České vysoké učení technické v Praze

Fakulta strojní, Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie

Disertační práce

Výzkum struktury povrchu kompozitních materiálů s ohledem na jejich využití v medicíně

Školitel: Doc. Ing. Rudolf Dvořák, CSc.

Školitel specialista: MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Vypracoval: Ing. Beránek Libor

Dne: 29. 9. 2010

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. Ing. Rudolfovi Dvořákovi, CSc. za vedení v průběhu doktorského studia a poskytnutí možnosti účastnit se grantového projektu výzkumu kompozitních materiálů, jehož výsledkem je mimo jiné i má dizertační práce. Dále bych rád poděkoval MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za její vstřícnost při konzultacích a za neutuchající energii s jakou udávala směr výše zmíněnému výzkumu a RNDr. Jiřímu Michálkovi, CSc. za konzultace v oblasti navrhování a vyhodnocování experimentů. Poděkování patří i mým kolegyním a kolegům, kteří mi pomáhali s přípravou vzorků Ing. Radce Bičišťové, Ing. Zdeňkovi Toldemu, Ing. Romanovi Švábkovi a Ing. Vladimírovi Jechovi. Markétě Bačákové a Věře Lisé bych rád poděkoval za množství času, které věnovaly počítání buněk. V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům za podporu, které se mi z jejich strany během celého studia dostalo.

Anotace

V minulých desetiletích se v medicíně rozšířilo použití umělých materiálů, ať už v ortopedii, zubní či rekonstrukční chirurgii. Jedním z řady potenciálních materiálů uvažovaných pro tato použití je i uhlíkový kompozit CFRC. Adhese a proliferace buněk jsou obvykle ovlivňovány morfologií povrchu, proto byla velká pozornost věnována i studiu struktury povrchu a jejímu vlivu na biokompatibilitu materiálu. Nevýhodou tohoto kompozitu je náchylnost k uvolňování částic uhlíkového materiálu do okolního prostředí, které se mohou kumulovat v tkáních a poškodit je. Možnou cestou, jak uvolňování mikročástic snížit může být povlakování povrchu materiálu odolnou biokompatibilní vrstvou. Dalším faktorem ovlivňujícím proliferaci buněk může být i jejich doménové uspořádání. Proto bylo rozhodnuto, že za pomoci statistických metod DOE bude navržen experiment, který má zhodnotit vliv a přínos různých zpracování povrchu, na biokompatibilitu tohoto kompozitního materiálu. Tato dizertační práce vznikla díky podpoře projektu **č. 101/06/0226 GA ČR** a její výsledky přispěly k úspěšné obhajobě tohoto grantového projektu v roce 2009.

Anotation

Research of the Surface of Composite Materials Regarding Their Medical Use

In recent decades, artificial materials have become widely used in medicine, particularly in orthopedic, dental and reconstructive surgery. One branch of these promising materials is Carbon Fibre-Reinforced Carbon composites. Their chemical nature (identical in both their fibres and matrix) is very close to chemically pure carbon, so these materials can be well tolerated by surrounding tissues. Moreover, the mechanical and other physical properties of CFRC, particularly their density, porosity and modulus of elasticity, can be tailored to be very close to those of the bone. However, these materials still need certain improvements before they are introduced into the organisms of experimental animals and into clinical practice. It is greatly important to determine the influence of surface properties such as roughness and texture on biocompatibility of selected material. This dissertation was supported by Project No. 101/06/0226 of GA CR (The Czech Science Foundation) and its results contributed to the successful defense of this grant project in 2009.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pod vedením mého školitele Doc. Ing. Rudolfa Dvořáka, CSc.

V Praze, dne 29. 9. 2010

Ing. Libor Beránek

Obsah

Seznam použité symboliky a zkratek *3*

Úvod *4*

1. Kompozitní materiál CFRC v biomedicíně *6*

1.1 Využití depozice tenkých vrstev 11

2. Cíle disertační práce *14*

2.1 Plánovaný postup řešení dané problematiky 14

3. Navrhování experimentů *15*

3.1 Vybrané typy návrhů experimentů 19

3.1.1 Jednofaktoriální experimenty 20

3.1.2 Úplné znáhodněné bloky 27

3.1.3 Vícefaktoriální návrhy 31

3.1.4 Obecný případ faktoriálního návrhu 35

4. Hodnocení a parametry struktury povrchu *38*

4.1 Pravidla a postupy pro posuzování struktury povrchu 40

5. Vývoj vhodné biokompatibilní vrstvy pro povlakování kompozitu CFRC *45*

5.1 Depozice vrstev 46

5.2 Struktura povrchu nanášených vrstev 47

5.3 Růst a morfologie buněk 48

5.4 Počty buněk 49

6. Návrh modifikace povrchu kompozitu CFRC z hlediska adhese a proliferace buněčných kultur *52*

6.1 Návrh experimentu 52

6.2 Příprava vzorků 53

6.2.1 Kompozitní materiál Carbon-Fiber Reinforced Carbon 54

6.2.2 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu broušením 55

6.2.3 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu laserem 56

6.2.4 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu depozicemi tenkých vrstev DLC 63

6.3 Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu kompozitu CFRC na vybrané parametry drsnosti povrchu 65

6.3.1 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou aritmetickou úchylku profilu 67

6.3.2 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou kvadratickou úchylku profilu 69

6.3.3 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou šířku prvků profilu 70

6.3.4 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na šikmost a špičatost profilu..... 71

6.4 Záznamy povrchů hotových vzorků..... 74

6.5 Kultivace a měření počtů a ploch buněk na vzorcích CFRC 76

6.6 Analýza počtů buněk a jejich ploch v závislosti na jednotlivých faktorech návrhu 77

6.6.1 Analýza výsledků průměrných ploch buněk v závislosti na jednotlivých faktorech.... 82

6.6.2 Analýza výsledků hustoty buněk na cm^2 v závislosti na jednotlivých faktorech 85

Závěr 88

Literatura..... 92

Publikační činnost autora 96

Seznam příloh 99

Seznam použité symboliky a zkratek

AFM	Atomic Force Microscopy	mikroskopie atomárních sil
CFRC	Carbon Fiber Reinforced Carbon	uhlíkový kompozit
DLC	Diamond-like Carbon	diamantu podobný uhlík
DOE	Design of Experiments	metodika navrhování experimentů
FBS	Fetal Bovine Serum	hovězí plodový roztok
MG63	Human osteosarcoma cell line	linie lidských kostních buňek
Nd:YAG	pevnolátkový laser Yttrium Aluminium Granátu dopovaný ionty neodymu	
PACVD	Plasma-Assisted Chemical Vapour Deposition	
PVD	Physical Vapor Deposition	
Ra	Průměrná aritmetická úchylka profilu	
RSm	Průměrná šířka prvků profilu	
Rsk	Šikmost profilu	
Rku	Špičatost profilu	
SEM	Scanning Electron Microscope	řádkovací elektronový mikroskop
μ	parametr představující úroveň společnou všem ošetřením	
τ_i	parametr představující vliv i-tého ošetření	
ε_{ij}	parametr představující náhodné chyby a předpokládá se	
σ^2	rozptyl	
λs	filtr profilu definující rozhraní mezi drsností a kratšími složkami vln profilu	
λc	filtr profilu definující rozhraní mezi složkami drsnosti a vlnitosti	
λf	filtr profilu definující rozhraní mezi vlnitosti a delšími složkami	

Úvod

V současné době nabývají v medicíně stále většího významu umělé materiály. Rozvíjí se nový obor zvaný tkáňové inženýrství, který se zabývá konstrukcí umělých biokompatibilních materiálů za účelem náhrady poškozených tkání a orgánů. Za nejlepší náhradu poškozené tkáně je sice dosud považována tkáň pocházející z organismu samotného pacienta, avšak často tuto tkáň nelze v organismu pacienta získat v dostatečném množství či není dostupná vůbec. Tkáně pocházející z organismu jiných lidských či dokonce zvířecích dárců jsou zatíženy nebezpečím nezvládnutelné imunitní reakce i přenosu infekce. Proto se konstruuje široké spektrum transplantátů umělých, např. náhrady kostí, kloubů, cév, kůže či očních čoček.

Aby mohl být považován materiál za biokompatibilní, musí mít mechanické vlastnosti obdobné jako u původní nahrazované tkáně. Nesmí uvolňovat toxické a kancerogenní molekuly ani částečky materiálu, které by mohly zánětlivě dráždit přilehlé i vzdálenější tkáně. Musí dále žádoucím způsobem vstupovat do interakce s buňkami. Může být zcela inertní, tj. neumožňující adhesi a růst buněk a aktivaci imunitního systému. Tento typ biomateriálů se užívá např. pro konstrukci kloubních ploch či očních čoček. Pro jiné druhy umělých implantátů, např. kostí a cév je však žádoucí, aby byl materiál integrován do okolní tkáně, tj. aby jeho povrch podporoval adhesi a růst buněk, a v případě materiálu s trojrozměrnou síťovitou či porézní strukturou i migraci buněk do nitra transplantátů.

Uhlík a uhlíkové materiály jsou velmi dobře přijímány živou tkání, to je také důvod, proč jsou biomateriály tohoto typu stále více užívány pro konstrukci a výrobu lékařských implantátů. Jako velmi vhodný materiál se nabízí uhlíkový kompozitní biokompatibilní materiál s možným využitím v chirurgii tvrdých tkání. Tento materiál je představován kompozitem s uhlíkovou matricí vyztuženou uhlíkovými vlákny (tzv. kompozit uhlík-uhlík. C-C kompozit, Carbon Fibre-Reinforced Carbon, CFRC). Jeho chemické složení (totožné co se týče vláken i matrice) se blíží chemicky čistému uhlíku, takže tento materiál by mohl být organismem lépe tolerován než např. kovy, které jsou v literatuře uváděny jako cytoxické. Pro své vynikající fyzikální vlastnosti, jako je vysoká

měrná pevnost, tepelná odolnost a dobrá tepelná a elektrická vodivost, jsou kompozity uhlík-uhlík využívány v technicky náročných průmyslových podmínkách. Předpoklad je, že by se stejně dobře mohly uplatnit i v medicíně. Jejich mechanické vlastnosti, jako jsou modul pružnosti či porozita, mohou být totiž vhodnou konstrukcí přizpůsobeny tak, aby se tyto látky podobaly kostem, což je činí atraktivními pro možné využití v ortopedii, zubní, plastické chirurgii a chirurgii páteře, např. jako náhrady meziobratlových plotének. Kovové materiály, často užívané v těchto oblastech chirurgie, jsou obvykle příliš tuhé, což vede k poškození a úbytku přilehlé kostní tkáně, do níž je materiál zakotven. Vysoká tuhost, spojená navíc s křehkostí, je charakteristická rovněž pro oxidickou keramiku. Další keramické materiály, např. fosforečnan vápenatý, uhličitan vápenatý a hydroxyapatit, mají nízkou pevnost (tj. odolnost proti lomu) a sklon k únavě materiálu. Užití syntetických polymerů v chirurgii tvrdých tkání je limitováno jejich příliš nízkou tuhostí, právě tak jako jejich nízkou odolností k vysokým teplotám, například při jejich sterilizaci. Jak ovšem vyplývá ze studií provedených v minulých letech, kompozity uhlík-uhlík vyžadují před zavedením do organismu experimentálních zvířat a do klinické praxe ještě další zdokonalení.

Další zajímavou oblastí, která si zaslouží pozornost, je studium struktury povrchu materiálů určených pro lékařské využití a jejího vlivu na buněčný růst. Stanovení vlivu různých úprav povrchu materiálu na jeho biokompatibilitu proto bude dalším výstupem této práce. Nabízí se i široká aplikovatelnost těchto poznatků nejen na kompozit CFRC, ale i na jiné materiály používané pro konstrukci kostních implantátů, zejména titan a jeho slitiny.

1. Kompozitní materiál CFRC v biomedicíně

Materiály používané pro lékařské účely v současné době zahrnují kovy a jejich slitiny, keramiku i syntetické polymery. Každá z těchto skupin materiálů má své specifické nevýhody. Kovové materiály jsou obvykle příliš tuhé, což může vést k poškození a úbytku přilehlé kostní tkáně, do níž je materiál zakotven [19, 20, 21]. Vysoká tuhost, spojená navíc s křehkostí a sníženou odolností proti únavovým selháním je charakteristická pro keramické materiály, například oxidickou keramiku, fosforečnan vápenatý, uhličitan vápenatý a hydroxyapatit [19, 21]. Využití syntetických polymerů v chirurgii tvrdých tkání je limitováno jejich příliš nízkou tuhostí, právě tak jako jejich nízkou odolností k vysokým teplotám, například při jejich sterilizaci [21]. Tyto nevýhody mohou být alespoň z části odstraněny kombinováním biomateriálů do kompozitů obsahujících dvě i více složek, například polymerní kostní implantáty vyztužené metalickými, keramickými případně uhlíkovými vlákny, nebo náhrady kloubů s kovovými a polymerními částmi [22, 23]. Perspektivním materiálem pro možné aplikace v chirurgii kostních tkání, zdá se být i kompozitní materiál vyvinutý týmem pod vedením MUDr. Bačákové v rámci grantu číslo 106/99/0626 Grantové agentury České republiky. Jedná se o kompozit nazývaný Carbon Fibre-Reinforced Carbon (CFRC). Jeho chemické složení (totožné co se týče vláken i matrice) se blíží chemicky čistému uhlíku, takže tento materiál by mohl být organismem dobře snášen. Mechanické a fyzikální vlastnosti, jako jsou modul pružnosti hustota či poréznost, mohou být vhodnou konstrukcí přizpůsobeny tak, aby se podobaly kostní tkáni. Nicméně, tyto materiály potřebují před jejich nasazením do organizmů experimentálních zvířat další zlepšení. Dosud nevyřešeným problémem zůstává jejich sklon k uvolňování částeček uhlíkového materiálu do okolního prostředí, zejména při cyklickém namáhání. Tato vlastnost je dána relativní křehkostí matrice [24, 25, 26].

Z určitého pohledu lze tento problém považovat za výhodu, například kdyby tyto materiály byty konstruovány jako tzv. "trojrozměrné", tj. se síťovitou či porézní strukturou umožňující vrůstání tkáně dovnitř materiálu, jeho postupné odbourávání buňkami a nahrazování přirozenou mezibuněčnou hmotou [27]. Na druhé straně je však známo, že částice uvolňované z umělých kostních náhrad obvykle aktivují buňky imunitního systému či přímo poškozují buňky kostní tkáně [28,29]. Proto je žádoucí zaměřit se na to, jak snížit

či případně úplně zamezit uvolňování částic z CFRC. Je prokázáno, že leštění CFRC vzorků vede ke značnému snížení počtu uvolňovaných částic [16]. Bylo také prokázáno, že drsnost povrchu popsaná parametry Ra a S je nepřímo úměrná počtu adherujícíh hladkých svalových buněk a kostních buněk linie MG-63 [16, 12]. Stejnou závislost potvrzují i jiní autoři ve svých studiích na titanu i jeho slitinách [30, 31, 32, 33]. Na druhou stranu v některých studiích měla větší drsnost povrchu umělého materiálu příznivý účinek na počet počátečně adherovaných buněk i jejich následný růst a diferenciaci. Například rostoucí drsnost povrchu polymethylmethakrylátu pískovaného hliníkovými zrny byla doprovázena silnou adhezí cévních buněk [34]. Podobně, rostoucí drsnost povrchu kovových kostních implantátů byla přímo úměrná objemu kostní tkáně obklopující implantát [35].

Je zajímavé, že v obou skupinách jsou hodnoty parametru Ra podobné, pohybující se v rozsahu od desetin mikrometru až do několika mikrometrů, obvykle 4 až 7 μm. Různé výsledky tedy mohou být vysvětleny různým chemickým složením každého z materiálů či požadavky různých typů buněk. Některé buňky totiž mohou preferovat povrchy hladké nad drsnými, jsou označovány ”rugophobic” a naopak některým se daří lépe na površích s větší drsností a označovány jsou ”rugophilic” [36, 37]. Jedno z možných vysvětlení může být, že parametry Ra a S, které jsou nejčastěji pro charakterizování profilu povrchu v těchto studiích používány, nedokážou dostatečně popsat odlišné tvary nepravidelností povrchu (topografii) a bylo by třeba provést komplexnější analýzy, nejlépe na 3-D měřícím zařízení. K dispozici máme profiloměr Talysurf 6 s rozšířenou sadou měřených parametrů: Ra, Rtm, Rp, Rv, Rpm, Rsk, Rku, Ry, S, Sm, Δq. Pro adhezi rozhodující fyzikální a chemické vlastnosti povrchové vrstvy jsou dále například smáčivost, elektrický náboj, porosita, pH [27, 34, 38, 39, 40, 41, 42].

Jiný zdroj zabývající se problematikou CFRC kompozitů a vlivem jejich opracování na biokompatibilitu [43] popisuje, jak leštění a povlakování uhlíkových kompozitů vyztužených uhlíkovými vlákny vrstvou karbidu titanu zvyšuje přilnavost a růst osteoblastů (MG63) a hladkých svalových buněk in vitro. V této publikaci byli CFRC kompozity vyrobeny z phenolových pryskyřic a jednosměrně orientovaných uhlíkových vláken Torayca karbonizací při 1000^0C a grafitizací při 2500^0C. Materiál byl poté rozřezán

diamantovým kotoučem na kusy o velikostech 8 x 10 x 3 mm a vrchní strana byla vyleštěna $Si0_2$ a pokryta vrstvou TiC o tloušťce 3,3 mikrometru metodou PE PVD. Byly připraveny tři sady modifikací vzorků: leštěné, s deponovanou vrstvou a leštěné s deponovanou vrstvou. Neupravené vzorky byly použity jako kontrolní skupina. Drsnost povrchu byla změřena profiloměrem Talysurf. Samozřejmě, že leštěním značně poklesla drsnost povrchu, povlakovaní se do snížení drsnosti nepromítlo. Na všech třech modifikacích povrchu, lidské buňky linie MG63 a krysí hladké cévní svalstvo (oboje vypěstované v Dulbeccoově základním médiu s 10% hovězího plodového séra) adherovaly ve vyšších množstvích (o 21-87% první den po vysazení) a také vykázaly kratší čas zdvojnásobení populace (o 13-40%) než na neupraveném kompozitu. Čtvrtý den po vysazení, tyto buňky dosáhly větší populační hustoty (o 61-378%), objemu (o 18-37%) i obsahu proteinů (o 16-120%). Tyto výsledky byly více zřetelné u buněk hladkého cévního svalstva než u buněk MG63 a v obou skupinách pokrytých C:Ti než pouze vyleštěných vzorků. Uvolňování částic uhlíku z CFRC kompozitu bylo u vzorků podstatně sníženo: 8x u pouze leštěných, 24x u povlakovaných a 42x u leštěných a povlakovaných. Uvedený výzkum přímo souvisí s tématem disertační práce a výsledky nám ukazují, že jak leštění, tak úprava povrchu depozicí vrstvy uhlík-titan znatelně zlepšují biokompatibilitu CFRC kompozitů in vitro, zvláště pokud jsou tyto dvě modifikace kombinovány. Z výsledků tohoto výzkumu budu při svém navrhování experimentu vycházet a přikládat jim značnou váhu. Na základě výsledků těchto experimentů budou stanoveny některé faktory návrhu experimentu.

Studiem interakce mezi tkání a implantovaným materiálem se zabývá publikace [44]. Interakce mezi tkání a implantovaným materiálem je kritický faktor ve studiu biokompatibility. Bioaktivita implantátu se očekává, pokud je vyžadována resorpce nebo kontrolovaná integrace s okolní tkání. Naopak inertnost biomateriálu je potřebná pro případy implantátů, které musejí snášet zatěžování. Požadované i nechtěné důsledky částečné biodegradace implantátů jsou diskutovány na základě autorovy experimentální práce, prováděné na hliníkových a CFRC kompozitech. Článek popisuje dva příklady vyšetřování interakcí mezi biokeramikou (CFRC, alumina, hydroxyapatite, tricalcium phosphate) a buňkami. Budoucnost výzkumu interakcí mezi biomateriálem a tkání se bude odvíjet od vývoje ve tkáňovém inženýrství. Článek se týká oblasti mého budoucího

působení okrajově, neboť pojednává spíše o způsobech vyšetřování interakce mezi biokeramikou a buňkami.

Tkáňové inženýrství je pokročilý, interdisciplinární vědecký obor, jenž se vyvíjí, aby uspokojil požadavky na bezpečnost, funkčnost a dostupnost náhrad, nezvratně poškozených tkání a orgánů [45]. První biomateriály byly konstruovány jako dvourozměrné (umožňovaly adhezi buněk pouze na povrchu) a trvanlivé (nedegradující). Naopak biomateriály nové generace jsou charakterizovány takzvanou trojrozměrnou porézní architekturou, která slibuje přilnavost, růst a dělení buněk uvnitř materiálu, spolu s postupným odbouráním implantátu a nahrazením regenerovanou plně funkční tkání. Ve snaze řídit tyto procesy jsou materiály dotovány definovaným spektrem bioaktivních molekul, jako jsou ligandy pro buněčné receptory, hormony a enzymy nebo syntetické regulátory chování buněk, integrované v určitých koncentracích a prostorovém rozložení na bioinertním podkladu odolném vůči adsorpci proteinů a adhezi buněk.

Buňky mohou vnímat fyzikální vlastnosti i chemické složení těchto materiálů a podle toho mohou upravovat svoje chování. Druhy biomateriálů můžeme rozdělit přinejmenším do tří skupin: 1) materiály inertní nedovolující adhezi buněk (včetně trombocytů a buněk imunitního systému), 2) materiály umožňující adsorpci celé extracelulární matrix molekuly, která obsahuje spojovací místa pro adhezní receptory na buňkách (např. integrinové receptory) a 3) pokročilé biomimetické materiály sestávající se z bioinertního podkladu dopovaného ligandy pro adhezní receptory (obvykle krátké sekvence aminokyselin, jako Arg-Gly-Asp) a funkčními skupinami hormonů a enzymů. Tyto bioaktivní molekuly mohou být navázány v definovaném spektru, koncentraci a prostorovém rozložení, za účelem řízení adheze, růstu a diferenciace. Popsaný výzkum z publikace [44] souvisí s tématem disertační práce okrajově, jelikož se zabývá adhezí buněk na umělých materiálech obecně, přesto je v něm zmínka o materiálech CFRC a jejich nevhodnosti pro růst buněk v neobrobeném stavu.

Další z možných aplikací kompozitu CFRC je nastíněna v publikaci [46]. Jedná se o klinické testy, porovnávající podpěry zubních korunek z CFRC a konvenčních prefabrikovaných podpěr. 27 zubů z horních čelistí na 18 pacientech bylo obnoveno buď

pomocí CFRC podpěr nebo za použití drahých tvářených slitin. V obou skupinách podpěr bylo použito zlaté slitiny typu III. Podpěry z CFRC (n = 16) byly cementovány kompozitním tmelem a konvenční podpěry byly cementovány fosfátem zinku. Byla zaznamenána 4 selhání ve skupině CFRC ve 24, 29, 56 a 87 měsících, v porovnání s jedním selháním po 84 měsících u kontrolní skupiny. Z výsledků je vidět, že podpory korunek z CFRC a s kompozitním tmelem si nevedly tak dobře jak bylo plánováno. V tomto případě se opět vyskytl problém s uvolňováním uhlíkových částic do okolní tkáně. Závěry tohoto výzkumu jen dokreslují riziko výskytu nežádoucích vlastností materiálů CFRC.

Vědecká studie [47] pojednává o materiálech pro implantáty na bázi plastů vyztužených uhlíkovými vlákny. Plasty vyztužené uhlíkovými vlákny byly klinicky používány jako materiály implantátů pro různé aplikace více než 20 let. Článek popisuje technické základy kompozitních materiálů, možnosti aplikací, výhody (např. pooperativní vizualizaci bez zkreslení, pomocí počítačové a magnetické resonanční tomografie) a nevýhody použití jako implantačního materiálu. Na základě experimentálních a klinických studií je zde také diskutována biokompatibilita plastů vyztužených uhlíkovými vlákny. Dále jsou zde prezentovány a zhodnoceny různé implantační systémy z těchto materiálů pro léčbu v ortopedické chirurgii jako náhrada kloubů a pro operace páteří. Současné aplikace těchto materiálů lze spatřit právě na poli chirurgie páteře. Studie přímo nesouvisí s tématem disertační práce, ale je z ní vidět, že neustále probíhají snahy o využití uhlíkových vláken v lékařství. Zde je použita, místo uhlíkové matrice plastová matrice, která přispívá ke snížení počtu uvolňovaných částic do okolních tkání.

Implantáty z CFRC, hydroxyapatitu (HA) a chirurgické oceli byly implantovány do stehenních kostí třech králíků a po třech měsících byly vytlačeny [48]. HA implantát byl použit jako referenční vzorek (byla očekávána dobrá fixace v kosti), naproti tomu u implantátu z chirurgické oceli byla očekávána nulová fixace. Po třech měsících byla kost ve všech případech zregenerována. Smyková síla mezi implantátem z CFRC a kostí byla nižší než v případě HA, ale vyšší než u implantátu z chirurgické oceli. Dále byla se vzorky CFRC provedena tlaková zkouška a tlaková síla po sledovaném období byla znatelně nižší (7x), než u kontrolních vzorků. Z toho můžeme vyvodit, že za tři měsíce došlo k jistému provázání mezi implantátem a hostitelskou tkání, což vedlo ke snížení mechanických

vlastností. Ve článku je mimo jiné zmiňováno, že v případě použití materiálu CFRC, byl v okolní kostní tkáni opět zaznamenán výskyt uhlíkových částic. Článek souvisí s tématem práce, neboť pojednává o konkrétním chování CFRC kompozitu, implantovaném do živého organismu. Cestu ke zvýšení biokompatibility kompozitu CFRC (stejně jako jiných materiálů) by mohlo představovat například povlakování povrchu odolnými biokompatibilními vrstvami.

1.1 Využití depozice tenkých vrstev

Depozice tenkých vrstev pomocí metod CVD (chemické depozice z plynné fáze) případně PECVD (za asistence plazmy), mají v současné době využití hlavně v polovodičovém průmyslu, avšak výhody těchto technologií jsou již celou řadu let využívány i ve strojírenském průmyslu.

V minulosti bylo vyvinuto několik nových systémů pevných lubrikantů a moderních lubrikačních metod, k dosažení nižšího tření a opotřebení a z toho důvodu vyšší životnosti v náročných tribologických aplikacích. Cílem publikace [49] je popsat tribologické vrstvy, vytvořené během testu kulička na podložce, povlakované TiN s obsahem Cl (s nízkým třením) nanesené pomocí metody PACVD a objasnit mechanizmus jejich vzniku. Pozorování těchto vrstev bylo provedeno optickým mikroskopem, optickým profiloměrem, Ramanovou spektroskopií a rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií. K získání informací o chemických reakcích na povlaku ovlivněných chlorem byla použita metoda diferenční skenovací kalorimetrie. Povlaky TiN s nízkým obsahem chloru (< 3% Cl) vykazovaly koeficienty tření přibližně 0,8, zatímco povlaky TiN s větším obsahem chloru než 3% vedly ke snížení koeficientu tření až pod 0,2. Publikace přímo nesouvisí s tématem disertační práce, spíše má posloužit k demonstraci možností využití speciálních vrstev, v tomto případě k dosažení efektu samomazání.

Drsnost povrchu nanášených vrstev závisí mimo jiné i na technologii depozice [50]. V tomto konkrétním případě byly filmy DLC naneseny na křemíkový podklad za použití tří rozdílných technik: a) doutnavým výbojem z metanu, b) magnetronovým naprašováním z uhlíkového terčíku a c) iontovým paprskem generovaným na katodovém obloukovém výboji. Byla provedena analýza drsnosti povrchu metodou AFM v nanometrových

rozlišeních (atomic force microscopy) jak na čistých, tak na vzorcích s nanesenou vrstvou DLC. Bylo shledáno, že v rámci účinků na drsnost povrchu, je zde mezní hodnota dopadové energie iontů. Pod touto iontovou energií, která je přibližně 50 eV pro všechny tři studované metody, je povrch DLC velmi drsný, zatímco nad touto energií drsnost razantně klesá. Tato hodnota je blízko mezním atomovým dislokačním energiím, které byly pro uhlík a diamant popsány dříve. Uvedená problematika se částečně vztahuje i k mé práci, neboť stejné vrstvy budou nanášeny i na testované uhlíkové kompozity. Vlastnosti uhlíkových vrstev mezi grafitickou a diamantovou strukturou se mohou měnit v širokém rozpětí, závisí i na materiálu prekursoru a parametrech procesů používaných různými autory. Vrstva DLC nanášena na křemíkový wafer [51] metodami MW ECR/PACVD (microwave electron cyclotron resonance/plasma-assisted chemical vapour deposition) ze směsi benzenu (7 sccm) a argonu (od 5 do 35 sccm) se záporným předpětím (-200 V), mikrovlnným výkonem (300 W), při 200-350^{0}C a rozsahu tlaků 0,01 - 0,15 Pa. Pro všechny povlaky připravené za konstantního průtoku plynného benzenu a různých průtoků argonu se drsnost pohybovala v rozmezích 0,02 – 1,65 μm. Zvyšování průtoku argonu z 5 na 35 sccm vedlo ke zlepšení morfologie povrchu, ke snížení hodnot drsnosti, která rostla s teplotou podkladu.

Depozice tenkých vrstev probíhala na Ústavu fyziky FS ČVUT v Praze pod vedením prof. Černého, který je expertem na danou problematiku. Z jeho předchozích prací uvedu příklad studie zaměřené na tenké filmy z uhlíku a karbon-nitridu [52]. Tyto filmy vykazují specifické optické a mechanické vlastnosti, které z nich dělají slibné materiály pro integrovanou optiku. Za tímto účelem byla zkoumána příprava a optické vlastnosti uhlíkových a karbon-nitridových vrstev nanesených na křemíkovém podkladu. Studie se zabývala problematikou výroby rovinných optických vlnovodů na polovodičovém podkladu metodou PACVD. Vlnovod je vlastně uhlíková či karbon-nitridová vrstva nanesená v PACVD aparatuře na vrstvu oxidu křemíku, která také poskytuje optické stínění a je připravena oxidací křemíkového waferu. Uhlík stejně tak jako karbon-nitrid byly získány reakcí metanu, metanu a dusíku nebo metanu a amoniaku v PACVD aparatuře. Vyrobené vrstvy byly prohlédnuty optickou elipsometrií a spektroskopií při 633 nm. Útlum nejlepších vzorků byl méně než 0,3 dB/cm. Také bylo zjištěno, že optické a mechanické vlastnosti vrstev vyrobených na kladné a záporné elektrodě jsou podstatně

rozdílné. Vrstvy nanesené na záporné elektrodě byly tvrdší a jejich index lomu byl vyšší než u vrstev nanesených na kladné elektrodě. Index lomu tvrdších vrstev se pohyboval v rozmezí 2,2 až 2,6, zatímco pro měkčí vrstvy 1,6 až 1,8. Také se dokázalo, že je v principu možné dopovat nanášené vrstvy ionty erbia, takže výsledné struktury mohou být použity jako aktivní vlnovody. Článek demonstruje jedno z mnoha využití aparatury PACVD, na kterém probíhalo nanášení vrstev probíhat.

2. Cíle disertační práce

Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu kompozitu CFRC dosud nebyly systematicky studovány a úpravy povrchu pro optimální interakci buňka-materiál budou předmětem této práce. Cestu ke zvýšení biokompatibility kompozitu CFRC (stejně jako jiných materiálů) by mohlo představovat například povlakování povrchu odolnými biokompatibilními vrstvami v kombinaci s dalšími úpravami jako jsou broušení, ozařovaní povrchu laserem či vytváření domén. Všechny uvažované modifikace směřují k optimalizaci struktury povrchu z hlediska adhese a růstu kostních buněk. Ačkoli budou modifikace povrchu prováděné na kompozitu CFRC, obdobné závěry je možné očekávat i na jiných materiálech, dnes již v lékařství běžně využívaných, například titan a jeho slitiny.

2.1 Plánovaný postup řešení dané problematiky

1. **Vývoj vhodné biokompatibilní vrstvy pro povlakování kompozitu CFRC**
    a. Volba kandidátů a vytvoření vzorků jejich depozicí na zvolený podklad
    b. Nasazení buněk na jednotlivé vzorky a jejich kultivace
    c. Vyhodnocení růstu buněk v několika časových horizontech
    d. Volba vhodné biokompatibilní vrstvy povlakování kompozitu CFRC
2. **Návrh modifikace povrchu kompozitu CFRC z hlediska adheze a proliferace buněčných kultur**
    a. Návrh plánu faktoriálního experimentu pro určení rozhodujících faktorů ovlivňujících biokompatibilitu kompozitu CFRC
    b. Výroba vzorků podle navrženého plánu experimentu, hodnocení struktury povrchu
    c. Provedení kultivace buněčných kultur a sběr dat
    d. Analýza experimentu, posouzení vlivu jednotlivých úprav povrchu kompozitu na jeho biokompatibilitu

Vzhledem k množství faktorů, které budeme při úpravách povrchu uvažovat a také vzhledem k tomu, že každý faktor bude mít až několik možných úrovní nastavení, bude experiment navržen za pomoci metod navrhování statistických experimentů (Design of Experiment) s využitím počítačové podpory dostupné v této oblasti.

3. Navrhování experimentů

Základním materiálem pro matematickou statistiku jsou data nesoucí informaci, kterou je třeba pomocí metod matematické statistiky vhodně zpracovat a využít. Neméně důležitá část je získávání dat v praxi, neboť ze špatných dat nelze učinit věrohodné závěry ani s pomocí těch nejsofistikovanějších statistických postupů. Jak připravovat sběr dat a jak je získávat se zabývá jedna z oblastí matematické statistiky, a to navrhování statistických experimentů [2]. Jedná se o oblast, jejímž obsahem je metodologie efektivního navrhování experimentů, z nichž lze získat objektivní závěry o sledovaných veličinách. Pokud je získávání informací o sledovaných veličinách zatíženo náhodnými chybami, zpracování dat metodami matematické statistiky je jediný objektivní přístup k vyhodnocení informace v datech obsažené.

Navrhování statistických experimentů se skládá ze dvou hlavních částí, a to z vlastního plánu experimentu a pak ze statistického vyhodnocení plánu, které na plánu experimentu bezprostředně závisí. Základem navrhování experimentů jsou dva principy, a to replikace a randomizace. Pod replikací se míní opakování experimentu. Toto opakování experimentu přináší experimentátorovi velice důležitou informaci o chybě experimentu a za druhé aritmetické průměry díky menším rozptylům dávají lepší odhady efektů jednotlivých faktorů, které jsou součásti experimentu. Randomizace je základní kámen, na kterém je založeno použití statistických metod pro vyhodnocování naměřených dat. Randomizace zaručuje, že rozložení experimentálního materiálu a pořadí, v jakém bude prováděno měření, jsou náhodná. Při aplikaci statistických metod se totiž vychází z předpokladu vzájemné nezávislosti jednotlivých měření, což lze právě zaručit s pomocí randomizace. Pomocí randomizace se též potlačuje dopad možných systematických vlivů, které se mohou projevit během experimentu.

Vyhodnocování navrženého experimentu končí rozhodnutím o existenci či neexistenci vlivu zkoumaných faktorů na sledované veličiny. Experimentem nazýváme ucelený souhrn pokusů či měření uspořádaných dle určitého schématu, kde právě uspořádání tohoto schématu je určujícím rysem. Pokusem se míní jedna zkouška či

měření provedené při určité kombinaci úrovní jednotlivých faktorů, jejichž vliv se sleduje. Výsledek pokusu je konkrétní hodnota sledované náhodné veličiny též zvané závislá proměnná či odezva. Na jakost výrobku působí celá řada různých veličin, které lze z hlediska navrhování experimentů rozdělit na náhodné a vymezitelné. Vymezitelnými veličinami míníme hlavně vstupy do výrobního procesu, kterým se v navrhování experimentů říká faktory. Náhodné vlivy (implicitní veličiny) způsobují variabilitu výsledků a jsou všudypřítomné. Faktorem je např. teplota, koncentrace, druh materiálu, dodavatel apod. Faktory mohou být kvantitativní či kvalitativní. Varianta faktoru vyjádřená bud' číselně u kvantitativního faktoru či slovně u kvalitativního faktoru se nazývá verzí faktoru. Když se sleduje vliv několika faktorů najednou, měření se provádějí pro různé kombinace jednotlivých verzí faktorů. Replikace tedy znamená opakování pokusu při zachování kombinace verzí faktorů. V některých případech jsou jednotlivé pokusy či měření uspořádány do bloků což jsou dílčí části celého experimentu, které mají většinou přirozené či logické opodstatnění.

Většinou se předpokládá, že variabilita měření uvnitř bloků je nižší nežli variabilita mezi bloky. Vliv faktoru se číselně vyjadřuje jako efekt faktoru, tj. rozdíl hodnoty odezvy odpovídající různým verzím faktoru. Faktory mohou být buď" pevné či náhodné, když verze faktoru jsou náhodně vybrány z množiny všech možných verzí faktoru. My se budeme především zabývat návrhy experimentů s pevnými faktory, protože tento přístup je v praxi nejčastější. Experiment se provádí postupně v několika cyklech; v první řadě je důležitější vyhledat nejpodstatnější faktory, které ovlivňují úrovně jakosti výrobků (*screening*). Po získání určitých informací se experiment opakuje již s vyloučením faktorů, které minimálně ovlivňují úroveň jakosti s novými verzemi klíčových faktorů popřípadě i s novými faktory.

