušce, nebo pevnost tlaku při tlakové zkoušce. Dále mezi statické zkoušky patří zkoušky krutem a střihem. Naopak u dynamických zkoušek působí velká síla nárazově během milisekund a u cyklických zkoušek, kterými se testuje především únava materiálu, se proměnné zatížení opakuje v cyklech. Mezi dynamické zkoušky patří zkouška rázem v ohybu pro určení houževnatosti nebo únavové zkoušky. Dále je možné zkoušet tvrdost, kde se nejčastěji provádí zkoušky vnikací a to buď dle Brinella, Rockwella nebo Vickerse.

Fibrilární struktura ovlivňuje vlastnosti kolagenu. Rozdělení jednoho celku do vláken mu přináší vyšší odolnost vůči šíření vzniklých trhlin, které se v jednolitém materiálu šíří mnohem rychleji. Zároveň se díky tomu zvyšuje i jeho ohebnost, která narůstá s počtem

vláken a je nepřímo úměrná čtvrté odmocnině poloměru vlákna. Právě tato skladba zaručuje kolagenním fibrilám velmi vysokou pevnost při namáhání tahem. Pevnost vláknům dodává i hydroxyprolin, díky své schopnosti vytvářet příčné vazby mezi molekulami [10].

K měření mechanických vlastností na molekulární úrovni se využívají creep testy se simulací na počítači, kdy jeden peptidový konec je trvale upevněn a druhý je tažen konstantní silou. Zaznamenává se především časový průběh deformace peptidu, vyvolaný působením této síly. Reakce molekuly kolagenu je modelována pomocí Kelvinova modelu, díky kterému lze vypočítat Youngův modul pružnosti (E) a viskozitu (η). Dále je možné určit okamžité napětí σ_0 jako podíl působící síly F a kolagenového průřezu, u kterého se předpokládá kruhový průřez o průměru 1,1 nm, což platí pro suchou kolagenní tkáň [10].

Modul pružnosti v tahu, také Youngův modul pružnosti, je definován jako poměr napětí a jím vyvolané deformace, čemuž odpovídá následující vztah.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \tag{1}$$

- E - modul pružnosti v tahu [Pa], většinou v GPa
- σ - napětí v tahu [Pa]
- ε - poměrná deformace, $\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$, kde Δl je prodloužení tělesa $\Delta l = l - l_0$, l je délka a l_0 je délka původní

Hodnota modulu pružnosti je vyšší u materiálů, které potřebují pro dosažení stejně velké deformace vyšší působící napětí a zároveň tedy dosahují nižších deformací, než materiály s menším Youngovým modulem při stejném napětí.

Youngův modul kolagenu v nativní formě dosahuje podle některé literatury hodnot v rozmezí zhruba od 3 po 9 GPa [1].

Tabulka 1- Hodnoty modulu pružnosti kolagenu [1]

Původ kolagenu	Stav	Metoda	Youngův modul pružnosti (GPa)
Hovězí achillova šlacha	Pevný, v 0,15M roztoku NaCl	Rentgenová difrakce	2,9 ± 0,1
Krysí ocasí šlacha v roztoku NaCl	Pevný, v 0,15M roztoku NaCl	Brillouinův rozptyl světla	9,0
Krysí ocasí šlacha v roztoku NaCl	Pevný, v 0,15M roztoku NaCl	Brillouinův rozptyl světla	5,1
Krysí kůže	Roztok acetát/NaCl/glycerol	Dynamické měření délky	4,1
Telecí kůže	0,05M roztok kys.octové a glycerolu	Statické měření délky	5,1-3,0

Viskozita charakterizuje vnitřní tření a je ovlivněna zejména přitažlivými silami mezi částicemi. Vnitřní tření je popsáno následující rovnicí, kde η je dynamická viskozita, τ je tečné napětí a $\frac{dv}{dy}$ je gradient rychlosti ve směru kolmém na rychlost.

$$\tau = \eta \frac{dv}{dy} \tag{2}$$

Pokud v kapalině působí velké přitažlivé síly, má vysokou hodnotu viskozity a také dochází k většímu brzdění jejího pohybu, nebo těles v této kapalině. Pro kolagen platí hodnota 3,84 ± 0,38 Pas [8].

2.1.4 Aplikace

Kolagen má velice rozmanité možnosti využití. V potravinářství se hojně uplatňuje jeho denaturovaná forma – želatina, vyskytuje se v bonbonech, tlačence či v potravinových doplňcích. Používá se také na jedlé obaly potravin, například uzenin. Lze z něj vyrobit lepidlo klih a široké využití má v kosmetice, kde pomáhá hydratovat pokožku a předcházet projevům stárnutí. Kolagen se také používá jako nosič pro pěstování tkáňových kultur.

Biomedicínské použití kolagenu vychází z blízkých fyziologických vlastností a chování u aplikovaného kolagenu oproti původnímu lidskému, konkrétně v jeho resorbovatelnosti, kterou lze ještě zvýšit síťováním, a vysoké absorpční schopnosti, která je způsobena velkým vnitřním povrchem a výhodně postavenými reakčními skupinami. Vhodné je zejména použití rozpustných kolagenů, které lze vyrobit velice čisté, oddělením nežádoucích látek denaturací. Další výhodou pro jeho použití je jeho nízká antigenita, u savců bývá velice dobře přijímán a nevyvolává tvorbu protilátek [8].

Pokud necháme působit specifické enzymy, dojde k odstranění telopeptidů z konců řetězců a antigenita se potlačí ještě více. Kolagen může také fungovat jako nosič, který na sebe váže určité látky - např. léčiva, která lokálně vnikají do rány a postupně se během období hojení uvolňují. Toto je jeden z hlavních důvodů, proč je o tento materiál v současnosti velký zájem. Nevýhodou těchto kolagenových systémů je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Kolagen je v lékařství používán buď jako přírodní vlákenné pletivo (kožní štípenky), jako netkané textilie nebo fixované pěny. Posledních dvou možností se dosáhne buď mechanickým rozmělněním vlákenného pletiva nebo přes rekonstituci z roztoku. Kolagenové scaffoldy se používají při konstrukci umělých chlopní [11].

Kolagenové membrány se používají především na krytí ran, hlavně popálenin, nebo i k dočasnému překrytí rány. Často obsahují další přísady, které urychlují hojení a zkracují tak léčebný proces. Netkané textilie z kolagenu se používají pro zastavení krvácení. Pro zvýšení biokompatibility implantátu s živou tkání se většinou používá kombinace polymerní cévní či orgánové náhrady a rozpustného kolagenu, která zároveň podněcuje růst buněk a přispívá kvalitnějšímu hojení postiženého místa. Konkrétně u cévních náhrad

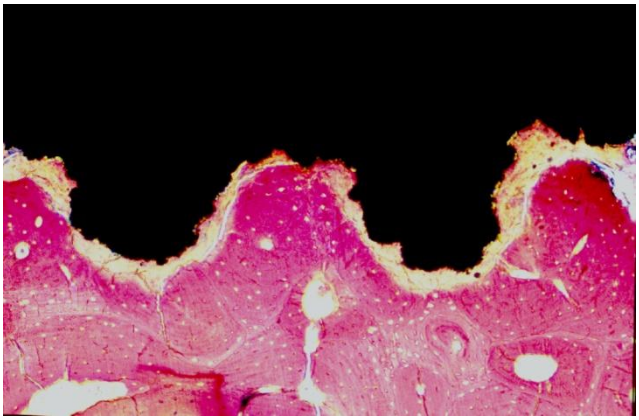
se využívají například porézní teflonové hadičky, které jsou ve svých pórech napuštěny směsí kolagenu a chitosanu [11].

Kombinace kolagenových vláken s hydroxyapatitem nebo fosforečnanem vápenatým se hojně využívá k náhradě zubů a kostí, kde má lepší výsledky při zacelení rány než při použití samotného hydroxyapatitu a podporuje rychlejší prorůstání implantátu kostí. Setkáme se také s kolagenovými lepidly [8].

2.2 Povrchové úpravy implantátu pro zvýšení osseointegrace

U materiálů, používaných na výrobu implantátů, je kromě jejich mechanických a fyzikálně – chemických vlastností důležitá jejich biokompatibilita, tedy odezva buněk v kontaktu s implantovaným materiálem a zda jsou poté i nadále schopny plnohodnotně plnit své fyziologické funkce. Pro vhodné přijetí kostních implantátů je zásadní jejich osseointegrace.

Pojem osseointegrace byl poprvé zaveden ve 40. letech minulého století díky práci profesora Per Ingvar Branemarkova, který ve Švédsku zkoumal průtok krve u králíků pomocí implantované titanové krabičky. Když svůj experiment dokončil a chtěl implantát vyndat, tak zjistil, že to již není možné, jelikož se kost s implantátem perfektně spojila. Branemark v tomto viděl velký možný přínos pro lidskou implantologii, vzniká zde totiž přímé rozhraní mezi kovem a kostí bez jakýchkoliv zásahů měkkých tkání. Na styčné ploše se tak nevyskytuje žádná zjizvená tkáň, ani vlákna chrupavčitá či vazivová. Osseointegraci můžeme pozorovat na následujícím obrázku, kde je vidět spojení kostní tkáně s implantovaným kovem na histologickém snímku [12].



Obrázek 5 - Histologický snímek titanového implantátu (černě) integrovaného do kosti (růžově) [13]

Hojení kosti kolem implantátu zahrnuje buněčné akce, které se odehrávají na styčné ploše až do doby, kdy je implantát zcela pokryt nově vytvořenou kostní tkání. Průběh osseointegrace je regulován diferenciací buněk, která je stimulována růstovými faktory. Ty jsou vylučovány na rozhraní kosti a implantátu. V poslední době se rozvíjí snaha o modifikaci implantačního povrchu právě růstovými faktory, které by měly podporovat osseointegraci a zlepšit buněčné funkce. Důležité jsou také faktory podporující neovaskularizaci, tedy tvorbu nových krevních cév. Největší potenciál zde ukazuje vaskulární endotelový růstový faktor, který se zároveň ukazuje být důležitým pro funkci osteoblastů při hojení kostí. Dále pak podporuje endotelové buňky v okolních tkáních v migraci, proliferaci a tvorbě tubulárních útvarů a je zcela nezbytný pro jejich přežití [14].

Z materiálového hlediska se využívá především čistý titan nebo slitina titanu, hliníku a vanadu, či keramické materiály ve spojení s oxidem zirkoničitým. U úprav se na základě zkoušení a výzkumu nejvíce osvědčily technologie zdrsňování povrchu, které mají velmi dobré výsledky z pohledu požadovaného spojení kosti s kovem. Nejběžnější metody pro dosažení zdrsnělého povrchu jsou tryskání, alkalické nebo kyselé leptání, elektrochemická anodizace či fyzikální plazmatické úpravy [14].

Úpravy povrchu pro podporu osseointegrace lze rozdělit na dvě skupiny: depozice povlaku a povrchové úpravy, podle toho zda se přidává nová vrstva na původní materiál, nebo se samotný povrch materiálu upravuje pomocí chemických, nebo fyzikálních metod. U depozice se na povrch materiálu nanese tenká vrstva s jinými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Díky tomuto způsobu je možno dosáhnout rozmanitého množství vlastností. Nevýhodou může být částečné nebo i kompletní oddělení této vrstvy ať už poškozením, nebo opotřebením [14].