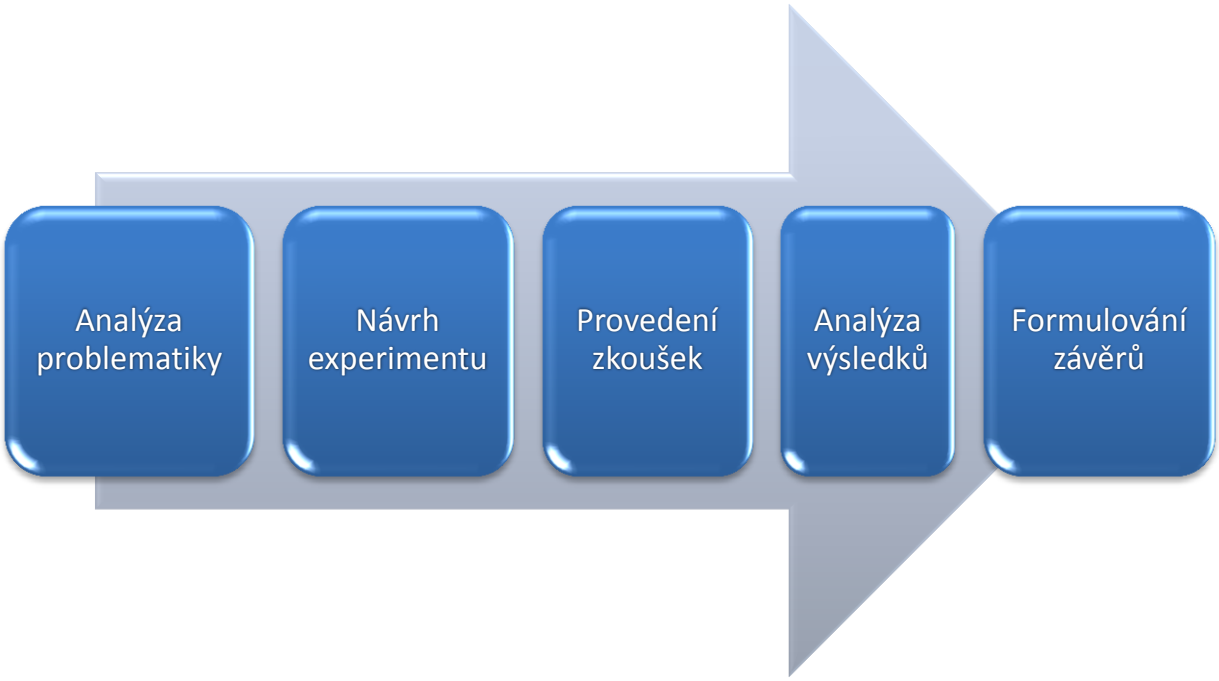
Dobrý návrh experimentu umožní rozdělit celkovou variabilitu odezvy na složky vyvolané působením jednotlivých faktorů, interakcí a rušivých složek a posoudit tak významnost jednotlivých příčin.

Jednotlivé fáze experimentu

Každý experiment lze rozdělit do následujících fází (Obr. 3.1):

Analýza problematiky (procesu)

Základní věcí, kterou je v první fázi experimentu nutno provést, je volba odezvy, tedy volba ukazatele případně ukazatelů, jejichž ovlivnění nejrůznějšími faktory chceme sledovat. Pokud se bavíme o problematice navrhování experimentů za účelem aktivního zlepšení procesů, může být odezva buď přímo charakteristikou jakosti procesu či s ní úzce souviset. Odezva je bud' spojitá náhodná veličina či diskrétní, udávající počet neshod či neshodných jednotek. Dále je nutno rozhodnout, které faktory budou zahrnuty do experimentu a jaké verze faktoru zvolíme. V prvním cyklu experimentu do něj všechny faktory zařadíme, jestliže se omezíme pouze na faktory statisticky významné. Jednotlivé úrovně faktorů volíme tak, aby skutečně bylo měřitelné rozlišení vlivů úrovní na odezvu. Není-li možno udržet faktor konstantní s pouze nepatrnými změnami během experimentu, je nutné jej považovat za blokový faktor, resp. za náhodný.



Obr. 3.1 – Přehled jednotlivých fází experimentu a jejich návaznosti

Návrh experimentu

Pak přichází na řadu vlastní návrh experimentu. Existuje celá řada návrhů experimentů a je nutné se při volbě, který použít, řídit časovou a finanční náročností tak,

aby navrhovaný experiment byl vhodným kompromisem všech omezujících veličin. Pokud jsou jednotlivé pokusy rozděleny do bloků, je předpokládáno, že uvnitř bloků pokusy vykazují větší homogenitu a nižší úroveň variability, nežli panuje mezi bloky. Cílem randomizace čili znáhodnění je zabránit směšování nějakého rušivého vlivu (např. teploty v místnosti, vlhkostí vzduchu, únavy obsluhy apod.) s působením zkoumaných faktorů či bloků. Příkladem znáhodnění je náhodný výběr, pořadí pokusů, náhodný výběr materiálu pro pokusy z jedné dávky. Když experiment probíhá v blocích, provádí se znáhodnění v rámci každého bloku.

Provedení zkoušek ve stanoveném pořadí

Zkoušky či měření se provedou ve stanoveném pořadí a výsledky se zaznamenávají dle předem připravených formulářů či s pomocí softwaru.

Analýza výsledků

Analýza výsledku úzce souvisí s formou navrženého experimentu. Provádí se vyhodnocování vlivu jednotlivých faktorů a jejich společného působení (interakcí). Cílem analýzy je vybrat ty faktory, které mají statisticky významný vliv na úroveň odezvy (znaku kvality). K tomu se používají metody testování hypotéz (t-test; F-test), metody analýzy rozptylu (ANOVA) či kovariance, regresní analýzy, optimalizační metody apod. Analýza rozptylu se používá k identifikování zdrojů variability v procesu a ke stanovení významu jejich jednotlivých faktorů. Jedná se o metodu testování hypotéz týkajících se středních hodnot. Jedná se o velmi rozšířenou statistickou metodu pro analyzování experimentálních dat. Analýza rozptylu je nástroj, který umožňuje porovnávat (testovat) několik středních hodnot najednou. Bylo by samozřejmě možné porovnávat každou dvojici různých středních hodnot zvlášť pomocí t-testu, ale tím se značně snižuje pravděpodobnost přijetí hypotézy o rovnosti středních hodnot, pokud tato hypotéza platí. Tuto problematiku právě ANOVA řeší, neboť porovnává všechny střední hodnoty najednou. Předmětem tohoto porovnání je stanovit podíl variability obsažené v datech, způsobené různým ošetřením, úrovněmi nebo faktory, ve srovnání s náhodnou variabilitou. Při vyhodnocování výsledků hraje nezastupitelnou roli výpočetní technika, pro kterou v poslední době existuje množství specializovaných softwarových nástrojů, které analýzu výsledků mohou usnadnit.

Závěry

Ze závěru experimentu by mělo vyplynout, které faktory či interakce mezi faktory mají rozhodující vliv na námi zvolenou odezvu (úroveň kvality), které úrovně rozhodujících kvantitativních znaků vedou k optimální hodnotě odezvy a naopak, které faktory, jsou irelevantní, takže u nich lze zmírnit např. tolerance, a tak snížit náklady.

3.1 Vybrané typy návrhů experimentů

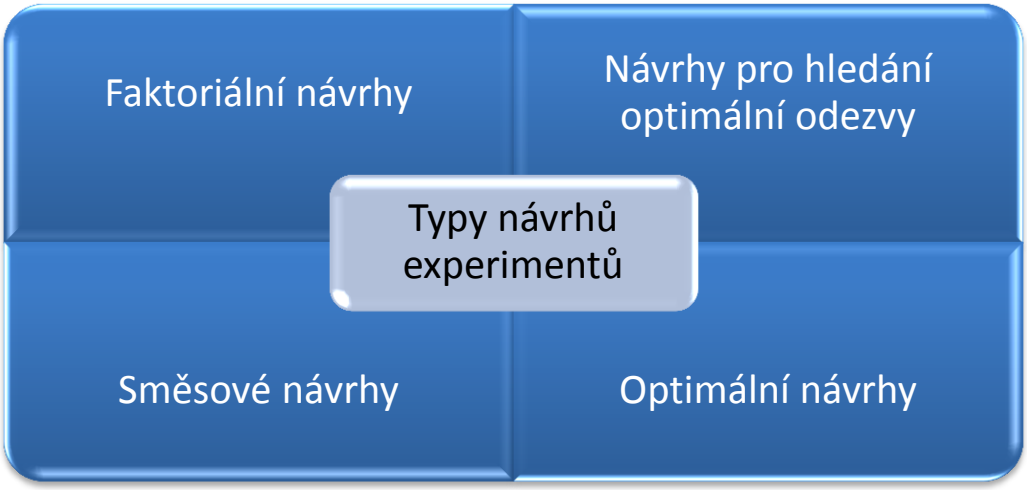
V praxi existuje celá řada návrhů experimentů, např. jednofaktoriální experimenty, úplné znáhodněné bloky, latinské čtverce, vícefaktoriální návrhy, Faktoriální návrhy typu 2^k, Box-Hunterovy návrhy, Plackett-Burmanovy návrhy, Taguchiho experimenty. Každý z nich je určen pro různý typ statistického zpracování a řešení problému. Vybranými typy návrhů se budu v další části zabývat. Obecně lze rozdělit návrhy experimentů do těchto čtyř skupin (Obr. 3.2):

A. Faktoriální návrhy. Ty slouží k identifikaci důležitých faktorů v experimentech.

B. Návrhy pro hledání optimální odezvy. Tyto návrhy jsou vhodné, pokud hledáme optimální kombinaci hodnot faktorů k dosažení optimální hodnoty odezvy.

C. Směsové návrhy. Tyto návrhy slouží k nalezení optimální směsi ingrediencí, které se podílejí na tvorbě odezvy. Zde se jedná obvykle o optimální procentuální zastoupení jednotlivých složek směsi, z nichž se vytváří výsledná veličina.

D. Optimální návrhy. Tyto návrhy jsou užitečné, pokud je k dispozici hodně informací a lze udat detailní specifikaci statistického modelu, který chceme testovat. Protože optimální testy jsou velice flexibilní, lze je použít v té situaci, kdy standardní návrhy jsou nevyhovující.



Obr. 3.2 - Obecné rozdělení typů návrhů experimentů

3.1.1 Jednofaktoriální experimenty

Tyto návrhy experimentů patří k nejjednodušším návrhům. Představme si, že chceme srovnat „a“ různých úrovní jednoho faktoru. Různé úrovně faktoru jsou jeho verzemi nebo též ošetřeními. Jednofaktoriální experimenty jsou též nazývány analýzou rozptylu s jednoduchým tříděním. Označme y_{ij} jako j-té pozorování při i-tém ošetření. Statistický model, který se používá k popisu jednofaktoriálních experimentů, má následující tvar:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \qquad (3.1)$$

pro $i = 1, 2, \ldots, a$; $j = 1, 2, \ldots, n_i$. Je-li $n_i = n$ pro všechna $i = 1, 2, \ldots, a$, hovoříme o homogenním neboli vyváženém experimentu. Parametr μ představuje úroveň společnou pro všechna ošetření, τ_i je parametr, který představuje vliv i-tého ošetření. Náhodné veličiny ε_{ij} jsou náhodné chyby a předpokládá se jejich vzájemná nezávislost a rozdělení $N(0; \sigma^2)$, kde parametr σ^2 udávající rozptyl je obecně též neznámý. Cílem je tedy ověřit hypotézy ohledně efektů a tyto efekty odhadnout. Dále se vyžaduje, aby se experiment prováděl náhodně, to je v náhodném pořadí, čímž se vylučuje či eliminuje vliv vnějších podmínek na provádění experimentu. Hovoříme pak o plně znáhodněném experimentu.

Výsledky experimentu lze sestavit do následující tabulky:

		Pozorování				
Ošetření	1	y_{11}	y_{12}	y_{13}	$\cdots$	y_{1n_1}
	2	y_{21}	y_{22}	y_{23}	$\cdots$	y_{2n_2}
	3	y_{31}	y_{32}	y_{33}	$\cdots$	y_{3n_3}
	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\cdots$	$\vdots$
	a	y_{a1}	y_{a2}	y_{a3}	$\cdots$	y_{an_a}

Úroveň faktoru, který je sledován, je udávána obvykle experimentátorem. Zde budeme uvažovat pevné úrovně faktoru, i když je možno na ně v některých situacích pohlížet, jako na náhodné veličiny. Hovoříme pak o náhodných faktorech. Užívá se označení "Model I" pro pevné faktory a "Model II" pro náhodné faktory. V případě, že se v modelu vyskytují oba typy faktorů, hovoříme o modelu smíšeném.

<u>ANOVA pro úplný jednofaktoriální experiment</u>

Vyjděme z modelu, který takový experiment popisuje:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \,, \tag{3.2}$$

kde τ_i jsou vlivy jednotlivých ošetření (verzí faktoru) a ε_{ij} náhodné chyby. Aby odhady parametrů τ_i, i = 1, 2, . . . , a, byly určeny normálními rovnicemi jednoznačně, je nutné provést tzv. reparametrizaci modelu, která spočívá v požadavku, aby např.

$$\sum_{i=1}^{a} \tau_i = 0 \,, \tag{3.3}$$

kdy tedy na τ_i pohlížíme jako na odchylky od celkového průměru μ. Zavedeme standardní označení:

$$\begin{aligned} y_{i.} &= \sum_{j=1}^{n} y_{ij} \,; & \bar{y}_{i.} &= \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} y_{ij} = \frac{y_{i.}}{n} \,; \\ y_{..} &= \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n} y_{ij} \,; & \bar{y}_{..} &= \frac{1}{an}\, y_{..} \,. \end{aligned} \tag{3.4}$$

Nás tedy zajímá otázka rovnosti ošetření τ_i , i = 1, 2, . . , a, nebo jejich rozdílnost. Jinými slovy chceme testovat hypotézu $H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \ldots \tau_a = 0$ proti obecné alternativě $H_1 : \tau_i \neq 0$ alespoň pro jedno i = 1, 2,. . , a. Rozbor se provádí tzv. analýzou rozptylu, což je rozklad celkové úrovně variability na jednotlivé části odpovídající jednotlivým ošetřením a náhodným chybám. Celkový součet čtverců má tvar

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}(y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 . \qquad (3.5)$$

Lze snadno ukázat, že

$$S_{TOT} = n\sum_{i=1}^{a}(\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2 + \sum_{i=1}^{a}\sum_{j}^{n}(y_{i\cdot j} - \bar{y}_{i.})^2 . \qquad (3.6)$$

Dvojná suma představuje součet čtverců odchylek jednotlivých měření y_{ij} od průměru v i-té třídě, to je tedy součet čtverců náhodných chyb a označíme jej S_E, kdežto druhý součet označený jako S_H představuje součet čtverců odchylek mezi ošetřeními či třídami. Máme tedy základní vztah $S_{TOT} = S_H + S_E$. (3.7)

Označme $N = a\cdot n$ celkový počet pozorování v našem experimentu. Pak suma S_{TOT} má (N - 1) stupňů volnosti, S_H má (a -1) stupňů volnosti a S_E má (N – a) stupňů volnosti. Bude-li σ^2 rozptyl náhodných chyb ε_{ij} , u nichž se předpokládá normální rozdělení, pak veličina S_{TOT}/σ^2 má χ^2-rozdělení s (N -1) stupni volnosti, rovněž tak S_E/σ^2 má χ^2-rozdělení s (N – a) stupni volnosti. Pokud platí hypotéza H_0, pak S_H/σ^2 má rovněž χ^2-rozdělení s (N - a) stupni volnosti. Dále jsou při platnosti hypotézy H_0 tyto součty navzájem stochasticky nezávislé. Takže, když platí H_0, pak podíl

$$F_0 = \frac{S_H/(a-1)}{S_E/(N-a)} = \frac{MS_H}{MS_E} , \qquad (3.8)$$

kde jsme označili

$$MS_H = \frac{S_H}{a-1} = , \qquad MS_E = \frac{S_E}{N-a} \qquad (3.9)$$

a nazvali průměrným součtem čtverců mezi třídami a průměrným čtvercem chyb, má F-rozdělení s (a - 1) a (N - a) stupni volnosti.

Dále lze ukázat, že střední hodnota MS_E je přímo σ^2, neboli

$$E\{MS_E\} = \sigma^2 \ , \tag{3.10}$$

kdežto střední hodnota MS_H splňuje vztah

$$E\{MS_H\} = \sigma^2 + \frac{n}{a-1}\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2 \ . \tag{3.11}$$

Z předchozího plyne, že při platnosti H_0 je rovněž

$$E\{MS_H\} = \sigma^2 \ , \tag{3.12}$$

kdežto při neplatnosti hypotézy H_0 je $E\{MS_H\} > \sigma^2$. Z tohoto vyplývá, že při větších hodnotách statistiky F_0 lze očekávat spíše porušení hypotézy H_0 a tedy hypotéza se zamítá na hladině významnosti α, když

$$F_0 > F(\alpha, a\text{-}1, N\text{-}a) \ , \tag{3.13}$$

kde $F(\alpha, a\text{-}1,N\text{-}a)$ je $(100 - \alpha)$ %-kvantil rozdělení $F(a - 1, N - a)$.

Jinak lze snadno spočítat, že lze taktéž psát

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n} y_{ij}^2 - \frac{1}{N} y_{..}^2 \ , \tag{3.14}$$

$$S_H = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a} y_{i.}^2 - \frac{1}{N} y_{..}^2 \tag{3.15}$$

a pak $S_E = S_{TOT} - S_H$.

Tabulka analýzy rozptylu

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F_0
Mezi třídami	S_H	a - 1	MS_H	MS_H / MS_E
Chyby (uvnitř tříd)	S_E	N - a	MS_E	
Celkový	S_{TOT}	N - 1		

Odhady parametrů modelu

Uvažujeme tedy model $y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$, kde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ a jsou navzájem nezávislé. Neznámé parametry jsou $\mu, \tau_1, \tau_2, \ldots, \tau_a$, tedy (a + 1) celkem.

Pro konstrukci odhadů se používá metoda nejmenších čtverců, čili se hledají takové hodnoty $\hat{\mu}, \hat{\tau}_1, \hat{\tau}_2, \ldots, \tau_a$, aby součet čtverců chyb

$$L = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}(y_{ij} - \mu - \tau_i)^2 \qquad (3.16)$$

byl minimální. Podmínka reparametrizace, aby $\sum_{i=1}^{a}\tau_i = 0$, pak dává jednoznačné řešení ve tvaru

$$\hat{\mu} = \bar{y}_{..}\,, \qquad (3.17)$$
$$\hat{\tau}_i = \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..}\,,\ i = 1, 2, \ldots, a\,.$$

Z praktického hlediska jsou velice důležité odhady rozdílů jednotlivých vlivů ošetření τ_i - τ_k, i, k = 1, 2, . . . , a, které se odhadují pomocí rozdílů průměrů v třídách $\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{k.}$. Rovněž jsou důležité odhady střední hodnoty i-tého ošetření, tedy parametru $\mu + \tau_i$ (tzv. efekt ošetření)

$$\hat{\mu}_i = \hat{\mu} + \hat{\tau}_i = \bar{y}_{..}\,. \qquad (3.18)$$

Jelikož platí, že $\bar{y}_i \sim N(\mu_i, \sigma^2/n)$, pak lze snadno stanovit i konfidenční interval s konfidenční úrovní (100 - α) % jako

$$\bar{y}_{i.} \pm t_{(\alpha/2, N-a)}\sqrt{MS_E/n} \qquad (3.19)$$

pro hodnotu $\mu_i = \mu + \tau_i$.

Parametrickým funkcím tvaru $\varphi = \sum_{i=1}^{a} c_i\tau_i$, kde $\sum_{i=1}^{a} c_i = 0$, říkáme kontrasty. Mezi ně patří i funkce již zmíněné $\varphi_{ik} = \tau_i - \tau_k$, které nazýváme elementárními kontrasty. Odhady kontrastů mají velice jednoduchý tvar, neboť - jak snadno zjistit - platí

$$\hat{\varphi} = \sum_{i=1}^{a} c_i\hat{\tau}_i\,. \qquad (3.20)$$

Je samozřejmě možné uvažovat též nevyvážený případ jednofaktoriálního návrhu, když není ve třídách stejný počet pozorování, ale v i-tém bloku či třídě je obecně n_i po-

zorování. Pak situace v analýze rozptylu je analogická jako v případě $n_i = n$ pro každé $i = 1, 2, \ldots, a$. Ve výpočtu odpovídajících součtů čtverců jsou pouze nepatrné změny. Zde

$$N = \sum_{i=1}^{a} n_i \,, \tag{3.21}$$

pak

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n} y_{ij}^2 - \frac{1}{N} y_{..}^2 \tag{3.22}$$

a

$$S_H = \sum_{i=1}^{a} \frac{1}{n_i} y_{i.}^2 - \frac{1}{n} y_{..}^2 \,. \tag{3.23}$$

Podmínka reparametrizace z důvodů jednoznačnosti existence odhadů parametrů metodou nejmenších čtverců je pak

$$\sum_{i=1}^{a} n_i \tau_i = 0 \,. \tag{3.24}$$

Síla testu o hypotéze H_o v analýze rozptylu

Síla testu nějaké statistické hypotézy se vypočítává jako doplněk do jedničky od tzv. chyby druhého druhu β. Chyba 2. druhu β je vlastně pravděpodobnost, že hypotéza H_0 sice neplatí, ale přesto je přijata, čili

$$\beta = P\{\text{přijetí Ho} \mid \text{Ho neplatí}\}.$$

Pak

$$1 - \beta = P\{\text{zamítnutí Ho} \mid \text{Ho neplatí}\}.$$

V našem případě s analýzou rozptylu pro jeden faktor o a úrovních to znamená, že

$$1 - \beta = P\{F_0 > F_{(\alpha;\, a-1;N-a)} \mid H_0 \text{ neplatí}\}.$$

Když hypotéza H_0 neplatí, pak statistika F_0 má tzv. necentrální F-rozdělení o (a - 1) a (N - a) stupních volnosti. V jeho rozdělení vystupuje tzv. parametr necentrality δ, kde při $\delta = 0$ toto rozdělení přechází v obvyklé F-rozdělení. Parametr necentrality δ zde úzce souvisí s parametrem ϕ, kde

$$\phi = \frac{n}{a\sigma^2} \sum_{i=1}^{a} \tau_i^2 \,. \tag{3.25}$$

Pokud by např. v modelu platilo, že $\tau_i^2 / \sigma^2 = 1$, i = 1, 2, . . . , a, kde a = 5, pak při $\alpha = 0{,}01$ pro n = 4 (počet pozorování v rámci jednoho ošetření) máme $1 - \beta = 0{,}62$; při n = 5 je $1 - \beta = 0{,}82$ a při n = 6 je $1 - \beta = 0{,}94$. Z toho vyplývá, že pokud chceme mít test o rovnosti ošetření silný alespoň na úrovní 94 %, pak je nutno v tomto konkrétním návrhu pro každé ošetření provést minimálně 6 měření.

Testování rovnosti několika rozptylů

Představme si, že máme celkem a tříd různých pozorování, např. každá třída je jinak ošetřena, a chceme zjistit, zdali mají stejné rozptyly, tzn.

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \ldots = \sigma_a^2 \tag{3.26}$$

a

H_1 : existuje alespoň jedno σ_i^2 různé od ostatních.

Pokud naše pozorování jsou normálně rozdělena, lze použít tzv. Bartlettův test, který je založen na výběrových rozptylech

$$S_i^2 = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}(y_{ij} - \bar{y}_{i.}) , \quad i = 1, 2, \ldots, a . \tag{3.27}$$

Spočteme

$$S_p^2 = \frac{1}{N-a}\sum_{i=1}^{a}(n-1)S_i^2 , \tag{3.28}$$

dále určíme

$$q = (N-a)\ln S_p^2 - \sum_{i=1}^{a}(n-1)\ln S_i^2 , \tag{3.29}$$

$$c = 1 + \frac{a+1}{3a(n-1)} .$$

Sledovaná statistika je

$$\chi_0^2 = 2{,}3026 q / c , \tag{3.30}$$

která při platnosti H_0 má rozdělení snadno aproximovatelné χ^2-rozdělením o (a - 1) stupních volnosti. Hypotéza H_0 se tedy zamítá, když

$$\chi_0^2 > \chi_{(\alpha;a-1)}^2 , \tag{3.31}$$

přičemž $\chi^2_{(\alpha;a-1)}$ je (100 - α)%-kvantil rozdělení χ^2 o (a - 1) stupních volnosti.

V případě, že výchozí měření se těžko popisují normálním rozdělením, je vhodnější použít jiné testy, např. tzv. neparametrické testy.

3.1.2 Úplné znáhodněné bloky

V některých případech je nutno rozdělit úplný jednofaktoriální experiment na několik částí (bloků), které pak de facto vystupují jako další faktor (blokový faktor), jenž má tolik verzí, kolik je bloků. Takovými bloky mohou být směny, stroje, operátoři, provedení experimentu v různých dnech apod., tedy je zřejmé, že tyto faktory, i když nás v experimentu nezajímají, mohou mít vliv na změnu podmínek, při nichž je experiment prováděn.

Takovýto model se dá popsat následujícím schématem:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} , \tag{3.32}$$

i = 1; 2, . . . , a, j = 1, 2, . . . , b, e_{ij} ~ N(0, σ^2) nezávislé, kde písmeno a představuje počet ošetření (úrovně sledovaného faktoru, v našem případě a = 4. čtyři typy ostří); písmeno b představuje počet bloků, v našem případě b = 4, čtyři vzorky. na nichž se budou měření provádět. Protože ošetření i blokové efekty lze definovat jako odchylky od nuly díky obecnému průměru μ, (intercept), lze požadovat, aby

$$\sum_{i=1}^{a} \tau_i = 0 , \quad \sum_{j=1}^{b} \beta_j = 0 \tag{3.33}$$

(tzv. podmínka reparametrizace). Především se zajímáme o testování hypotézy, že úrovně ošetření jsou stejné, tj.

$$H_0 : \mu_1 = \mu 2 = \cdots = \mu_a \tag{3.34}$$

proti alternativní hypotéze

$$H_1 : \mu_i \neq \mu_j \quad \text{alespoň pro jednu dvojici i , j .}$$

Vlastní vyhodnocení experimentu se provádí opět pomocí analýzy rozptylu, která buď hypotézu o rovnosti nezamítne, nebo naopak zamítne. Pak sledovaný faktor má vliv na chování responzní veličiny.

Anova pro jednofaktoriální experiment rozdělený do úplných bloků

Zaveďme označení:

$$y_{i\cdot} = \sum_{j=1}^{b} y_{ij} , \qquad i = 1, 2, \ldots, a , \tag{3.35}$$

$$y_{\cdot j} = \sum_{i=1}^{a} y_{ij} , \qquad i = 1, 2, \ldots, b , \tag{3.36}$$

$$y_{\cdot\cdot} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} y_{ij} = \sum_{i=1}^{a} y_{i\cdot} = \sum_{j=1}^{b} y_{\cdot j} , \tag{3.37}$$

$$\bar{y}_{i\cdot} = \frac{y_{i\cdot}}{b} , \qquad \bar{y}_{\cdot j} = \frac{y_{\cdot j}}{a} , \tag{3.38}$$

$$\bar{y}_{\cdot\cdot} = \frac{y_{\cdot\cdot}}{N} ,$$

kde $N = ab$ je celkový počet měření. Označme dále

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} (y_{ij} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2 . \tag{3.39}$$

Pak lze psát následující rozklad:

$$S_{TOT} = b\sum_{i=1}^{a}(\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2 + a\sum_{j=1}^{b}(\bar{y}_{\cdot j} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2 + \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(y_{ij} - \bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot j} + \bar{y}_{\cdot\cdot})^2 , \tag{3.40}$$

neboli

$$S_{TOT} = S_H + S_{BLOK} + S_E . \tag{3.41}$$

Celkový součet S_{TOT} má $N - 1$ stupňů volnosti, S_H má $a - 1$ stupňů volnosti, S_{BLOK} má $b - 1$ stupňů volnosti a na součet chyb zbývá tedy celkem $(a-1)(b-1)$ stupňů volnosti. Pokud chyby jsou normálně rozdělené, pak S_H / σ^2, S_{BLOK} / σ^2 a S_E / σ^2 jsou vzájemně nezávislé kvadratické formy s χ^2-rozdělením. Dále platí

$$E\left\{\frac{S_H}{(a-1)}\right\} = \sigma^2 + \frac{b\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2}{a-1} , \tag{3.42}$$

$$E\left\{\frac{S_{BLOK}}{(b-1)}\right\} = \sigma^2 + \frac{a\sum_{j=1}^{b}\beta_j^2}{b-1} , \tag{3.43}$$

$$E\left\{\frac{S_E}{(a-1)(b-1)}\right\} = \sigma^2 . \tag{3.44}$$

To znamená, že pro test hypotézy H_0 proti alternativě H_1 je rozumné použít podíl

$$F_0 = \frac{S_H (a-1)(b-1)}{S_E (a-1)} , \qquad (3.45)$$

který má při platnosti hypotézy H_0, tj. $\sum_{i=1}^{a} \tau_i^2 = 0$, F-rozdělení s [(a-1); (a-1) (b-1)] stupni volnosti, čili hypotéza H_0 se zamítá na hladině významnosti α, když

$$F_0 > F_{\alpha;\,(a-1);\,(a-1)(b-1)} , \qquad (3.46)$$

kde $F_{\alpha;\,(a-1);\,(a-1)(b-1)}$ je kritická hodnota F-rozdělení na hladině α.

Samozřejmě, že lze též testovat významnost bloků, tj. hypotézu

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \ldots = \beta_a = 0 \qquad (3.47)$$

proti alternativě H_1 : alespoň jedno $\beta_j \neq 0$. Zde použijeme statistiku

$$F_0 = \frac{S_{BLOK}}{S_E} \frac{(a-1)(b-1)}{(b-1)} , \qquad (3.48)$$

která za platnosti H_0 má F-rozdělení se [(b-1), (a-1)/(b-1)] stupni volnosti. Pokud by hypotéza nebyla zamítnuta, lze považovat blokové efekty za zanedbatelné a nebylo tedy nutné členit experiment do bloků.

Tabulka analýzy rozptylu

Zdroj variability	Součty čtverců	Stupně volnosti	F_0
Ošetření	$S_H = \sum_{i=1}^{a} \frac{y_{i\cdot}^2}{b} - \frac{y_{\cdot\cdot}^2}{N}$	a - 1	$\frac{S_H (a-1)(b-1)}{S_E (a-1)}$
Bloky	$S_{BLOK} = \sum_{j=1}^{b} \frac{y_{\cdot j}^2}{a} - \frac{y_{\cdot\cdot}^2}{N}$	b - 1	
Chyby	$S_E = S_{TOT} - S_H - S_{BLOK}$	(a - 1)(b - 1)	
Celkový	$\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} y_{ij}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot}^2}{N}$	ab - 1	

Analýza reziduí modelu

V uvažovaném modelu úplných znáhodněných bloků se předpokládá, že chyby modelu $\{e_{ij}\}$ jsou vzájemně nezávislé a normálně rozdělené $N(0, \sigma^2)$. Odhady těchto chyb, neboli rezidua modelu, získáme ze součtu S_E, tj.

$$\hat{\varepsilon}_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{.j} + \bar{y}_{..} \ . \tag{3.49}$$

Pokud náš model je adekvátní a dobře vystihuje situaci, pak by tato rezidua měla mít rozdělení $N(0, \sigma^2)$ a měla by být nezávislá. O tom se lze přesvědčit např. pomocí testů dobré shody pro normální rozdělení (χ^2-test či Kolmogorov-Smirnovův test) a vzájemnou nezávislost lze testovat pomocí neparametrických testů pro nezávislost či Ljung-Boxovým testem.

Odhady parametrů modelu

V uvažovaném modelu máme celkem tyto neznámé parametry: μ, τ_1, τ_2, ... , τ_a, β_1, β_2, ... , β_b, a σ^2. Tyto parametry budeme odhadovat pomocí metody nejmenších čtverců, tj. chceme, aby

$$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(y_{ij} - \mu - \tau_i - \beta_j)^2 = \min, \tag{3.50}$$

což za podmínky tzv. reparametrizace $\sum_{i=1}^{a} \tau_i = \sum_{j=1}^{b} \beta_j = 0$ vede k jednoznačně určeným odhadům

$$\begin{aligned} \hat{\mu} &= \bar{y}_{..} , \\ \hat{\tau}_i &= \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..} \quad \text{pro} \quad i = 1, 2, \ldots, a , \\ \hat{\beta}_j &= \bar{y}_{.j} - \bar{y}_{..} \quad \text{pro} \quad j = 1, 2, \ldots, b , \\ \hat{\sigma}^2 &= \frac{S_E}{(a-1)(b-1)} \ . \end{aligned} \tag{3.51}$$

Vysvětlující účinnost modelu se vyjadřuje podílem

$$R^2 = \frac{S_{MODEL}}{S_{TOT}} \ , \tag{3.52}$$

kde

Čím je R^2 blíže k jedničce, tím je model lepší.

3.1.3 Vícefaktoriální návrhy

Mnoho experimentů má za vstupy více faktorů než pouze jeden. Cílem faktoriálních návrhů je navrhnout takové uspořádání pokusů či měření, které by co nejlépe postihlo vlivy jednotlivých faktorů, popř. i jejich interakcí na sledovanou veličinu. Při úplných faktoriálních experimentech uvažujeme provedení všech možných kombinací úrovní sledovaných faktorů. Pokud tedy budeme mít dva faktory A, B o a a b úrovních, tak celkový počet všech kombinací je právě součin $a \bullet b$.

U faktoriálních návrhů se běžně používá následující názvosloví. Efektem faktoru se míní změna ve sledování závislé proměnné (v měřeních či pokusech), která je odezvou na změnu v úrovních faktoru.

Představme si nejjednodušší faktoriální návrh o dvou faktorech A, B a dvou úrovních A_1, A_2 a B_1, B_2. Schematicky lze takovýto návrh vyjádřit následující tabulkou:

	B_1	B_2
A_1	ab_{11}	ab_{12}
A_2	ab_{21}	ab_{22}

s výsledky měření $\{ab_{ij}\}$ pro $i, j = 1, 2$. Hlavní efekt faktoru A se pak odhaduje pomocí

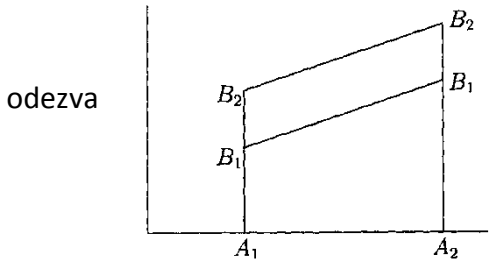
$$\hat{A} = \frac{ab_{21} + ab_{22}}{2} - \frac{ab_{11} + ab_{12}}{2} \; ; \qquad (3.53)$$

analogicky pro faktor B

$$\hat{B} = \frac{ab_{12} + ab_{22}}{2} - \frac{ab_{11} + ab_{21}}{2} \; . \qquad (3.54)$$

Při některých experimentech lze zjistit, že rozdíl v odezvě mezi dvěma úrovněmi faktoru není stejný pro všechny úrovně ostatních faktorů. Když tento jev nastane, hovoříme o interakci mezi faktory, dvěma či více. Např. když by se dramaticky lišila čísla $ab_{21} - ab_{11}$, což je při úrovni B_1 faktoru B od $ab_{22} - ab_{12}$, které je získáno jako rozdíl při úrovni B_2 faktoru B, pak lze usuzovat na existenci interakce mezi faktory A a B. Když si tuto situaci zobrazíme graficky, pak mezi faktory A, B nebude existovat interakce, když nakreslené součty budou "rovnoběžné". Pokud se budou úsečky "křížit", pak lze usuzovat

na existenci interakce mezi faktory A a B. Toto hodnocení je ovšem subjektivní a lze jej brát pouze jako orientační (viz obrázek 3.3).



Obr. 3.3 – Grafické zobrazení interakce mezi faktory

Pokud lze předpokládat, že existují interakce mezi faktory, pak faktoriální návrh je jedinou možností, jak toto postihnout a analyzovat. V tom je velká výhoda faktoriálních návrhů oproti ostatním návrhům. Na druhou stranu jejich nevýhodou může být celkový počet pozorování, který teoreticky při n faktorech se stejným počtem úrovní k je kn .

<u>ANOVA pro úplný dvoufaktoriální experiment</u>

Nejdříve si rozebereme faktoriální experiment pouze se dvěma faktory. Nechť faktor A má a úrovní, faktor B má b úrovní a nechť při každé kombinaci úrovní máme n replik experimentu. Takovýto pokus lze popsat následujícím modelem:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad , \tag{3.55}$$

kde i = 1, 2, . . . , a; j = 1, 2, . . . , b; k = 1, 2, . . . , n; přičemž ε_{ijk} jsou náhodné chyby nezávislé navzájem a s rozdělením $N(0, \sigma^2)$. Člen $(\tau\beta)_{ij}$ v modelu odpovídá možné interakci mezi faktory A a B.

Z důvodů jednoznačnosti odhadů neznámých parametrů μ , τ_i , β_j , $(\tau\beta)_{ij}$ při použití metody nejmenších čtverců, je nutno položit tzv. reparametrizační podmínky

$$\sum_{i=1}^{a} \tau_i = \sum_{j=1}^{b} \beta_j = 0 , \tag{3.56}$$

$$\sum_{i=1}^{a} (\tau\beta)_{ij} = 0 \text{ pro } , \; j = 1, 2, \ldots, b , \tag{3.57}$$

$$\sum_{j=1}^{b} (\tau\beta)_{ij} = 0 \text{ pro } , \; i = 1, 2, \ldots, a . \tag{3.58}$$

Celkový počet pozorování v experimentu je $N = a \bullet b \bullet n$.