Modifikace povrchu umožňuje zlepšení vlastností jako je drsnost, morfologie nebo smáčivost, ale možnosti jsou v tomto případě limitovány charakterem původního materiálu [14].

Jedny z nejčastějších důvodů selhání implantátu jsou jeho aseptické uvolnění a infekce. Nedostatečná osseointegrace je pak jedním z důvodů vedoucích právě k uvolnění. Dále se pomocí povrchových úprav a vrstev dá snížit riziko adheze přísedících bakterií k povrchu implantátu a následné tvorbě infekce. Právě styčná plocha mezi

implantátem a kostí tvoří ideální prostředí pro přichycení bakterií, jejich proliferaci a tvorbu tenkého biofilmu, ve kterém produkují ochranné sekrety na bázi polymerů. Tyto látky pak značně stěžují léčbu infekce. Ačkoliv může infekci způsobit široká škála bakterií, až 70 % všech těchto poškození v ortopedických implantátech způsobuje nejčastěji *Stafylokok epidermidis* nebo *Stafylokok aureus* [14].

2.2.1 Fyzikálně – chemické úpravy povrchu

V následující kapitole jsou popsány nejběžnější fyzikální a chemické povrchové úpravy implantátů.

2.2.1.1 Tryskání

Tryskání je díky své jednoduchosti a cenové dostupnosti jedna z nejběžnějších metod modifikací povrchu. Mikročástice o průměru 10-540 µm jsou urychlovány a směřovány na cílový povrch pomocí stlačeného vzduchu. Jako částice se používají korund (Al_2O_3), karbid křemíku (SiC), oxid titaničitý (TiO_2), hydroxyapatit nebo zirkon (ZiO_2). Cílem tryskání je zvýšení drsnosti. Její výsledná hodnota závisí na materiálu zvoleném pro tryskání a také na způsobu jakým je usměrňován na součást, především pod jakým úhlem a jaká je jeho energie při dopadu [15].

2.2.1.2 Naleptání

Při naleptání povrchu chemikáliemi (HCl, HF, H_2SO_4) se působením kyselin v titanu vytvářejí drobné jamky v řádu mikrometrů. Leptání se většinou využívá po tryskání a dohromady tvoří referenci pro porovnání s dalšími možnými postupy. Nejrozšířenější je otryskání pomocí částic Al_2O_3 o rozměru 200 – 540 µm následované naleptáním směsí HCl a H_2SO_4. Dosahuje se tak požadované drsnosti makrostruktur tryskáním a mikrostrukur naleptáním [15].

2.2.1.3 Anodizace

Další hojně studovanou metodou je anodizace, která spočívá v galvanostatické elektrochemické oxidaci probíhající v silné kyselině (H_2SO_4, H_3PO_4, HF), která zajišťuje vznik porézní vrstvy oxidu titaničitého TiO_2 [15].

2.2.1.4 Laser

Laserové paprsky mohou také vézt ke zlepšení vlastností. Absorpce vysokohustotní radiace způsobí vznik tepla, které má za následek lokální tání tenké povrchové vrstvičky kovu. Tato vrstva po přesměrování paprsků na jiné místo velmi rychle rekrystalizuje. Působením okolního vzduchu poté dojde k oxidaci a vzniku plošky TiO_2. Nejpoužívanější typ laseru pro zkoumání změn povrchu v souvislosti s osseointegrací je laser Nd:YAG. Typické parametry jsou rychlost 100 – 300 ms^{-1}, délka pulzu 10 – 20 ns a energie pulzu 0,2 – 0,5 mJ. Morfologie laserem ošetřeného titanu vykazuje zvýšenou drsnost s hodnotami 0,5 – 2 µm [15].

2.2.1.5 Plazma

Aplikace studené plazmy na titanový implantát se začala více zkoumat až v posledních letech. Postupy s plazmou je možno rozdělit podle tlaku, během kterého aplikace probíhá. Za sníženého tlaku, nižšího než je atmosferický, je menší potřebná síla pro vyslání plazmy, což umožňuje použití levnějších a jednodušších generátorů. Zároveň je při nižším tlaku i lepší kontrola rozptylu plazmy. Postup s atmosferickým tlakem je ovšem mnohem jednodušší v tom, že nevyžaduje použití drahých tlakových systémů. Plazma se často používá pro čistění a sterilizaci po ostatních povrchových úpravách, ale zároveň byla zkoumána i pro zvýšení osseointegrace a dodání antibakteriálních vlastností implantátu. Pro tyto aplikace se nejčastěji používají argon a kyslík [15].

2.2.2 Anorganické povlaky

Z anorganických povlaků, které byly testovány pro zvýšení biokompatibility a snížení bakteriální adheze na Ti povrchu, jsou nejvýznamnější sloučeniny na bázi hydroxyapatitu, případně jeho cementů [14].

Vrstva hydroxyapatitu se na implantát může nanášet magnetronovým naprašováním, pomocí iontového svazku, plazma sprejováním nebo pulzním laserem. Magnetron a iontové svazky jsou vhodné zejména pro získání hladkého kompaktního povrchu, nicméně nanášení tohoto filmu je velice zdlouhavé a jeho tloušťka je limitována na několik mikrometrů. Plazma sprejování a pulzní laser zaručují vrstvě drsnost.

Sprejované povrchy vykazují menší hustotu a vysokou poréznost, zatímco vrstvy dosažené pulzním laserem mají vyšší hustotu [14].

Cementy vznikají reakcí vápníku a fosforu v práškovém stavu ve vodním prostředí. Když se dostanou do styku s tělesnými tekutinami, vytvoří nanokrystalky hydroxyapatitu. Nejosvědčenější metodou nanášení této vrstvy je sprejování plazmou [14].

Mezi dalšími testovanými sloučeninami jsou TiO_2, včetně jeho sloučenin s dalšími prvky, nebo různé nitridy [14].

Z kovů má antimikrobiální schopnosti stříbro, které se dlouhodobě využívá k boji s infekcemi napříč medicínskými odvětvími. V rámci ortopedických materiálů se snažíme vyhnout zásahům do struktury povrchu implantátu a nanášení tlustých vrstev. Používá se tak implantace stříbra pomocí plazmových iontů. Tyto povrchy pak vykazují slibné výsledky v boji s bakteriemi, které shromažďují a přeměňují na čerstvé kultury. Ovšem i zde existuje maximální vhodné množství použitého stříbra, při jehož překročení může dojít k ohrožení růstu kostí. Stříbro se dá také kombinovat s dalšími prvky, jako jsou hořčík, zinek nebo vápník [14].

2.2.3 Organické povlaky

Pro zvýšení osseointegrace jsou zkoumány i organické povlaky. Nejrozvinutější jsou plazmaticky nanášené polymery, které jsou velmi vhodné pro vytvoření definované tenké přechodové vrstvy pro imobilizaci biologicky aktivních molekul. Díky plazmě dochází k přeměně monomerů na polymery za účasti energetických částic (elektrony, ionty). Velmi často má takto vzniklý polymer jiné chemické složení i chemické a fyzikální vlastnosti než polymer vzniklý klasickou polymerizací v kapalné fázi, i když jsou použity stejné monomery [15].

Povrch lze upravovat také pomocí navázání růstových faktorů a peptidů. Bioaktivní molekuly mohou být umístěny na povrch s cílem podpořit povrchové reakce mezi kostí a implantátem. Mezi takové úpravy patří například imobilizace kostních růstových faktorů pro zvýšení ostoegeneze a depozice peptidových řetězců pro spuštění určitých buněčných funkcí. Právě využití růstových faktorů v ortopedických implantátech podporuje aktivitu osteoblastů a zlepšuje integraci [15].

Studovány jsou také proteinové sekvence se schopností ovlivnit specifické osteogenní buněčné funkce jako mineralizaci a diferenciaci [15].

Zajímavé může být i použití chitosanu, což je lineární polysacharid vyrobený deacetylací chitinu, který se v přírodě vyskytuje v exoskeletu hmyzu. U tohoto polymeru se zkoumá jak jeho možné využití v tkáňovém inženýrství, tak jeho antibakteriální vlastnosti. Pro zvýšení jeho antibakteriálních funkcí je možné skombinovat jej s různými antibiotiky, například vankomycinem [14].

2.2.3.1 Organicko-anorganické kompozitní vrstvy

V posledních několika desetiletích se objevují snahy vytváření biomimetických povrchů, které by napodobovaly strukturu a složení kostní tkáně. Tyto vrstvy kombinují kalcium fosfát s biologickými složkami, jako jsou peptidy, růstové faktory nebo různé protilátky pro podporu interakcí na rozhraní kosti a implantátu. Komplikovaný je ovšem způsob, kterým by tyto látky bylo možné skombinovat. Pro přípravu fosfátových vrstev bývají používány způsoby, které vyžadují vysoké teploty a nefyziologické prostředí, proto by připadala v úvahu jen fyzikální absorpce biologických částic. Ta je však často spojena s vysokou úvodní uvolňovací rychlostí, která je nežádoucí a může vézt ke komplikacím a vedlejším účinkům. Proto jsou preferovány metody s možností pozvolného uvolnění. Výhodná může být například vrstva kalcium fosfátu s pozvolna uvolňujícími se antibiotiky, která podporuje shlukování kostních buněk [14].

2.2.4 Vrstvy obsahující antibiotika

Vznik infekce po implantaci není omezen pouze na dobu bezprostředně po operaci, ale může nastat kdykoliv. Zatímco agresivní bakterie jako *zlatý stafylokok* se většinou projeví krátce po implantaci, ty méně virulentní mohou vést k pozdějším chronickým infekcím, které jsou často obtížně léčitelné, jelikož v době jejich objevení již kolem sebe mají ochranný biofilm. Je tedy žádoucí vyvinout technologii, která bude s bakteriemi bojovat i v dlouhodobém měřítku [1].

Novým přístupem k tomuto problému je lokalizovaná aplikace antibiotik pomocí nosičů uchycených na implantátu, ze kterých se poté postupně uvolňují. Hickock a Shapiro například zmínili metodu, při které je vankomycin implantován na povrchu spolu

s titanovým implantátem, nebo jeho sloučeninami. Tento povlak pak byl schopný průkazně bojovat s různými bakteriemi po zkoumanou dobu jednoho roku. Vancomycin společně s titanem také potlačoval ostelýzu, úbytek kostní tkáně, při implantaci stehenních kostí u krys, což také poukazuje na výhodné využití antibiotik lokalizovaných přímo v implantátu [14].

3 Metodika experimentu

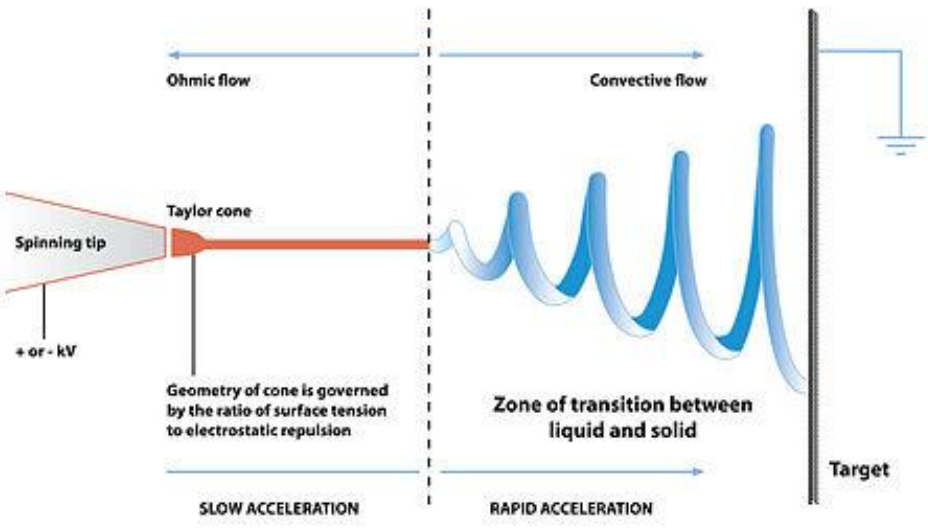
V experimentální části své bakalářské práce se zabývám analýzou adhezních zkoušek vrstvy připravené z kolagenu typu I a hydroxyapatitu, která je modifikována antibiotikem (vankomycin), na kovových ortopedických a dentálních implantátech. Tato vrstva je připravována kombinací elektrospinningu a elektroblowingu roztoku kolagenu s nanočásticemi hydroxyapatitu a následnou impregnací antibiotiky ve formě disperze.

3.1 Popis vrstvy a její příprava

Motivací pro vývoj této vrstvy bylo snížení rizika komplikací, uvedených v teoretické části práce, zejména pak snížení rizika reoperace implantátů vlivem vzniku zánětu, a tím prodloužení jejich životnosti.

Nanokompozitní vrstva je složená z kolagenových nanovláken se střední hodnotou průměru 100 – 350 nm, přičemž tato vlákna obsahují 75 až 100 hm. % kolagenu typu I (telecí kůže, VUP Medical, Brno, ČR). Dále tato vrstva obsahuje 5 až 15 hm. % hydroxapatitu (Sigma-Aldrich, Německo) ve formě nanočástic o velikosti 50 – 250 nm. Poslední složkou vrstvy je vankomycin (Vancomycin Hydrochloride, Mylan, S.A.S., Francie), který tvoří 10 % hmotnosti hotové vrstvy a je do ní aplikován impregnací z etanolové (Penta, ČR) disperze.

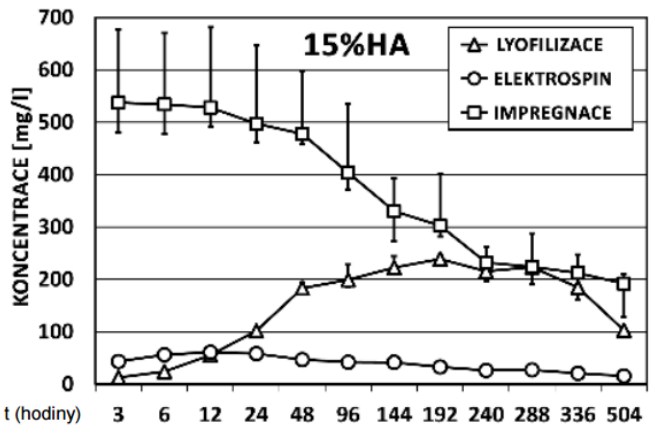
Příprava této vrstvy začíná smísením požadovaného množství kolagenu a polyethylenoxidu (pomocný polymer, Sigma-Aldrich, Německo) s fosfátovým pufrem. Tato směs je následně vystavena teplotě 32 až 42°C po dobu 60 – 72 hodin. Dále se přistoupí k homogenizaci za vysokých otáček 7000 – 15000 ot.min^{-1}. Během tohoto kroku se přidává hydroxyapatit a ethanol. Takto vytvořený roztok se dále elektrostaticky zvlákňuje v elektrickém poli 200 – 300 kV.m^{-1} za relativní vlhkosti vzduchu menší než 30 % a teplotě nepřesahující 37°C. Zvlákňování může být ještě doplněno o electroblowing, proud vzduchu předehřátý na 20 – 25°C, který je přiváděn do oblasti kolem ústí trysek a má kladný vliv na tvorbu vláken z tohoto roztoku.



Obrázek 6 - Schéma elektrospinningu [16]

Pro zvýšení stability se roztok dále máčí v roztoku 95 hm.% alkoholu s vodou a N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodimidhydrochloridem (Sigma-Aldrich, Německo) a N-hydroxysukcinimidem (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 18 – 30 hodin při teplotě 32 – 42°C, kdy dojde k zesíťování. Následně je potřeba vzniklou vrstvu promýt ve fyziologickém roztoku, případně fosfátovém pufru, po dobu alespoň 2 x 30 minut a poté minimálně půl hodiny v destilované vodě, což vede k úplnému vymytí polyethylenoxidu. Pro vysušení vrstvy se používá vakuové vymrazování. Takto vytvořená vrstva může být dále sterilizována pomocí ethylenoxidu nebo gama záření [17].

Pro aplikaci antibiotik se volí impregnace v disperzi ethanolu o koncentraci antibiotik 10 %. Tento postup byl testován spolu s dalšími dvěma variantami. První byla lyofilizace, zamražení následované dvojitým sušením, kolagenu, hydroxyapatitu a vankomycinu. Druhou možností bylo elektrostatické zvlákňování disperze kolagenu, hydroxyapatitu a vankomycinu. Z těchto tří variant vyšla nejlépe právě impregnace, což je patrné na následujícím grafu.

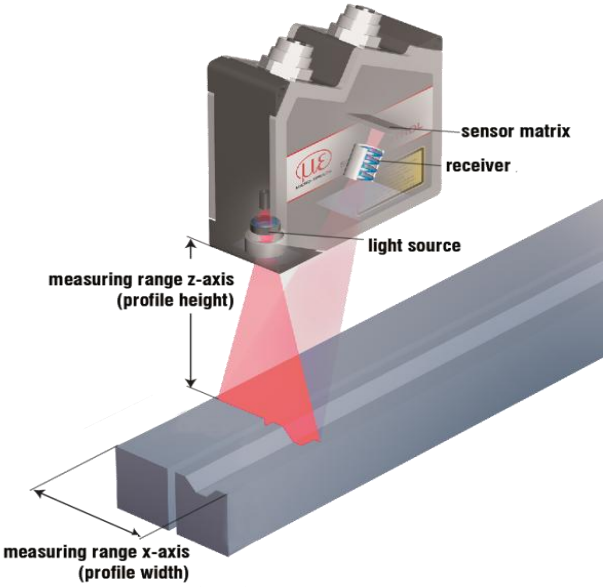


Obrázek 7 - Vliv zvolené metody aplikace antibiotik na kinetiku jejich uvolňování. Minimální inhibiční koncentrace pro vankomycinu rezistentní kmen *Stafylokoka zlatého* je 16mg/l [17].

3.2 Průběh experimentu

Pro analýzu adhezních vlastností kolagenové nanovrstvy byly využity modelové válečky. Válečky byly vyrobeny z materiálu Ti6Al4V. Jejich průměr byl 5 mm a výška 8 mm. Ve válečku byla vyvrtána díra o hloubce 6mm se závitem M3 (ISO 261).

Vzorky byly naskenovány pomocí laserového řádkového skeneru ScanControl LLT 2800-25, jehož senzor pracuje na principu křížení světla. Použitý laserový paprsek měl vlnovou délku 655 nm. Použito bylo rozlišení 1024 bodů s rozlišením 10 µm.

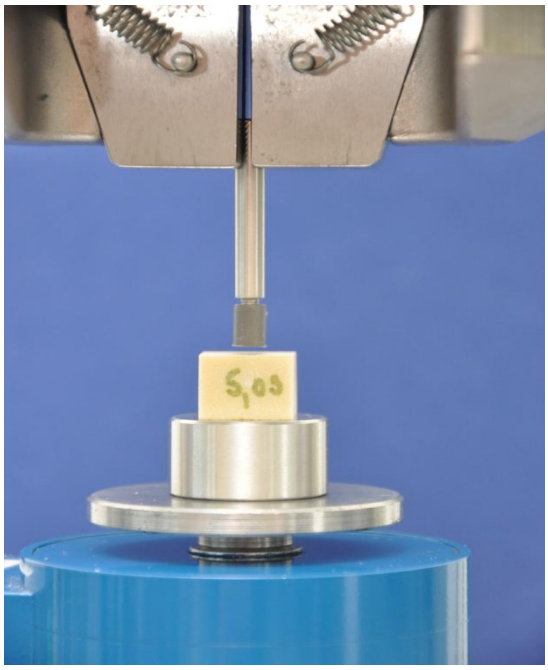


Obrázek 8 - Princip snímání skeneru ScanControl [20]

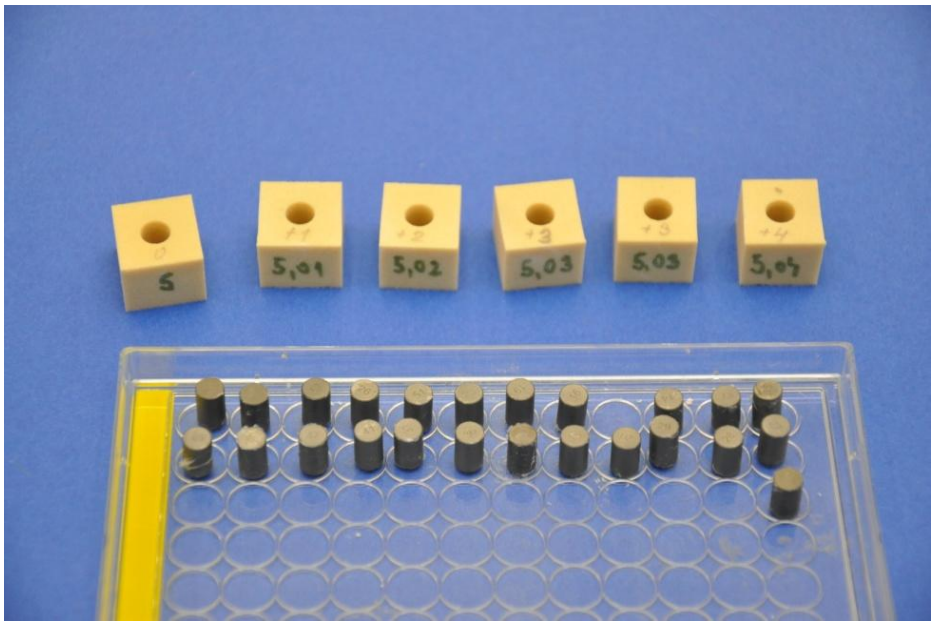
Nejprve byly naskenovány holé vzorky bez vrstvy. Následovalo pokrytí vzorků kolagenovou vrstvou pomocí metody elektrostatického zvlákňování při napětí 28 kV ze vzdálenosti 10 cm s dávkováním 0,5 ml/hod. Zároveň byla také provedena povrchová úprava vzorků. 5 vzorků bylo bez úpravy, 5 bylo odmaštěno acetonem, 5 bylo odmaštěno acetonem a smočeno v 1% naředěném kolagenovém roztoku, 5 bylo odmaštěno acetonem a smočeno v PBS a posledních 5 bylo odmaštěno acetonem, smočeno v mořící lázni (HNO_3 + HF + NaF + Na_3PO_4) a poté smočeno v 1% kolagenovém roztoku.