Pro další označme:

$$y_{i..} = \sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk}\,; \qquad \bar{y}_{i..} = \frac{1}{bn} y_{i..} \quad \text{pro} \quad i = 1, 2, \ldots, a\,; \tag{3.59}$$

$$y_{.j.} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk}\,; \qquad \bar{y}_{.j.} = \frac{1}{an} y_{.j.} \quad \text{pro} \quad j = 1, 2, \ldots, b\,;$$

$$y_{ij.} = \sum_{k=1}^{n} y_{ijk}\,; \qquad \bar{y}_{ij.} = \frac{1}{n} y_{ij.} \quad \text{pro} \quad i = 1, 2, \ldots, a\,;\ j = 1, 2, \ldots, b\,;$$

$$y_{...} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk}\,; \qquad \bar{y}_{...} = \frac{1}{abn} y_{...}\,.$$

Pak celkový součet čtverců $S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n}(y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2$ se dá rozložit na součet součtů čtverců

$$S_{TOT} = bn\sum_{i=1}^{a}(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})^2 + an\sum_{j=1}^{b}(\bar{y}_{.j.} - \bar{y}_{...})^2 + n\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...})^2 +$$

$$+ \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n}(y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})^2 \quad , \tag{3.60}$$

což lze vyjádřit jako

$$S_{TOT} = S_A + S_B + S_{AB} + S_E\,. \tag{3.61}$$

Zde je nutno požadovat, aby $n \geq 2$. Co se týče stupňů volnosti, pak S_{TOT} má (nab - 1) stupňů volnosti, S_A má a - 1, S_B má b - 1 a S_{AB} má (a - 1) (b - 1) stupňů volnosti. Na součet čtverců chyb S_E pak zbývá ab(n - 1) stupňů volnosti. Lze odvodit, že součty S_A, S_B, S_{AB} a S_E po dělení parametrem rozptylu σ^2 jsou vzájemně nezávislé a mají χ^2-rozdělení s výše uvedenými stupni volnosti. Dále lze zjistit, že

$$E\left\{\frac{S_A}{a-1}\right\} = \sigma^2 + \frac{bn}{a-1}\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2\,, \tag{3.62}$$

$$E\left\{\frac{S_B}{b-1}\right\} = \sigma^2 + \frac{an}{b-1}\sum_{j=1}^{b}\beta_j^2\,, \tag{3.61}$$

$$E\left\{\frac{S_{AB}}{(a-1)(b-1)}\right\} = \sigma^2 + \frac{n}{(a-1)(b-1)}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(\tau\beta)_{ij}^2\,, \tag{3.62}$$

$$E\left\{\frac{S_E}{ab(n-1)}\right\} = \sigma^2\,. \tag{3.63}$$

Pro testování hypotézy $H_0 : \tau_i = 0$, $i = 1, 2, \ldots, a$ (čili není patrný vliv faktoru A), resp. $H_0 : \beta_j = 0$, $j = 1, 2, \ldots, b$ (není patrný vliv faktoru B), resp. $H_0 : (\tau\beta)_{ij} = 0$, $i = 1, 2, \ldots, a$; $j = 1, 2, \ldots, b$ (není patrný vliv interakce) proti odpovídajícím alternativám je tedy vhodné vzít odpovídající podíly

$$F_0 = \frac{S_A}{a-1} \cdot \frac{ab(n-1)}{S_E} , \tag{3.64}$$

resp.

$$F_0 = \frac{S_B}{b-1} \cdot \frac{ab(n-1)}{S_E} , \tag{3.65}$$

resp.

$$F_0 = \frac{S_{AB}}{(a-1)(b-1)} \cdot \frac{ab(n-1)}{S_E} , \tag{3.66}$$

které při platnosti odpovídající hypotézy H_0 mají F-rozdělení s odpovídajícími stupni volnosti. Hypotéza H_0 se zamítá, když hodnota statistiky F_0 překročí odpovídající kritickou hodnotu.

Jinak lze odpovídající součty S_{TOT}, S_A, S_B, S_{AB} a S_E vyjádřit přijatelnějšími výrazy, a to

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk}^2 - \frac{1}{abn} y_{\ldots}^2 , \tag{3.67}$$

$$S_A = \frac{1}{an}\sum_{i=1}^{a} y_{i\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{abn} y_{\ldots}^2 , \tag{3.68}$$

$$S_B = \frac{1}{bn}\sum_{j=1}^{b} y_{\cdot j\cdot}^2 - \frac{1}{abn} y_{\ldots}^2 , \tag{3.69}$$

$$S_{AB} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} y_{ij\cdot}^2 - \frac{1}{bn}\sum_{i=1}^{a} y_{i\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{abn} y_{\ldots}^2 - S_A - S_B , \tag{3.70}$$

$$S_E = S_{TOT} - S_A - S_B - S_{AB} ,$$

neboli

$$S_E = S_{TOT} - \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} y_{ij\cdot}^2 + \frac{1}{abn} y_{\ldots}^2 . \tag{3.71}$$

Odhady parametrů modelu

Vyřešením tzv. normálních rovnic, které dostaneme diferencováním součtu čtverců chyb po aplikaci metody nejmenších čtverců, získáme následující odhady:

$$\begin{aligned}
\hat{\mu} &= \bar{y}_{...}\,, \\
\hat{\tau}_i &= \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...} \quad \text{pro} \quad i = 1, 2, \ldots, a\,, \\
\hat{\beta}_j &= \bar{y}_{.j.} - \bar{y}_{...} \quad \text{pro} \quad j = 1, 2, \ldots, b\,, \\
\widehat{(\tau\beta)} &= \bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...} \quad \text{pro} \quad i = 1, 2, \ldots, a;\ j = 1, 2, \ldots, b\ .
\end{aligned} \tag{3.72}$$

Charakteristiky necentrality u faktorů a jejich interakce, tj. veličiny

$$\begin{gathered}
\frac{bn}{a\sigma^2}\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2\ ,\quad \frac{an}{b\sigma^2}\sum_{j=1}^{b}\beta_j^2\ , \\
\frac{n}{\sigma^2\left[(a-1)(b-1)+1\right]}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(\tau\beta)_{ij}^2
\end{gathered} \tag{3.73}$$

hrají podstatnou roli při zjišťování síly použitého testu.

3.1.4 Obecný případ faktoriálního návrhu

Mějme tedy konečný počet faktorů A, B, C, . . . , K, z nichž faktor A má a úrovní; faktor B má b úrovní, atd. až faktor K má k úrovní. Nechť je celkem n replik experimentu; tj. v rámci celého experimentu máme dohromady N = n·a·b pozorování. Jak vypadá odpovídající statistický model si pro jednoduchost ukážeme na konkrétním příkladu se třemi faktory A, B, C. Model má tvar

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}\ ,$$

kde i = 1, 2,...., a; j = 1, 2,...,b; k = 1,2,...,c; l = 1, 2;....n . Pak

$$S_{TOT} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c}\sum_{\ell=1}^{n} y_{ijk\ell}^2 - \frac{1}{abcn}y_{....}^2\ . \tag{3.74}$$

<u>ANOVA pro úplný třífaktoriální experiment</u>

Součty čtverců pro hlavní efekty pak mají následující tvary:

$$S_A = \frac{1}{bcn}\sum_{i=1}^{a} y_{i\cdot\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 , \tag{3.75}$$

$$S_B = \frac{1}{acn}\sum_{j=1}^{b} y_{\cdot j\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 , \tag{3.76}$$

$$S_C = \frac{1}{abn}\sum_{k=1}^{c} y_{\cdot\cdot k\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 . \tag{3.77}$$

Dále je nutno stanovit součty čtverců pro interakce 2. řádu AB, BC, a AC.

$$S_{AB} = \frac{1}{cn}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} y_{ij\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 - S_A - S_B , \tag{3.78}$$

$$S_{BC} = \frac{1}{an}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c} y_{\cdot jk\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 - S_B - S_C , \tag{3.79}$$

$$S_{AC} = \frac{1}{bn}\sum_{i=1}^{a}\sum_{k=1}^{c} y_{i\cdot k\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 - S_A - S_C . \tag{3.80}$$

Pro součet čtverců příslušejících jediné interakci 3. řádu ABC má vzorec následující tvar

$$S_{ABC} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c} y_{ijk\cdot}^2 - \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 - S_A - S_B - S_C - S_{AB} - S_{AC} - S_{BC} . \tag{3.81}$$

Součet čtverců pro odhad rozptylu chyb σ^2 se získá pomocí vzorce

$$S_E = S_{TOT} - \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c} y_{ijk\cdot}^2 + \frac{1}{abcn} y_{\cdot\cdot\cdot\cdot}^2 . \tag{3.82}$$

Následující tabulka analýzy rozptylu poskytuje schéma pro výpočet statistik, které pomocí F-testu určují, který faktor či která interakce jsou statisticky významné.

Tabulka ANOVA pro třífaktoriální experiment

Zdroj variability	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný součet čtverců	Střední hodnota průměrného součtu čtverců	F-test (F_0)
A	SS_A	a - 1	MS_A	$\sigma^2 + \frac{bcn}{a-1}\sum \tau_i^2$	MS_A / MS_E
B	SS_B	b - 1	MS_B	$\sigma^2 + \frac{acn}{b-1}\sum \beta_j^2$	MS_B / MS_E
C	SS_C	c - 1	MS_C	$\sigma^2 + \frac{abn}{c-1}\sum \gamma_k^2$	MS_C / MS_E
AB	SS_{AB}	(a-1)(b-1)	MS_{AB}	$\sigma^2 + \frac{cn}{(a-1)(b-1)}\sum\sum (\tau\beta)_{ij}^2$	MS_{AB} / MS_E
AC	SS_{AC}	(a-1)(c-1)	MS_{AC}	$\sigma^2 + \frac{bn}{(a-1)(c-1)}\sum\sum (\tau\gamma)_{ik}^2$	MS_{AC} / MS_E
BC	SS_{BC}	(b-1)(c-1)	MS_{BC}	$\sigma^2 + \frac{an}{(b-1)(c-1)}\sum\sum (\beta\gamma)_{jk}^2$	MS_{BC} / MS_E
ABC	SS_{ABC}	(a-1)(b-1)(c-1)	MS_{ABC}	$\sigma^2 + \frac{n}{(a-1)(b-1)(c-1)}\sum\sum\sum (\tau\beta\gamma)_{ijk}^2$	MS_{ABC} / MS_E
Chyba	SS_E	abc(n-1)	MS_E	σ^2	
Celkem	SS_{TOT}	ancn-1			

4. Hodnocení a parametry struktury povrchu

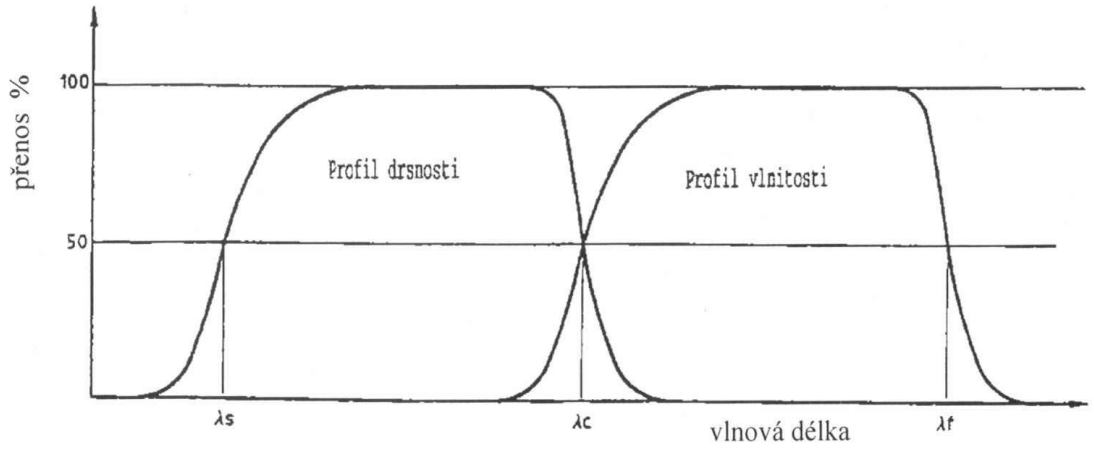
Struktura povrchu jsou opakované nebo náhodné úchylky od geometrického povrchu, které tvoří třírozměrnou topografii povrchu. Struktura zahrnuje drsnost, vlnitost, stopy po obrábění, nedokonalosti a úchylky tvaru na omezené ploše povrchu [1].

Pojem „omezená plocha povrchu" není blíže specifikován a je zřejmě limitován možnostmi přístrojů na měření struktury (profiloměry), resp. jejich měřicím rozsahem. Při hodnocení jsou i nadále respektovány možnosti měřicí techniky a redukce plochy (3D) na profil (2D). Profil je průsečnice skutečného povrchu a dané roviny. V praxi se obvykle volí rovina kolmá k rovině rovnoběžné se skutečným povrchem ve vhodném směru, většinou kolmém na převládající směr nerovností. Souřadnicový systém, ve kterém jsou definovány parametry struktury povrchu, je vytvořen osami pravotočivé kartézské soustavy: osa X ve směru snímání (střední čáry), osa Y je také na skutečném povrchu a osa Z směřuje z povrchu, tj. z materiálu do okolního prostředí. Tato konvence byla mezinárodně přijata. Filtr profilu je definován jako filtr, který rozděluje profil na krátkovlnné a dlouhovlnné složky. V přístrojích na měření struktury jsou rozlišovány 3 druhy filtrů. Mají stejné přenosové charakteristiky, ale rozdílné hodnoty mezní vlnové délky, též označované cut-off. Rozdělení struktury a systém filtrace je na obr. 4.1:

***λs* filtr** profilu definuje rozhraní mezi drsností a kratšími složkami vln profilu.

***λc* filtr** profilu definuje rozhraní mezi složkami drsnosti a vlnitosti

***λf* filtr** profilu definuje rozhraní mezi vlnitosti a delšími složkami vln



Obr.4.1- Přenos profilů drsnosti a vlnitosti

Výstupem po aplikaci uvedeného principu filtrace jsou 3 profily:

Základní profil (P - profil): úplný profil po aplikaci krátkovlnného filtru λs. Je základem pro hodnocení parametrů základního profilu.

Profil drsnosti (R - profil): profil odvozený ze základního profilu potlačením dlouhovlnných složek použitím filtru λc. Profil je záměrně pozměněn a je základem pro hodnocení parametrů drsnosti.

Profil vlnitosti (W - profil): profil odvozený postupnou aplikací filtrů λf a λc na základní profil, potlačující dlouhovlnné složky filtrem λf a krátkovlnné složky filtrem λc. Profil je záměrně pozměněn a je základem pro hodnocení parametrů vlnitosti.

Pro vyhodnocování jednotlivých profilů a jejich parametrů je používán mezinárodně přijatý systém středních čar profilu (M - systém), v rozšířeném pojetí nazývaný též systémem středních prvků. V tomto systému jsou definovány: střední čára základního profilu, střední čára profilu drsnosti a střední čára profilu vlnitosti.

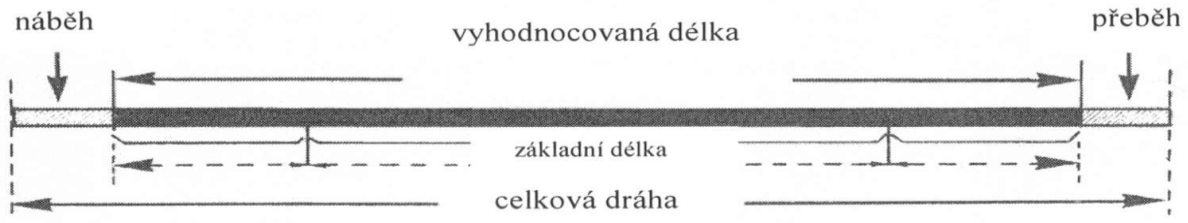
Základní délka je délka ve směru osy X, použitá pro rozpoznání nerovností charakterizujících vyhodnocovaný profil. Bývá též označována jako mezní vlnová rozteč, resp. cut - off. Pro jednotlivé profily jsou definovány:

lp - základní délka pro základní profil, je rovna vyhodnocované délce

lr - základní délka pro profil drsnosti, číselně rovná zvolené vlnové délce filtru λc

lw - základní délka pro profil vlnitosti, číselně rovná zvolené vlnové délce filtru λf.

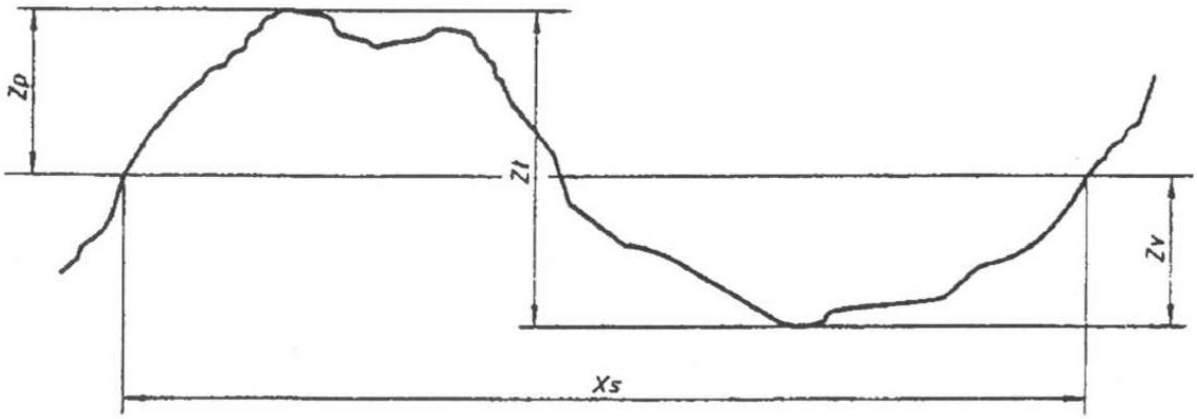
Vyhodnocovaná délka ln je délka ve směru osy X, použitá pro posouzení vyhodnocovaného profilu. Může obsahovat jednu nebo více délek základních, přičemž normalizovaný a v praxi obvykle používaný je počet 5, tzn. že ln = 5 lr (resp. lw), jak schematicky ukazuje obr. 4.2 skutečná dráha snímače je delší o náběh a přeběh.



Obr. 4.2 - Délky ve směru osy X

Pro porovnatelnost výsledků měření se základní délka volí z normalizované řady a její velikost závisí především na výšce a rozteči nerovností profilu a jeho druhu (periodický, aperiodický) a použité konečné technologii výroby. Každý profil získaný měřením je do určité míry pozměněn (zkreslen) vlivem použité filtrace. Při nevhodné volbě základní délky mohou být vyhodnocené hodnoty charakteristik profilu podstatně rozdílné (i více než o 100%). Proto volba základní délky má rozhodující vliv na výsledky měření struktury povrchu. Pro geometrické parametry struktury povrchu je vhodné vysvětlení některých základních definic, které charakterizují profil podle nového systému GPS.

Výstupek profilu: z povrchu ven směřující (z materiálu do okolního prostředí) část posuzovaného profilu spojující dva přilehlé body na průsečíku profilu s osou X
Prohlubeň profilu: dovnitř směřující (z okolního prostředí do materiálu) část posuzovaného profilu spojující dva přilehlé body na průsečíku profilu s osou X
Prvek profilu: výstupek profilu a přilehlá prohlubeň - viz Obr. 4.3



Obr. 4.3 - Prvek profilu

4.1 Pravidla a postupy pro posuzování struktury povrchu

Při měření a vyhodnocování parametrů struktury jsou velmi důležité zadané vstupní podmínky měření. Proto je pro objektivní posouzení nezbytné dodržovat určitá stanovená pravidla volby těchto podmínek, především základní délky, jejíž správné stanovení má zásadní vliv na výsledky měření.

Parametry struktury jsou definovány na základní nebo vyhodnocované délce. Pro parametry definované na základní délce je hodnota vypočítána pomocí dat naměřených jen na této jedné základní délce. Odhad průměrných hodnot pak je stanoven jako aritmetický průměr parametru ze všech jednotlivých základních délek, přičemž normalizovaný počet je pět základních délek. V případě jiného počtu musí být tento počet u značky parametru uveden, např. Ra1, Ra4 apod. Pro parametry definované na vyhodnocované délce je odhad hodnoty parametru vypočítán pomocí naměřených dat z vyhodnocované délky rovné pěti délkám základním. Totéž platí pro křivky a odpovídající parametry.

Pokud na výkrese nebo ve výrobní dokumentaci není uveden jiný požadavek, je vyhodnocovaná, resp. základní délka následující:

R - parametry:vyhodnocovaná délka se určuje dále uvedeným postupem

P - parametry: vyhodnocovaná délka je rovna délce měřeného prvku

<u>Pravidlo 16 %:</u> pro požadavky specifikované horní mezí parametru (ISO 1302) je povrch považovaný za přijatelný, jestliže ne více než 16 % všech naměřených hodnot parametrů přesahuje hodnotu požadovanou výrobní dokumentací. Totéž platí pro event. zadanou dolní mez. Toto pravidlo vychází z normálního Gaussova rozdělení náhodných chyb, kdy v intervalu $\mu \pm s$ se nachází 68 % naměřených hodnot (pravděpodobnost 68 %), kde μ je aritmetický průměr a s směrodatná odchylka.

<u>Pravidlo maxima:</u> při požadavcích specifikovaných největší hodnotou parametru (ISO 1302) nesmí žádná z naměřených hodnot na kontrolovaném povrchu být větší než hodnota uvedená ve výrobní dokumentaci. Značka parametru musí být v tomto případě doplněna indexem *max,* např. Ra_{max}.

Při hodnocení povrchu pomocí parametrů struktury se neuvažují vady, resp. nedokonalosti povrchu, např. rýhy, póry, trhliny, otřepy apod. Spolehlivost rozhodnutí, zda kontrolovaný povrch vyhovuje specifikaci a přesnost stanovení průměrné hodnoty parametru struktury závisí mj. na:

- počtu základních délek na vyhodnocované délce
- počtu vyhodnocovaných délek, tzn. počtu měření na povrchu.

Pokud se vyhodnocovaná délka pro R - parametry nerovná pěti základním délkám, je jejich horní a dolní mez přepočítána a vztažena k vyhodnocované délce z pěti základních délek. Vztah mezi směrodatnými odchylkami je vyjádřen jednoduchou rovnicí

$s_5 = s_n\sqrt{\frac{n}{5}}$, kde *n* je počet (menší než 5) použitých základních délek.

Uvedený požadavek měření na 5 základních délkách splňují prakticky všechny používané přístroje na měření struktury povrchu. U některých přístrojů je počet základních délek dokonce volitelný. Výjimka může nastat i v případě, že během dráhy snímače se snímač dostane mimo svůj vertikální rozsah a zaznamená data z menšího, ale oznámeného počtu základních délek. Ve smyslu tohoto obvyklého způsobu měření a vyhodnocení lze považovat zjištěné hodnoty parametrů již jako průměrné (pro parametry definované na základní délce). Kromě toho především u laboratorních přístrojů je samozřejmostí statistické vyhodnocení pro libovolný počet měření na různých místech povrchu.

Je vhodné připomenout, že některé národní normy, např. BS (British Standart) definují prakticky všechny parametry na délce vyhodnocované, což je i v souladu s postupem měření. Je tedy možné event. i polemizovat o vhodnosti definic parametrů na základních délkách. Spolehlivost rozhodnutí na základě výsledků měření je tím větší, čím větší je počet měření a proto i menší nejistota průměrné hodnoty parametru. Na druhé straně se zvyšuje časová náročnost a náklady na měření, proto je zpravidla nutný určitý kompromis mezi náklady a spolehlivostí výsledků měření.

Pravidla a postupy pro kontrolu dotykovými přístroji specifikují především základní pravidla pro volbu mezní vlnové délky (tj. základní délky) pro měření parametrů <u>profilu drsnosti.</u> Tato pravidla je nutné dodržet vždy, pokud není základní délka specifikována požadavkem přímo ve výrobní dokumentaci.

Pro měření parametrů drsnosti je třeba nejprve vizuálně určit, zda je profil periodický nebo aperiodický. Na základě tohoto rozhodnutí se uplatňují poněkud odlišné postupy.

<u>Postup pro neperiodický profil drsnosti</u>

Pro povrchy s neperiodickým profilem se používá následující postup:

a) Odhadne se neznámý parametr profilu drsnosti Ra, Rz, Rz1max nebo RSm libovolným způsobem, např. vizuálně, srovnáním pomocí vzorkovnice apod.

b) Odhadne se základní délka z tabulky 4.1, 4.2 nebo 4.3 pro Ra, Rz, Rz1max nebo RSm odhadnuté v kroku a).

c) Měřicím přístrojem s nastavenou hodnotou základní délky odhadnuté v kroku b) se provede reprezentativní měření uvedených parametrů.

d) Porovnají se naměřené hodnoty uvedených parametrů s rozsahem jejich hodnot v tab. 4.1, 4.2 nebo 4.3 odpovídající odhadnuté základní délce. Jsou-li tyto hodnoty mimo rozsah hodnot pro odhadnutou základní délku, zvolí se větší, případně menší základní délka. Dalším reprezentativním měřením získané hodnoty se opět porovnají s hodnotami v příslušných tabulkách. V tomto případě by měla být dosažena kombinace měřené hodnoty a základní délky navrhovaná v uvedených tabulkách.

e) Získají se reprezentativní hodnoty zmíněných parametrů pro jednu základní délku kratší, není-li tato nastavená kratší základní délka hodnocena v předcházejícím kroku d). Pohledem se zkontroluje, zda výsledná kombinace parametrů a základní délky je uvedena v tabulkách.

f) Jestliže jen závěrečné nastavení podle kroku d) odpovídá tab. 4.1, 4.2 nebo 4.3, potom nastavená základní délka a hodnoty Ra, Rz, Rz1max nebo RSm jsou správné. Jestliže krok e) také předkládá kombinaci danou v tabulkách, potom nastavená kratší základní délka a odpovídající hodnota Ra, Rz, Rz1max nebo RSm jsou správné.

g) Provede se konečné reprezentativní měření žádaných parametrů s použitím mezní vlnové délky (základní délky) určené v předchozích krocích.

<u>Postup pro periodický profil drsnosti</u>

Pro povrchy s periodickým profilem se použije následující postup:

a) Libovolným způsobem se odhadne délkový parametr RSm.
b) Pro odhadnutou hodnotu RSm se z tab. 3.3 určí doporučovaná hodnota základní délky.
c) Je-li to nezbytné ve sporném případě, změří se hodnota RSm při nastavené hodnotě základní délce, určené podle bodu b).
d) Jestliže hodnota RSm z kroku c) odpovídá podle tab. 3.3 menší nebo větší hodnotě mezní vlnové délky cut-off, než v kroku b), použije se menší nebo větší hodnota základní délky.

e) Provede se konečné reprezentativní měření žádaných parametrů s použitím hodnoty mezní vlnové délky (základní délky) určené v předchozích krocích.

Tabulka 4.1: Základní délky drsnosti pro měření Ra, Rq, Rsk, Rku a křivek a odpovídajících parametrů pro neperiodické profily (např. broušení)

Ra [μm]	Základní délka Ir	Vyhodnocovaná délka ln
0,006 < Ra <	0,08	0,4
0,02 < Ra < 0,1	0,25	1,25
0,1 < Ra < 2	0,8	4,0
2 < Ra < 10	2,5	12,5
10 < Ra < 80	8,0	40,0

Tabulka 4.2: Základní délky drsnosti pro měření Rz, Rv, Rp, Rc, Rt neperiodických profilů (např. broušení)

Rz[1)], Rz1max[2)] [μm]	Základní délka Ir [mm]	Vyhodnocovaná délka
0,025 < Rz,Rz1max <	0,08	0,4
0,1 < Rz,Rz1max < 0,5	0,25	1,25
0,5 < Rz,Rz1max < 10	0,8	4,0
10 < Rz,Rz1max < 50	2,5	12,5
50 < Rz,Rz1max < 200	8,0	40,0

[1)] Rz je použito při měření Rz, Rv, Rp, Re, Rt

[2)] Rz1max je použito jen při měření Rz1max, Rv1max, Rp1max, Rc1max.

Tabulka 4.3: Základní délky drsnosti pro měření R - parametrů periodických profilů s RSm periodických a neperiodických profilů

Rsm [μm]	Základní délka Ir [mm]	Vyhodnocovaná délka
0,013 < RSm <	0,08	0,4
0,04 < RSm< 0,13	0,25	1,25
0,13 < RSm< 0,4	0,8	4,0
0,4 < RSm< 1,3	2,5	12,5
1,3 < RSm< 4	8,0	40,0

5. Vývoj vhodné biokompatibilní vrstvy pro povlakování kompozitu CFRC

Jak již bylo řečeno dříve, kompozit CFRC je náchylný k uvolňování uhlíkových mikročástic. Jako možné řešení se jeví vývoj biokompatibilních vrstev které by povrch ochránily, stabilizovaly a navíc příznivě podporovaly růst buněk. Byly vyzkoušeny vrstvy následujícího chemického složení: Cr_2O_3, Si, SiO_2 and DLC. Pozornost byla věnována především vrstvě DLC, neboť už ze své povahy (čistý uhlík) byla očekávána jak dobrá adhese na kompozitu CFRC, tak dobrá tolerance *in vitro*.

DLC (diamond-like carbon) je metastabilní stav amorfního uhlíku, který obsahuje jak diamantové (sp^3) tak i grafitové (sp^2) vazby. Obsah diamantových vazeb (10÷80 %) má rozhodující vliv na vlastnosti DLC vrstev, především mechanických. Například, čím je větší obsah sp^3 vazeb, tím je větší mikrotvrdost. Takové vrstvy mohou obsahovat velké množství (0÷60%) vodíku, který také ve značné míře ovlivňuje jejích vlastnosti (mechanické, elektrické, optické aj.). Například, se změnou množství vodíku se mění rezistivita deponované vrstvy.

K přípravě DLC vrstev se používají různé metody. Například plazmatické metody RF (radio frequence) nebo DC (direct current) PACVD (plasma assisted chemical vapour deposition), napařování pomoci elektronového svazku nebo rozprašování uhlíkového targetu iontovým bombardováním. Výběrem metody, parametrů (napětí, teplota a další) a typu prekursoru (CH_4, C_2H_6, uhlíkový target) se dá měnit množství diamantových vazeb a vodíku ve vrstvě, a tím regulovat vlastnosti připravovaných vrstev.

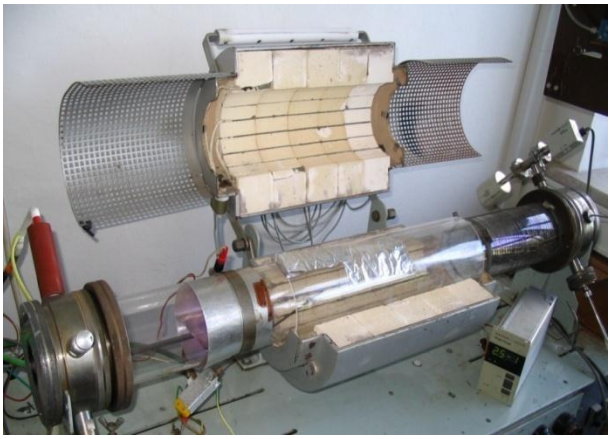
Díky svým dobrým mechanickým a elektrochemickým vlastnostem se DLC vrstvy používají jako vrstva prodlužující životnost mechanicky namáhaných dílů různých komponent. Protože se odpor těchto vrstev dá měnit v širokých mezích, nacházejí tyto vrstvy též použití jako pasivační vrstva výkonových polovodičových součástek nebo jako dielektrická vrstva mezi hradlem a kanálem v MDS tranzistorech.

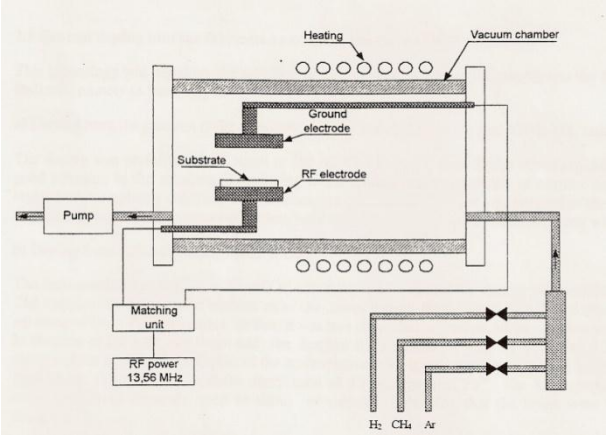
5.1 Depozice vrstev

Depozice tenkých vrstev DLC probíhala v reakční komoře (Obr. 5.1) na Ústavu fyziky FS ČVUT pod vedením prof. Černého. Vrstvy byly připraveny metodou známou jako PACVD (plasma assisted chemical vapour deposition) neboli chemickou depozicí za asistence plazmy na skleněné vzorky o rozměrech 10x10mm a tloušťce 0,2mm, za podmínek uvedených v tabulce 5.1.

Tab. 5.1 Parametry deponování jednotlivých vrstev

Vrstva	Prekursor	Tlak [10^{-1} Torr]	Předpětí [V]	Atmosféra / průtok [ccm/min]	Teplota [^{O}C]
Cr_2O_3	Chromium acetylacetonate $Cr(CH_3COCH{=}COCH_3)_3$	5	-600	Ar / 45 O_2 / 10	300
Si	Silane SiH_4	4,6	-450	Ar / 45	70
SiO_2	Hexamethyldisiloxane $C_6H_{12}OSi_2$	3,5	-500	N_2 / 30 O_2 / 10	50
DLC	Methane CH_4	5,2	-100	Ar / 30 H_2 / 40	60



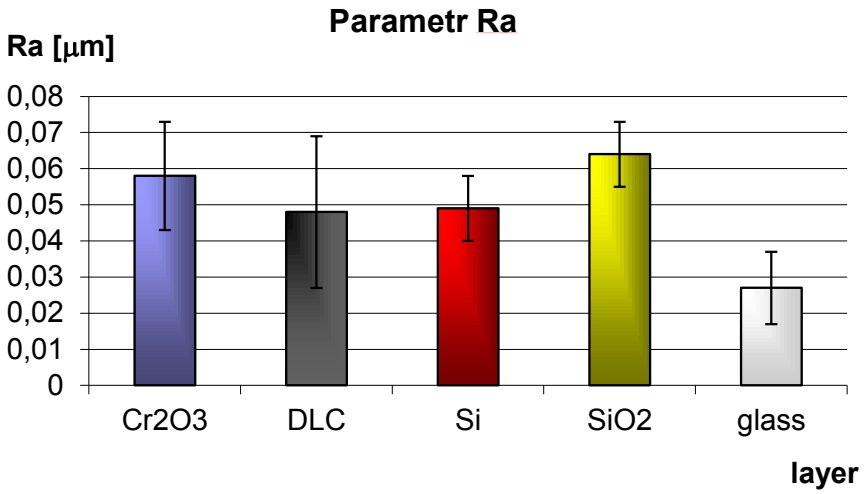


Obr. 5.1- Reaktor PACVD a jeho schéma

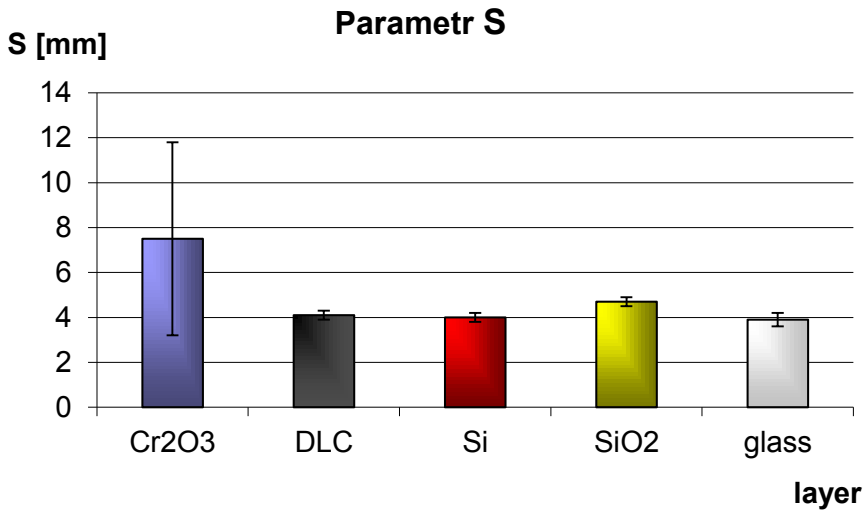
5.2 Struktura povrchu nanášených vrstev

Experimentální měření struktury povrchu bylo provedeno na laboratorním dotykovém profiloměru Talysurf 6 firmy Taylor Hobson.

Pro popis struktury povrchu byly vybrány parametry Ra, S, Rsk a Rku. Měření bylo prováděno ve třech řezech na každém vzorku a hodnoty uvedené v grafech (Obr. 5.2, 5.3) představují tedy průměrnou hodnotu ze tří měření. Pro porovnání jsou zde uvedeny i hodnoty parametrů pro nedeponovaný skleněný vzorek.