Pro protlačení byly vzorky našroubovány na válcový trn a následně protlačeny skrz válcové díry o průměru 5 mm v blocích z tvrzené polyuretanové pěny, která simuluje lidskou kost. Použit byl zatěžovací stroj MTS MiniBionix 858.2 se silovým snímačem s nominální hodnotou 100 N. Všechny vzorky byly před pokrytím i po pokrytí přeměřeny mikrometrem a roztříděny do 4 skupiny pro protlačení děrami o průměru 5,00, 5,01, 5,02 a 5,03 mm. Tyto přesné rozměry děr byly vystruženy na primární odvrtané díře a následně ověřeny pomocí etalonů. Po protlačení byly vzorky opět naskenovány.

Obrázek 9 - Záběr z průběhu experimentu



Obrázek 10 - Detail protlačovacího trnu, válečku a polyueratanové pěny



Obrázek 11 - Polyuretanové kostky s děrami a vzorky připravené na protlačování

3.3 Statistické vyhodnocení experimentu

Při statistickém vyhodnocení experimentálně získaných dat jsem se ve své bakalářské práci omezila pouze na výpočet výběrových charakteristik polohy a rozptýlení, se kterými jsem se doposud během studia setkala. Ze získaných hodnot jsem určovala střední hodnotu poloměru jako aritmetický průměr $\bar{x}$,

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{x=1}^{n} x_i \qquad (3)$$

kde x_i jsou jednotlivé naměřené hodnoty, n je počet měření.

Rozptyl střední hodnoty jsem poté stanovila jako směrodatnou odchylku s.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2} \qquad (4)$$

Při výpočtu závislosti protlačovací síly na průměru modelového vzorku jsem hodnoty linearizovala a určila jednoduchou lineární regresi. Tento postup spočívá v aproximaci získaných hodnot metodou nejmenších čtverců a výslednou přímku lze popsat následujícími vztahy,

$$y = b_1 + b_2 * x \qquad (5)$$

kde pro odhadnuté parametry b_1 a b_2 platí

$$b_2 = \frac{n\sum_{i=1}^{n}(x_i y_i) - \sum_{i=1}^{n} x_i \sum_{i=1}^{n} y_i}{n\left(\sum_{i=1}^{n} x_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^{n} x_i\right)^2} \tag{6}$$

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i - b_2 \sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \tag{7}$$

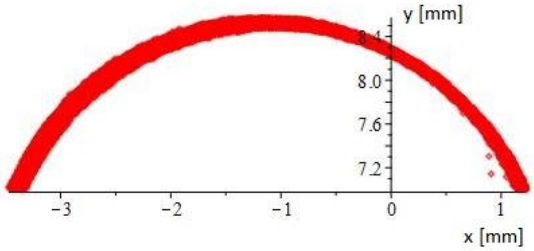
Zde jsem také určovala korelační koeficient, který obecně může nabývat hodnot od -1 po +1, kde -1 vyjadřuje nepřímou závislost a +1 závislost přímou. Korelační koeficient 0 značí neexistující lineární závislost mezi dvěma veličinami. Počítala jsem jej pomocí Pearsonova vztahu.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 * \sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}} \tag{8}$$

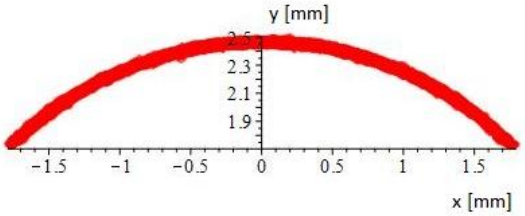
4 Výsledky experimentu

4.1 Srovnání morfologie povrchu před a po nanesení vrstvy

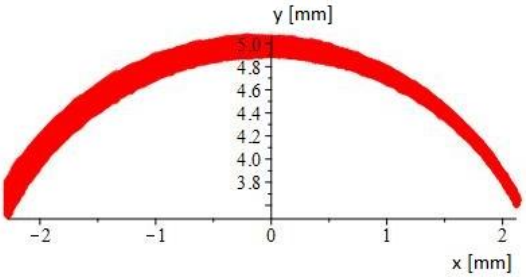
Vzorky jsem vyhodnocovala pomocí softwaru Maplesoft. Naskenované hodnoty bylo nejdříve potřeba oříznout o 7,5 % na začátku i konci, kde byly velké odchylky ve snímání, které by způsobovaly nepřesnosti ve vyhodnocování. Na snímcích je vidět, že díky principu fungování skeneru nebyl naskenován celý povrch válečku, ale pouze kruhová úseč. Nasnímanou část vzorku bylo třeba vystředit a posunout do počátku souřadného systému pomocí metody nejmenších čtverců. Zde detailně prezentované výsledky jsou pro vzorek 23.



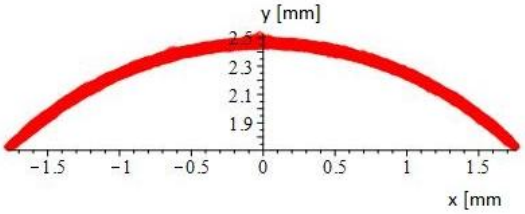
Obrázek 12 - Nevystředěná úseč před pokrytím (vzorek 23)



Obrázek 13 - Vystředěná úseč před pokrytím (vzorek 23)

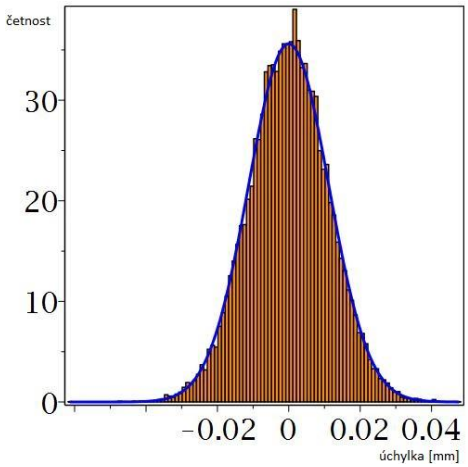


Obrázek 14 - Nevystředěná úseč po pokrytí (vzorek 23)

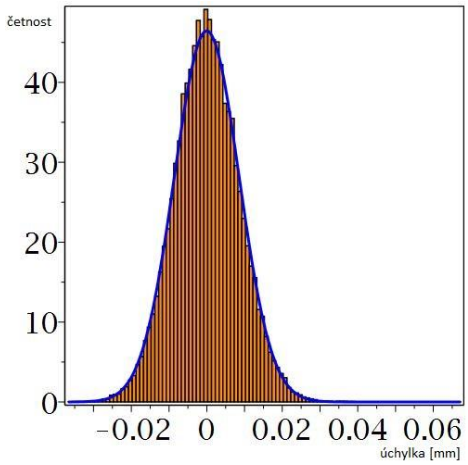


Obrázek 15 - Vystředěná úseč po pokrytí (vzorek 23)

Na histogramu směrodatných odchylek je patrné, že úchylky od ideální hodnoty poloměru, která byla získána aproximací pomocí metody nejmenších čtverců, se nejčastěji pohybovaly od -0,02 mm po 0,02 mm, a to jak před pokrytím vzorku kolagenovou vrstvou, tak po nanesení této vrstvy. U vzorku po pokrytí se hodnoty odlišovaly méně než u vzorku před pokrytím. Délka třídícího intervalu histogramu je 0,001 mm. Modrá křivka znázorňuje hustotu odchylek od ideálního poloměru.

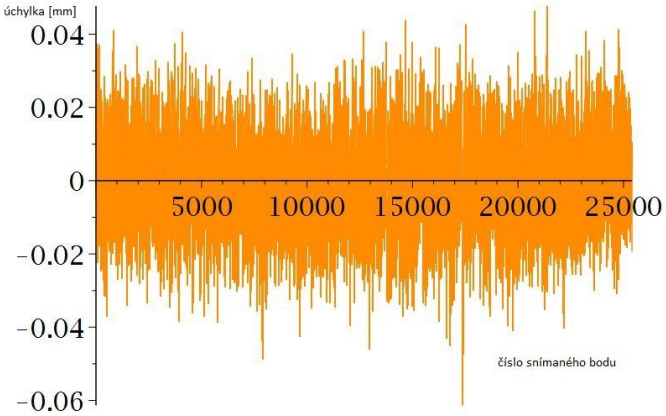


Obrázek 16 - Histogram úchylek před pokrytím (vzorek 23)

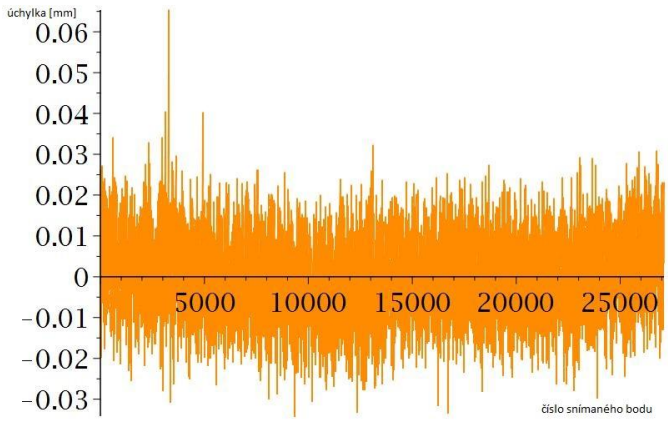


Obrázek 17 - Histogram úchylek po pokrytí (vzorek 23)

Na grafech zobrazujících rozložení úchylek v rámci souboru všech nasnímaných bodů je opět vidět, že nejčastěji se hodnoty směrodatných odchylek od střední hodnoty poloměru se pohybovaly v intervalu od -0,02 mm po 0,02 mm. Jdou zde ovšem zobrazeny i extrémnější hodnoty jako -0,06 mm u nepokrytého vzorku. Dále je zde také vidět, že směrodatné odchylky u pokrytých vzorků se odlišovali v rámci celého souboru méně.

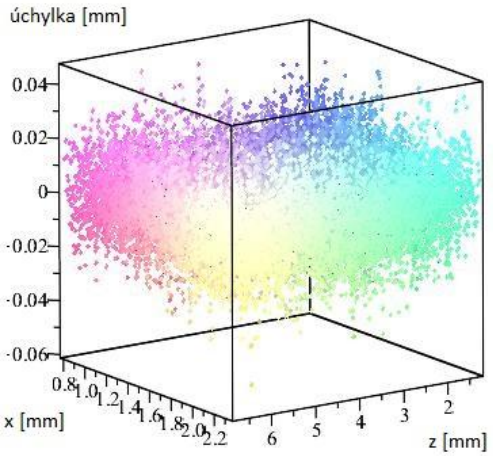


Obrázek 18 - Rozložení úchylek v souboru nasnímaných bodů před pokrytím (vzorek 23)

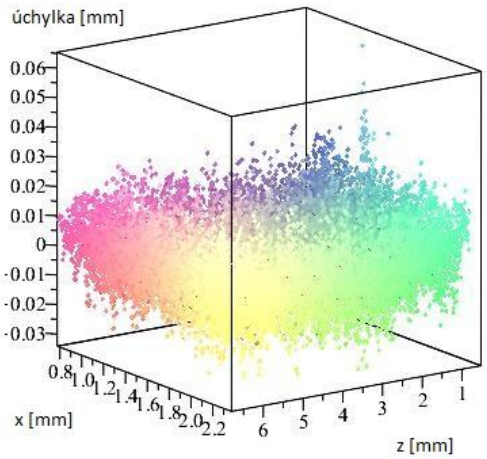


Obrázek 19 - Rozložení úchylek v souboru nasnímaných bodů po pokrytí (vzorek 23)

To samé jako na předešlých snímcích je patrné i na 3D rozložení úchylek na rozvinuté ploše úseče válce.