Obr. 5.2 - Parametr profilu povrchu Ra na deponovaných vrstvách



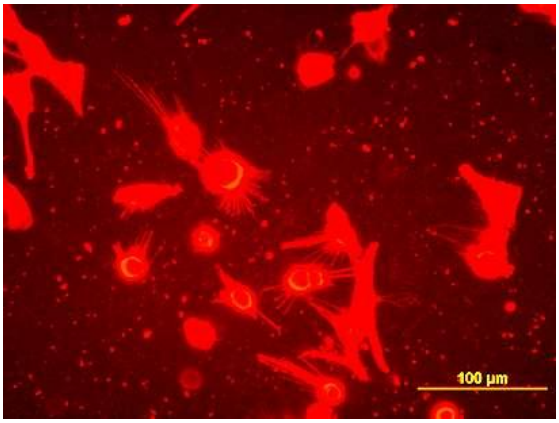
Obr. 5.3 - Parametr profilu povrchu S na deponovaných vrstvách

Jak se dalo očekávat, depozice tenkých vrstev ovlivnila drsnost povrchu pouze minimálně. Podle názoru MuDr. Lucie Bačákové CSc. z Fyziologického ústavu AV ČR a

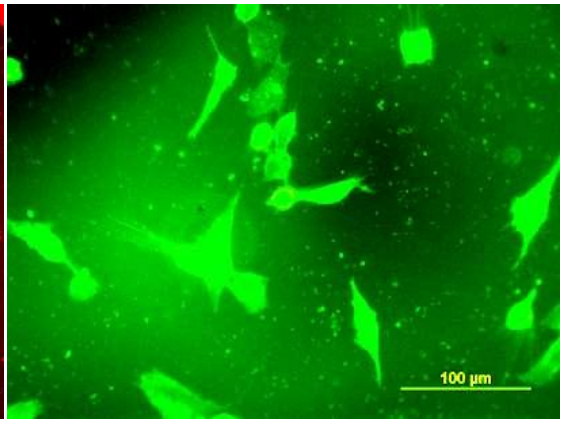
jejího předešlého výzkumu, drsnost v setinách mikrometru neovlivňuje růst buněk, které jsou v řádech desítek mikrometrů.

5.3 Růst a morfologie buněk

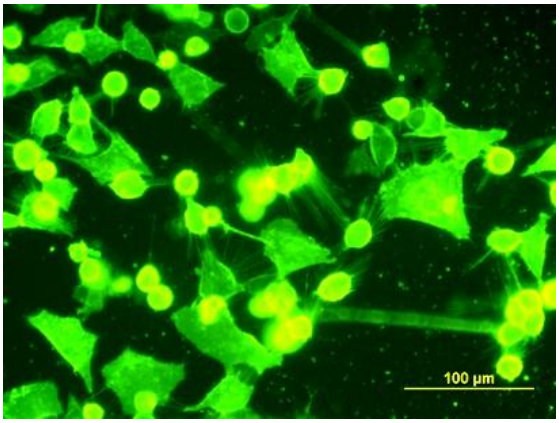
Kultivace buněk probíhala na Fyziologickém institutu AV ČR, Praha 4. Skleněné vzorky byly očištěny destilovanou a deionizovanou vodou, vysterilizovány v autoklávu a umístěny do Petriho kultivačních misek (Gama, průměr 5 cm). Poté byly osazeny lidskými kostními buňkami linie MG-63 v hustotě 25 000 buněk/cm^2. Buňky byly pěstovány v 6 ml roztoku Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium doplněným 10% hovězího plodového roztoku a 40 mg/ml gentamycinu. Šest vzorků od každého typu deponované vrstvy bylo uschováno v pokojové teplotě po dobu 1, 3 a 7 dnů a poté byly buňky počítány. Morfologie buněk osteosarkomu linie MG-63 je ilustrována na obrázcích (Obr. 5.4,5.5, 5.6, 5.7), zvýraznění bylo dosaženo díky fluorescenčním pigmentům PKH 26 a 67.



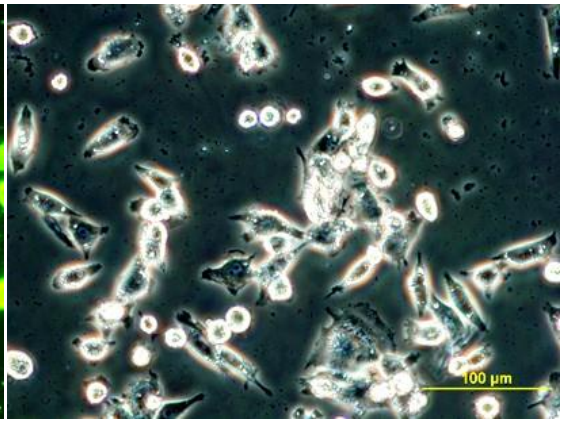
Obr 5.4 - Cr_2O_3, membránová pigmentace PKH 26



Obr 5.5 - DLC, membránová pigmentace PKH 67



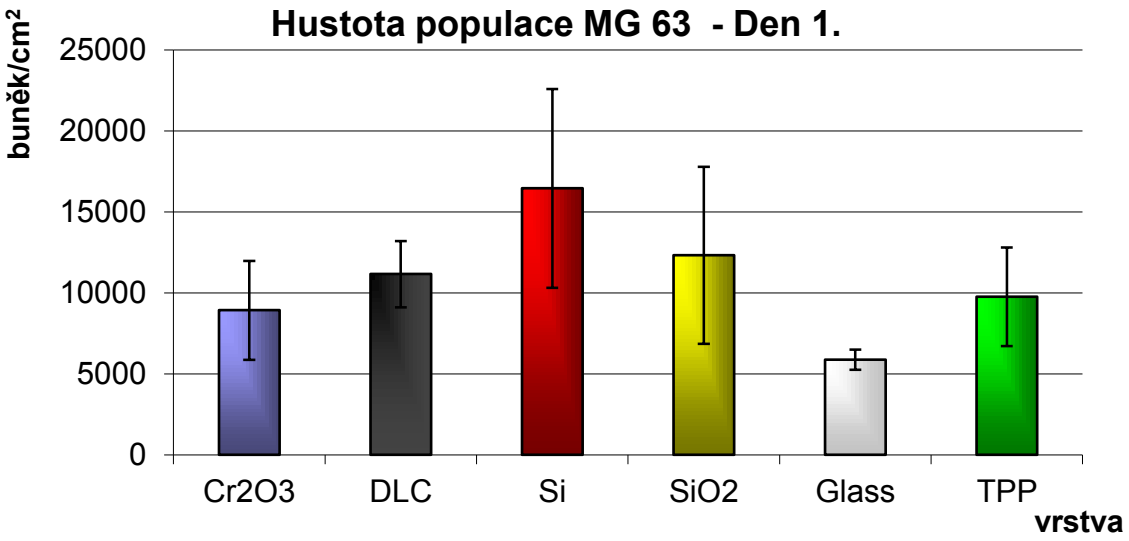
Obr. 5.6 - Si, membránová pigmentace PKH 67



Obr. 5.7- SiO_2, nativní kultura

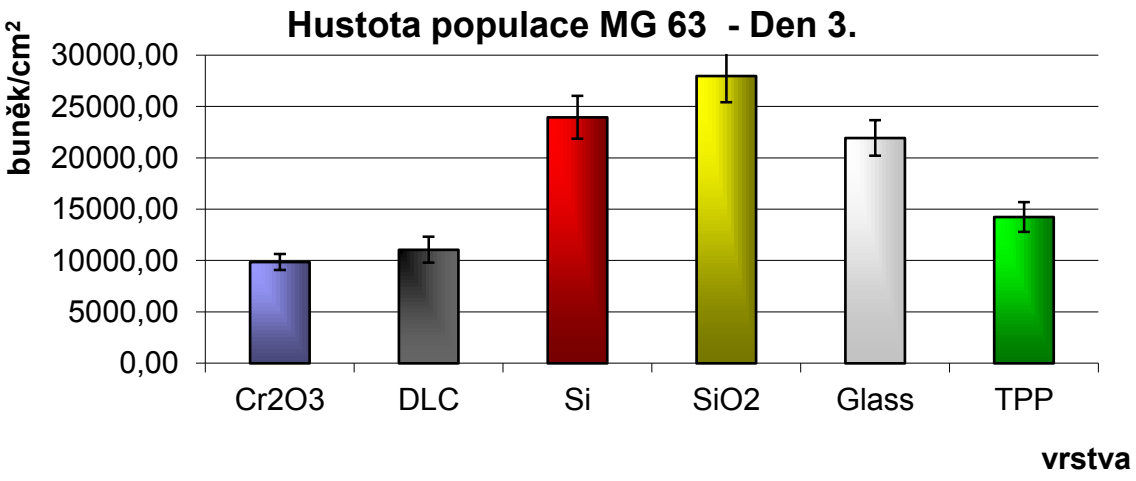
5.4 Počty buněk

První den byly buňky počítány v zorných polích mikroskopu, třetí a sedmý den již díky vysokému počtu buněk nebylo počítání v zorných polích možné, tak byly buňky opláchnuty ze vzorků pomocí roztoku Trypsinu a počítání probíhalo v Burkerově hemocytometru (komůrce). Výsledky jednotlivých měření jsou vyneseny do grafů (Obr. 5.8, 5.9, 5.10). První den po nasazení byly počty buněk shodné či dokonce vyšší než ve standardní kultivační misce z polystyrenu, nebo čistém skle.



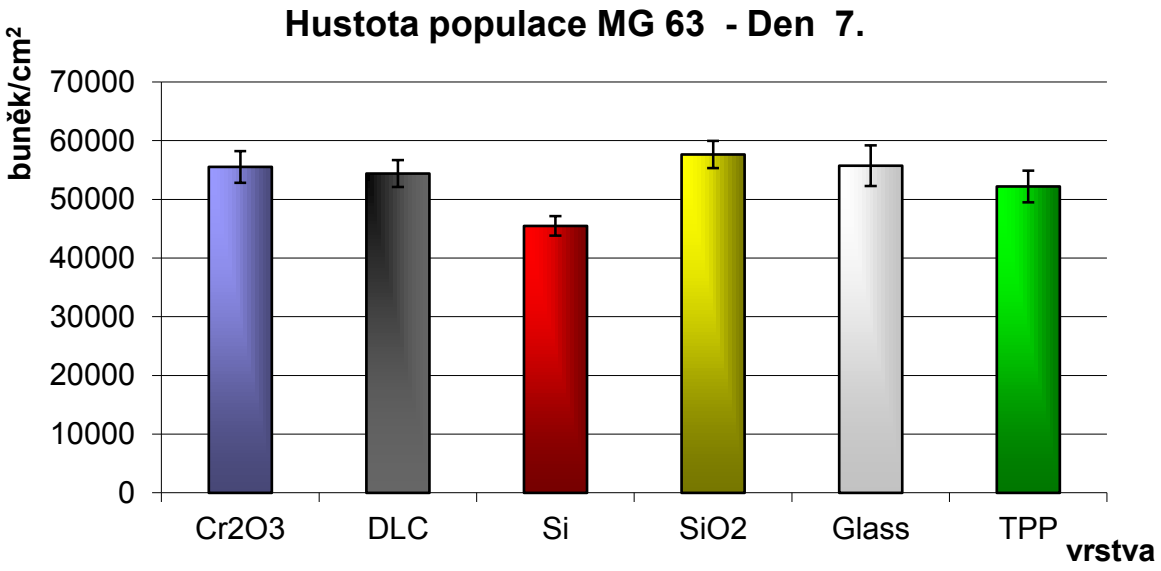
Obr. 5.8 - Populační hustota buněk linie MG-63 – Den 1.

Třetí den po nasazení se počty buněk na vrstvách z Cr_2O_3 a DLC propadly pod hodnoty naměřené na vzorku bez vrstvy a polystyrenové kultivační misce, zatímco buňky na vrstvě Si a SiO_2 vykazovaly nejvyšší počty.

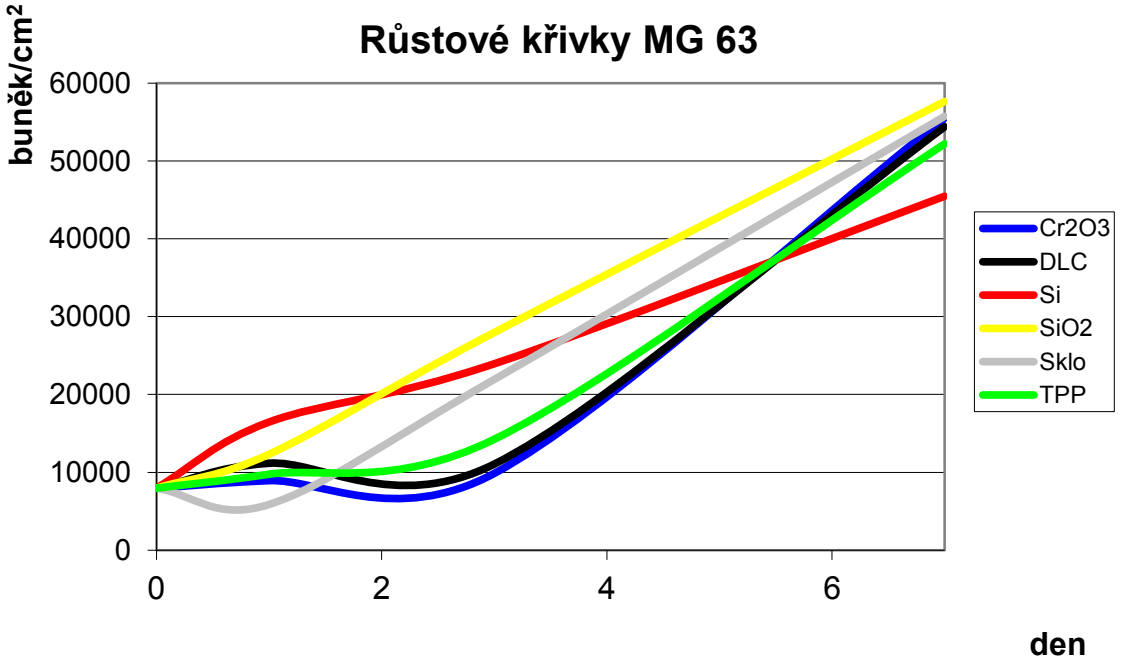


Obr. 5.9 - Populační hustota buněk linie MG-63 – Den 3.

Sedmý den po nasazení však již byli počty buněk na všech typech deponovaných vrstev vyrovnané. Na obrázku 5.11 jsou zkonstruované růstové křivky MG-63 na jednotlivých površích.



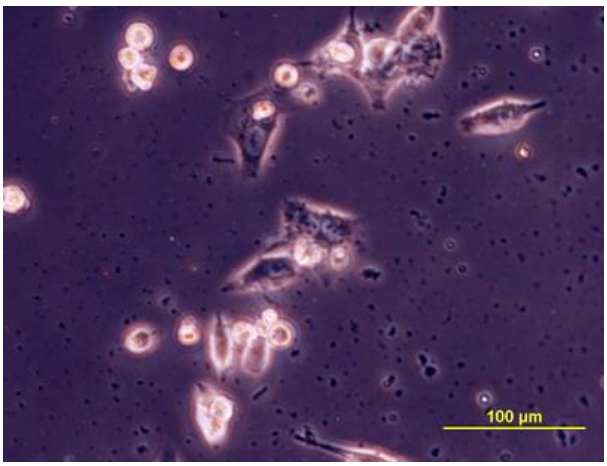
Obr. 5.10 - Populační hustota buněk linie MG-63 – Den 7.



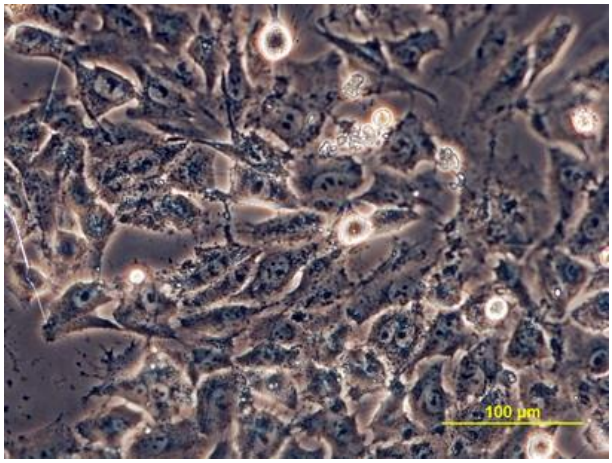
Obr. 5.11 - Růstové křivky buněk linie MG-63 na různých typech povrchových vrstev

Pro ilustraci jsou přiloženy i snímky ze zorných polí mikroskopu po 1 a 3 dnech, na vzorku s vrstvou DLC (obr. 5.12, 5.13). Vidíme, že již po třech dnech buňky pokrývají téměř celou

plochu vzorku a počítání v zorném poli by bylo díky velkému množství buněk a jejich vzájemnému kontaktu těžko proveditelné.



Obr 5.12 - DLC - 1. den



Obr 5.13 - DLC – 3. den

Je možné konstatovat, že všechny testované vrstvy jsou vhodné pro kolonizaci buňkami linie MG-63. Musíme však vzít v potaz možnou cytotoxicitu a karcinogenicitu vrstvy obsahující chrom. Připravená vrstva DLC velice dobře podporuje růst buněk a bude využita v další fázi výzkumu, kde bude sledován mimo jiné vliv různých druhů deponovaných vrstev DLC na uhlíkovém kompozitu CFRC na jeho biokompatibilitu. Deponovaný povrch bude představovat jeden z faktorů modifikujících povrch kompozitu CFRC, obecného faktoriálního návrhu experimentu.

6. Návrh modifikace povrchu kompozitu CFRC z hlediska adhese a proliferace buněčných kultur

Kompozitní materiály, například kompozity s uhlíkovou či polymerní matricí vyztuženou uhlíkovými vlákny, jsou považovány za perspektivní pro konstrukci kostních a kloubních náhrad, kostních implantátů, pomůcek pro osteosyntézu i kostních fixací. Jejich nevýhodou však často bývají povrchové fyzikální a chemické vlastnosti méně vhodné pro adhesi buněk a následnou integraci implantátu do okolní kostní tkáně, jako je například nevhodná povrchová topografie materiálu, vysoká hydrofobicita apod. Uhlíkové kompozity jsou navíc náchylné k uvolňování částic uhlíkového materiálu do okolního prostředí, které se mohou kumulovat v okolních tkáních a poškodit je. Proto je důležitým odvětvím konstrukce materiálů pro dlouhodobou implantaci do lidského organismu povrchová úprava těchto materiálů, například broušením, leštěním a pokrýváním mechanick odolnými biokompatibilními vrstvami. Dalším, v odborné literatuře diskutovaným, významným faktorem ovlivňujícím adhesi buněk na povrchu materiálu je také doménové uspořádání buněk.

Biokompatibilní materiál

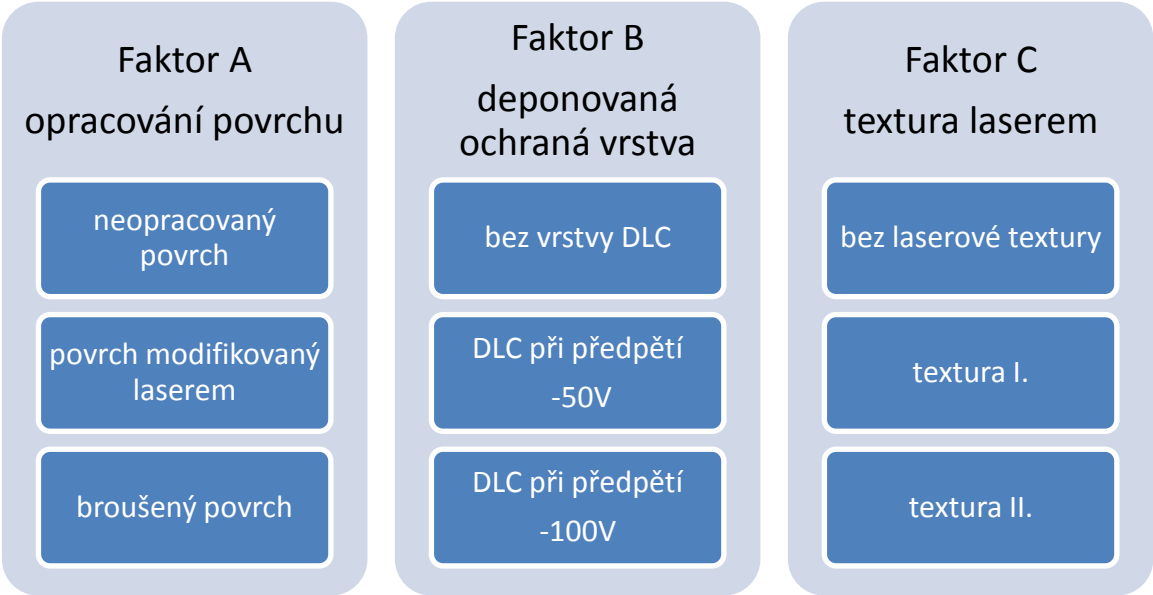
Aby mohl být materiál považován za biokompatibilní měl by mít podobné mechanické vlastnosti jako okolní materiál a nedocházelo tak k aseptické nekróze. Dále nesmí uvolňovat žádné toxické nebo kancerogenní částice a musí splňovat požadovanou interakci s buňkami, biokompatibilní materiály tedy mohou být inertní anebo mohou podporovat adhesi v závislosti na jejich zamýšleném použití (např. čočky, klouby versus cévy, kosti).

6.1 Návrh experimentu

Po důkladném rozboru situace byl navržen statistický experiment, který v sobě zahrnuje tři faktory a každý faktor se třemi úrovněmi neboli verzemi, tak aby mohl být komplexně studován vliv jednotlivých faktorů na responsní veličiny. Jedná se o takzvaný úplný třífaktoriální návrh (3.1.4.), kde první faktor představuje stupeň opracování povrchu, druhý představuje deponovanou ochrannou vrstvu a třetí představuje perforaci

povrchu laserem. Jedná se o úplný návrh typu 3^3, tedy návrh obsahuje celkem 27 jednotlivých běhů, které pokrývají všechny možné kombinace jednotlivých verzí faktorů. Dále bylo rozhodnuto, z důvodu získání odhadu všech možných interakcí mezi faktory, uvažovat dvě replikace návrhu, tj. celkem 54 běhů. Jako response budou sloužit hodnoty ploch adherovaných buněk v μm^2 a počet buněk první den po nasazení na cm^2 vzorku. Jedná se tedy o rozsáhlý návrh, jehož provedení nám však poskytne velice důkladnou informaci o vlivu jednotlivých faktorů. Randomizace běhů není v tomto případě zapotřebí, protože de facto všechny běhy budou provedeny současně a buňky budou kultivovány u všech kombinací nastavení úrovní jednotlivých faktorů najednou.

Zvolené faktory a jejich úrovně jsou



Poté byl za použití software Design Expert navržen plán experimentu. Na základě plánu experimentu tedy bylo připraveno celkem 54 vzorků uhlíkového kompozitu CFRC o velikosti 1x1 cm s odpovídající úpravou povrchu podle návrhu. Vygenerovaný plán experimentu je přiložen jako Příloha 1.

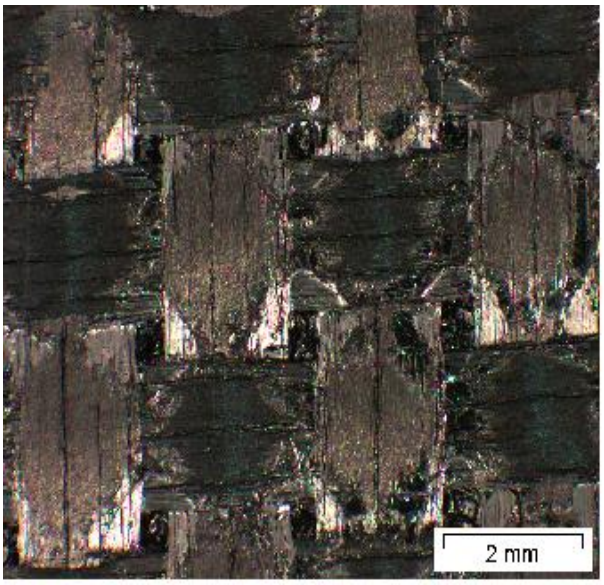
6.2 Příprava vzorků

Příprava vzorků probíhala již podle potřeb plánu experimentu, nejprve bylo na určených vzorcích provedeno opracování povrchu, tj. 18 vzorků bylo ponecháno v původním stavu, 18 bylo ozářeno pomocí laseru a na 18ti vzorcích byl jejich povrch

broušen. Poté byly vzorky podle plánu experimentu texturovány laserem, tj. 18 vzorků bylo ponecháno bez textury, 18 bylo texturováno otvory o průměru 0,1 mm, jejichž hloubka byla 0,2 mm a rozteč mezi nimi 0,3 mm (textura I.) a do 18ti vzorků byly vypáleny otvory o průměru 0,4 mm, hloubce 0,8 mm a rozteči 1,2 mm (textura II.). Finální úpravou povrchu byla depozice vrstev DLC při různých hodnotách předpětí (-50V a -100V). Opět podle plánu experimentu bylo 18 vzorků ponecháno bez deponované vrstvy, 18 vzorků bylo deponováno vrstvou amorfního uhlíku při předpětí -50V (DLC I.), na zbylých 18ti proběhla depozice při předpětí -100V (DLC II.). Samotná fáze přípravy vzorků byla díky množství různých faktorů a jejich úrovní časově velice náročná.

6.2.1 Kompozitní materiál Carbon-Fiber Reinforced Carbon

CFRC byl připraven v Ústavu struktury a mechaniky hornin AVČR z komerčně dostupné uhlíkové tkaniny (Toray T 800) infiltrované prekursorem uhlíkové matrice (fenolická pryskyřice UMAFORM LE, Synpo a. s., Pardubice). Po napuštění prekursorem byl čtvercový polotovar sušen ve formě při 125 ^{0}C a osovém tlaku 1MPa. Materiál byl karbonizován při 1000°C v dusíkové atmosféře, celkem 2x opakovaně impregnován pryskyřicí a re-karbonizován. Na závěr byl materiál grafitizován při 2200°C. Na konci výrobního procesu tedy získáváme materiál (Obr. 6.1), jehož chemické složení je téměř 100% C. Mechanické vlastnosti mohou být modifikovány ve velkém rozsahu, použitím různých typů tkanin a počtem vrstev. Desky materiálu o tloušťce 2 mm byly rozřezány diamantovou pilou na vzorky tvaru čtverce o straně 10 mm.

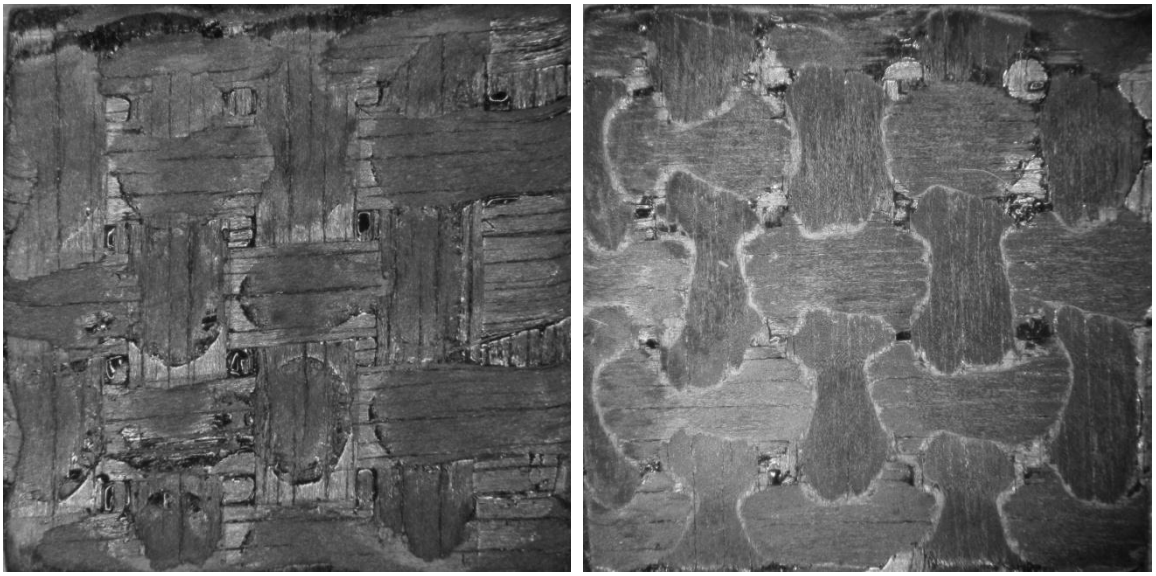


Obr. 6.1 - kompozit Carbon-Fiber Reinforced Carbon

6.2.2 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu broušením

Struktura povrchu ovlivňuje významně funkci každé součásti. U povrchů strojírenských součástí jsou to zejména životnost opotřebení, schopnost držet olejový film, koroze, přilnavost vrstev, přesnost, těsnost, vibrace, pevnost nalisovaných spojů, odrazivost atd. V případě biokompatibilních materiálů souvisí s povrchem zvláštní vlastnost a tou je adheze. Broušení je významná a nejrozšířenější dokončovací technologie. Touto technologií lze dosáhnout velmi jemné struktury povrchu, která je výsledkem několika faktorů, jako je zrnitost použitého brusného materiálu, druh pojiva, otáčky brusného kotouče, posuv, případně vliv řezného prostředí. Charakter povrchu je z hlediska rozdělení nerovností náhodný a není možno v profilu povrchu nalézt žádné periodické složky, které jsou typické pro obrábění jednobřitými nebo vícebřitými nástroji. Pokud se brousí povrch stále jemnějším brusným materiálem (s menší zrnitostí), odstraní se obvykle všechny stopy předchozího obrábění. Maximální výška nerovností, včetně dalších parametrů struktury povrchu, se sníží, ale náhodný charakter povrchu zůstane stejný.

Vzorky byly broušeny postupně brusnými papíry o zrnitostech 350, 600, 800, 1000 a 4000, takže výsledný povrch byl na možnosti uhlíkového kompozitu, podle subjektivního hodnocení zrcadlově lesklý, parametr drsnosti povrchu Ra se pohyboval v rozmezí 0,97-2μm. Následně byly vzorky z důvodu očistění oprány v ultrazvukové pračce. Ukázka vzorků s neopracovaným povrchem a povrchem opracovaným broušením je znázorněna na obrázku 6.2.



Obr. 6.2 - vlevo povrch v neopracovaném stavu, napravo povrch broušený

6.2.3 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu laserem

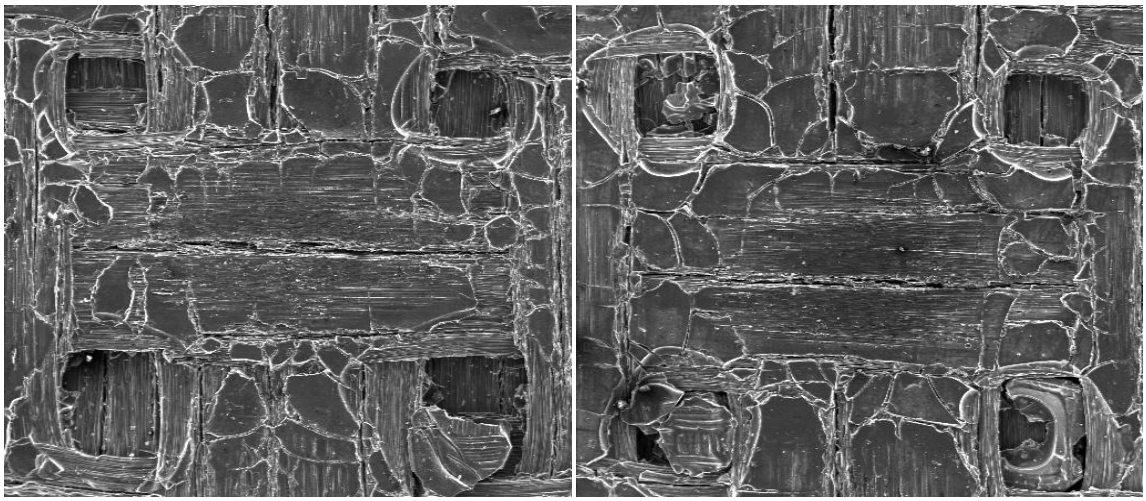
S cílem zlepšení vlastností uhlíkových kompozitů (zejména zvýšení soudržnosti uhlíkové matrice, zlepšení adheze, růstu a diferenciace kostních buněk) byl povrch vzorků ozařován laserovým paprskem. Úpravy byly prováděny na obráběcím centru MCVL 1000 LASER (Obr. 6.3). Jedná se o obráběcí centrum, u kterého je na vřeteníku vedle vřetena umístěn Nd:YAG laser s výstupním výkonem 50W (stopa paprsku Ø 0,1 mm, rozteč 0,07 mm). Kromě toho je stroj vybaven souvisle řízeným otočným a naklápěcím stolem. Toto uspořádání umožňuje provádět na jednom stroji na jedno upnutí obrobku až pětiosé obrábění běžnými řeznými nástroji a následně laserové technologie, např. mikrofrézování. příp. popisování paprskem laseru.

Obr. 6.3 – obráběcí centrum MCVL 1000 Laser

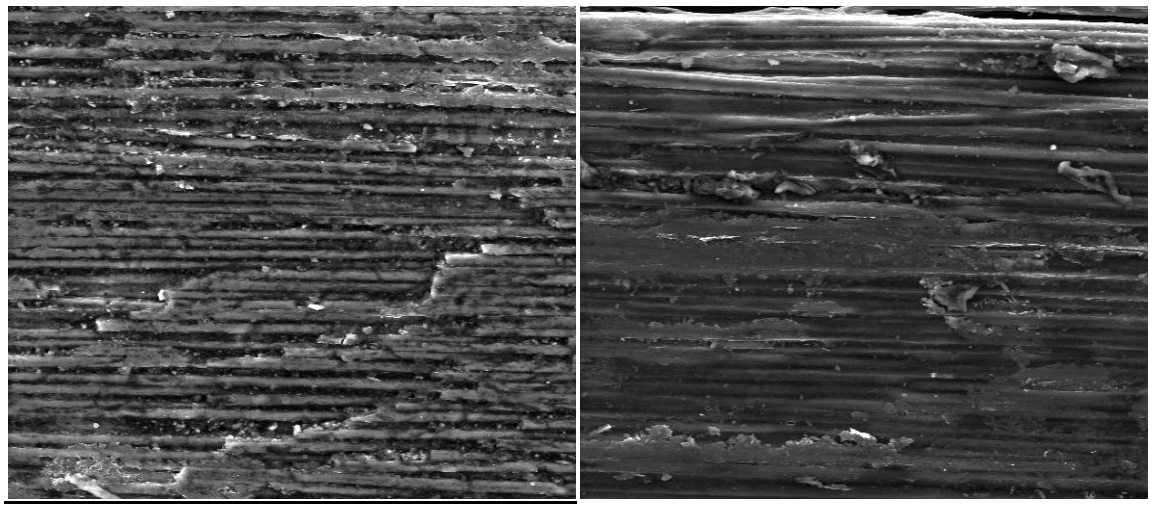
Při ozařování povrchu laserem byly 4 vzorky upravovány najednou. Povrch byl v řádkovacím režimu stroje opálen laserem, což jak je vidět z analýz pomocí řádkovací elektronové mikroskopie vedlo k odstranění volných uhlíkových vláken na povrchu vzorku. Snímky kde je porovnán jak nemodifikovaný povrch, tak povrch ozářený laserem jsou na obrázku 6.4, snímky kompozitu CFRC pořízené SEM jsou na obrázcích 6.5 až 6.7.

Obr. 6.4 - srovnání povrchu nemodifikovaného (vlevo) s povrchem opracovaným laserem (vpravo)

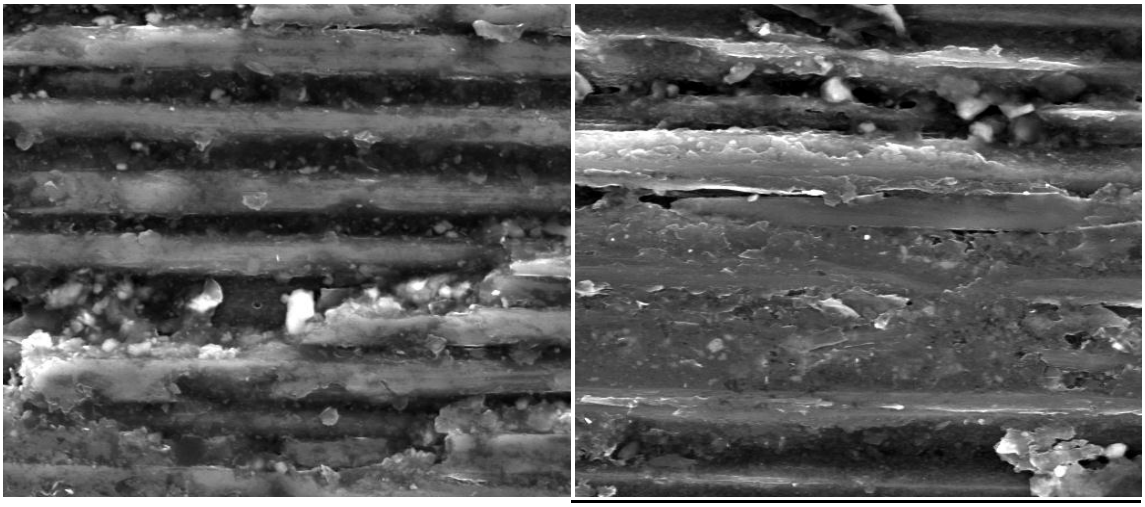
Snímky byly pořízeny metodou SEM na řádkovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-5410. Rastrovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) je metoda, která umožňuje zobrazování povrchu pomocí sekundárních a odražených elektronů. Elektronové mikroskopy, které využívají k zobrazení vzorku těchto typů elektronů ve spojení s rastrováním povrchu se nazývají rastrovací (řádkovací) elektronové mikroskopy. Princip rastrovací elektronové mikroskopie je následující. Elektronový paprsek urychlený v elektrickém poli je velmi dobře stabilizován a může být vychylován systémem elektromagnetických cívek v osách x, y. Povrch je postupným vychylováním snímán řádek po řádku a takto je postupně skládán obraz vzorku. Sekundární elektrony (SE) jsou detekovány scintilačními detektory a vznikající signál se převádí na zobrazovací jednotku, čím větší je počet SE, tím světlejší bod dostáváme. Sekundární elektrony se mohou dostat z hloubky maximálně několika nanometrů, proto zobrazení přináší informaci pouze o povrchové vrstvě. Urychlovací napětí elektronů při měření bylo 20 kV, pracovní vzdálenost 20 mm a matice obrazu byla 512x512 bodů.



Obr. 6.5 - snímky pořízené elektronovou řádkovací mikroskopií při 35 násobném zvětšení vlevo snímek nemodifikovaného vzorku, vpravo vzorek upravený laserem



Obr. 6.6 - snímky SEM uhlíkové matrice kompozitu CFRC, vlevo nemodifikovaný povrch, vpravo povrch modifikovaný laserem (zvětšeno 500x)



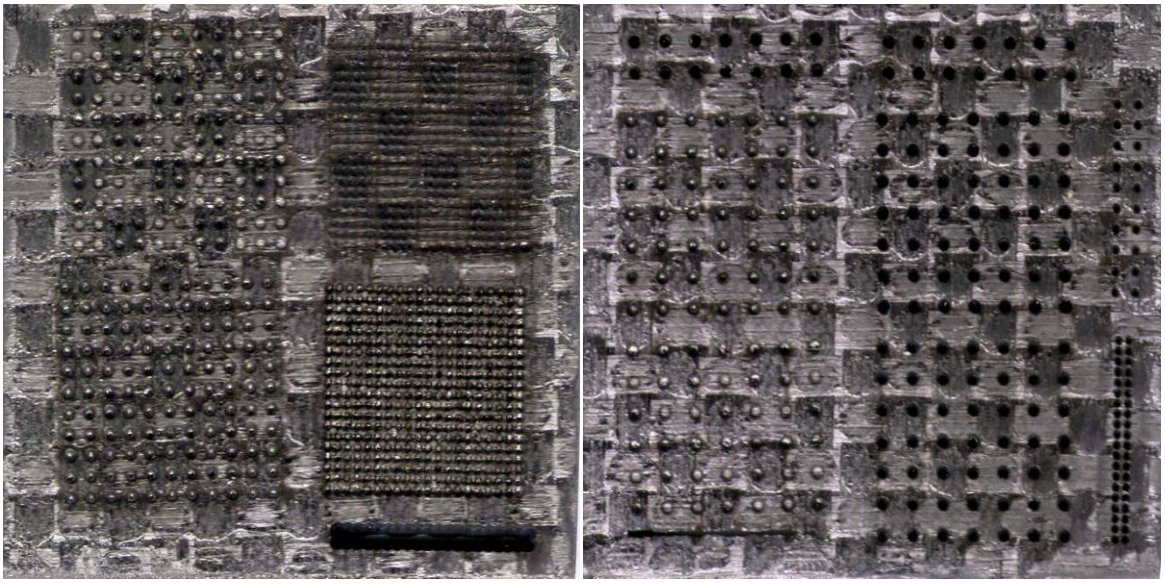
Obr. 6.7 - snímky SEM uhlíkové matrice kompozitu CFRC, vlevo nemodifikovaný povrch, vpravo povrch modifikovaný laserem (zvětšeno 2000x)

Jak je vidět ze snímků získaných elektronovou řádkovací mikroskopií povrch modifikovaný laserem vykazuje menší množství volných vláken na povrchu vzorku. Uhlíková vlákna uvolněná a vyčnívající z matrice kompozitu na povrchu vzorku byla laserem odpařena. Povrch takto upraveného kompozitu by tedy měl být méně náchylný k uvolňování mikroskopických úlomků těchto vláken.

<u>Parametry laseru pro modifikaci povrchu laserem:</u>

Výkon: 50W	Rozteč: 0,07 mm
Rychlost paprsku: 80 mm/s	Velikost plochy: 24 x 24 mm
Frekvence pulzů: 4000 Hz	Počet přejezdů: 2

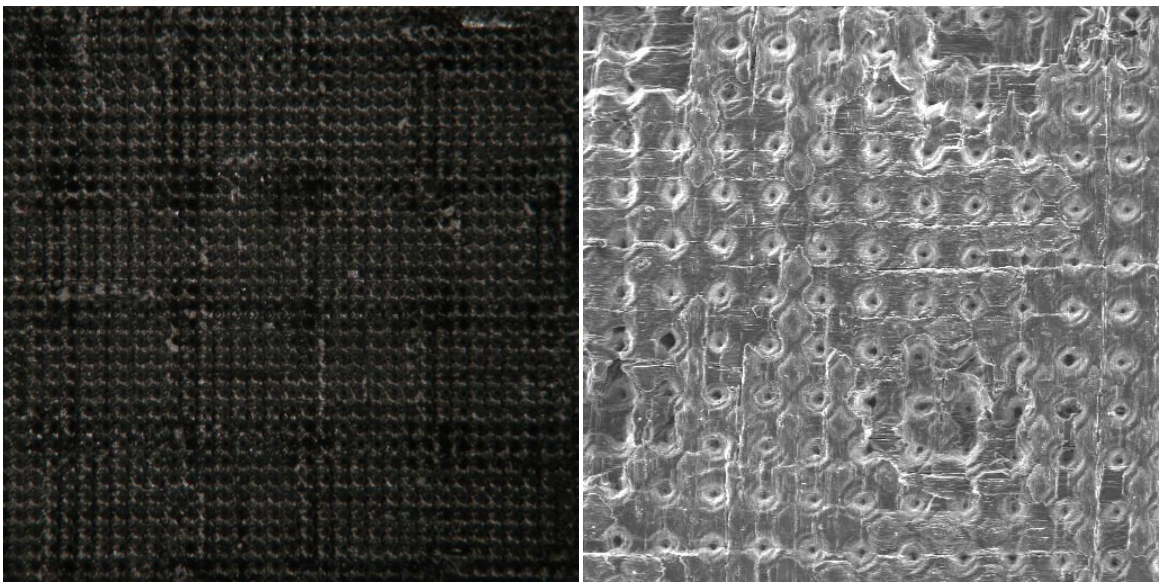
Na stejném zařízení byla prováděna i perforace povrchu laserem, tedy vytvoření textury. Vliv takovéhoto uspořádání domén na růst buněk (na jejich počet a plochu) bude předmětem studia. Nejprve bylo nutné otestovat chování laseru na uhlíkovém kompozitu při různých parametrech nastavení. Ukázka testovacích vzorků pro různé parametry nastavení dráhy paprsku, počtu přejezdů a energie laseru je na obrázku 6.8.



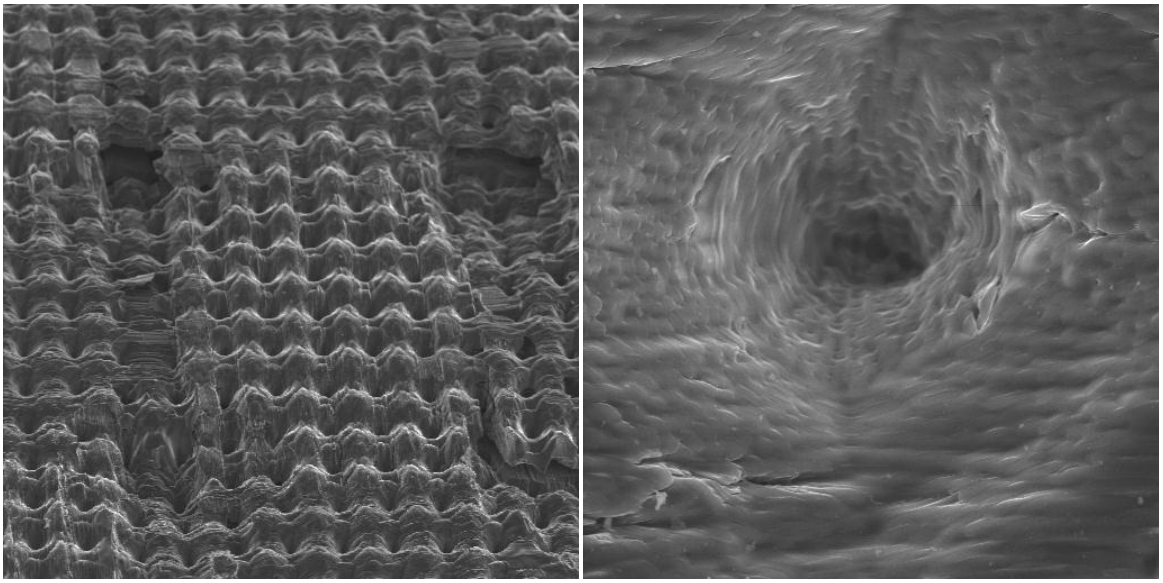
Obr. 6.8 - ukázky vzorků uhlíkového kompozitu z fáze testování různých parametrů nastavení při jejich obrábění laserem

Po fázi testování obrábění laserem byly vytvořeny dvě varianty texturování povrchu. První úroveň faktoru textura povrchu byl povrch bez textury, druhou úrovní daného faktoru

byla textura I. (Obr. 6.9 a Obr. 6.10). Ta spočívala ve vypalování dírek o průměru 0,1 mm, hloubce 0,2 mm a rozteči mezi jednotlivými dírkami 0,3 mm.

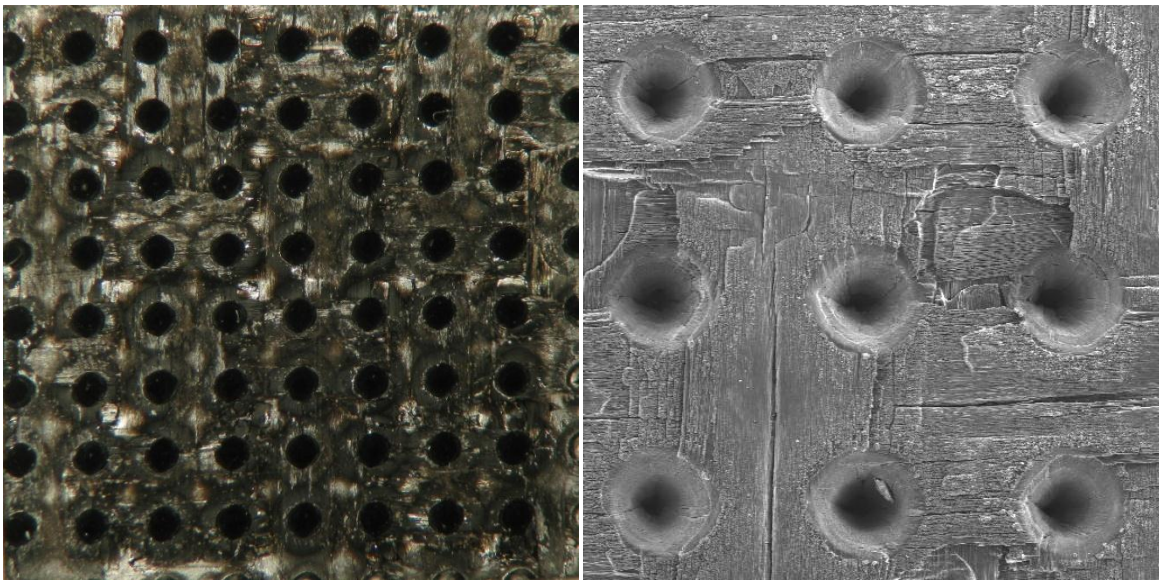


Obr. 6.9 - povrch vzorku s texturou varianty textura I. (vlevo) a povrch zaznamenaný metodou SEM při zvětšení 35

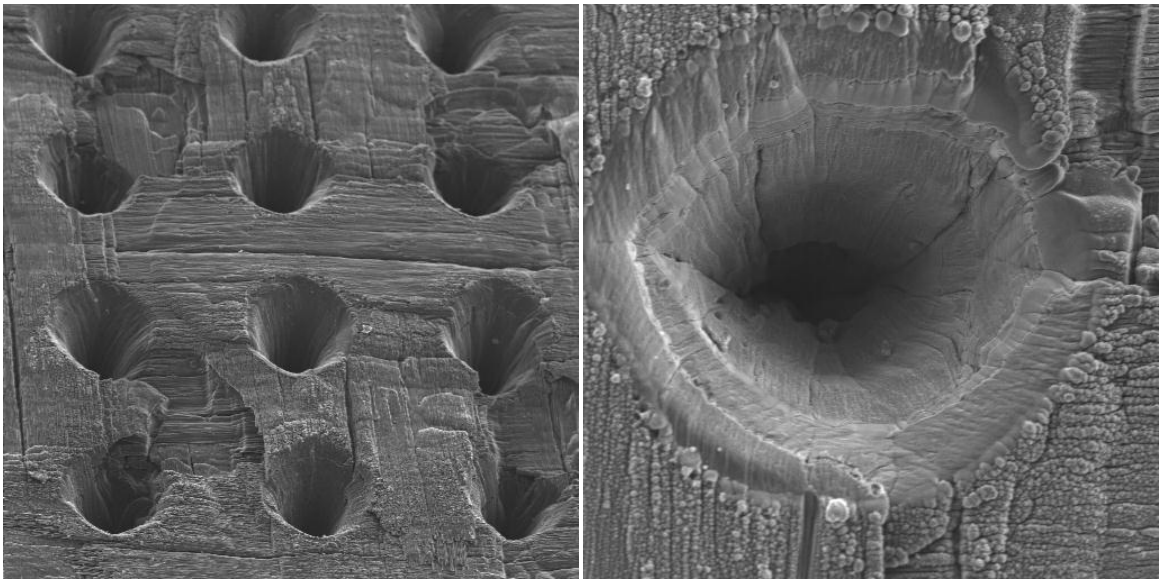


Obr. 6.10 - povrch vzorku s texturou varianty textura I. zaznamenaný metodou SEM (zleva zvětšení 35x a 750x)

Ve třetí úrovni faktoru „textura povrchu“ byly do povrchu laserem vypalovány otvory o průměru 0,4 mm, hloubce 0,8 mm a rozteči mezi jednotlivými otvory 1,2 mm (textura II., Obr. 6.11 a Obr. 6.12).



Obr. 6.11 - povrch vzorku s texturou varianty textura II. . (vlevo) a povrch zaznamenaný metodou SEM při zvětšení 35



Obr. 6.12 - povrch vzorku s texturou varianty textura II. zaznamenaný metodou SEM (zleva zvětšení 35x a 750x)

Každá z úrovní faktoru „Textura laserem“ byla provedena na 6 vzorcích pro jednotlivé úrovně faktoru opracování povrchu (neopracovaný povrch, opracovaný pomocí laseru a opracovaný broušením). Vzorek byl laserem texturován pouze z jedné definované strany. Programy pro obráběcí centrum MCVL 1000 LASER na jednotlivé druhy textur jsou uvedeny níže.

```
********************************
* UHLIKOVE DESTICKY
* textura 1
* (prumer 0.1, hloubka 0.2, roztec 0.3)
********************************
power 500
speed 80
frequency 4500
repeat 15
repeat 33
repeat 33
circle 0.001 0 0
reloffset 0.3 0
endrepeat
reloffset -9.9 0.3
endrepeat
offset 0 0
erasescreen
endrepeat
```

```
********************************
* UHLIKOVE DESTICKY
* textura 2
* (prumer 0.4, hloubka 0.8, roztec 1.2)
********************************
power 500
speed 80
frequency 4500
repeat 45
repeat 8
repeat 8
circle 0.15 0 0
circle 0.08 0 0
circle 0.01 0 0
reloffset 1.2 0
endrepeat
reloffset -9.6 1.2
endrepeat
offset 0 0
erasescreen
endrepeat
```

6.2.4 Úprava povrchu uhlíkového kompozitu depozicemi tenkých vrstev DLC

Cílem bylo vytvořit na uhlíkové vzorky povlaky DLC s dobrou adhezí a tloušťkou okolo 200 nm. Tomu byl přizpůsoben jak výběr metody, tak jednotlivých parametrů depozice. Zvolenou metodou depozice vrstvy DLC bylo PACVD (plasma assisted chemical vapor deposition). Depozice probíhala na Ústavu fyziky FS ČVUT v Praze pod vedením prof. Černého. Čištění vzorků před vlastní depozicí bylo provedeno jak chemicky, tak v plazmatu argonem.

Chemicky byly vzorky čištěny v ultrazvukové vaně naplněné acetonem po dobu t=10 min. Poté došlo k vyjmutí vzorků z acetonu a ofouknutí jeho zbytků z povrchu vzorků proudem dusíku. Čištění v plazmatu probíhalo za následujících podmínek. Do reaktoru byly umístěny uhlíkové vzorky společně se čtyřmi kousky křemíku, následně byl reaktor vyčerpán vývěvou na počáteční tlak $p = 6.10^{-2}$ Torr. Poté byl zapnut přívod argonu a r.f. (střídavé) plazma. Průtok argonu byl nastaven na 45 ccm/min, tlak na 5.10^{-1} Torr a předpětí -100 V. Doba čištění vzorků byla nastavena na 10 min. Po uplynutí nastaveného času byla ponechána pauza 20 minut na ochlazení vzorků a elektrod.

Prekurzorem neboli reakční látkou byl zvolen metan – CH_4 a vodík – H_2. Pro čištění i depozici bylo použito r. f. (střídavé) plazma o frekvenci f=13,56 MHz. Vzorky byly rozděleny na dvě skupiny, přičemž se tyto lišily v použitém předpětí během depozice a tím i času potřebném k dosažení požadované tloušťky. Vzorky každé skupiny byly povrchově upraveny z obou stran vždy za stejných podmínek depozice. Použitá elektroda měla rozměry 10x10 cm a byla zapojena jako katoda.

Depozice obou variant DLC povlaků uhlíkových vzorků CFRC probíhala v r.f. plazmatu následovně. Po zapnutí přívodu plynů (CH_4=50 ccm/min a H_2=30 ccm/min) se tlak ustálil na hodnotě $p=7,5.10^{-1}$ Torr.

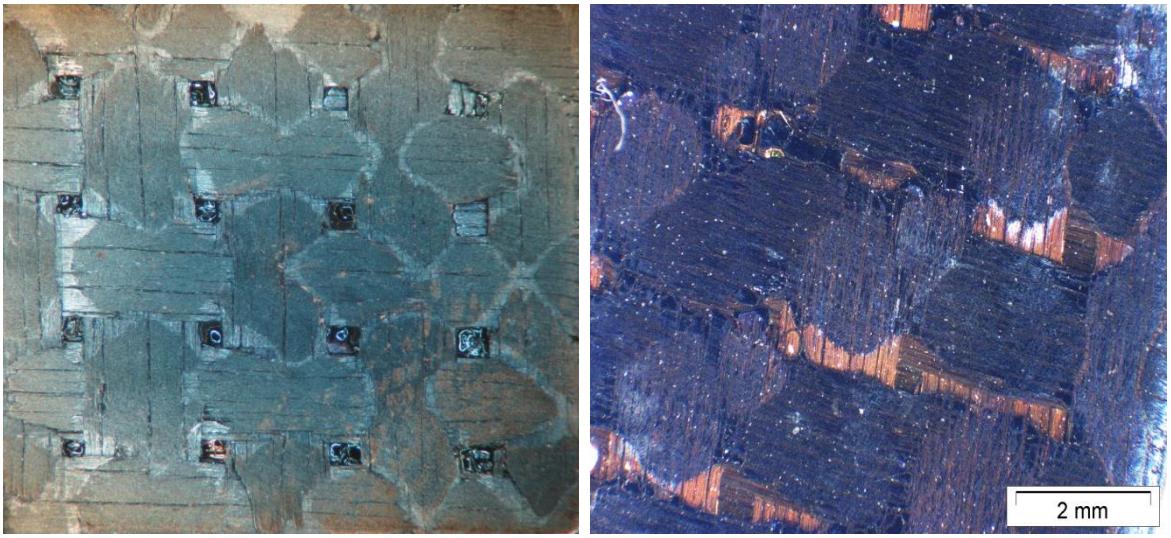
Depozice varianty DLC1 pro předpětí -50V probíhala ve dvou fázích. První část depozice probíhala po dobu t=20 min. Poté byla ponechána pauza na ochlazení elektrod

po dobu 10 minut. Následovala druhá část depozice rovněž po dobu t=20 min za nezměněných podmínek. (vzhledem k nižšímu použitému předpětí nedocházelo k tak rychlému ohřevu elektrod).

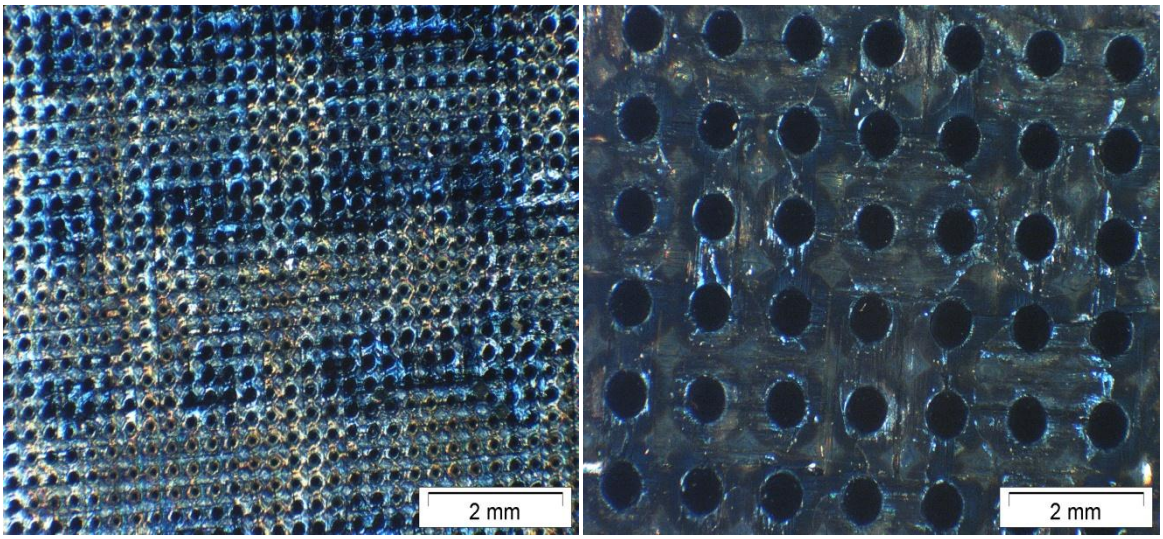
Depozice varianty DLC2 při předpětí -100 V probíhala také ve dvou fázích. První část depozice probíhala po dobu t = 8 min. Poté byla ponechána pauza na ochlazení elektrod po dobu 10 minut. Následovala druhá část depozice rovněž po dobu t = 8min za nezměněných podmínek. Přehled parametrů pro obě varianty deponovaného DLC je v tabulce 6.1. Ukázka vzorků s deponovanými vrstvami DLC je na obrázcích Obr. 6.13 a Obr. 6.14.

Tabulka 6.1 – přehled parametrů použitých pro depozici dvou variant DLC vrstvy

DLC1	DLC2
CH_4 = 50 ccm/min	CH_4 = 50 ccm/min
H_2 = 30 ccm/min	H_2 = 30 ccm/min
p = 7,7.10^{-1} Torr	p = 7,7.10^{-1} Torr
U = -50 – -60 V	U = -100 V
P = 20 – 25 W	P = 50 W
t = 2x20 min ➔ celková doba depozice t=40 min.	t = 2x8 min ➔ celková doba depozice t=16 min.



Obr. 6.13 - ukázka vzorků s deponovanou vrstvou amorfního uhlíku (vlevo - broušený vzorek s deponovanou vrstvou DLC 1, vpravo - broušený vzorek s deponovanou vrstvou DLC 2)



Obr. 6.14 - ukázka vzorků s deponovanou vrstvou amorfního uhlíku (vlevo - broušený povrch, textura 1, deponovaná vrstva DLC 1, vpravo - laserem modifikovaný povrch, textura 2, deponovaná vrstvou DLC 2)

6.3 Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu kompozitu CFRC na vybrané parametry drsnosti povrchu

Laboratoř metrologie Ústavu technologie obrábění, projektování a metrologie FS ČVUT v Praze je vybavena dotykovým profiloměrem Talysurf 6 firmy Taylor Hobson, přístroj je díky pravidelné údržbě ve velmi dobrém stavu. Sestava vyhovuje požadavkům na přístroje tohoto typu v systému norem GPS. Celkový pohled na měřicí zařízení je na obr. 6.15. Přístroj se skládá ze základní desky s dvěma T drážkami a prizmatem pro uložení měřené součásti. Na základní desce je umístěn vertikální stojan s vedením pro svislý motorický pohyb posuvové jednotky s přesným přímovodem, o rozsahu posuvu 120 mm. Na posuvovou jednotku se instalují vyměnitelné snímače s dotykovým hrotem, které pracují na indukčním principu. Množství nejrůznějších snímačů, které jsou k dispozici, nám umožňuje pro konkrétní aplikaci zvolit vždy nejvhodnější snímač. Signál ve formě elektrických impulzů je následně přes zesilovače a elektrické frekvenční filtry veden do počítače Talydata 2000, který se stará nejen o zpracování signálu, ale také o řízení cyklu měření a vyhodnocení. Přístroj je dále vybaven lineárním zapisovačem pro záznam profilu ve zvoleném vertikálním a horizontálním zvětšení a tiskárnou pro tisk požadované

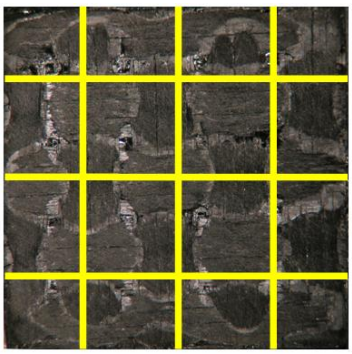
dokumentace. Vyhodnocované zvolené parametry jsou prakticky identické s novým doporučením GPS, v některých případech je jiné označení symboly podle britské normy. Také délka, na které jsou parametry definovány (základní 1 nebo vyhodnocovaná ln) je rozdílná. Porovnání je uvedeno v tabulce 6.2.

Tabulka 6.2: Porovnání označení parametrů

GPSr. 1999	Délka	Talysurf 6	Délka
Rp, Wp	l	Rp,Wp	ln
Rv, Wv	l	Rv, Wv	ln
Rz	l	Rti	l
Re	l	Rtm	ln
Rt, Wt	ln	Rp+Rv, Wt	ln
Ra, Wa	l	Ra, Wa	ln
Rq,Wq	l	Rq, Wq	ln
Rsk	l	Rsk	ln
Rku	l	Rku	ln
RSm	l	Sm	ln
RAq, WAq	l	Aq, Aq	ln
Rmr(c)	ln	Tp	ln
R8c	ln	[Mm]	ln
Rmr	ln	HTP	ln
Abbottova křivka	ln	Abbottova křivka	ln
Amplitudové rozd.	ln	Amplitudové rozd.	ln

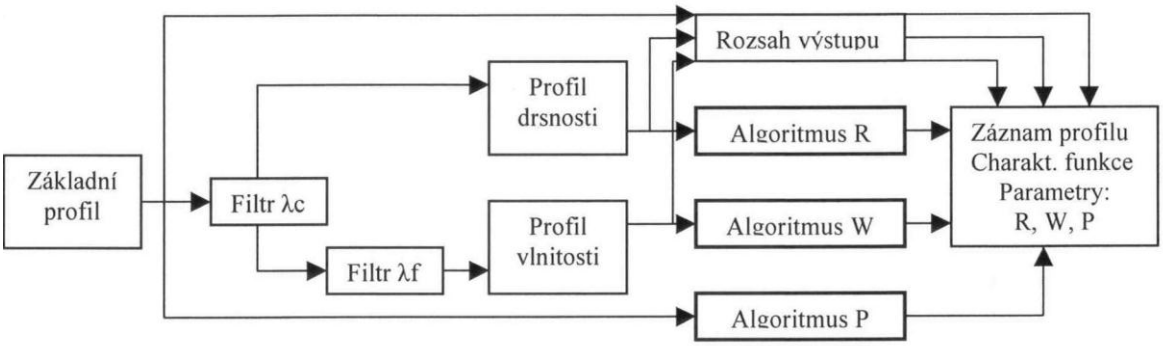
Obr. 6.15: Profiloměr Talysurf 6

Měření bylo prováděno v souladu s pravidly a postupy uvedenými v kapitole 4.1 na profiloměru Taylor-Hobson Talysurf 6 bez použití kluzné opěrky. Měření bylo provedeno za použití standardního snímače s poloměrem hrotu 2 μm a příslušných filtrů. Na každém z 54 vzorků bylo provedeno měření v 6ti řezech (3 rovnoběžné řezy ve 2 na sebe navzájem kolmých směrech), schéma měření je znázorněno na obrázku 6.16. Byly sledovány následující parametry, jejichž hodnoty představují průměrnou hodnotu z 6-ti měření: Ra, Rq, Ry, Rtm, Rv, Rp, Sm, DELQ, Rsk, Rku, S, R3z, Rpm, R3y včetně jejich směrodatných odchylek. Což nám poskytuje veliké množství dat, díky



Obr. 6.16 – znázornění řezů ve kterých byly měřeny vzorky CFRC na přístroji Talysurf 6

kterým můžeme popsat vliv jednotlivých povrchových úprav na povrch kompozitního materiálu CFRC. Při hodnocení struktury povrchu je nutná znalost definic parametrů, jejich význam a tzv. vypovídací schopnost a použití pro různé druhy povrchů vyrobených různými technologiemi. Všechny uvedené parametry jsou definovány pro profily drsnosti, vlnitosti a základního profilu (R, W, P). Přehledné informativní schéma jejich rozlišení je na obr. 6.17 ve formě vývojového diagramu pro posuzování struktury povrchu.



Obr. 6.17: Schéma posuzování struktury povrchu

Pro hodnocení struktury povrchu jsou definovány 3 druhy parametrů, které vycházejí z rozboru uvedených jednotlivých profilů, jsou to:

R - parametr: vypočítaný z profilu drsnosti

W - parametr: vypočítaný z profilu vlnitosti

P - parametr: vypočítaný ze základního profilu.

6.3.1 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou aritmetickou úchylku profilu

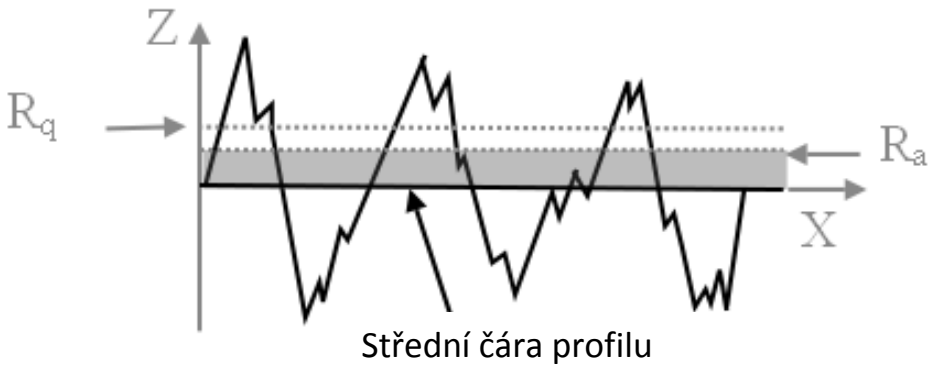
<u>Průměrná aritmetická úchylka profilu Ra, Wa, Pa</u>: aritmetický průměr absolutních hodnot pořadnic Z(x) v rozsahu základní délky

$$Ra\ (Wa, Pa) = \frac{1}{l}\int_0^l |Z(x)|dx \qquad (6.1)$$

kde 1 = lr, lw, lp.

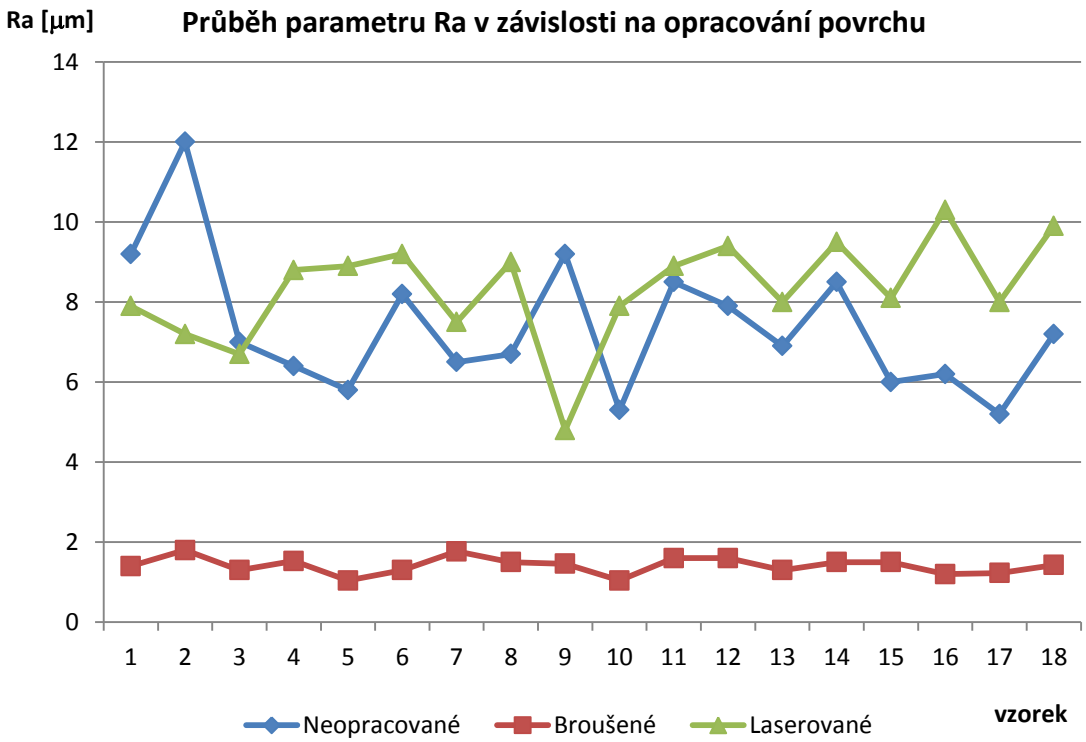
Grafická interpretace je na obr. 6.18. Parametr Ra z podstaty své definice nerozlišuje výstupky a prohlubně a neumožňuje určit charakter povrchu. Informuje pouze o průměrné

velikosti úchylek (hladký nebo hrubý povrch). Přes tyto nedostatky je to dosud nejpoužívanější parametr.



Obr. 6.18 - grafická interpretace parametrů drsnosti povrchu Ra a Rq

Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou aritmetickou úchylku profilu je znázorněn v grafu Obr. 6.19.



Obr. 6.19 - Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou aritmetickou úchylku drsnosti profilu Ra

Je zřejmé, že broušení vedlo k výraznému snížení drsnosti povrchu Ra v průměru na 1,42µm. Zatímco modifikace povrchu laserem k výrazné změně nevedla, Ra se

z průměrných 7,37 µm u neopracovaného povrchu zvýšilo na 8,4 µm u povrchu modifikovaného laserem, což představuje nárůst o 14%.

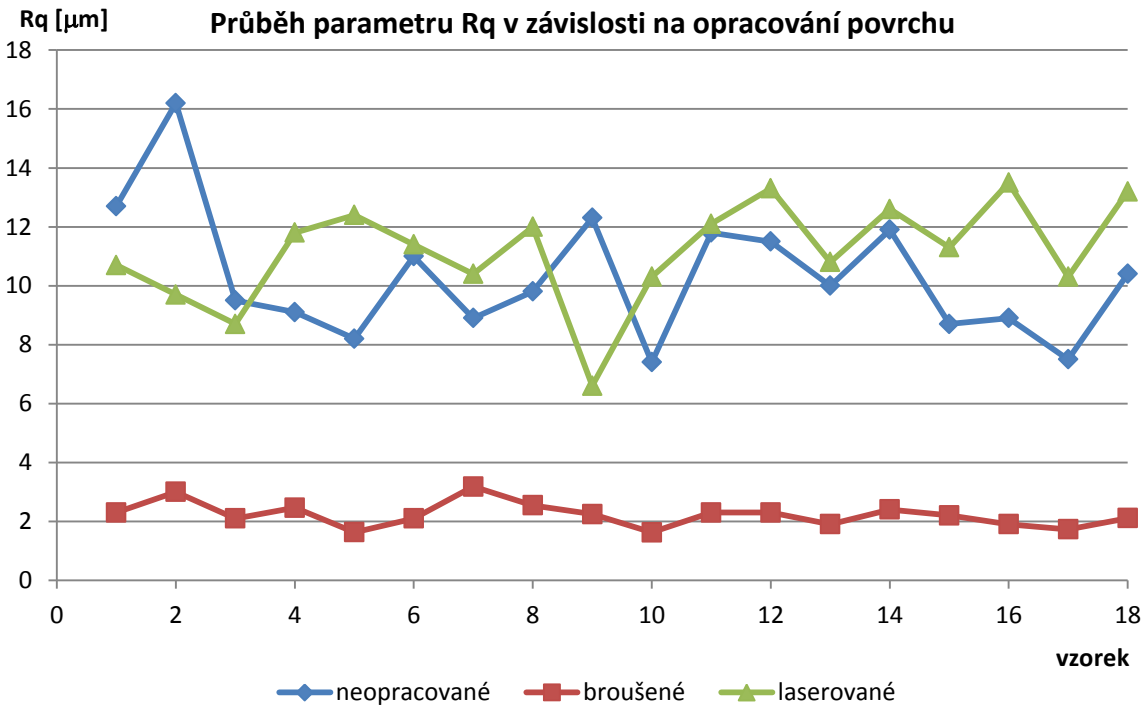
6.3.2 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou kvadratickou úchylku profilu

Průměrná kvadratická úchylka profilu Rq, Wq, Pq: kvadratický průměr pořadnic Z (x) v rozsahu základní délky

$$Rq\ (Wq, Pq) = \sqrt{\frac{1}{l}\int_0^l Z^2(x)dx} \qquad (6.2)$$

Kde 1 = lr, lw, lp.