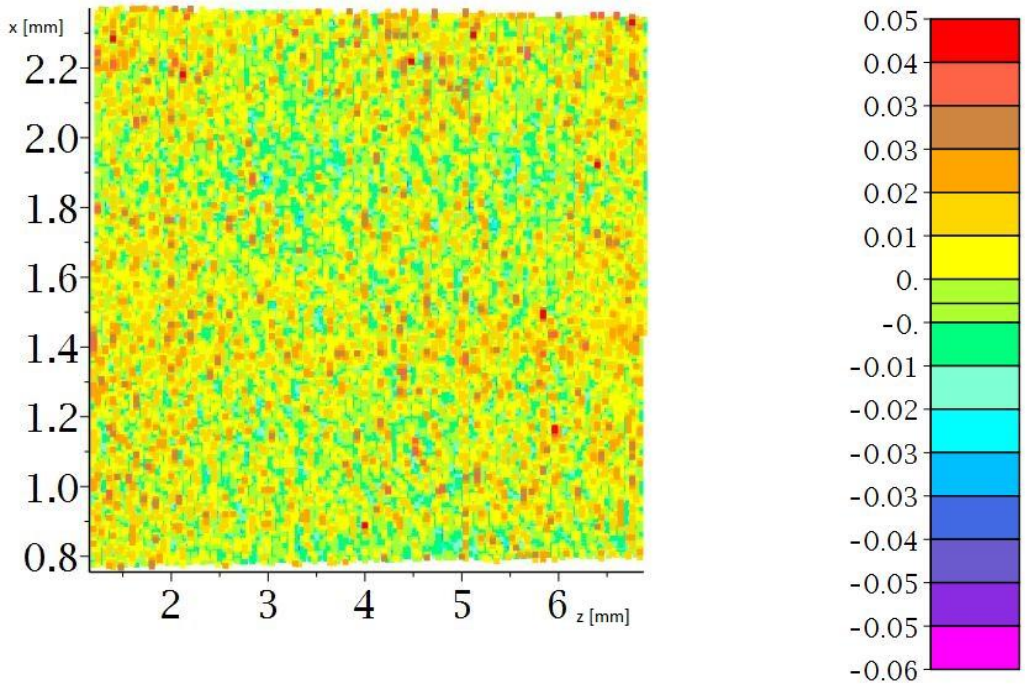
Obrázek 20 - 3D rozložení úchylek před pokrytím (vzorek 23)



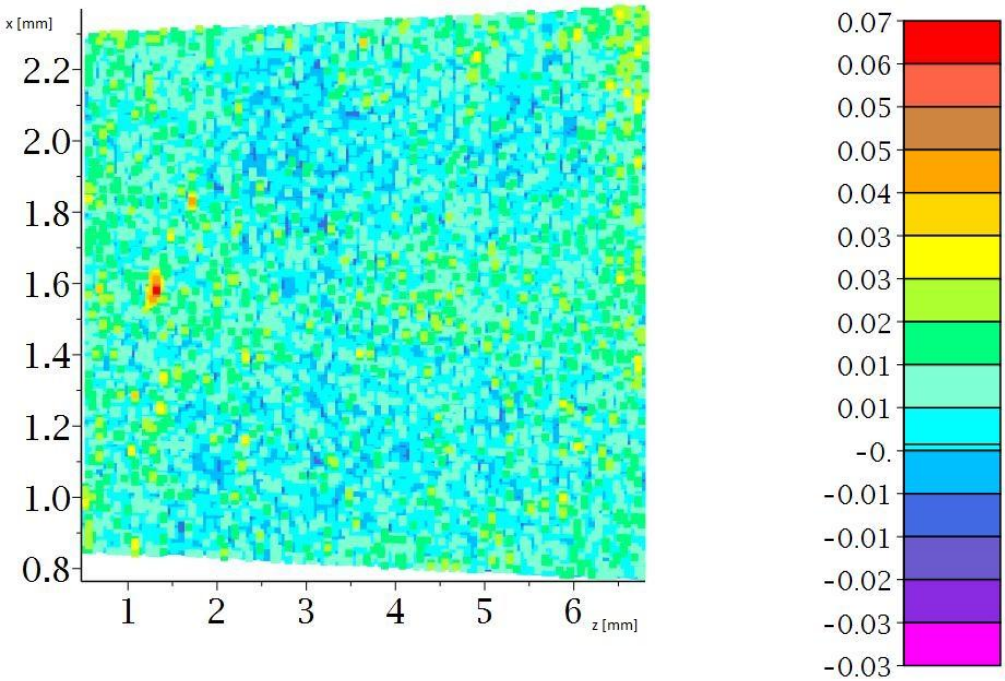
Obrázek 21 - 3D rozložení úchylek po pokrytí (vzorek 23)

Na snímcích 22 a 23 je vidět reliéf rozvinuté snímané vrstvy, kdy jednotlivé barvy podle legendy zobrazují úchylky. Na celé ploše nejsou patrné žádné velké výkyvy a hodnoty úchylek se pohybují v očekávaných mezích. Na grafu před pokrytím je vidět několik bodů, ve kterých odchylka dosahuje maximální kladné hodnoty 0,05 mm. Většina odchylek je ve žlutém pásmu, které představuje hodnoty 0,01 až 0,03 mm, a v pásmu tyrkysovém pro stejné hodnoty v záporné části. Na snímku po pokrytí jsou hodnoty především zelené a tyrkysové, tedy v rozmezí -0,01 až 0,02 mm. Na povrchu se vyskytuje

větší množství bodů se žlutou odchylkou 0,03 až 0,05 mm a jedna oblast s maximální kladnou úchylkou 0,07 mm.

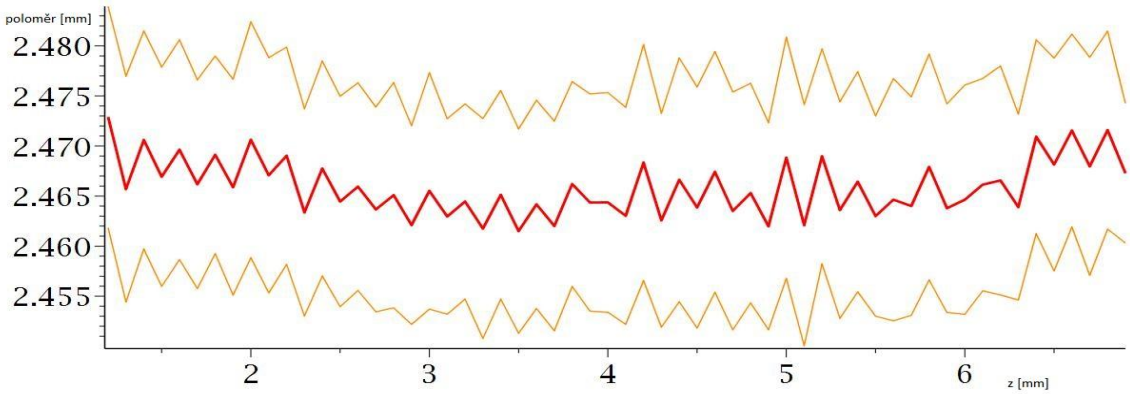


Obrázek 22 - Reliéf rozvinuté plochy vzorku před pokrytím (vzorek 23)

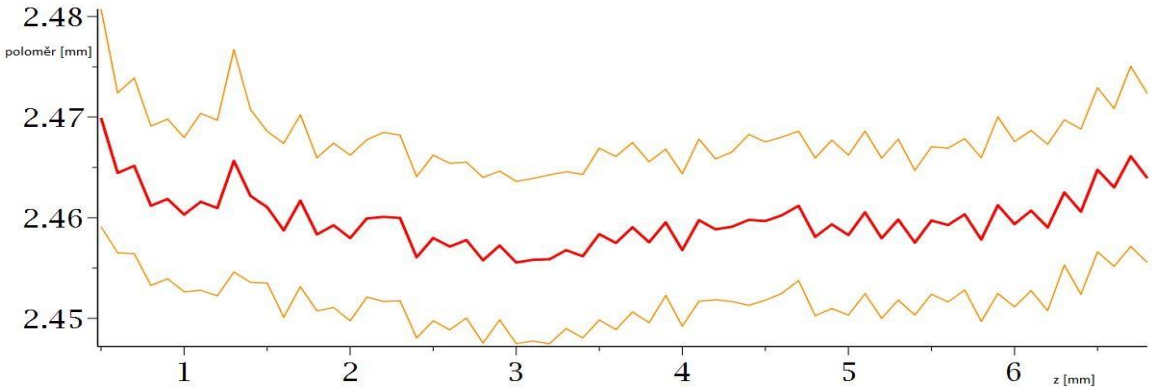


Obrázek 23 - Reliéf rozvinuté plochy vzorku po pokrytí (vzorek 23)

Obrázky 24 a 25 zobrazují červeně průměrnou hodnotu poloměrů v závislosti na délkové souřadnici v milimetrech. Vrcholy červené křivky představují průměrné hodnoty spočtené po každých 100 µm délky. Oranžově jsou vyneseny hodnoty s přičtenou (pro horní křivku), nebo odečtenou směrodatnou odchylkou (pro spodní křivku). U vzorku před pokrytím se průměrná hodnota poloměru většinou pohybovala mezi 2,470 mm a 2,465 mm a to na délce od 1,2 mm po 6,9 mm. Vzorek po pokrytí měl hodnoty poloměru mezi 2,490 mm a 2,485 mm na délce 0,5 mm až 6,8 mm. Na obou vzorcích je patrný mírný propad hodnot uprostřed délky. Tento jev může být stále způsoben odfiltrováním okrajových hodnot, které byly špatně nasnímané skenerem. Jinak na obou vzorcích nejsou patrné žádné velké odchylky, pohybovaly se pouze v řádech mikrometrů.



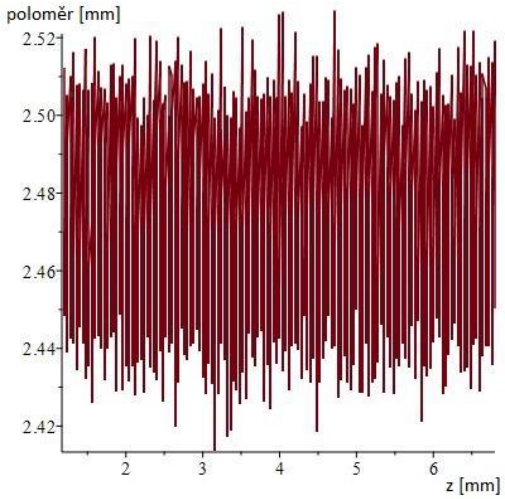
Obrázek 24 - Hodnoty poloměrů před pokrytím v závislosti na délkové souřadnici[mm], červeně –průměrné hodnoty poloměru po 100 µm délky, oranžově – průměrné hodnoty poloměru +- směrodatná odchylka (vzorek 23)



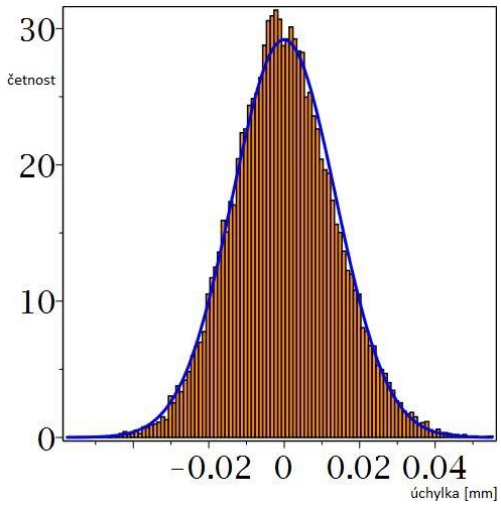
Obrázek 25 - Hodnoty poloměrů po pokrytí v závislosti na délkové souřadnici [mm] , červeně –průměrné hodnoty poloměru po 100 µm délky, oranžově – průměrné hodnoty poloměru +- směrodatná odchylka (vzorek 23)

4.2 Morfologie povrchu po protlačení

Na obrázku 26 je vidět rozložení poloměrů po protlačení v závislosti na nasnímaných bodech. Je zde patrné, že hodnoty poloměru vykazovaly větší rozptyl než u vzorků před a po nanesení vrstvy. To samé dokumentuje i obrázek 27, na kterém je znázorněn histogram směrodatných odchylek. Ty se sice stejně jako před protlačením pohybují nejčastěji v rozmezí od -0,02 mm po 0,02 mm, ovšem rozptyl hodnot je širší a bylo zaznamenáno i více hodnot s odchylkou 0,04 mm. Délka třídícího intervalu histogramu je 0,001 mm. Modrá křivka znázorňuje hustotu odchylek od ideálního poloměru.

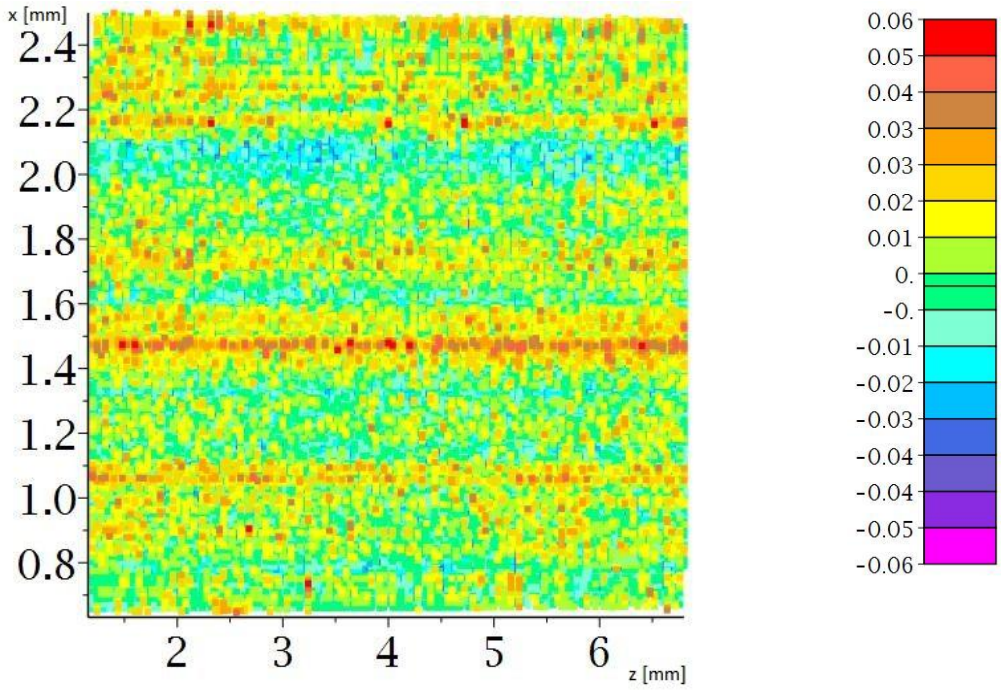


Obrázek 26 - Rozložení poloměrů v souboru nasnímaných dat (vzorek 23)



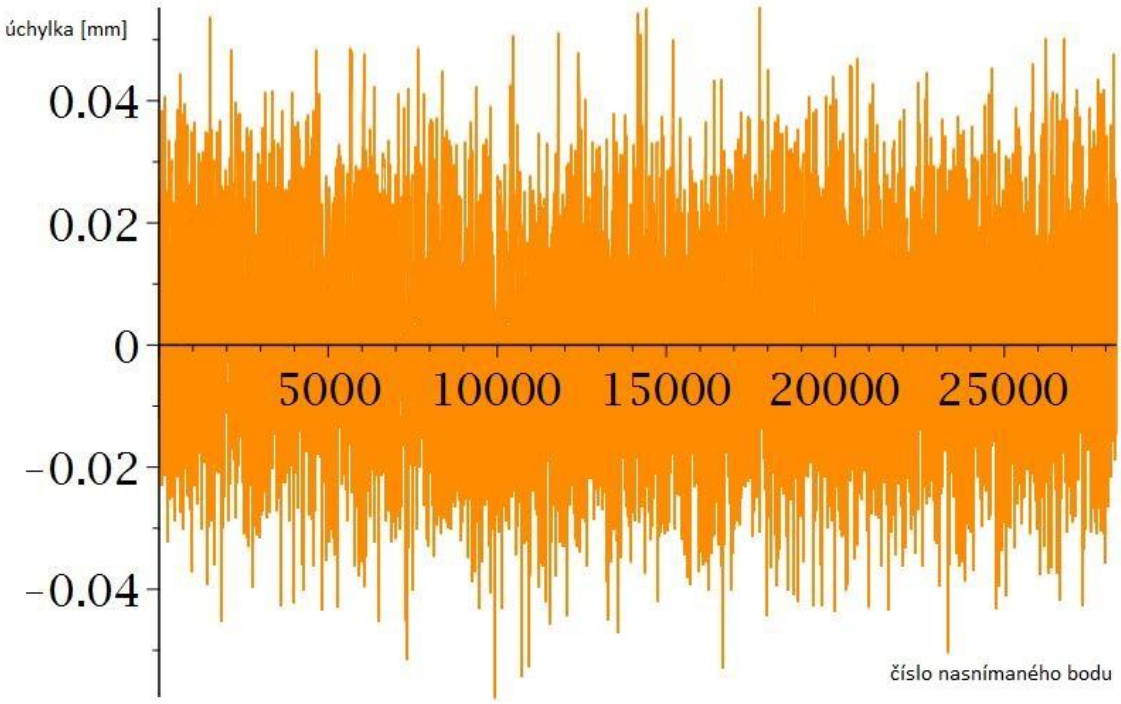
Obrázek 27 - Histogram úchylek po protlačení (vzorek 23)

Na reliéfu rozvinuté plochy úseče vzorku na obrázku 28 je vidět, že hodnoty úchylek se pohybovaly v pruzích podél celého vzorku. Nejčastější hodnoty byly v intervalu od -0,03 mm po 0,03 mm, ale jsou zde patrné i pruhy o větších úchylkách, s maximální úchylkou uprostřed vzorku s odchylkou 0,04 mm až 0,06 mm.



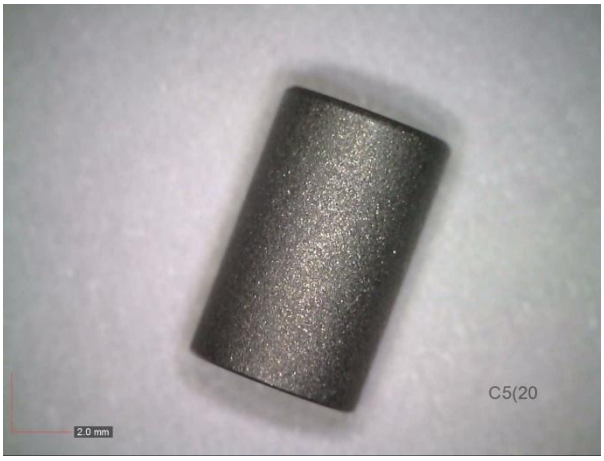
Obrázek 28 - Reliéf rozvinuté plochy po protlačení (vzorek 23)

Na obrázku 29 jsou hodnoty úchylek v souboru nasnímaných bodů zobrazeny ve 2D.



Obrázek 29 - Hodnoty úchylek po protlačení (vzorek 23)

Na snímcích 30 až 33 jsou vidět vzorky 23, 49 a 61 před nanesením vrstvy a po protlačení.



Obrázek 30 - Vzorek 23 před nanesením vrstvy

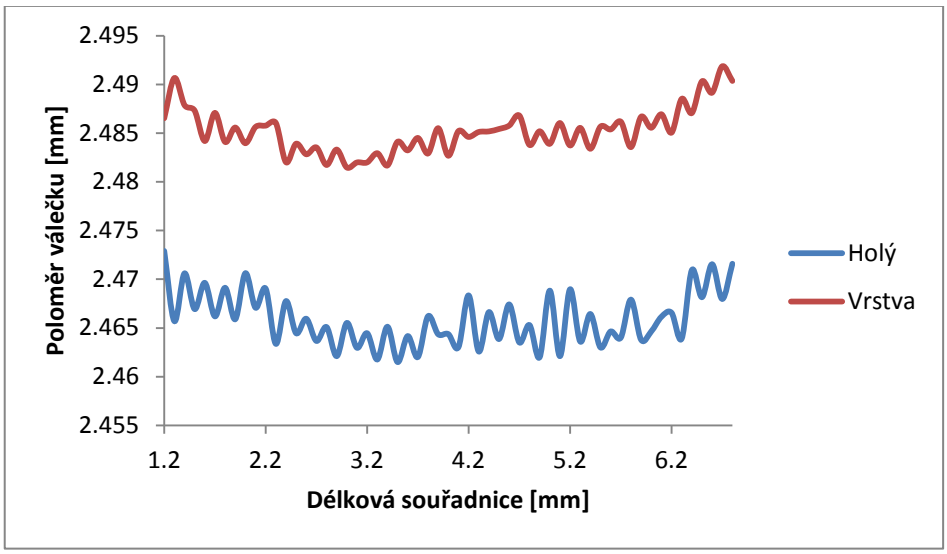
Obrázek 31 - Vzorek 23 po protlačení

Obrázek 32 - Vzorek 49 po protlačení

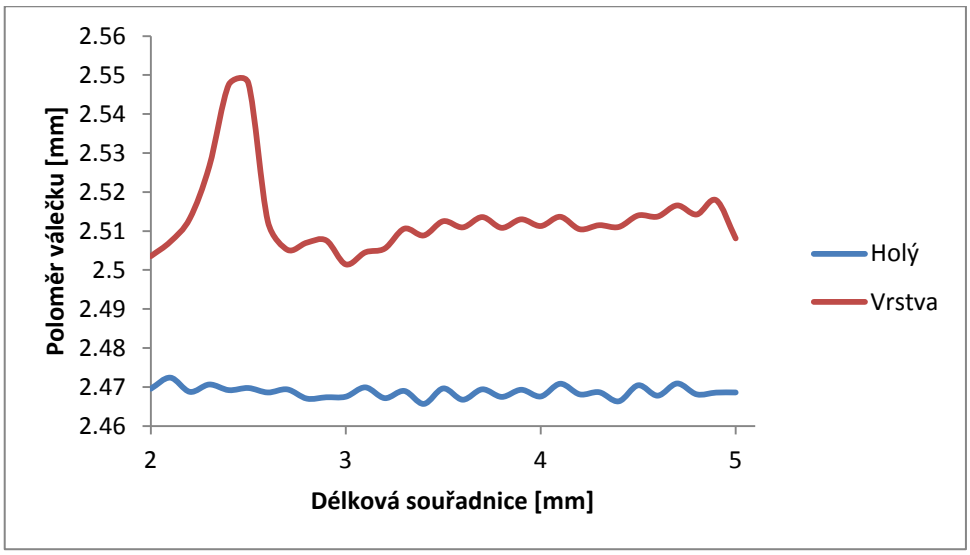
Obrázek 33 - Vzorek 61 po protlačení

5 Diskuze

Následující dva obrázky (Obr. 34 a 35) poskytují srovnání středních hodnot poloměrů před a po nanesení kolagenové vrstvy pro vzorek 23 a pro vzorek 61. Na obou grafech je jasně patrný nárůst poloměru po nanesení kolagenové vrstvy po celé zkoumané délce vzorku. Hodnoty obou poloměrů se odlišují maximálně v řádech pár desítek mikrometrů.