Tento parametr vyjadřuje směrodatnou odchylku pořadnic všech bodů profilu od střední čáry, vychází tedy z centrálního momentu 2. řádu. Grafická interpretace je na obr. 6.18. Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou kvadratickou úchylku profilu je znázorněn v grafu Obr. 6.20.



Obr. 6.20 - Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou kvadratickou úchylku drsnosti profilu Rq

Z grafu je zřejmé, že broušení vedlo také ke snížení průměrné kvadratické úchylky profilu Rq z hodnoty 10,32µm u neopracovaného povrchu v průměru na 2,22µm. Zatímco

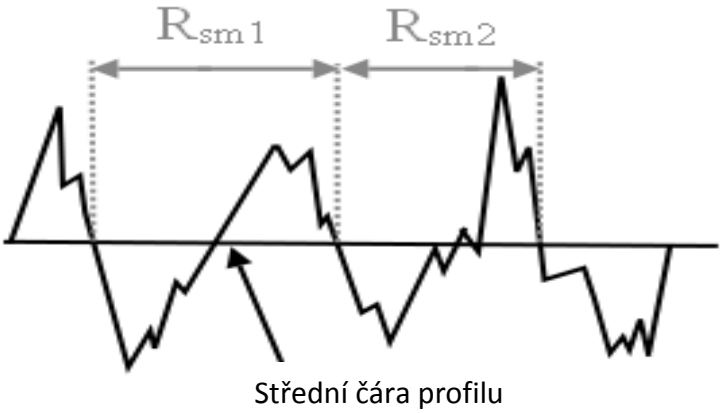
modifikace povrchu laserem vedla k mírnému zvýšení parametru Rq na hodnotu 11,17µm.

6.3.3 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou šířku prvků profilu

Průměrná šířka prvků profilu RSm, WSm, PSm: aritmetický průměr šířek Xs prvků profilu v rozsahu základní délky

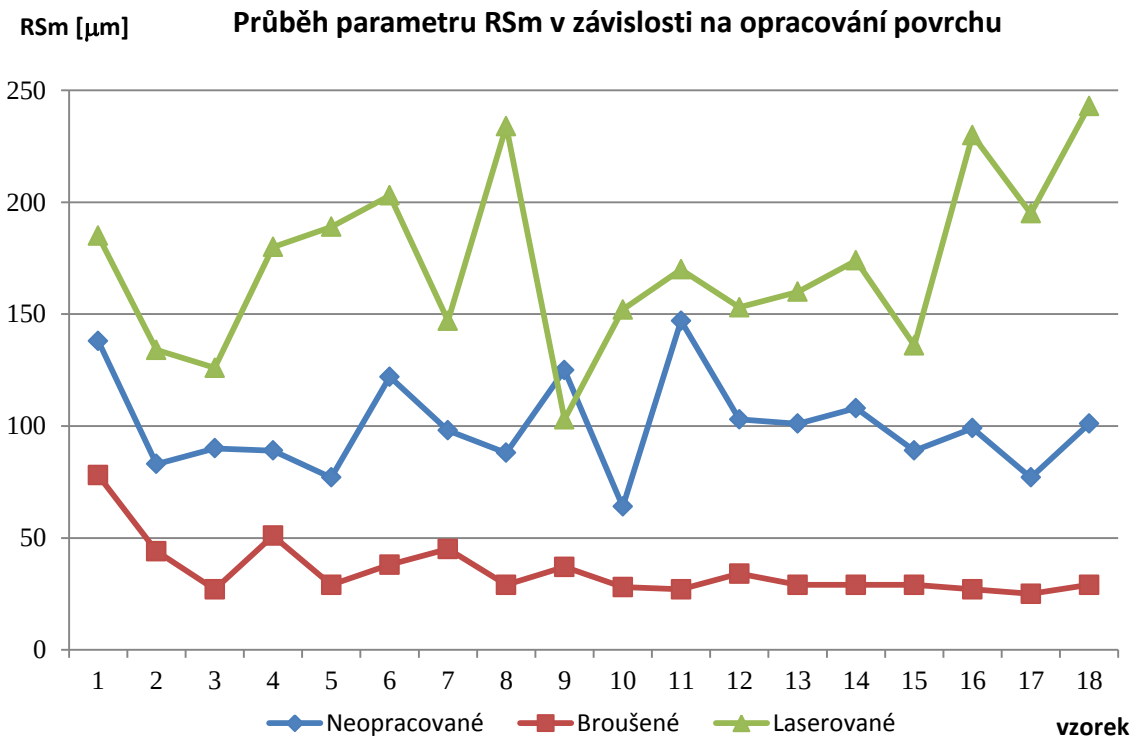
$$RSm(WSm, PSm) = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m} Xs_i \qquad (6.3)$$

Grafická interpretace průměrné šířky prvků profilu RSm je na obr. 6.21.



Obr. 6.21 - grafická interpretace průměrné šířky prvků profilu RSm

Průměrná hodnota průměrné šířky prvků profilu na 18ti neopracovaných vzorcích činila 99,9µm. U broušených vzorků hodnota RSm klesla na 35,3µm. Laserová modifikace povrchu se promítla do nárůstu průměrné šířky prvků profilu drsnosti na hodnotu 173µm.



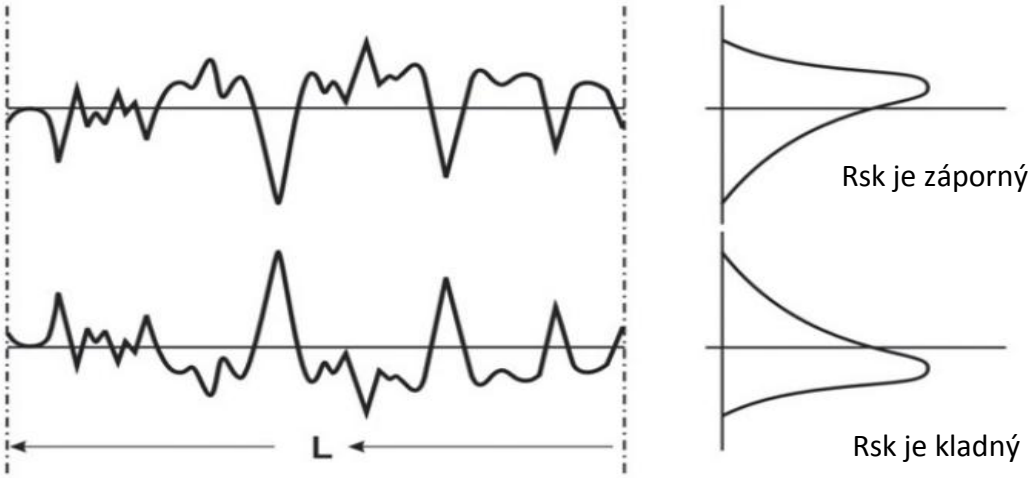
Obr. 6.22 - Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na průměrnou šířku prvků profilu RSm

6.3.4 Vliv úrovní faktoru opracování povrchu na šikmost a špičatost profilu

Šikmost profilu (skewness) Rsk, Wsk, Psk: podíl průměrné hodnoty třetích mocnin pořadnic Z(x) a třetí mocniny hodnoty Rq (Wq, Pq) v rozsahu základní délky

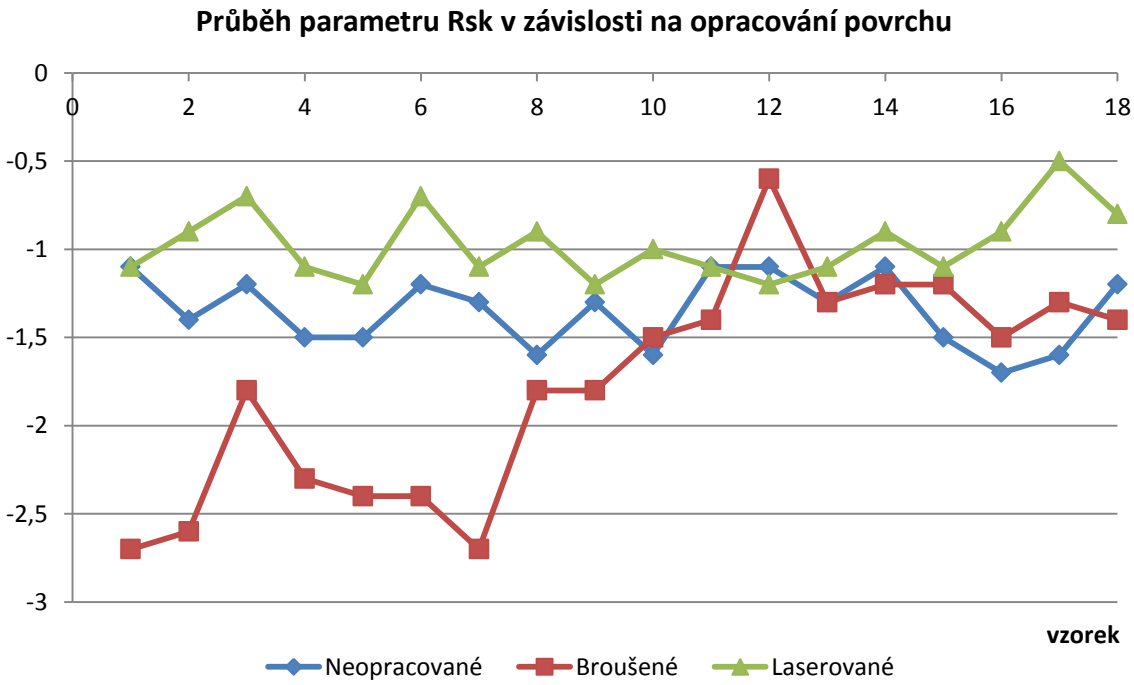
$$Rsk = \frac{1}{Rq^3}\left[\frac{1}{lr}\int_0^{lr} |Z^3(x)dx|\right] \qquad (6.4)$$

Analogicky jsou definovány Wsk, Psk. Parametry šikmosti jsou mírou symetrie a hustoty pravděpodobnosti hodnot pořadnic a jsou ovlivňovány ojedinělými výstupky nebo prohlubněmi. Grafická interpretace parametru Rsk je na Obr. 6.23.



Obr. 6.23 - grafická interpretace šikmosti profilu Rsk

Průměrná hodnota šikmosti profilu na 18ti neopracovaných vzorcích činila -1,35. U broušených vzorků hodnota Rsk klesla na -1,77. Laserová modifikace povrchu se promítla do nárůstu průměrné šikmosti profilu na hodnotu -0,97. Ve věch třech případech tedy v různé míře převládají prohlubně. Průběh parametru Rsk v závislosti na opracování povrchu je na Obr. 6.24.

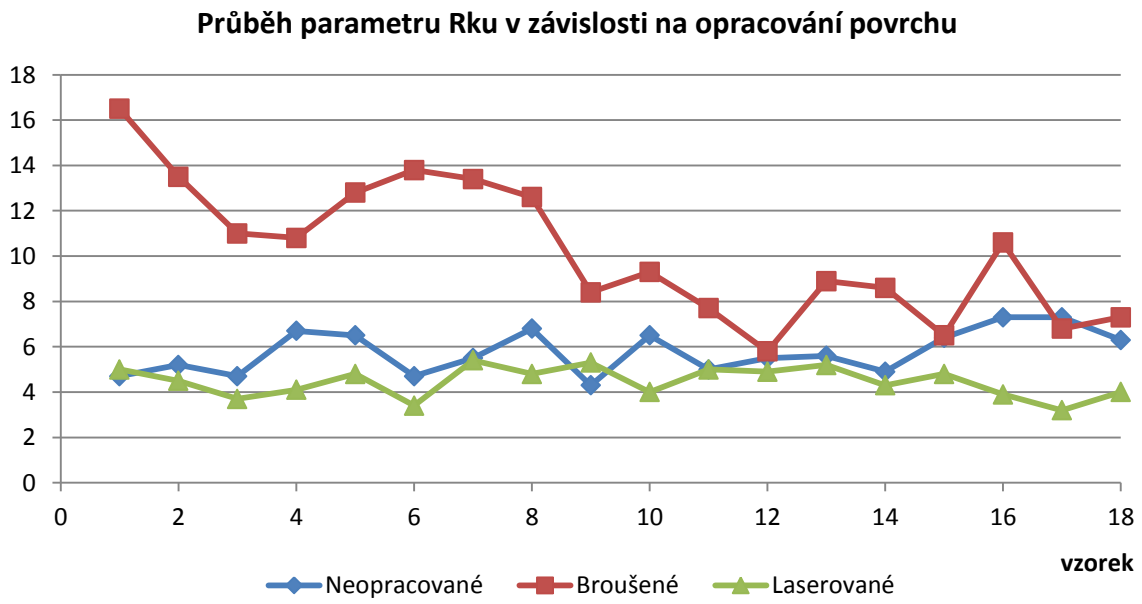


Obr. 6.24 - Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na šikmost profilu Rsk

Špičatost profilu (kurtosis) Rku, Wku, Pku: podíl průměrné hodnoty čtvrtých mocnin pořadnic Z(x) a čtvrté mocniny hodnoty Rq (Wq, Pq) v rozsahu základní délky

$$Rku = \frac{1}{Rq^4}\left[\frac{1}{lr}\int_0^{lr} |Z^4(x)dx|\right] \qquad (6.5)$$

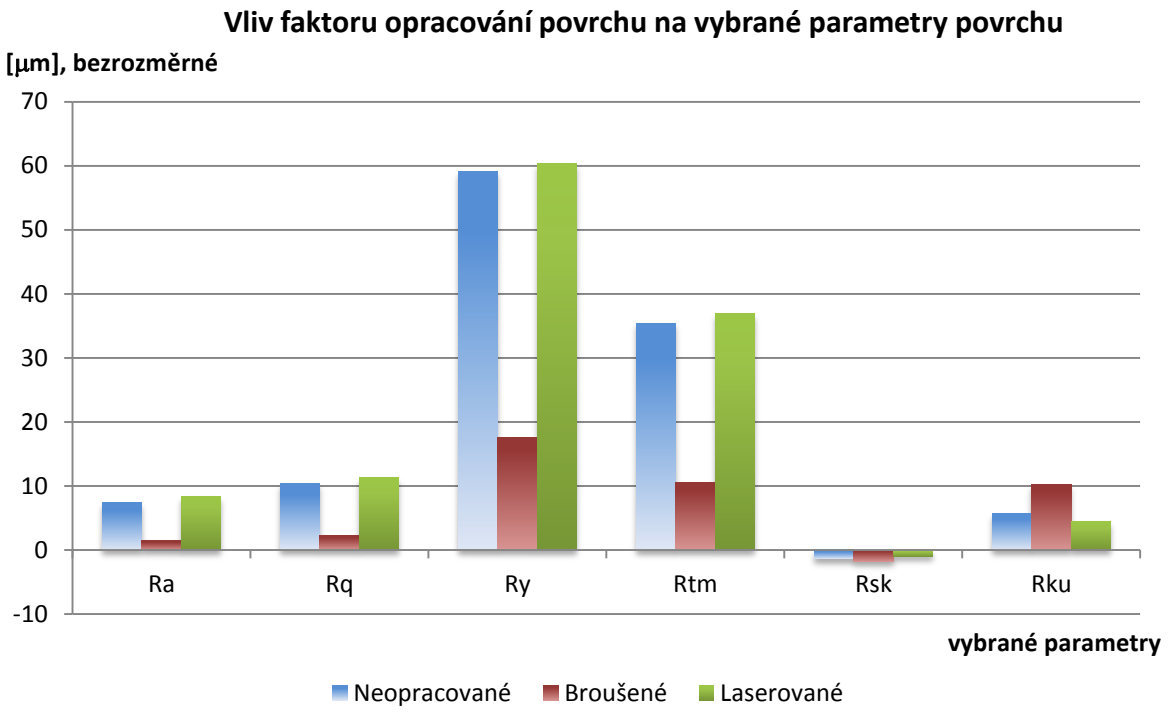
Analogicky jsou definovány Wku, Pku. Parametry jsou mírou špičatosti rozložení hustoty pravděpodobnosti hodnot pořadnic a jsou též ovlivňovány ojedinělými výstupky nebo prohlubněmi. Ze vztahů (6.4) a (6.5) pro výpočet vyplývá, že jsou poměrem 3., resp. 4. centrálního momentu a 3. (resp. 4.) mocniny směrodatné odchylky (Rq). Představují tedy koeficienty asymetrie, resp. špičatosti (koncentrace) profilu, neboť profil je možno klasifikovat jako statistický soubor naměřených hodnot pořadnic jednotlivých bodů profilu. Tyto parametry mají značný význam při hodnocení struktury povrchu především s hlediska jeho funkčních vlastností. Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na špičatost profilu je znázorněn v grafu Obr. 6.25.



Obr. 6.25 - Vliv jednotlivých úrovní faktoru opracování povrchu na špičatost profilu Rku

Průměrná hodnota špičatosti profilu na 18ti neopracovaných vzorcích činila 5,77. U broušených vzorků hodnota Rku stoupla na hodnotu 10,24. Laserová modifikace povrchu se promítla do poklesu průměrné špičatosti profilu na hodnotu 4,46.

Vliv faktoru opracování povrchu na jednotlivé parametry profilu povrchu je znázorněn na Obr. 6.26.



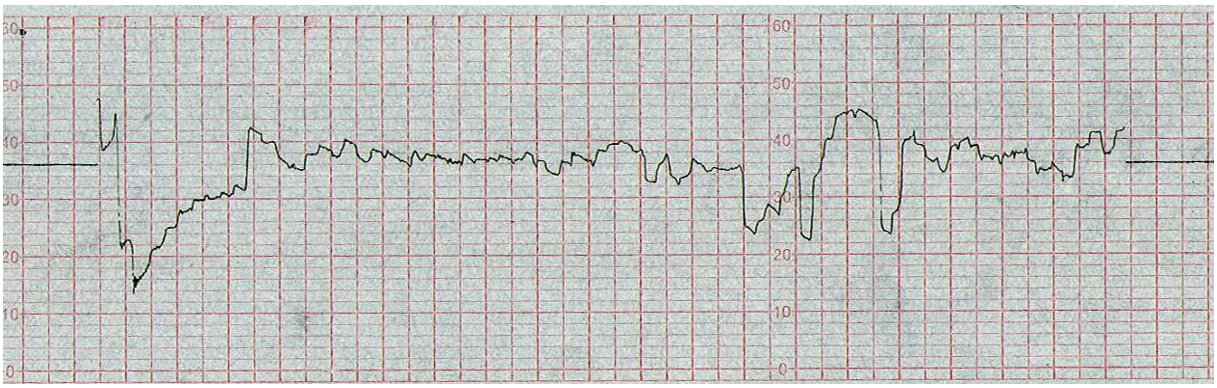
Obr 6.26 - Vliv opracování povrchu na vybrané parametry profilu drsnosti povrchu

Kompletní přehled všech měřených parametrů profilu drsnosti povrchu je uveden v příloze 2.

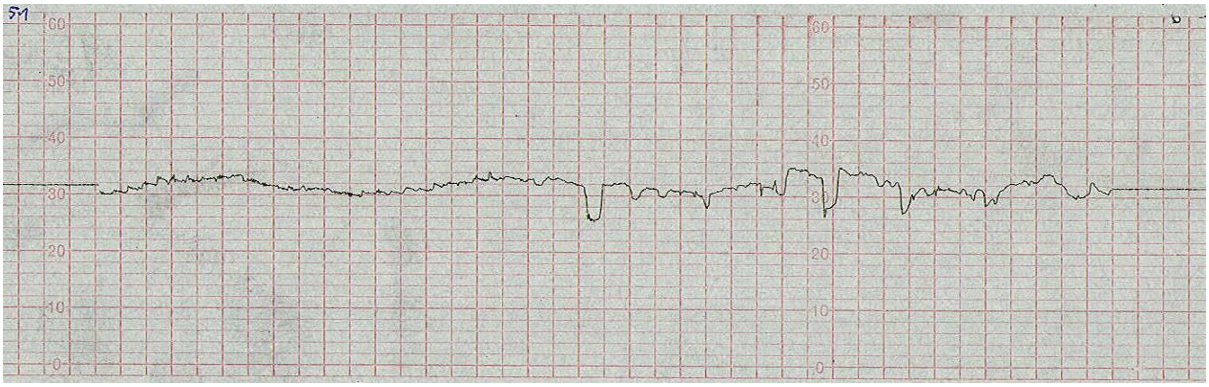
6.4 Záznamy povrchů hotových vzorků

Níže jsou zobrazené záznamy vybraných povrchů již hotových vzorků, tzn. povrch má příslušnou úroveň opracování, úroveň textury povrchu i úroveň deponované vrstvy. Záznamy byly pořízeny na profiloměru Taylor-Hobson Talysurf 6 a jsou zobrazeny na Obr. 6.27, Obr. 6.28 a Obr. 6.29.

Obr.6.27- Záznam povrchu vzorku č.20 (neopracovaný, textura 2, bez deponované vrstvy)



Obr.6.28 - Záznam povrchu vzorku č.8 (neopracovaný, bez laserové textury, deponovaná vrstva DLC1)



Obr.6.29 - Záznam povrchu vzorku č.51 (broušený, textura 2, deponovaná vrstva DLC2)

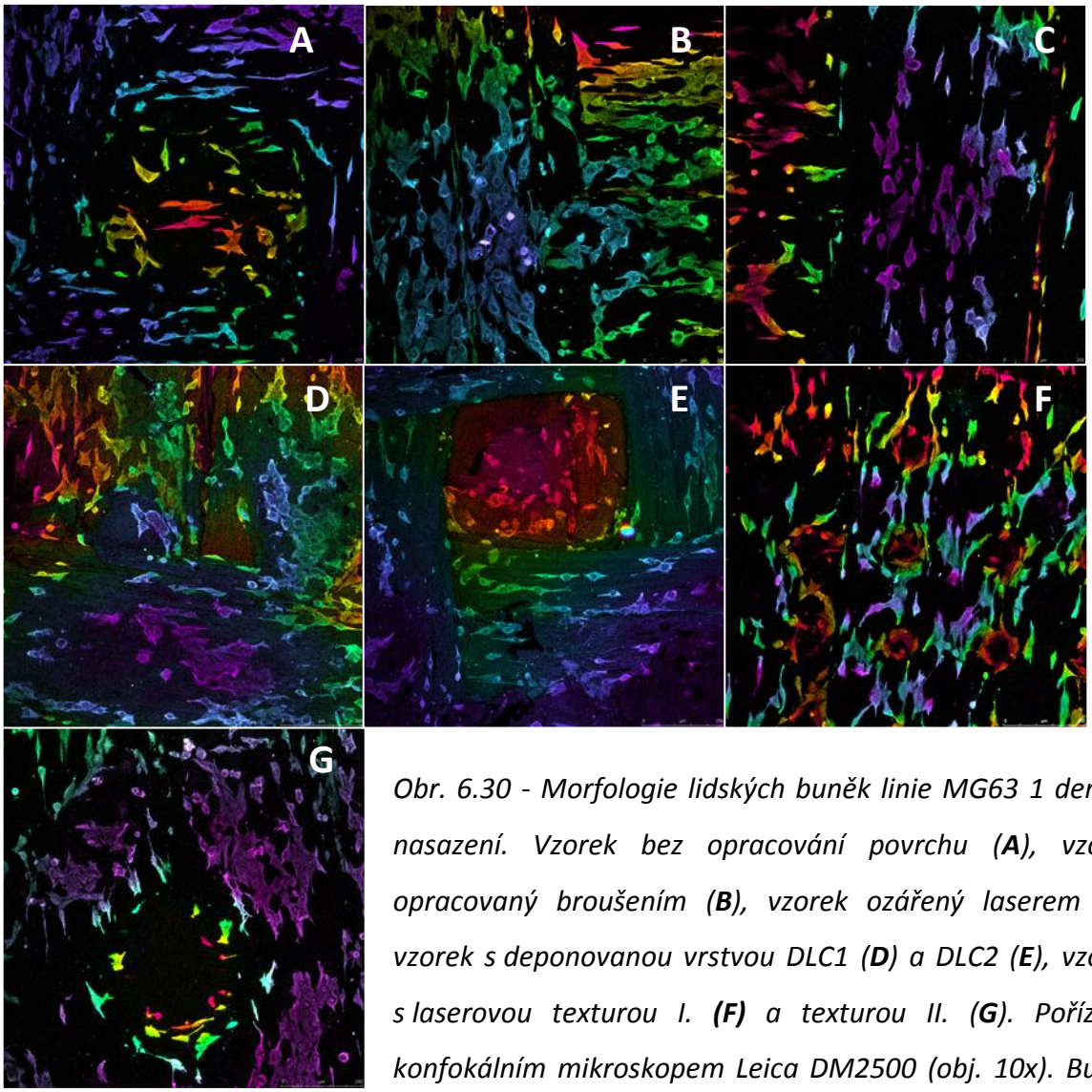
Jak horizontální tak i vertikální zvětšení bylo pro snadné porovnání u všech vzorků voleno konstantní a to následovně: horizontální zvětšení V_h = 50x (1 dílek odpovídá 0,1mm); vertikální zvětšení Vv = 500x (1 dílek odpovídá 4 μm). Na prvním záznamu je velice dobře patrná rozteč řádkování laseru při variantě perforace 2, jenž činí 0,3 mm čemuž odpovídají 3 dílky v horizontálním směru.

6.5 Kultivace a měření počtů a ploch buněk na vzorcích CFRC

Kultivace buněk stejně jako získávání hodnot jejich počtů a ploch probíhala na Fyziologickém ústavu AV ČR, Praha 4 pod vedením MUDr. Lucie Bačákové, CSc. Vzorky kompozitů CFRC byly nejprve 2 hodiny sterilizovány v 70% Etanolu, poté byly osušeny na vzduchu, umístěny do kultivačních misek s 24 komůrkami (průměr jednotlivých komůrek byl 15mm, materiál TPP, výrobce Trasadingen, Švýcarsko) a osazeny lidskými kostními buňkami linie MG-63 v hustotě 30 000 buněk/komůrku, což je přibližně 17 000 buněk/cm^2. Buňky byly pěstovány v 1 ml roztoku Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Sigma, U.S.A., Cat. No D5648) doplněným o 10% hovězí plodový roztok (FBS; Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) a 40 μg/ml gentamycinu (LEK, Ljubljana, Slovenia). Kultivace probíhala při 37^0C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO_2.

Po 24 hodinách od nasazení byly buňky opláchnuty roztokem PBS (phosphate-buffered saline), zafixovány a zvýrazněny fluorescenčními barvivy. Fixace proběhla umístěním vzorků do 70% Etanolu o teplotě -20^0C po dobu 10 minut. Proteiny buněčné membrány a cytoplazmatu byly zvýrazněny barvivem Texas Red C_2-maleimide (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; 20ng/ml in PBS), buněčná jádra byla obarvena látkou Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.; 5μg/ml in PBS). Vlastní barvení probíhalo po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Poté byly buňky na vzorcích nasnímány pomocí konvenčního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 50 a konfokálního mikroskopu Leica DM 2500.

Na fluorescenčním mikroskopu byl každý vzorek zachycen v 16ti zorných polích, která byla náhodně, avšak rovnoměrně rozložena po povrchu vzorku. V těchto zorných polích byly buňky spočítány a jejich plocha byla vyhodnocena v programu Atlas. Za tuto časově náročnou činnost patří mé poděkování Markétě Bačákové. Konfokální mikroskopie umožnila přesné zaostření buněk na nepravidelném povrchu i uvnitř uměle vytvořených pórů, složením finálního obrazu z více řezů a umožnila tak studovat i morfologii adherovaných buněk (Obr. 6.30). U vzorku číslo 50 došlo ke kontaminaci nečistotami a nejsou tak pro něj k dispozici žádné měřené hodnoty.

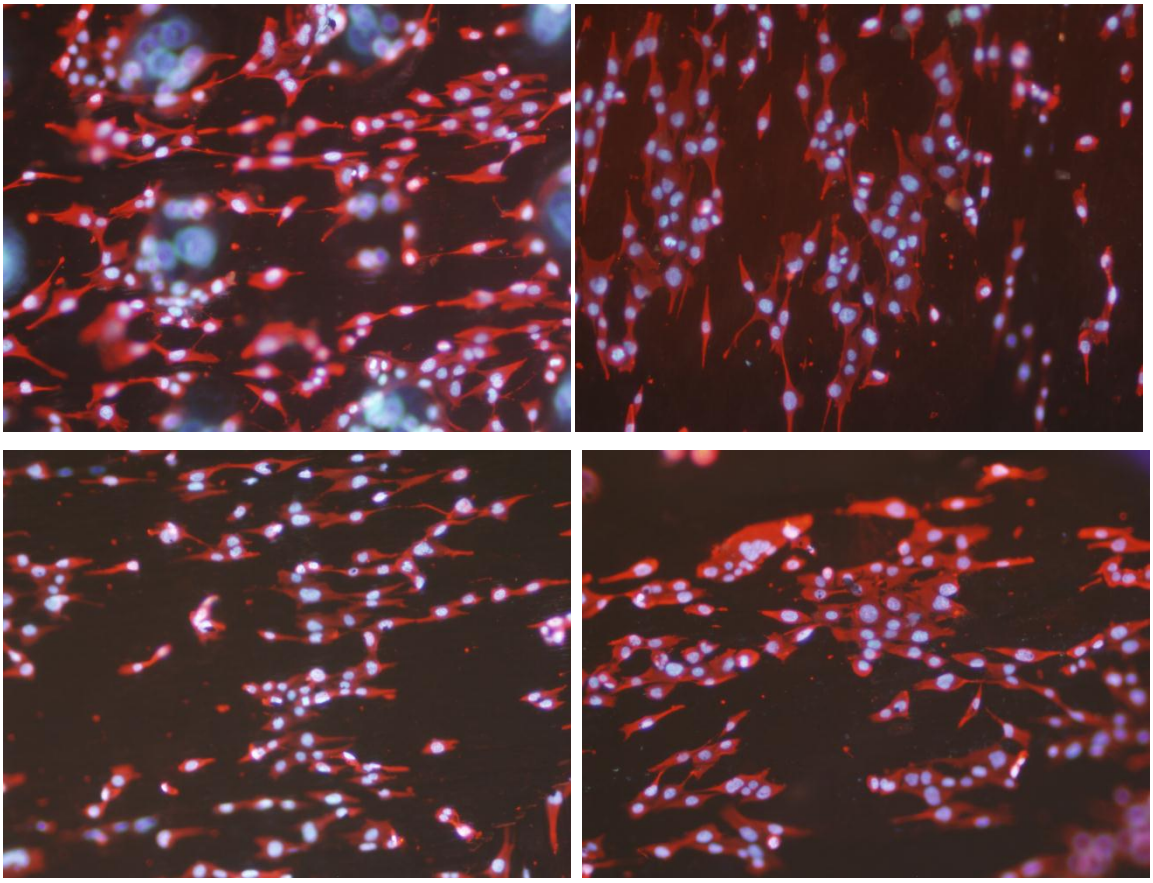


*Obr. 6.30 - Morfologie lidských buněk linie MG63 1 den po nasazení. Vzorek bez opracování povrchu (**A**), vzorek opracovaný broušením (**B**), vzorek ozářený laserem (**C**), vzorek s deponovanou vrstvou DLC1 (**D**) a DLC2 (**E**), vzorek s laserovou texturou I. **(F)** a texturou II. (**G**). Pořízeno konfokálním mikroskopem Leica DM2500 (obj. 10x). Buňky jsou zvýrazněny spektrálními barvami v závislosti na hloubce, ve které se nacházely. **A** - kompozice 18 řezů do hloubky 170 µm; **B, C -** 8 řezů, hloubka 70 µm; **D -** 6 řezů, hloubka 50 µm; **E -** 25 řezů, hloubka 240 µm; **F -** 11 řezů, hloubka 100 µm; **G** - 29 řezů, hloubka 280 µm. Tloušťka všech řezů byla 10 µm.*

6.6 Analýza počtů buněk a jejich ploch v závislosti na jednotlivých faktorech návrhu

Každý z 54 vzorků byl na mikroskopu Olympus IX 50 zachycen v 16-ti zorných polích ve vysokém rozlišení. To představuje celkem 864 snímků, na těchto snímcích bylo následně provedeno jak měření ploch adherovaných buněk, tak vyhodnocení jejich počtu. Tyto dvě hodnoty pro každý vzorek představují responsní veličiny, jejichž závislost na jednotlivých faktorech byla předmětem analýzy. Ukázka několika náhledů zorných polí, ve

kterých probíhalo vyhodnocení počtů i ploch buněk je na obrázku 6.31. Výsledky uvedených měření jsou uvedeny v Příloze 3 a Příloze 4. Výsledný počet buněk pro jednotlivé vzorky je uváděn jako jejich hustota na cm^2 povrchu vzorku. Plocha buněk je udávána v μm^2. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.3 a v grafech (Obr. 6.32 a 6.33).

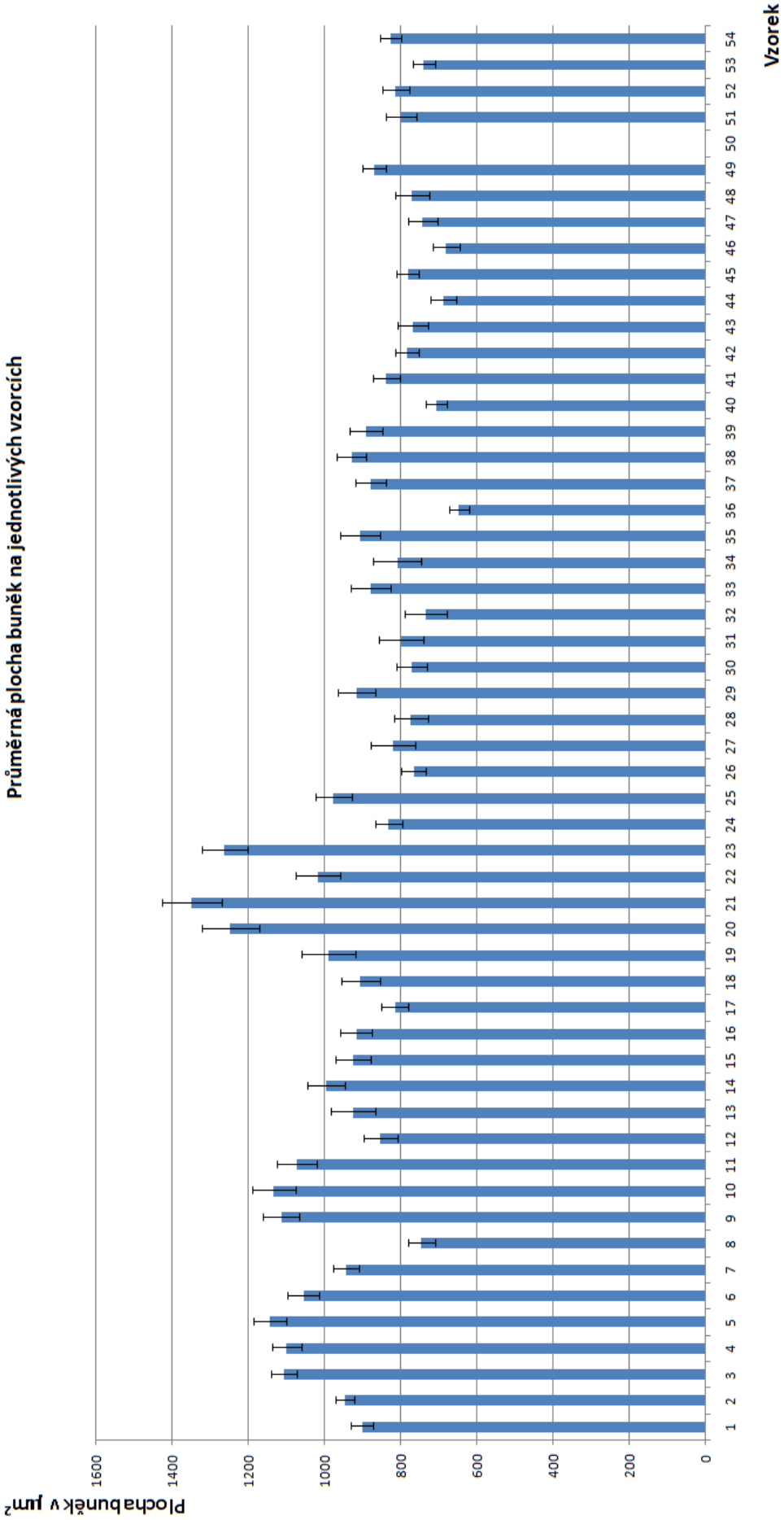


Obr. 6.31 – Ukázka zorných polí, ve kterých probíhalo vyhodnocování počtů buněk a měření jejich ploch

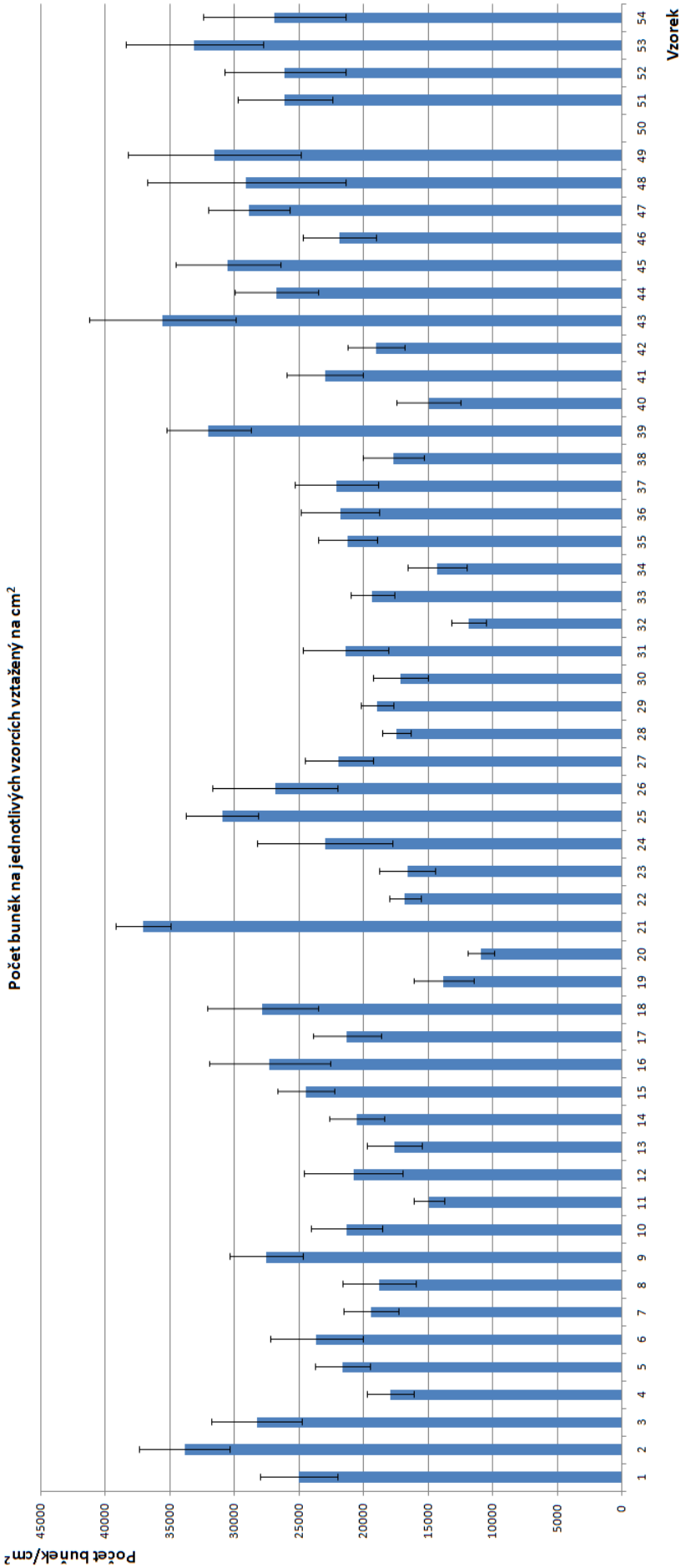
Tabulka 6.3

Shrnutí výsledků průměrné plochy buněk v μm^2 a počtu buněk na cm^2 na jednotlivých vzorcích.

Číslo vzorku	Plocha buněk v μm^2	SEM	Počet buněk na cm^2	SEM
1	902	28	25002	2976
2	947	24	33850	3508
3	1107	33	28269	3518
4	1099	39	17923	1800
5	1144	42	21599	2131
6	1055	41	23640	3561
7	943	33	19421	2112
8	745	35	18785	2813
9	1114	47	27543	2839
10	1133	57	21281	2758
11	1071	52	14928	1175
12	853	45	20782	3838
13	926	58	17606	2096
14	996	49	20510	2107
15	924	46	24457	2196
16	917	41	27270	4657
17	815	35	21281	2648
18	905	51	27815	4298
19	989	72	13794	2305
20	1247	76	10935	1020
21	1348	78	37071	2158
22	1016	59	16789	1242
23	1262	60	16607	2178
24	832	35	23005	5266
25	976	48	30946	2779
26	766	33	26862	4863
27	821	58	21916	2659
28	773	44	17469	1103
29	915	49	18921	1252
30	772	40	17152	2102
31	797	58	21372	3302
32	735	55	11888	1327
33	878	53	19330	1678
34	809	62	14293	2258
35	906	52	21236	2252
36	647	25	21825	3039
37	879	40	22098	3215
38	929	38	17696	2359
39	892	42	31989	3236
40	706	27	14974	2498
41	837	35	23005	2968
42	783	31	19012	2224
43	767	40	35574	5689
44	689	34	26771	3224
45	781	30	30492	4047
46	681	35	21871	2811
47	743	38	28895	3134
48	770	44	29085	7664
49	869	31	31536	6688
50	-		-	-
51	799	39	26091	3634
52	813	37	26091	4694
53	740	29	33124	5315
54	826	28	26907	5551



Obr. 6.32 – Výsledné průměrné hodnoty plochy adherovaných buněk na jednotlivých vzorcích v μm^2



Obr. 6.33 – Výsledné počty buněk vztažené na cm^2 na jednotlivých vzorcích

Jak je vidět z předcházejících grafů, jedná se o veliké množství naměřených dat, které je třeba analyzovat, aby mohl být posouzen vliv jednotlivých faktorů a jejich společného působení (interakcí) na zvolené odezvy, jimiž jsou počet buněk na cm^2 a průměrná plocha adherovaných buněk v μm^2. Cílem analýzy je vybrat ty faktory, které mají statisticky významný vliv na úroveň odezvy. K tomu použiji metody analýzy rozptylu (ANOVA), která se obecně používá k identifikování zdrojů variability v procesu a ke stanovení významu jejich jednotlivých faktorů. Jedná se o velmi rozšířenou statistickou metodu pro analyzování experimentálních dat, jde vlastně o metodu testování hypotéz týkajících se středních hodnot.

6.6.1 Analýza výsledků průměrných ploch buněk v závislosti na jednotlivých faktorech

Pro vyhodnocení výsledků bylo stejně jako pro navržení experimentu použito softwarového řešení Design Expert 6.0. Výsledky analýzy jsou shrnuty do Tabulky 6.4

Tabulka 6.4

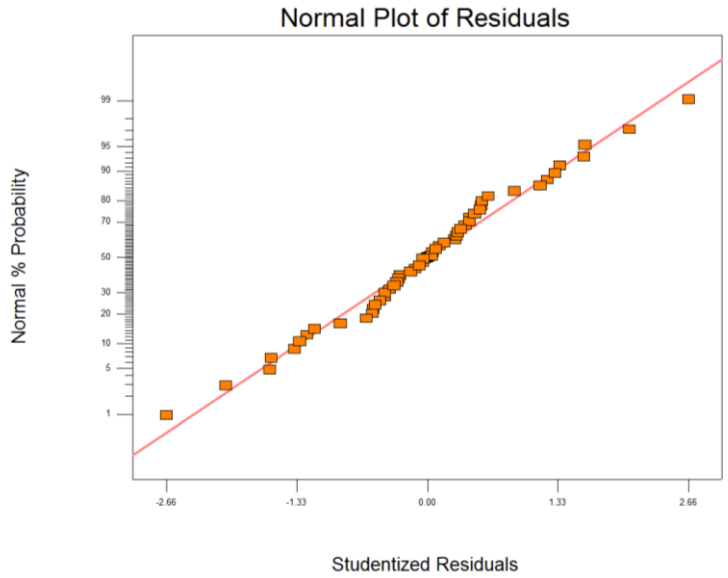
Tabulka s výsledky analýzy rozptylu pro stanovení vlivu jednotlivých faktorů na responzní veličinu – průměrnou plochu buněk v μm^2.

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

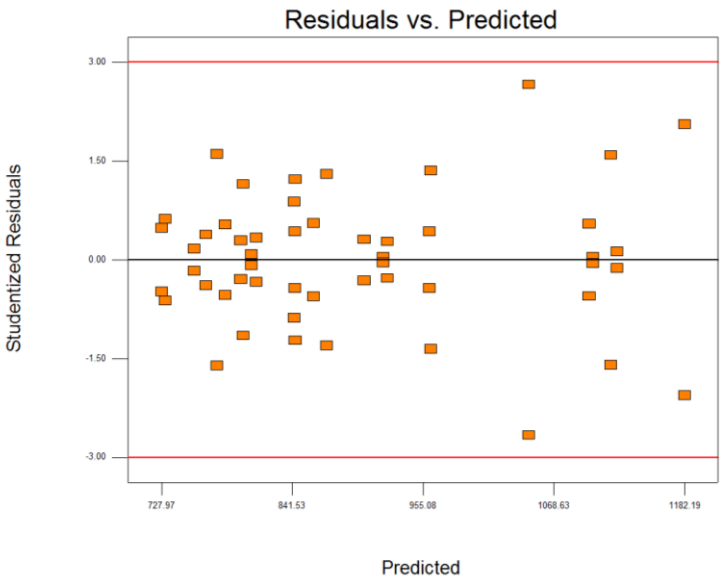
Source		Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model		9.275E+005	26	35672.51	2.73	0.0064	significant
	A	*19299.30*	*2*	*9649.65*	*0.74*	*0.4875*	
	B	*2.853E+005*	*2*	*1.427E+005*	*10.92*	*0.0004*	
	C	*3.108E+005*	*2*	*1.554E+005*	*11.90*	*0.0002*	
	AB	*16934.79*	*4*	*4233.70*	*0.32*	*0.8592*	
	AC	*59397.66*	*4*	*14849.42*	*1.14*	*0.3611*	
	BC	*1.660E+005*	*4*	*41497.12*	*3.18*	*0.0299*	
	ABC	*89052.72*	*8*	*11131.59*	*0.85*	*0.5672*	
Pure Error		3.396E+005	26	13062.47			
Cor Total		1.267E+006	52				

Hodnota F u použitého modelu je 2,73 což značí, že model je statisticky významný a je zde pouze 0,64% pravěpodobnost, že takto vysoká hodnota F je zapříčiněna šumem. P hodnota nižší než 0,05 značí, že daný faktor či interakce více faktorů jsou statisticky významné. V tomto případě jsou významné faktory B, C a jejich interakce v tabulce

označená jako BC. Dle velikosti hodnoty p můžeme seřadit vliv jednotlivých faktorů na základě jejich významnosti. Vidíme, že na průměrnou polochu adherovaných buněk má největší vliv faktor C (textura vytvořená laserem), dále pak faktor B (deponovaná ochraná vrstva). Díky významnosti těchto jednotlivých faktorů hraje důležitou roli i vzájemná interakce těchto faktorů. Normální pravděpodobnostní graf na obrázku 6.34 dokládá splnění požadavku normality měřených dat, zatímco graf reziduí na obrázku 6.35 ilustruje splění předpokladu rovnosti rozptylů naměřených dat a jejich náhodné rozdělení.

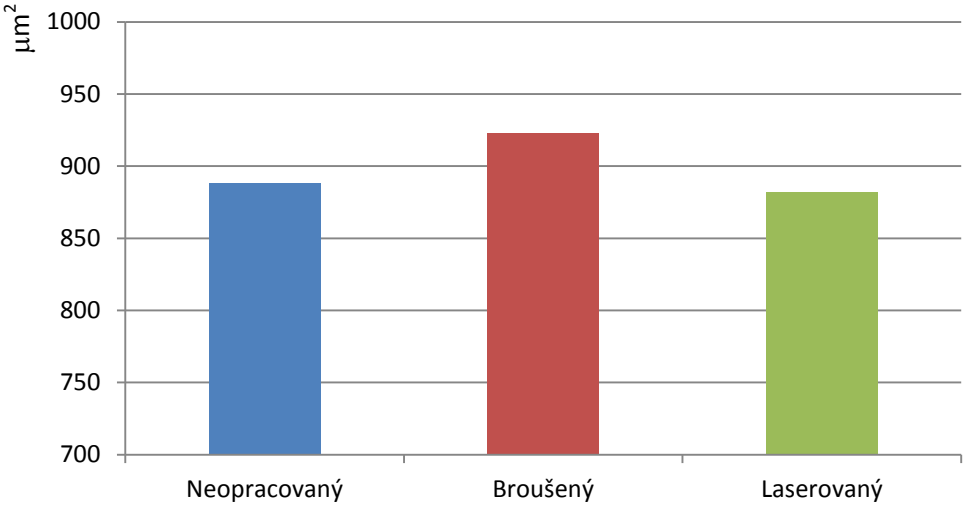


Obr. 6.34 – Normální pravděpodobnostní graf pro měřené hodnoty průměrné plochy buněk

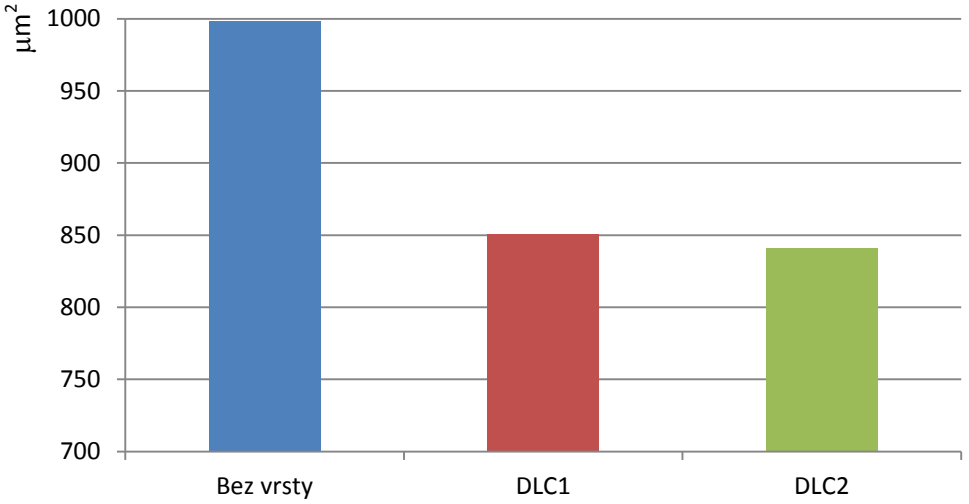


Obr. 6.35 – Graf reziduí v závislosti na predikované responzní veličině

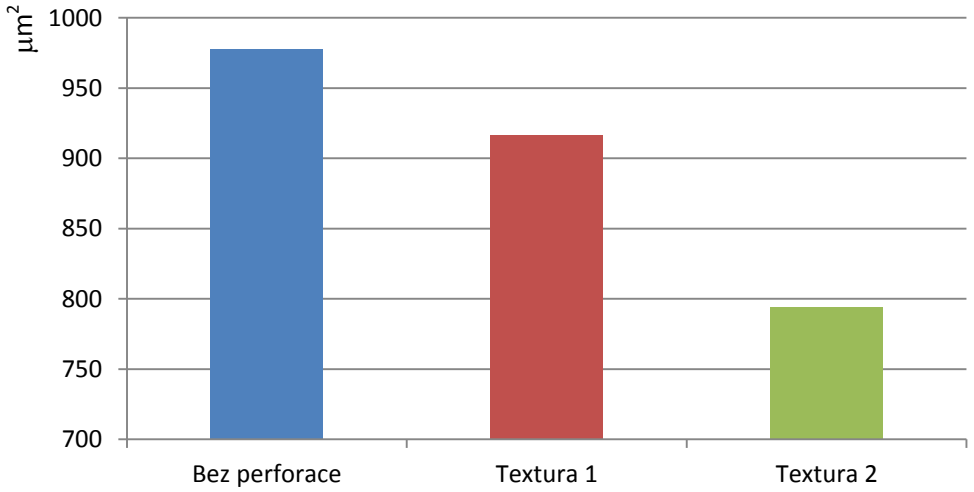
Grafická reprezentace vlivu jednotlivých faktorů na responzní veličinu – průměrnou plochu buněk je znázorněna na obrázcích 6.36, 6.37 a 6.38.



Obr. 6.36 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru A (Opracování povrchu) na průměrnou plochu buněk



Obr. 6.37 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru B (Deponovaná vrstva) na průměrnou plochu buněk



Obr. 6.38 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru C (Textura laserem) na průměrnou plochu buněk

6.6.2 Analýza výsledků hustoty buněk na cm^2 v závislosti na jednotlivých faktorech

Tabulka 6.5

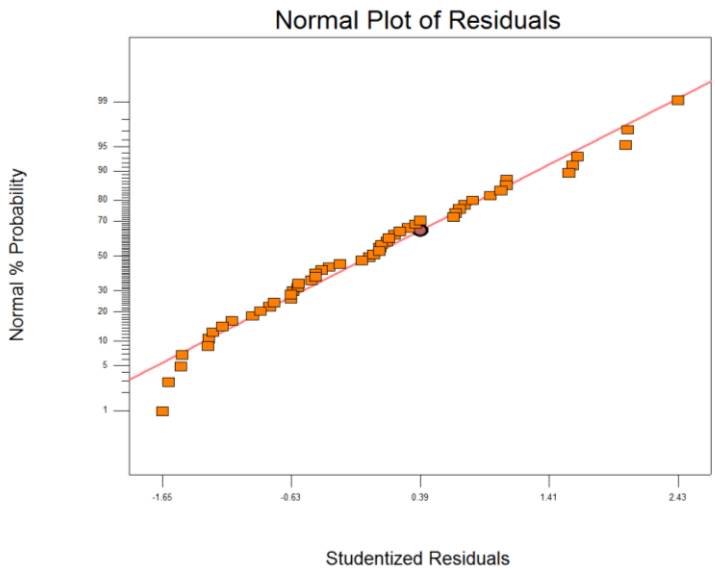
Tabulka s výsledky analýzy rozptylu pro stanovení vlivu jednotlivých faktorů na responzní veličinu – hustota buněk na cm^2.

ANOVA for Selected Factorial Model

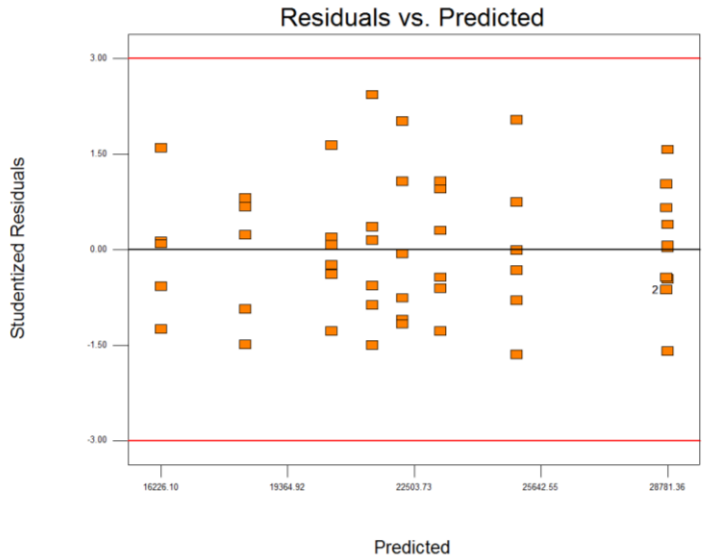
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	8.044E+008	8	1.006E+008	4.47	0.0005	significant
B	*7.939E+007*	*2*	*3.969E+007*	*1.77*	*0.1833*	
C	*4.459E+008*	*2*	*2.229E+008*	*9.92*	*0.0003*	
BC	*2.946E+008*	*4*	*7.365E+007*	*3.28*	*0.0198*	
Residual	9.668E+008	43	2.248E+007			
Lack of Fit	*4.458E+008*	*18*	*2.476E+007*	*1.19*	*0.3389*	*not significant*
Pure Error	*5.210E+008*	*25*	*2.084E+007*			
Cor Total	1.771E+009	51				

Hodnota F u použitého modelu 4,47 značí jeho statistickou významnost, je zde pouze 0,05% pravěpodobnost, že takto vysoká hodnota F je zapříčiněna šumem. P hodnota 0,0003 značí, že významným faktorem, který ovlivňuje husotu buněk faktor C, tedy typ textury vytvořené laserem. Normální pravděpodobnostní graf na obrázku 6.39 dokládá splnění požadavku normality měřených dat, zatímco graf reziduí na obrázku 6.40 ilustruje splění předpokladu rovnosti rozptylů naměřených dat a jejich náhodné rozdělení.

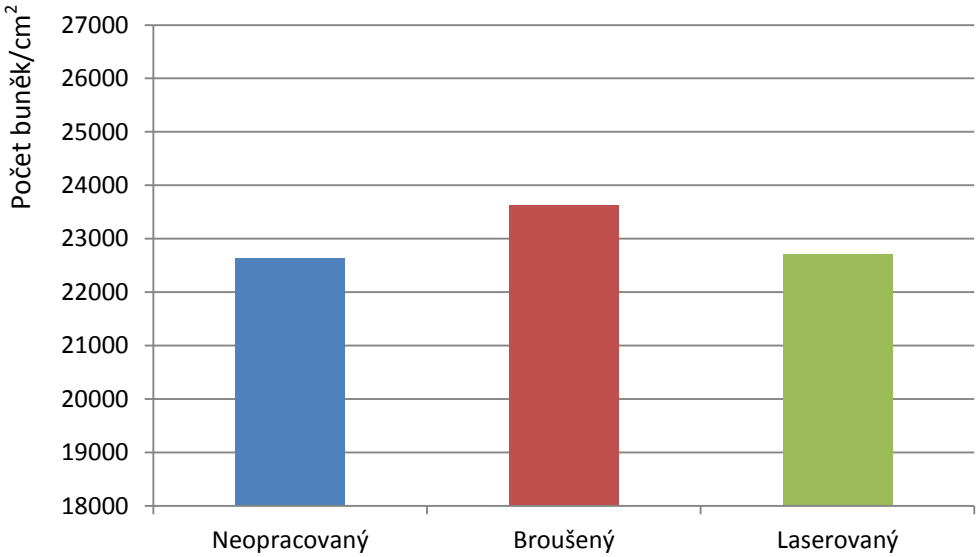


Obr. 6.39 – Normální pravděpodobnostní graf pro měřené hodnoty hustoty buněk

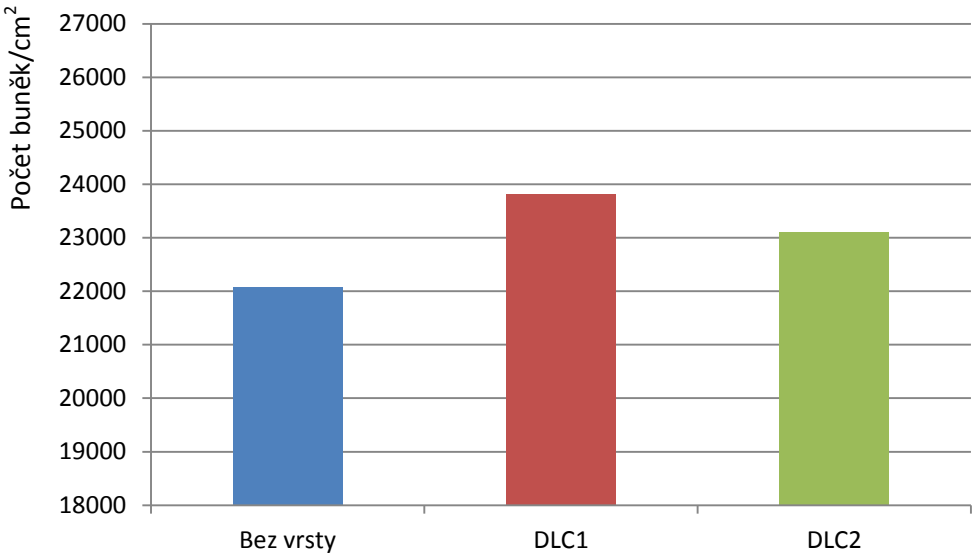


Obr. 6.40 – Graf reziduí v závislosti na predikované responzní veličině

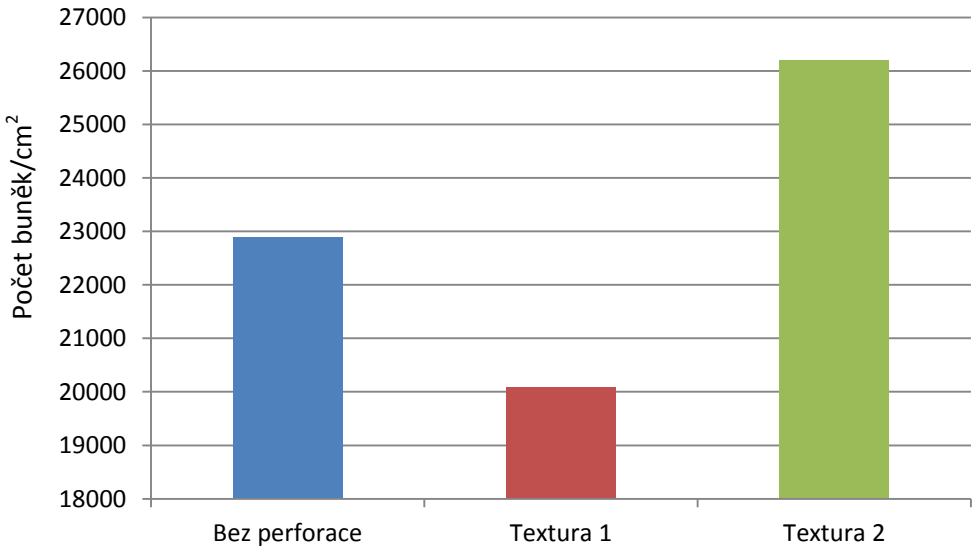
Grafická reprezentace vlivu jednotlivých faktorů na responzní veličinu – hustotu adherovaných buněk na cm^2 je znázorněna na obrázcích 6.41, 6.42 a 6.43.



Obr. 6.41 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru A (Opracování povrchu) na počet buněk



Obr. 6.42 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru B (Deponovaná vrstva) na počet buněk



Obr. 6.42 – Vliv jednotlivých úrovní Faktoru C (Textura laserem) na počet buněk

Závěr

V minulých desetiletích se v medicíně rozšířilo použití umělých materiálů, ať už v ortopedii, zubní či rekonstrukční chirurgii. Jedním z řady potenciálních materiálů uvažovaných pro tato použití je i uhlíkový kompozit Carbon Fibre Reinforced Carbon (CFRC). Adhese a proliferace buněk jsou obvykle ovlivňovány morfologií povrchu, proto byla velká pozornost věnována studiu struktury povrchu a jejímu vlivu na biokompatibilitu materiálu. Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu kompozitu CFRC dosud nebyly systematicky studovány a úpravy povrchu pro ovlivnění interakce buňka-materiál byly předmětem této práce.

V první fázi byl výzkum zaměřen na vývoj vhodné biokompatibilní vrstvy pro povlakování kompozitu CFRC, neboť jak již bylo řečeno dříve, kompozit CFRC je náchylný k uvolňování uhlíkových mikročástic do okolních tkání a možné pokrytí kompozitu biokompatibilní vrstvou, která by povrch ochránila, stabilizovala a navíc příznivě podporovala růst buněk představovalo jedno z možných řešení. Byly vyzkoušeny vrstvy následujícího chemického složení: Cr_2O_3, Si, SiO_2 and DLC. Kultivace buněk probíhala na Fyziologickém ústavu AV ČR. Vzorky byly vysterilizovány a osazeny lidskými kostními buňkami linie MG-63 v hustotě 25 000 buněk/cm^2. Buňky byly pěstovány na šesti vzorcích od každého typu deponované vrstvy po dobu 1, 3 a 7 dnů a poté byly spočítány. Je možné konstatovat, že všechny testované vrstvy se jevily jako vhodné pro kolonizaci buňkami linie MG-63. Musíme však vzít v potaz možnou cytotoxicitu a karcinogenicitu vrstvy obsahující chrom. Velice dobře podporovala růst buněk připravená vrstva DLC (Diamond Like Carbon). To společně s prokázanou dobrou adhesí této vrstvy na uhlíkovém kompozitu vedlo k jejímu využití v další fázi projektu, kdy byl mimo jiné sledován vliv různých druhů deponovaných vrstev DLC na uhlíkovém kompozitu CFRC na jeho biokompatibilitu a deponovaný povrch tak představoval jeden z faktorů modifikujících povrch kompozitu CFRC.

Ve druhé fázi mé práce již bylo cílem navrhnout a experimentálně vyhodnotit různé modifikace povrchu kompozitu CFRC z hlediska adheze a proliferace buněčných kultur. Po důkladném rozboru situace byl navržen statistický experiment, který v sobě

zahrnoval tři faktory, každý z nich o třech úrovních, tak aby mohl být komplexně studován vliv jednotlivých faktorů na responsní veličiny. První faktor představoval stupeň opracování povrchu, druhý představovala deponovaná ochranná vrstva a třetí faktor představovala textura povrchu vytvořená pomocí laseru. Jednalo se o úplný návrh typu 3^3, tedy návrh obsahující celkem 27 jednotlivých běhů, které pokrývají všechny možné kombinace jednotlivých úrovní faktorů. S uvažováním dvou replikací návrhu bylo provedeno celkem 54 běhů. Jako response sloužily hodnoty průměrné plochy adherovaných buněk v μm^2 a počtu buněk první den po nasazení na cm^2 vzorku. Jednalo se tedy o velice rozsáhlý experiment. Vzhledem k množství uvažovaných faktorů a jejich úrovní bylo nutné jak k návrhu experimentu, tak jeho vyhodnocení použít softwarové podpory ve formě programu Design Expert 6. Příprava vzorků probíhala podle vytvořeného plánu experimentu, nejprve bylo na určených vzorcích provedeno opracování povrchu, tj. 18 vzorků bylo ponecháno v původním stavu, 18 bylo ozářeno pomocí laseru a na 18ti vzorcích byl jejich povrch broušen. Poté byly vzorky podle plánu experimentu texturovány laserem, tj. 18 vzorků bylo ponecháno bez textury, 18 bylo texturováno otvory o průměru 0,1 mm, jejichž hloubka byla 0,2 mm a rozteč mezi nimi 0,3 mm (textura I.) a do 18ti vzorků byly vypáleny otvory o průměru 0,4 mm, hloubce 0,8 mm a rozteči 1,2 mm (textura II.). Finální úpravou povrchu byla depozice vrstev DLC při různých hodnotách předpětí (-50V a -100V). Opět podle plánu experimentu bylo 18 vzorků ponecháno bez deponované vrstvy, 18 vzorků bylo deponováno vrstvou amorfního uhlíku při předpětí -50V (DLC I.), na zbylých 18ti proběhla depozice při předpětí -100V (DLC II.). Samotná fáze přípravy vzorků byla díky množství různých faktorů a jejich úrovní časově velice náročná.

Na každém z 54 vzorků bylo provedeno měření drsnosti povrchu a byly sledovány vybrané parametry, které nám umožnili posoudit vliv jednotlivých technologií opracování na kvalitu povrchu kompozitu CFRC. Broušení vedlo k výraznému snížení drsnosti povrchu Ra v průměru na 1,42μm. Zatímco modifikace povrchu laserem k výrazné změně nevedla, Ra se z průměrných 7,37 μm u neopracovaného povrchu zvýšilo na 8,4 μm u povrchu modifikovaného laserem, což představuje nárůst o 14%. Průměrná hodnota průměrné šířky prvků profilu RSm na 18ti neopracovaných vzorcích činila 99,9μm. U broušených

vzorků hodnota RSm klesla na 35,3μm. Laserová modifikace povrchu se promítla do nárůstu průměrné šířky prvků profilu drsnosti na hodnotu 173μm.

Na Fyziologickém ústavu AV ČR byla na vzorcích provedena kultivace buněk a sběr dat o responsních veličinách. Analýza výsledků prokázala výrazný vliv faktoru laserem vytvořené textury povrchu na velikost průměrné plochy buněk i na počet buněk přepočtený na cm^2. Faktor deponované vrstvy se ukázal jako statisticky významný pouze v případě velikosti průměrné plochy buněk. Na základě těchto výsledků bych doporučil věnovat pozornost výzkumu biokompatibility materiálů používaných v lékařství i v oblasti laserem vytvářené textury na povrchu materiálu, neboť ta se ukázala jako statisticky významná pro možnost ovlivnění biokompatibility kompozitního materiálu CFRC. Tato technologie je snadno aplikovatelná i na ostatní typy materiálů používaných v chirurgii tvrdých tkání jako jsou chirurgická ocel, titan a jeho slitiny.

Náhrady velkých kloubů jsou celosvětově stále častěji prováděnou operací. Odhaduje se, že počet implantací přesahuje České republice 10.000 za rok. Zásadním a stále významnějším problémem je fakt, že jsou stále častěji operováni biologicky mladší pacienti (kteří jsou také mnohem pohybově aktivnější) a to samozřejmě klade větší nároky na kvalitu všech implantátů. Dochází mnohem více k časnému selhání náhrad a nutnosti reoperací, které jsou pro pacienta velkou zdravotní zátěží. Jedním z kritických míst je rychlost sekundární fixace implantátu aplikovaného bez použití kostního cementu. V případě pozdní stabilizace implantátu vede neadekvátní zatěžování k uvolnění implantátu a jeho selhání.

Na základě výstupů disertační práce mohou být vylepšovány technologie nanášení bioaktivní vrstvy na plochy kotvících prvků náhrad, které jsou v přímém kontaktu s kostní tkání a u nichž je rozhodujícím faktorem kvality právě schopnost rychlého spojení s kostí v etapě tzv. sekundární fixace. Využití povrchové úpravy zvyšující biokompatibilitu a prodlužující životnost endoprotézy může mít značný přínos jak společenský (ekonomický), také však lidský.

Výzkum v rámci této dizertační práce byl umožněn díky podpoře grantového projektu **č. 101/06/0226 GA ČR** a její výsledky přispěly k úspěšné obhajobě tohoto grantového projektu v roce 2009.

Literatura

[1] DVOŘÁK, R. *Metrologie geometrických vlastností povrchu*. [Docentská habilitační práce]. Praha: ČVUT FS, Ústav strojírenské technologie, 2002. 116 s.

[2] FABIAN, F. - HORÁLEK, V. - KŘEPELA, J. - CHMELÍK, V. et al. *Statistické metody řízení jakosti*. Česká společnost pro jakost, ISBN 978-80-02-01897-1

[3] BAČÁKOVÁ, L. - NOSKOVÁ, L. - FILOVÁ, E. - ŠVORČÍK, V.*Adhese cévních a kostních buněk na umělé materiály vyvíjené pro tkáňové inženýrství (Adhesion of vascular and bone cells on synthetic materials developed for tissue engineering)*, Československý časopis pro fyziku 56: 74-79, 2006

[4] ČERNÝ, F - GUROVIČ, J. - PALAMARČUK, D. - ZORIJ, M. The Use of Multiplex IBM/PACVD Method in the Preparation of Diamond-Like Films on Metal Substrates *In: 8th International Conference New Diamond Science and Technology.* Melbourne: The University of Melbourne, 2002, vol. 1, s. 211.

[5] BAČÁKOVÁ, L. Tkáňové inženýrství – nový trend v současné medicíně a biotechnologiích. *Předneseno na akci Týden vědy a techniky, 6. -12. 11. 2006, Praha*

[6] MICHÁLEK, J. - KŘEPELA, J. *Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE)*. Česká společnost pro jakost

[7] ČERNÝ, F. - GUROVIČ, J. et al. Thin carbon and carbon nitride films for passive and aktive optical waveguides. *Combinatorial and Composition Spread Techniques in Materials and Device Development II.* Proceedings of Spie Volume 4281 (str. 114 – 121) 2001.

[8] THOMAS, Colin R.: *Essentials of Carbon -Carbon Composites* . Cambridge,The Royal Society of Chemistry 1993, 234p.

[9] BALÍK, K. - GLOGAR, P. - HÁJEK, M. - TOMANOVÁ, A. Kompozitní materiály uhlík-uhlík, *Ceramics - Silikáty 36*, s. 163 - 168, 1992

[10] BERANOVÁ, Z. *Mechanismy porušování kompozitu uhlík-uhlík*, Praha, 2001

[11] BAČÁKOVÁ, L. - STARÝ, V. - KOFROŇOVÁ, O. - LISÁ, V. *Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 celis and vascularsmooth muscle celis in vitro,* John Wiley&Sons, Inc.,2000á

[12] STARÝ, V. - BAČÁKOVÁ, L. - HORNÍK, J. - CHMELÍK, V. Bio-compatibility of the surface layer of pyrolytic graphite, *Thin solid films, 2003*

[13] BAČÁKOVÁ, L. et al. *Uhlíkové kompozity s mechanicky odolnými povrchovými vrstvami - nové materiály pro využití v medicíně*, Praha, 2002

[14] STARÝ, V. Studium vlivu povrchových vlastností kompozitních materiálů na jejich biokompatibilitu, *Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu*, 2002

[15] BOKROS, J. C. - PRICE, R. J. Deformation and fracture of pyrolytic carbons deposited in a luidized bed, *Carbon, 1966*, Vol. 3, pp. 503-519.

[16]BAČÁKOVÁ, L.. - STARÝ, V. - KOFRONOVÁ, O. *Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro.* J Biomed Mater Res. 2001. Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha.

[17] BACAKOVA, L. - KABATOVA, J. - LISA, V. - STARY, V. - FENCL, J. *Adhesion, growth and differentiation markers in human osteoblast-like cells cultured on surface-modified metallic materials designed for bone implants*. Inzynieria Biomaterialów (Engineering of Biomaterials), IX (58-60): 1-3, 2006.

[18] BAČÁKOVÁ, L. - NOSKOVÁ, L. - FILOVÁ, E. *Adhese cévních a kostních buněk na umělé materiály vyvíjené pro tkáňové inženýrství (Adhesion of vascular and bone cells on synthetic materials developed for tissue engineering*), Československý časopis pro fyziku 56: 74-79, 2006.

Literature

[19] BLAZEWICZ, S. - CHLOPEK, J. - LITAK, A. *Biomaterials 18*:437-439, 1997.

[20] LI, S.H. - LIU, Q. - de WIJN, J.R. - ZHOU, B.L. - de GROOT, K. *Biomaterials 18*: 389-395, 1997.

[21] MEROLLI, A. - PERRONE, V. - TRANQUILLI LEALI, P. - AMBROSIO, L. - de SANTIS R. - NICOLAIS L. *J. Mater. Sci. Mater. Med. 10*: 265-268, 1999.

[22] VEMUGANTI, A. - SIEGLER, S. - ABUSAFIEH, A. - KALIDINDI, S. *J. Biomed. Mater. Res., 38*: 328-336, 1997.

[23] BAČÁKOVÁ, L. - MAREŠ, V. - BOTTONE, M-G. - PELLICCIARI, C. - LISÁ, V. - ŠVORČÍK, V. *J. Biomed. Mater. Res. 49*: 369-379, 2000a.