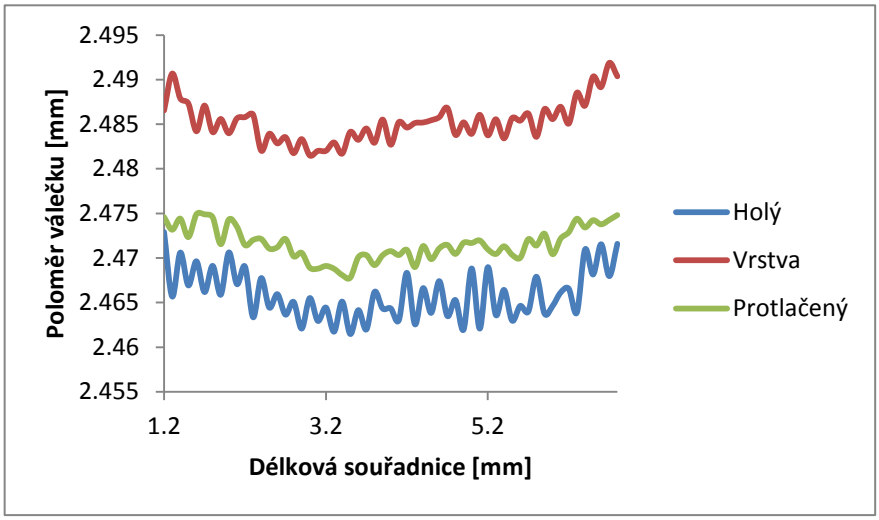


Obrázek 34 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý) a po nanesení vrstvy (vrstva) pro vzorek 23

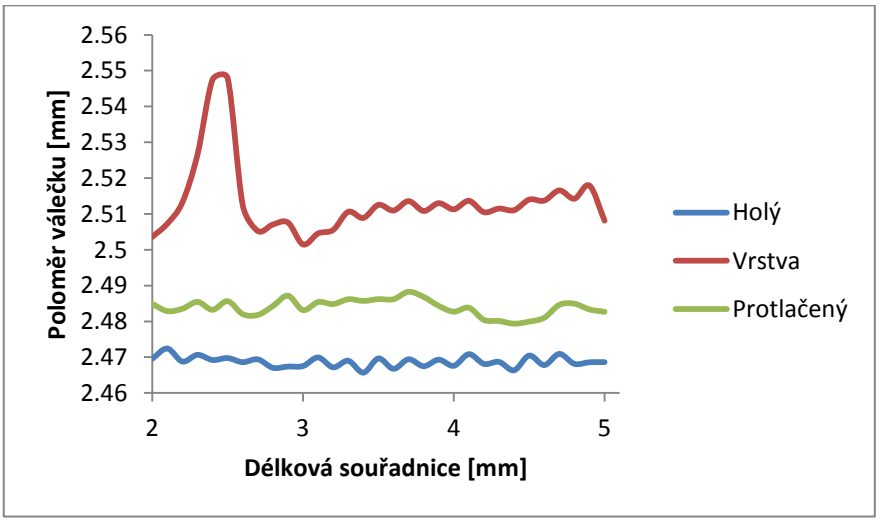


Obrázek 35 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý) a po nanesení (vrstva) pro vzorek 61

Na následujících grafech (Obr. 36 a 37) je srovnán poloměr před nanesením vrstvy, po nanesení vrstvy a po protlačení. Je zde vidět, že ačkoliv se při protlačovací zkoušce část kolagenové vrstvy otře, stále je tato vrstva na povrchu vzorku patrná.



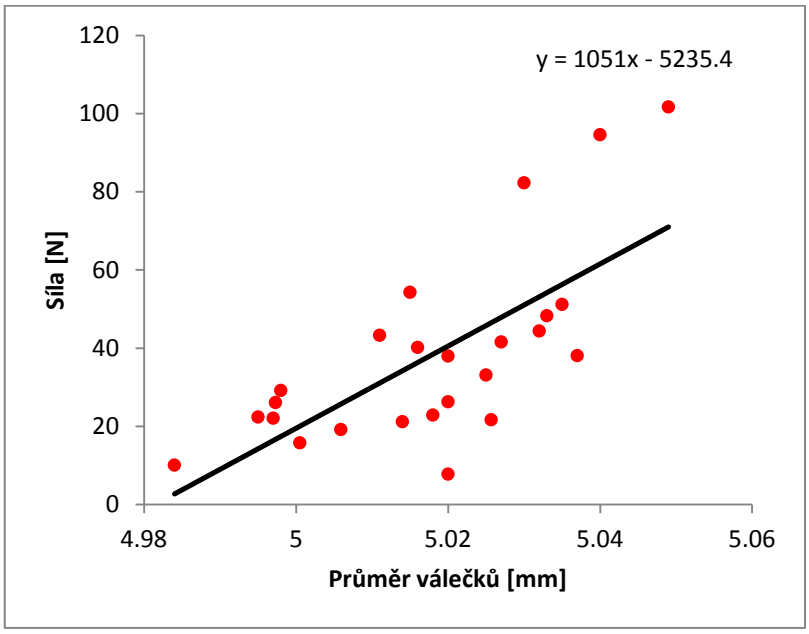
Obrázek 36 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý), po nanesení (vrstva) a po protlačení (protlačený) pro vzorek 23



Obrázek 37 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý), po nanesení (vrstva) a po protlačení (protlačený) pro vzorek 61

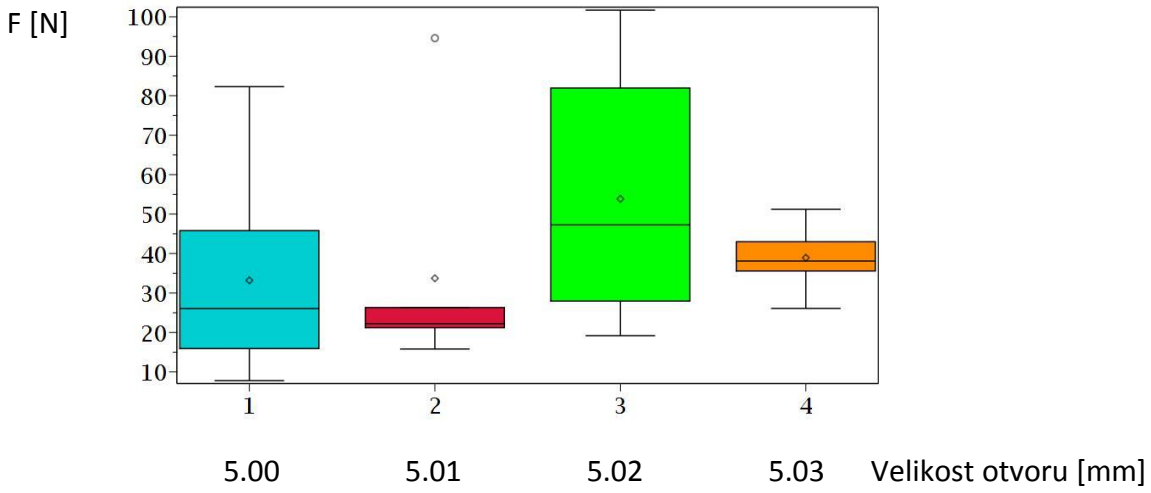
Kromě morfologie povrchu jsem se zabývala také hodnocením protlačovací zkoušky, a to konkrétně možnými závislostmi protlačovací síly na poloměru válečku, rozměru protlačovacího otvoru a povrchové úpravě titanového válečku.

Všechny vzorky byly vyrobeny s průměrem 5 mm a délkou 8 mm, ovšem již při snímání vzorků před nanesením kolagenové vrstvy bylo vidět, že i tak jsou v povrchu odchylky v řádu mikrometrů. Tyto odchylky přetrvávaly i po nanesení kolagenové vrstvy. Na následujícím grafu je znázorněna závislost protlačovací síly na ideálním průměru válečku, získaném aproximací pomocí metody nejmenších čtverců. Z grafu se dá usoudit, že potřebná protlačovací síla je závislá na průměru válečku a také na tloušťce kolagenové vrstvy, která ovlivňuje výsledný průměr. Pro menší průměry byla potřebná mnohem menší síla než pro průměry větší. Korelační koeficient vyšel 0,7064, což značí poměrně vysokou míru závislosti obou veličin.



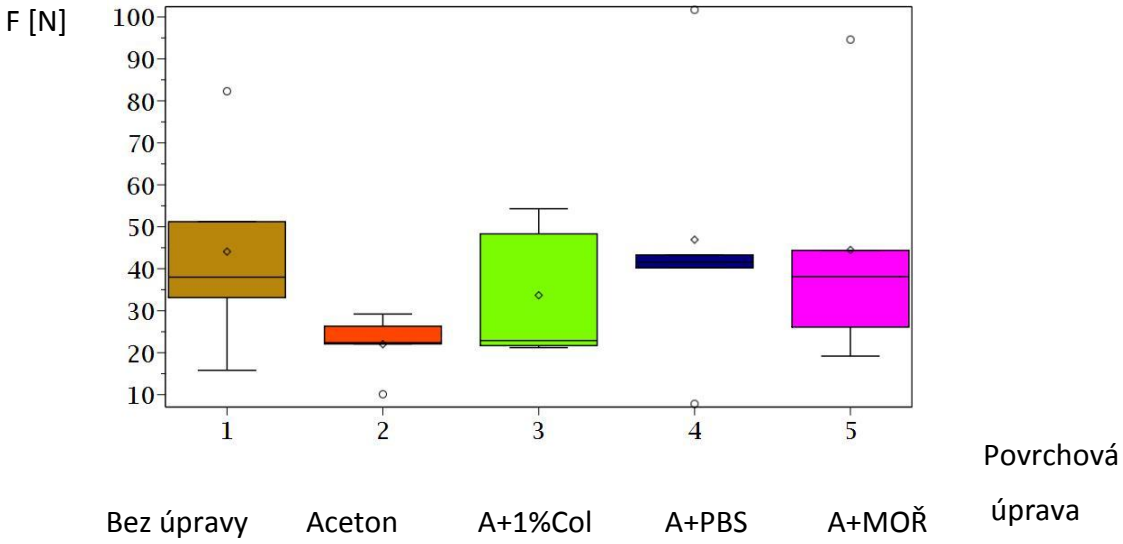
Obrázek 38 - Závislost protlačovací síly na průměru válečku s korelačním koeficientem 0,7064

Vzorky byly roztříděny podle průměru do čtyř skupin pro protlačování čtyřmi otvory v polyuretanové pěně o průměrech 5,00mm, 5,01mm, 5,02mm a 5,03mm. Tyto skupiny nebyly stejně velké. První skupina obsahovala 8 vzorků, druhá 6, třetí 4 a čtvrtá 7 vzorků. Rozpětí sil v závislosti na průměru díry je znázorněno na Obr. 39. Na grafu je patrné široké rozpětí hodnot u jednotlivých skupin a není zde patrná žádná závislost.



Obrázek 39 - Protlačovací síla dosažená při protlačování různě velikými otvory v polyuretanové pěně

Poslední graf zobrazuje rozmezí protlačovacích sil pro jednotlivé druhy použitých povrchových úprav. První skupina vzorků byla ponechána bez úprav, druhá byla odmaštěna acetonem, třetí byla odmaštěna acetonem a smočena v 1% roztoku kolagenu, čtvrtá byla odmaštěna acetonem a smočena v PBS, poslední pátá skupina byla odmaštěna acetonem, smočena v mořící lázni a následně v kolagenovém roztoku. Všechny tyto skupiny obsahovaly 5 vzorků. Nejmenší průměrné hodnoty byly ve skupinách 2 a 4, ovšem ve čtvrté skupině byly zároveň dvě velmi odlišné hodnoty od průměrné síly 40 N. Pouze v případě skupiny 2 byly hodnoty stanovené s nemenším rozptylem a bez extrémních odchylek. Z porovnání výsledků měření však nevyplývá žádný jednoznačný rozdíl mezi jednotlivými úpravami povrchu.



Obrázek 40 - Závislost protlačovací síly na povrchové úpravě

Při vyhodnocení experimentu se také ukázalo, že použitý skener ScanControl nebyl zvolen vhodně, jelikož při jeho rozlišení 10 µm není schopen přesně rozlišit nerovnosti povrchu, které se pohybují pouze v jednotkách mikrometrů, a výsledky tak byly často zkreslené.

6 Závěr

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo analyzovat adhezi kolagenové vrstvy na modelovém implantátu a zhodnotit průběh protlačování. V teoretické části jsem objasnila motivaci pro vývoj nové povrchové vrstvy implantátu. Jelikož kolagen tvoří z největší části analyzovanou vrstvu, věnovala jsem popisu jeho struktury a vlastností velkou pozornost. Dále jsem uvedla základní přehled možných povrchových úprav pro zvýšení osseointegrace, což bylo jednou z motivací pro vývoj této vrstvy.

V experimentální části jsem prezentovala složení vrstvy a princip zvoleného experimentu. Dále jsem prezentovala výsledky analýzy vrstvy. Nejdříve jsem porovnávala morfologii povrchu pro vzorky před nanesením kolagenu a vzorky po nanesení kolagenu. Dále jsem se věnovala otázce, zda i po protlačení vzorového válečku s kolagenovou vrstvou polyuretanovou pěnovou zůstane část vrstvy na vzorku. Tedy zda je adheze kolagenové vrstvy dostatečná. Jak fotografická dokumentace, tak analýza snímaných dat ukazují, že vrstva na povrchu vzorku ulpěla, ačkoliv mohla být částečně poškozena. Adheze kolagenové vrstvy na vzorovém implantátu tedy byla prokázána.

V poslední části jsem hodnotila výsledky protlačovací zkoušky a zjišťovala možné závislosti průběhu protlačování na odlišných vlastnostech vzorků. Podařilo se mi zjistit závislost mezi protlačovací silou a tloušťkou nanesené kolagenové vrstvy. U odlišných povrchových úprav jsem žádnou prokazatelnou souvislost nenašla, stejně tak u rozdílných velikostí děr v polyuretanové pěně.

Během vyhodnocování dat jsem zjistila, že skener ScanControl nebyl zvolen vhodně. Tento přístroj měří s citlivostí 10 µm, a to pro snímání povrchu implantátů není dostačující. Doporučuji tedy zvolit vhodnější metodu snímání. Samotná zkouška adheze pomocí protlačování polyuretanovou pěnou se ovšem osvědčila.

Cíle práce byly splněny.

7 Seznam literatury

[1] Cowin Stephen C. , Doty Stephen B., New York, NY: Springer, 2007. *Collagen*

[2] *Fibers of collagen type I* [online]. In: . [cit. 2017-05-22]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/25/Fibers_of_Collagen_Type_I_-_TEM_.jpg/220px-Fibers_of_Collagen_Type_I_-_TEM_.jpg

[3] *Merck Millipore* [online]. [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Anti-Mouse-Collagen-Type-I-Antibody,MM_NF-AB765P?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F&bd=1

[4] *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: http://fblt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/2-metabolismus-pojivovych-tkani/

[5] Rentgenové záření. *Radiobiologie* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: http://fbmi.sirdik.org/1-kapitola/14/145.html

[6] KOOLMAN, J. a K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie.* 4. české vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0

[7] *Kolagenní vlákna* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt5-2-1.htm

[8] PETERKOVÁ, Petra a Lubomír LAPČÍK. KOLAGEN - VLASTNOSTI, MODIFIKACE A APLIKACE. *Chemické listy* [online]. 2000, , 371-379 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/06-PDF/371-379.pdf

[9] *Sol Gel* [online]. In: . [cit. 2017-05-22]. Dostupné z: http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/File:780px-Wiki_SolGel1.jpg

[10] POLÁKOVÁ, Lenka. *Mechanické vlastnosti kolagenu*. Hradec Králové, 2013.

[11] FILOVÁ, E., F. STRAKA, T. MIŘEJOVSKÝ, J. MAŠÍN a L. BAČÁKOVÁ. *Tissue-Engineered Heart Valves*. 2009, Physiological Research, 58, Suppl 2, 141-152.

[12] Osseointegration. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Osseointegration

[13] *Titanium implant integrated into bone: Histologic section* [online]. In: . [cit. 2017-05-22]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Osseointegration#/media/File:Osseointegration_Histology.jpg

[14] *Biomaterials*. Oxford: Elsevier Ltd. ISSN 0142-9612.

[15] MANDRACCI, Pietro, Federico MUSSANO, Paola RIVOLO a Stefano CAROSSA. Surface Treatments and Functional Coatings for Biocompatibility Improvement and Bacterial Adhesion Reduction in Dental Implantology. *Coatings* [online]. [cit. 2017-05-15].

[16] *Electrospinning diagram* [online]. In: . [cit. 2017-05-22]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/ca/Electrospinning_Diagram.jpg/450px-Electrospinning_Diagram.jpg

[17] SUCHÝ, T., ŠUPOVÁ, M., KLAPKOVÁ, E., ADÁMKOVÁ, V., ZÁVORA, J., ŽALOUDKOVÁ, M., RÝGLOVÁ Š., BALLAY, R., DENK, F., POKORNÝ, M., SAUEROVÁ, P., HUBÁLEK KALBÁČOVÁ, M., HORNÝ, L., VESELÝ, J., VOŇAVKOVÁ, T., PRŮŠA, R. *The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: Microstructure vs. nanostructure,* 2017, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 100, 219–229

[18] *Laser Profile Scanning* [online]. In: . [cit. 2017-05-22]. Dostupné z: http://www.bestech.com.au/laser-profile-scanning-2d3d/

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Vlákna kolagenového typu I [2] 10

Obrázek 2 - Biosyntéza kolagenu typu I [6] 11

Obrázek 3 - Struktura kolagenu typu I [6] 12

Obrázek 4 - Přeměna solu na gel [9] 15

Obrázek 5 - Histologický snímek titanového implantátu (černě) integrovaného do kosti (růžově) [13] 20

Obrázek 6 - Schéma elektrospinningu [16] 28

Obrázek 7 - Vliv zvolené metody aplikace antibiotik na kinetiku jejich uvolňování. Minimální inhibiční koncentrace pro vankomycinu rezistentní kmen *Stafylokoka zlatého* je 16mg/l [17]. 29

Obrázek 8 - Princip snímání skeneru ScanControl [20] 29

Obrázek 9 - Záběr z průběhu experimentu 30

Obrázek 10 - Detail protlačovacího trnu, válečku a polyueratanové pěny 30

Obrázek 11 - Polyuretanové kostky s děrami a vzorky připravené na protlačování 31

Obrázek 12 - Nevystředěná úseč před pokrytím (vzorek 23) 33

Obrázek 13 - Vystředěná úseč před pokrytím (vzorek 23) 33

Obrázek 14 - Nevystředěná úseč po pokrytí (vzorek 23) 33

Obrázek 15 - Vystředěná úseč po pokrytí (vzorek 23) 33

Obrázek 16 - Histogram úchylek před pokrytím (vzorek 23) 34

Obrázek 17 - Histogram úchylek po pokrytí (vzorek 23) 34

Obrázek 18 - Rozložení úchylek v souboru nasnímaných bodů před pokrytím (vzorek 23) 34

Obrázek 19 - Rozložení úchylek v souboru nasnímaných bodů po pokrytí (vzorek 23) 35

Obrázek 20 - 3D rozložení úchylek před pokrytím (vzorek 23) 35

Obrázek 21 - 3D rozložení úchylek po pokrytí (vzorek 23) 35

Obrázek 22 - Reliéf rozvinuté plochy vzorku před pokrytím (vzorek 23) 36

Obrázek 23 - Reliéf rozvinuté plochy vzorku po pokrytí (vzorek 23) 36

Obrázek 24 - Hodnoty poloměrů před pokrytím v závislosti na délkové souřadnici[mm], červeně –průměrné hodnoty poloměru po 100 µm délky, oranžově – průměrné hodnoty poloměru +- směrodatná odchylka (vzorek 23) 37

Obrázek 25 - Hodnoty poloměrů po pokrytí v závislosti na délkové souřadnici [mm] , červeně –průměrné hodnoty poloměru po 100 µm délky, oranžově – průměrné hodnoty poloměru +- směrodatná odchylka (vzorek 23) 37

Obrázek 26 - Rozložení poloměrů v souboru nasnímaných dat (vzorek 23) 38

Obrázek 27 - Histogram úchylek po protlačení (vzorek 23) 38

Obrázek 28 - Reliéf rozvinuté plochy po protlačení (vzorek 23) 39

Obrázek 29 - Hodnoty úchylek po protlačení (vzorek 23) 39

Obrázek 30 - Vzorek 23 před nanesením vrstvy 40

Obrázek 31 - Vzorek 23 po protlačení 40

Obrázek 32 - Vzorek 49 po protlačení 40

Obrázek 33 - Vzorek 61 po protlačení 40

Obrázek 34 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý) a po nanesení vrstvy (vrstva) pro vzorek 23 41

Obrázek 35 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý) a po nanesení (vrstva) pro vzorek 61 41

Obrázek 36 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý), po nanesení (vrstva) a po protlačení (protlačený) pro vzorek 23 42

Obrázek 37 - Srovnání poloměrů před nanesením vrstvy (holý), po nanesení (vrstva) a po protlačení (protlačený) pro vzorek 61 42

Obrázek 38 - Závislost protlačovací síly na průměru válečku s korelačním koeficientem 0,7064 43

Obrázek 39 - Protlačovací síla dosažená při protlačování různě velikými otvory v polyuretanové pěně 44

Obrázek 40 - Závislost protlačovací síly na povrchové úpravě 44