[24] CZAJKOWSKA, B. - BLAZEWICZ, M. *Biomaterials 18*: 69-74, 1997.

[25] LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M. - KOMENDER, J. - CHLOPEK, J. *J. Biomed. Mater. Res. 48*: 289-296, 1999.

[26] PEŠÁKOVÁ, V. - KLÉZL, Z. - BALÍK, K. - ADAM, M. *J. Mater. Sci.: Mater. Med. 11*: 793-798, 2000.

[27] COOK, A.D. - HRKACH, J.S. - GAO N.N., JOHNSON I.M. *J. Biomed. Mater. Res. 35*:513-523, 1997.

[28] MOSTARDI, R.A. - MEERBAUM, S.O. - KOVACIK, M.W. - GRADISAR, I.A. *J. Biomed. Mater. Res. 47*:60-64, 1999.

[29] NAKASHIMA, Y. - SUN, D.H. - TRINDADE, M.C.D. - MALONEY, W.J. - GOODMAN, S.B. - SCHURMAN, D.J. - SMITH, R.L. *J. Bone Joint Surg. – Am. 81A*: 603-615, 1999.

[30] BOYAN, B.D. - BATZER, R. - KIESWETTER, K. - LIU, Y. - COCHRAN, D.L. - DEAN, D.D. - SCHWARTZ, Z. *J. Biomed. Mater. Res. 39*:77-85, 1998.

[31] LINCKS, J. - BOYAN, B.D. - BLANCHARD, C.R. - LOHMANN, C.H. - LIU, Y. - COCHRAN, D.L. *Biomaterials 19*: 2219-2232, 1998.

[32] AHMAD, M. - GAWRONSKI, D. - BLUM, J. - GOLDBERG, J. - GRONOWICZ, G. *J. Biomed. Mater. Res. 46*: 121-131, 1999.

[33] DEGASNE, I. - BASLE, M.F. - DEMAIS, V. - HURE, G. - LESOURD, M. - GROLLEAU, B. - MERCIER, L. - CHAPPARD, D. *Calcif. Tiss. Int. 64*:.499-507, 1999.

[34] LAMPIN, M. - LEGRIS, C. - DEGRANGE, M. - SIGOT-LUIZARD, M.F. *J. Biomed. Mater. Res. 36*: 99- 108, 1997.

[35] SUZUKI, K. - AOKI, K. - OHYA, K. *Bone 21*: 507-514, 1997.

[36] WANG, J.Y. - WICKLUND, B.H. - GUSTILO, R.B. - TSUKAYAMA, D.T. *Clin. Orthop. Relat. Res. 339*:216-226, 1997.

[37] HACKING, S.A. - BOBYN, J.D. - TANZER, M. - KRYGIER, J.J. *Clin Orthopaed Relat Res 364*: 240-253, 1999.

[38] SBARBATI, R. - GIANNESSI, D. - CENNI, M.C. - LAZZERINI, G. - VERNI, F. - De CATERINA, R. *Int. J. Artif. Org. 14*: 491-498, 1991.

[39] LEE, J.S. - KAIBARA, M. - IWAKI, M. - SASABE, H. - SUZUKI, Y. - KUSAKABE, M. *Biomaterials 14*: 958-960, 1993.

[40] DOHERTY, M.J. - SCHLAG, G. - SCHWARZ, N. - MOLLAN, R.A.B. - NOLAN, P.C. - WILSON, D.J. *Biomaterials 15*: 601-608, 1994.

[41] SUZUKI, T. - NISHIZAWA, K. - YOKOGAWA, Y. - NAGATA, F. - KAWAMOTO, Y. - KAMENYAMA, T. *J. FERMENT. Bioeng. 81*: 226-232, 1996.

[42] SMETANA, K. - LUKÁŠ, J. - PALEČKOVÁ, V. - BARTOŠKOVÁ, J. - LIU, F.-T. - VACÍK J. - GABIUS, H.-J. *Biomaterials 18*: 1009-1014, 1997.

[43] BACAKOVA, L. - STARY, V. - KOFRONOVA, O. *Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro.* J Biomed

Mater Res. 2001. Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague.

[44] LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M. - KOMENDER, J. *Interaction between tissues and implantable materials*. The Medical University of Warsaw, Institute of Biostructure, Department of Transplantology & Central Tissue Bank, Poland. Front Med Biol Eng. 2000

[45] BAČÁKOVÁ, L. - FILOVA, E. et al. *Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering*. Physiol Res. 2004 Department of Growth and Differentiation of Cell Populations, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

[46] KING, P.A. - SETCHELL, D.J. - REES, J.S. *Clinical evaluation of a carbon fibre reinforced carbon endodontic post*. Division of Restorative Dentistry, University of Bristol Dental School, Bristol, UK. J Oral Rehabil. 2003 Aug;30(8):785-9

[47] BADER, R. - STEINHAUSER, E. - RECHL, H. et. al. *Carbon fiber-reinforced plastics as implant materials*. Klinik fur Orthopadie und Sportorthopadie, Technische Universitat Munchen, Munich. Orthopade. 2003 Jan;32(1):32-40.

[48] LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M. - KOMENDER, J. *Journal of materials science: Materials in medicine 8 (1997) 485 – 488.* Fixation of carbon fibre-reinforced carbon composite implanted into bone.

[49] BADISCH, E. - MITTER, C. et al. Characterization of tribo-layers on self-lubricating PACVD TiN coatings. *Thin Solid Films 460 (2004) 125–132*

[50] PENG, X.L. - BARBER, Z.H. - CLYNE, T.W. Surface roughness of diamond-like carbon films prepared using various techniques. *Surface and Coatings Technology 138 2001 23]32.* Department of Materials Science & Metallurgy, Cambridge University, Pembroke Street, Cambridge CB2 3QZ, UK. Accepted 31 October 2000

[51] KHETTACHE, A. - TOUHAMI, M. - Zine et al. Influence of argon flow rate on the surface morphology and roughness of the DLC films prepared by MW ECR\PACVD . *Carbon v 41 n 4 2003. p 856-858 , 2003.*

[52] ČERNÝ, F. - GUROVIČ, J. et al. Thin carbon and carbon nitride films for passive and active optical waveguides. *Combinatorial and Composition Spread Techniques in Materials and Device Development II.* Proceedings of Spie Volume 4281 (str. 114 – 121) 2001.

Publikační činnost autora

Beránek, L. - Dvořák, R. - Bačáková, L.
Navrhování experimentů pro biomedicínský výzkum pomocí metod DOE In: Request ´06. Praha: Centrum pro jakost a spolehlivost výroby, 2007, s. 24-29. ISBN 978-80-01-03709-6.

Beránek, L. - Dvořák, R. - Bačáková, L.
Surface Modifications for Potential Carbon Composite Implants In: Funkčné povrchy v strojárstve 2007. Trenčín: Trenčianska univerzita, Fakulta špeciálnej techniky, 2007, s. 17-24. ISBN 978-80-8075-217-0.

Beránek, L. - Dvořák, R. - Bačáková, L. - Černý, F.
Praktické využití statistických metod navrhování experimentů In: Strojírenská technologie. 2007, roč. XII, č. 4, s. 24-29. ISSN 1211-4162.
Dvořák, R. - Beránek, L.

Dvořák, R. - Beránek, L.
Roundness Measurement and Filtering Profile In: ICPM 2007 - 4th International Congress on Precision Machining 2007. Kielce: Kielce University of Technology, 2007, vol. 2, s. 55-59. ISBN 978-83-88906-91-6.

Beránek, L.
CFRC Composites Surface Study In: Coordinate Measuring Technique. Bielsko-Biała: Wydawnictwo akademii techniczno-humanistycznej w Bielsku-Białej, 2008, p. 388-393. ISBN 978-83-60714-40-9.

Bačáková, L. - Beránek, L. - Bačáková, M. - Soukup, D. - Lisa, V. - et al.

Human Bone-Derived Cells on C-C Composites Treated by Grinding, a-C:H Coating, Laser Irradiation and Laser Perforation In: Engineering of Biomaterials. 2008, vol. XI, no. 75, p. 2-6. ISSN 1429-7248.

Beránek, L.

Od profilprojektoru k opticko dotykové měřicí technice, Počítačová tomografie [Vyzvaná přednáška]. Centrum technologických informací a vzdělávání. 2009-04-27.

Beránek, L. - Volf, L. - Zelenka, A.

Návrh dispozičního řešení montážní linky podsestav kontejnerových vozů In: Výrobní systémy dnes a zítra. Liberec: Technická univerzita Liberec, 2009, . ISBN 978-80-7372-541-9.

Beránek, L. - Volf, L. - Zelenka, A.

Optimalizace linky pro výrobu kontejnerových vozů In: Modelování a optimalizace podnikových procesů 2009. Plzeň: Západočeská univerzita, 2009, s. 1-8. ISBN 978-80-7043-844-2.

Beránek, L. - Volf, L. - Zelenka, A. - Tatíček, F.

Zpráva o provedení instrumentované rázové zkoušky a stanovení koeficientu délkové teplotní roztažnosti u vybraných materiálů [Výzkumná zpráva]. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2009. 1. 22 s.

Volf, L. - Beránek, L. - Zelenka, A.

Simulační modelování a jeho využití při návrhu nového rozmístění svařovacích linek In: Výrobní systémy dnes a zítra. Liberec: Technická univerzita Liberec, 2009, -6. ISBN 978-80-7372-541-9.

Volf, L. - Beránek, L. - Zelenka, A.

Využití simulačního modelování pro návrh nové koncepce svařovacích linek In: Modelování a optimalizace podnikových procesů 2009. Plzeň: Západočeská univerzita, 2009, -7. ISBN 978-80-7043-844-2.

Beránek, L. - Miroslav Jan Skopal, MJS - Skopal Jaroslav, J.-S.

Geometrické požadavky na výrobky (GPS) – Přejímací a periodické zkoušky souřadnicových měřicích strojů (CMM) – ČSN EN ISO 10360-2, PPN

Beránek, L. - Volf, L. - Macháček, P. - Mikeš, P.

Virtual CMM concept and its usage for educational purposes In: Advances in Coordinate Metrology. Bielsko-Biała: Wydawnictwo akademii techniczno-humanistycznej w Bielsku-Białej, 2010, p. 318-324. ISBN 978-83-62292-56-1.

Beránek, L. - Volf, L. - Vilček, I. V. - Mikeš, P.
POČÍTAČOVÁ SIMULACE JAKO NÁSTROJ OPTIMALIZACE VÝROBNÍHO SYSTÉMU In: Transfer inovácií [online]. 2010, roč. 16/2010, č. 16, s. 130-133. Internet:http://www.sjf.tuke.sk/transferinovacii/pages/archiv/transfer/16-2010/pdf/130-133.pdf. ISSN 1337-7094.

Beránek, L. - Volf, L. - Zelenka, A.
Využití počítačové simulace při optimalizaci montáží In: Reliability quality estimation 09. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2010, díl 1, s. 24-30. ISBN 978-80-7372-619-5.

Macháček, P. - Tomíček, J. - Beránek, L. - Mikeš, P.
Application of Laser Scanning in Reverse Engineering and Prototype Manufacturing In: Advances in Coordinate Metrology. Bielsko-Biała: Wydawnictwo akademii techniczno-humanistycznej w Bielsku-Białej, 2010, p. 309-318. ISBN 978-83-62292-56-1.

Mikeš, P. - Beránek, L. - Volf, L. - Macháček, P.
Design and manufacturing testing artefact for education measuring on coordinate measuring machines In: Advances in Coordinate Metrology. Bielsko-Biała: Wydawnictwo akademii techniczno-humanistycznej w Bielsku-Białej, 2010, p. 325-329. ISBN 978-83-62292-56-1.

Volf, L. - Beránek, L. - Macháček, P. - Mikeš, P. **Computer simulation of measurement process and systems** In: Advances in Coordinate Metrology. Bielsko-Biała: Wydawnictwo akademii techniczno-humanistycznej w Bielsku-Białej, 2010, p. 330-335. ISBN 978-83-62292-56-1.

Seznam příloh

Příloha 1 - Plán experimentu

Příloha 2 - Parametry drsnosti povrchu pro jednotlivé vzorky

Příloha 3 – Počty buněk na jednotlivých vzorcích

Příloha 4 – Průměrné plochy buněk

Příloha 5 - Vyjádření významu projektu pro praxi - společnosti Beznoska

Příloha 6 – 1x DVD se snímky zorných polí vzorků po kultivaci buněk

Příloha 1. Plán experimentu

			Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1	Response 2
Std	Run	Block	A:opracování	B:deponovaný povrch	C:perforace laserem	Růst buněk	Adhese
1	22	Block 1	neopracované	bez vrstvy	bez perforace		
2	41	Block 1	neopracované	bez vrstvy	bez perforace		
3	30	Block 1	broušené	bez vrstvy	bez perforace		
4	3	Block 1	broušené	bez vrstvy	bez perforace		
5	43	Block 1	laser	bez vrstvy	bez perforace		
6	32	Block 1	laser	bez vrstvy	bez perforace		
7	11	Block 1	neopracované	aCH 1	bez perforace		
8	17	Block 1	neopracované	aCH 1	bez perforace		
9	2	Block 1	broušené	aCH 1	bez perforace		
10	40	Block 1	broušené	aCH 1	bez perforace		
11	31	Block 1	laser	aCH 1	bez perforace		
12	9	Block 1	laser	aCH 1	bez perforace		
13	45	Block 1	neopracované	aCH 2	bez perforace		
14	24	Block 1	neopracované	aCH 2	bez perforace		
15	33	Block 1	broušené	aCH 2	bez perforace		
16	7	Block 1	broušené	aCH 2	bez perforace		
17	16	Block 1	laser	aCH 2	bez perforace		
18	39	Block 1	laser	aCH 2	bez perforace		
19	46	Block 1	neopracované	bez vrstvy	perforace 1		
20	18	Block 1	neopracované	bez vrstvy	perforace 1		
21	28	Block 1	broušené	bez vrstvy	perforace 1		
22	6	Block 1	broušené	bez vrstvy	perforace 1		
23	15	Block 1	laser	bez vrstvy	perforace 1		
24	25	Block 1	laser	bez vrstvy	perforace 1		
25	50	Block 1	neopracované	aCH 1	perforace 1		
26	44	Block 1	neopracované	aCH 1	perforace 1		
27	14	Block 1	broušené	aCH 1	perforace 1		
28	1	Block 1	broušené	aCH 1	perforace 1		
29	23	Block 1	laser	aCH 1	perforace 1		
30	37	Block 1	laser	aCH 1	perforace 1		
31	38	Block 1	neopracované	aCH 2	perforace 1		
32	21	Block 1	neopracované	aCH 2	perforace 1		
33	8	Block 1	broušené	aCH 2	perforace 1		
34	47	Block 1	broušené	aCH 2	perforace 1		
35	42	Block 1	laser	aCH 2	perforace 1		
36	48	Block 1	laser	aCH 2	perforace 1		
37	34	Block 1	neopracované	bez vrstvy	perforace 2		
38	54	Block 1	neopracované	bez vrstvy	perforace 2		
39	36	Block 1	broušené	bez vrstvy	perforace 2		
40	10	Block 1	broušené	bez vrstvy	perforace 2		
41	4	Block 1	laser	bez vrstvy	perforace 2		
42	53	Block 1	laser	bez vrstvy	perforace 2		
43	52	Block 1	neopracované	aCH 1	perforace 2		
44	49	Block 1	neopracované	aCH 1	perforace 2		
45	26	Block 1	broušené	aCH 1	perforace 2		
46	12	Block 1	broušené	aCH 1	perforace 2		
47	51	Block 1	laser	aCH 1	perforace 2		
48	35	Block 1	laser	aCH 1	perforace 2		
49	19	Block 1	neopracované	aCH 2	perforace 2		
50	27	Block 1	neopracované	aCH 2	perforace 2		
51	20	Block 1	broušené	aCH 2	perforace 2		
52	29	Block 1	broušené	aCH 2	perforace 2		
53	5	Block 1	laser	aCH 2	perforace 2		
54	13	Block 1	laser	aCH 2	perforace 2		

Příloha 2 - Parametry drsnosti povrchu pro jednotlivé vzorky

	A:Opracování	B:deponovaný povrch	C:perforace laserem	Ra	[μm]	Rq	[μm]	Ry	[μm]	Rtm	[μm]	Rv	[μm]	Rp	[μm]	Sm	[μm]	DELQ	[deg]	Rsk		Rku		S	[μm]	R3z	[μm]	Rpm	[μm]	R3y	[μm]
1	neopracované	bez vrstvy	bez perforace	5,3	0,8	8	1,5	47	12	29	5	33	9	16	4	134	10	23,8	2,1	-1,8	0,6	7,4	3,2	24	4	21	3	11	2	38	11
2	neopracované	bez vrstvy	bez perforace	5,3	1,3	7,7	2	48	13	26	6	31	8	17	6	149	41	21,9	4,4	-1,5	0,4	6,3	1,4	23	6	20	5	10	3	36	11
3	broušené	bez vrstvy	bez perforace	0,97	0,23	1,52	0,28	11,3	1,8	7,1	1,4	8,5	1,8	3,2	0,8	35	10	8,9	1,3	-2,5	1,2	14	9,7	12	1	5,6	0,7	2,3	0,6	9,7	1,6
4	broušené	bez vrstvy	bez perforace	1,24	0,42	1,84	0,56	12,9	3,5	7,9	1,6	9,3	2,6	3,9	1,1	51	27	9,5	1,7	-2,1	0,5	9,2	3,1	12	1	6,5	1,6	2,8	0,5	11,6	3,3
5	laser	bez vrstvy	bez perforace	7,3	0,5	9,9	0,7	50	6	31	2	33	2	22	2	225	33	18,5	3	-1	0,1	4,1	0,4	27	3	21	4	13	1	37	5
6	laser	bez vrstvy	bez perforace	9,7	2,2	13,3	2,4	70	16	40	8	41	11	30	8	277	91	27,1	4,8	-0,9	0,7	4,5	1,8	40	16	27	4	19	5	55	14
7	neopracované	aCH 1	bez perforace	8,3	0,8	11,7	0,9	69	11	36	4	40	7	29	6	250	90	29,8	3,2	-1,1	0,5	5,1	1,2	31	6	26	3	17	2	53	4
8	neopracované	aCH 1	bez perforace	9	2	12,4	2,9	65	13	38	7	42	9	24	4	222	68	29,3	4,1	-1,2	0,4	4,7	1	29	5	28	5	16	2	51	10
9	broušené	aCH 1	bez perforace	1,03	0,2	1,7	0,25	14	2,1	8,5	1,4	11	1,8	3,8	1,3	36	8	11,6	1,8	-3,1	0,9	16,7	8,4	12	1	5,8	0,9	2,4	0,4	9,8	1,8
10	broušené	aCH 1	bez perforace	2,2	1,18	3,6	1,89	22,5	10,4	12,9	5,3	16,1	6,4	6,5	5	67	39	13,6	4,8	-2,4	0,7	11,2	4,8	13	3	10,4	4,4	3,9	1,8	20,7	9,8
11	laser	aCH 1	bez perforace	7,4	1,3	9,8	1,9	51	12	31	7	33	11	20	3	310	89	20,6	5,1	-0,9	0,5	4,4	1,8	27	7	21	5	13	2	40	14
12	laser	aCH 1	bez perforace	8	0,8	11,3	0,9	59	6	35	5	37	3	25	5	237	58	22,8	2,8	-1,2	0,2	4,6	1	34	11	21	5	14	2	42	8
13	neopracované	aCH 2	bez perforace	4,9	0,9	6,6	1,3	37	8	26	6	23	5	14	4	145	16	22,2	4,1	-1,1	0,3	4,5	0,9	19	3	20	5	11	3	31	8
14	neopracované	aCH 2	bez perforace	5,9	1	9,1	1,1	54	8	29	3	37	9	17	2	150	26	25	2,4	-2,1	1	9,1	6,1	22	3	22	3	11	1	47	10
15	broušené	aCH 2	bez perforace	1,47	0,15	2,08	0,24	13,7	2,2	9,1	0,8	9,1	1,5	4,6	1	44	12	11	0,4	-1,5	0,3	6,9	1,5	12	1	7,4	0,9	3,6	0,3	12	2,3
16	broušené	aCH 2	bez perforace	1,19	0,45	1,82	0,71	12,9	4,4	8,7	2,7	9,4	2,5	3,8	1,9	36	17	9,9	2,3	-2,1	0,7	9,6	3,9	11	1	7	2,3	2,6	0,9	11,1	4,8
17	laser	aCH 2	bez perforace	7,9	1,9	10,7	1,9	56	10	34	7	36	7	22	3	211	94	24,1	3,2	-1	0,4	4,8	2,6	25	4	23	3	14	2	38	8
18	laser	aCH 2	bez perforace	9	2	12,1	2,4	61	10	38	7	37	5	26	5	287	62	24,5	3,3	-1	0,3	4,1	1,1	25	5	27	4	15	3	49	7
19	neopracované	bez vrstvy	perforace 1	16,8	5,1	19,9	5,4	85	17	65	14	48	8	40	10	303	32	42,4	7	-0,2	0,3	2,4	0,5	91	27	33	18	34	8	48	27
20	neopracované	bez vrstvy	perforace 1	18,6	3,4	22,7	5,2	110	40	74	17	62	27	51	13	300	22	45,4	7,1	-0,3	0,4	2,8	1	95	28	30	25	40	11	42	34
21	broušené	bez vrstvy	perforace 1	20	3	22,9	3,5	90	13	75	12	41	8	52	8	292	15	50,6	3,2	0,2	0,1	1,9	0,1	80	31	47	24	42	8	59	29
22	broušené	bez vrstvy	perforace 1	20	3,6	23,5	4,9	103	38	76	15	47	18	57	20	307	48	47,5	2,9	0,2	0,2	2,2	0,6	84	33	45	23	43	8	57	31
23	laser	bez vrstvy	perforace 1	17,7	4,7	20,9	5,2	89	21	71	14	43	10	50	13	293	59	47,3	6,2	0,2	0,2	2,2	0,4	64	25	43	23	39	7	57	30
24	laser	bez vrstvy	perforace 1	17,6	1,4	21,1	1,2	95	18	69	7	48	18	54	7	291	31	47	2,4	0,1	0,5	2,6	1	87	29	38	20	38	5	58	30
25	neopracované	aCH 1	perforace 1	20,5	2,4	24	2,6	103	20	81	11	51	10	56	8	308	28	50,1	5	0,1	0,1	2,1	0,3	71	17	50	22	44	7	63	28
26	neopracované	aCH 1	perforace 1	21,2	2,5	24,8	2,6	105	17	82	9	51	9	59	10	287	22	49,2	4,8	0,2	0,2	2,1	0,3	79	18	46	24	46	6	58	29
27	broušené	aCH 1	perforace 1	12,8	2,6	15,7	2,7	68	9	53	8	34	8	37	7	250	40	39,4	4,4	-0,2	0,4	2,6	0,8	54	8	38	9	29	5	50	11
28	broušené	aCH 1	perforace 1	18,9	2,6	22,4	3,5	92	22	70	10	46	15	50	10	300	7	47,8	2,3	0,2	0,3	2,2	0,5	89	24	42	9	40	6	65	8
29	laser	aCH 1	perforace 1	17,5	2,7	20,6	2,5	86	9	72	7	43	4	50	11	278	33	47,9	4,4	0,1	0,2	2,2	0,4	70	17	44	14	39	5	58	12
30	laser	aCH 1	perforace 1	14,3	1,7	17,1	1,8	72	8	57	7	36	6	41	4	277	33	42,5	4	0,1	0,2	2,3	0,1	63	15	39	10	31	4	55	13
31	neopracované	aCH 2	perforace 1	21,2	3,2	24,2	3,6	99	16	79	9	49	11	52	6	305	24	50,7	2,3	0,1	0,2	1,9	0,2	62	12	58	7	42	5	77	12
32	neopracované	aCH 2	perforace 1	21,2	7,7	24,8	7,7	104	24	82	22	49	8	58	15	296	30	47,9	6,8	0,1	0,3	2,3	0,7	68	14	54	21	45	14	80	16
33	broušené	aCH 2	perforace 1	19,5	5	22,1	5,2	82	13	73	12	39	7	45	9	279	23	46,7	8,5	0	0,2	1,8	0,3	59	10	57	13	39	8	66	16
34	broušené	aCH 2	perforace 1	19,6	2,1	22,6	2,2	87	25	72	7	45	25	45	3	284	34	48,3	6,2	-0,1	0,6	2,4	1,6	70	46	48	25	39	4	58	29
35	laser	aCH 2	perforace 1	19,8	3,9	23,3	4,2	97	25	77	14	50	12	52	11	279	40	48,3	5,1	0,1	0,1	2,2	0,4	67	17	44	23	41	6	60	30
36	laser	aCH 2	perforace 1	19,9	3,3	23,7	4,5	103	28	78	14	53	14	58	15	294	55	50,3	2,5	0	0,2	2,3	0,4	64	25	52	10	42	8	69	11
37	neopracované	bez vrstvy	perforace 2	16	5,9	21,8	7,5	95	21	69	22	66	17	43	18	314	60	39,8	9,9	-1,1	0,3	4,3	0,9	53	19	30	10	30	11	58	15
38	neopracované	bez vrstvy	perforace 2	7,7	1,6	11	0,8	62	8	39	6	37	8	29	5	170	56	28,8	1,6	-1	0,8	5,7	2,6	31	4	25	4	20	5	49	9
39	broušené	bez vrstvy	perforace 2	4,1	1,8	5,9	2,8	37	13	21	6	24	9	15	4	126	41	18	3,1	-1,1	0,8	6,8	3,9	21	5	16	5	9	3	30	15
40	broušené	bez vrstvy	perforace 2	6,2	5,7	8,3	7,8	43	39	27	20	28	27	16	13	173	176	21,7	11,8	-0,9	0,4	4,2	0,7	22	14	18	9	11	8	32	23
41	laser	bez vrstvy	perforace 2	11	2,8	14,3	3,2	77	19	46	9	46	8	32	10	302	143	28,3	6,2	-0,9	0,3	4,1	1,4	20	3	38	7	21	5	64	16
42	laser	bez vrstvy	perforace 2	11,2	1,7	15,3	2	86	15	45	5	53	9	33	7	370	212	32,7	5,5	-1	0,2	4,5	0,8	21	4	37	3	20	2	66	7
43	neopracované	aCH 1	perforace 2	9,7	4,1	13,4	4,6	66	20	42	14	44	11	29	9	156	77	30,6	3,8	-1,2	0,7	5,1	2,6	19	3	34	10	20	7	60	20
44	neopracované	aCH 1	perforace 2	11,6	5,3	16,3	7,7	91	34	50	17	55	19	36	15	187	70	35,4	10,6	-1,3	0,3	5,4	1,2	24	8	40	13	24	11	76	30
45	broušené	aCH 1	perforace 2	6	4,9	7,7	5,9	39	20	26	13	23	10	16	11	176	84	21,4	9,4	-0,8	0,5	4,5	2,2	12	1	22	13	12	8	35	20
46	broušené	aCH 1	perforace 2	4,9	2,8	6,8	4	40	21	24	12	27	15	15	6	113	54	19,6	5,9	-1,2	0,6	5,6	1,6	14	3	21	9	10	4	37	20
47	laser	aCH 1	perforace 2	8,9	1,2	11,3	1,5	58	10	36	5	36	4	24	5	253	46	28,6	2,7	-0,8	0,4	3,7	1	18	2	29	7	16	3	49	15
48	laser	aCH 1	perforace 2	9,1	0,9	11,9	1,5	64	11	41	3	38	6	28	9	250	99	30,3	3,2	-0,8	0,4	3,9	0,7	20	1	31	6	18	2	49	11
49	neopracované	aCH 2	perforace 2	11	3,3	14,6	3,2	80	10	49	9	45	11	37	12	294	181	33,5	5,2	-0,7	0,8	4,2	1,6	25	2	38	6	22	7	71	8
50	neopracované	aCH 2	perforace 2	6,5	1,2	8,9	1,6	52	9	34	7	36	8	19	2	132	25	27,3	5,1	-1,1	0,4	5,3	1	19	2	28	4	15	2	44	6
51	broušené	aCH 2	perforace 2	3,5	1,7	4,6	2,2	25	10	18	7	16	8	11	4	92	34	17	3,5	-0,9	0,5	4,7	2,1	13	2	16	6	8	2	22	9
52	broušené	aCH 2	perforace 2	3,2	0,7	4,4	1,6	28	11	18	5	16	7	12	4	100	56	16,3	4,9	-0,8	0,6	4,5	2,3	12	1	15	5	8	2	25	12
53	laser	aCH 2	perforace 2	7	2,1	8,9	2,6	46	12	35	8	28	7	21	6	182	74	24,9	4,7	-0,6	0,5	3,7	0,6	18	4	28	6	15	3	38	10
54	laser	aCH 2	perforace 2	12,3	2,8	16,1	3,7	83	20	50	9	49	14	34	10	305	141	33	4,9	-0,8	0,2	3,7	1	26	5	37	9	23	4	67	19

Příloha 3 - Počty buněk v jednotlivých zorných polích na vzorcích a výpočet počtů buněk na 1 cm²

obrázek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	54	23	24	46	28	8	19	5	23	16	4	10	4	32	27	32	20	24	13	11	76	27	30	5	55	31	22
2	42	54	20	16	32	17	18	15	33	35	29	12	14	21	20	42	21	35	11	17	52	30	20	16	28	29	77
3	28	32	45	20	39	25	15	22	41	23	21	16	22	29	67	25	16	42	14	17	51	28	12	21	41	18	27
4	11	87	76	12	59	30	23	27	30	19	16	18	21	8	38	24	24	50	5	23	39	20	17	10	33	26	21
5	18	68	33	15	27	35	26	8	43	10	23	13	15	44	29	13	21	42	7	12	49	18	21	9	59	12	20
6	34	52	30	31	11	60	29	26	43	39	20	6	42	41	31	27	61	120	7	25	65	25	10	98	56	42	27
7	48	47	47	18	35	42	43	58	71	38	24	31	30	35	38	36	53	32	23	21	59	27	16	91	63	31	40
8	68	65	84	23	17	25	31	27	28	21	28	83	40	33	28	48	22	32	18	20	57	17	15	44	35	108	10
9	16	57	34	24	19	88	8	20	21	17	22	25	22	38	19	22	19	23	31	12	43	23	12	31	53	11	26
10	13	22	16	35	18	50	20	14	19	31	27	37	22	20	35	48	37	34	6	16	67	33	23	73	28	94	29
11	53	51	18	35	22	36	33	62	66	30	18	63	25	21	35	129	6	54	19	8	44	15	63	14	21	51	43
12	34	59	63	23	42	15	50	25	56	79	18	52	24	11	17	35	49	34	24	14	35	21	29	14	26	12	21
13	22	42	40	28	23	24	36	12	34	25	19	22	31	28	49	15	27	38	51	9	57	9	23	11	22	23	39
14	52	13	30	33	33	28	19	37	15	22	28	9	16	14	28	36	19	16	38	21	51	16	26	16	67	24	20
15	31	22	35	30	28	10	44	35	41	33	10	42	11	27	33	31	40	20	8	8	42	26	21	16	37	41	30
16	27	52	28	6	43	28	14	21	43	31	22	19	49	50	45	38	34	17	29	7	30	35	28	38	58	39	31
Prumer	**34.4375**	**46.625**	**38.9375**	**24.6875**	**29.75**	**32.5625**	**26.75**	**25.875**	**37.9375**	**29.3125**	**20.5625**	**28.625**	**24.25**	**28.25**	**33.6875**	**37.5625**	**29.3125**	**38.3125**	**19**	**15.0625**	**51.0625**	**23.125**	**22.875**	**31.6875**	**42.625**	**37**	**30.1875**
SD	16.90353	19.92277	19.97822	10.22232	12.10234	20.22529	11.99722	15.97446	16.12232	15.66192	6.673018	21.79564	11.90238	11.96383	12.47247	26.44735	15.04092	24.40961	13.08944	5.790438	12.25544	7.051005	12.37134	29.90812	15.78132	27.61642	15.10063
n	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
ODMOCNI	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106
SEM	4.099707	4.831981	4.845429	2.479277	2.935249	4.905354	2.909754	3.874375	3.910237	3.798574	1.618445	5.28622	2.886751	2.901656	3.025018	6.414425	3.647958	5.920201	3.174655	1.404387	2.972381	1.71012	3.00049	7.253785	3.827532	6.697966	3.662442
bb/cm2	**25001.63**	**33849.75**	**28268.63**	**17923.13**	**21598.5**	**23640.38**	**19420.5**	**18785.25**	**27542.63**	**21280.88**	**14928.38**	**20781.75**	**17605.5**	**20509.5**	**24457.13**	**27270.38**	**21280.88**	**27814.88**	**13794**	**10935.38**	**37071.38**	**16788.75**	**16607.25**	**23005.13**	**30945.75**	**26862**	**21916.13**
SEM bb/cm	2976	3508	3518	1800	2131	3561	2112	2813	2839	2758	1175	3838	2096	2107	2196	4657	2648	4298	2305	1020	2158	1242	2178	5266	2779	4863	2659

28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
17	25	32	16	25	32	6	20	34	33	19	47	11	17	19	72	20	52	17	47	41	2		18	13	16	40
29	15	17	24	30	22	5	18	51	7	11	68	35	31	19	59	30	41	18	53	57	52		16	26	19	37
13	27	29	33	20	34	25	35	56	45	9	44	15	35	11	42	29	30	29	57	14	31		35	31	57	11
24	26	12	26	17	31	6	32	7	24	37	40	13	26	11	2	26	12	48	13	18	21		8	26	20	6
38	25	27	9	16	31	21	18	29	4	26	27	29	23	39	30	31	87	11	43	58	43		26	30	35	44
23	42	50	18	21	31	20	25	57	18	36	35	64	69	33	68	77	44	22	46	7	29		17	50	51	137
28	12	25	24	15	21	46	21	54	67	50	38	22	47	20	84	43	34	36	74	172	71		72	36	67	63
18	25	19	20	26	17	22	38	11	33	31	29	8	31	14	8	37	9	29	28	9	32		57	16	60	22
28	34	42	13	6	9	24	28	30	14	8	23	20	26	32	13	16		7		8	17		16	24	63	54
32	22	14	76	3	44	27	56	34	17	21	39	22	57	32	52	36	24	25	30	49	84		58	35	106	53
25	29	5	33	13	18	48	58	34	46	31	33	30	53	34	98	51	40	62	46	33	164		72	84	106	32
19	31	25	17	21	41	17	15	19	51	48	30	8	9	11	67	23	82	47	32	102	32		27	34	46	19
27	21	14	14	13	22	16	32	13	33	11	56	11	13	33	17	73	62	37	28	9	26		52	112	9	23
22	31	25	39	9	16	12	17	9	25	22	95	10	24	58	23	32	42	54	25	11	42		32	22	38	17
23	23	10	64	8	33	8	27	29	55	17	40	19	30	29	42	51	25	24	15	28	19		43	28	22	12
19	29	32	45	19	24	12	28	14	15	13	61	13	16	24	107	15	46	16	60	25	30		26	8	15	23
24.0625	**26.0625**	**23.625**	**29.4375**	**16.375**	**26.625**	**19.6875**	**29.25**	**30.0625**	**30.4375**	**24.375**	**44.0625**	**20.625**	**31.6875**	**26.1875**	**49**	**36.875**	**42**	**30.125**	**39.8**	**40.0625**	**43.4375**	**#DIV/0!**	**35.9375**	**35.9375**	**45.625**	**37.0625**
6.26598	7.113075	11.93803	18.75089	7.535472	9.528029	12.82559	12.78802	17.26062	18.2573	13.39589	18.3756	14.18391	16.85514	12.62917	32.30893	18.31165	22.2967	15.96611	17.26764	43.52542	37.98415	#DIV/0!	20.63805	26.657	30.1836	31.52453
17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	16	17	16	17	17	1	17	17	17	17
4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106	4	4.123106	4	4.123106	4.123106	1	4.123106	4.123106	4.123106	4.123106
1.519723	1.725174	2.895399	4.547759	1.82762	2.310886	3.110663	3.101549	4.186316	4.428047	3.248982	4.456736	3.440104	4.087973	3.063023	7.836065	4.441228	5.574175	3.87235	4.31691	10.55647	9.21251	#DIV/0!	5.005463	6.465273	7.320599	7.645821
17469.38	**18921.38**	**17151.75**	**21371.63**	**11888.25**	**19329.75**	**14293.13**	**21235.5**	**21825.38**	**22097.63**	**17696.25**	**31989.38**	**14973.75**	**23005.13**	**19012.13**	**35574**	**26771.25**	**30492**	**21870.75**	**28894.8**	**29085.38**	**31535.63**	**#DIV/0!**	**26090.63**	**26090.63**	**33123.75**	**26907.38**
1103	1252	2102	3302	1327	1678	2258	2252	3039	3215	2359	3236	2498	2968	2224	5689	3224	4047	2811	3134	7664	6688	#DIV/0!	3634	4694	5315	5551

Příloha 4 - Průměrná plocha buněk na jednotlivých vzorcích

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
průměr	9174.852	9633.59	11262.65	11182.63	11638.67	10733.68	9595.969	7583.978	11332.04	11534.24	10901.04	8678.561	9420.259	10130.41	9402.778	9329.22	8293.076	9208.847	10068.33	12687.85	13720.45	10339.53	12840.44	8464.647	9935.225	7796.969	8351.037
Mikrony	901.6127	946.6929	1106.781	1098.917	1143.732	1054.799	942.9959	745.2775	1113.6	1133.47	1071.246	852.8422	925.7288	995.5158	924.011	916.7824	814.9606	904.9534	989.4146	1246.835	1348.309	1016.065	1261.83	831.8209	976.3346	766.2081	820.6564
SD	5001.648	4718.335	6270.139	5591.201	4950.311	5419.404	4307.358	3453.279	5679.839	5805.054	4417.256	4171.274	4508.805	4973.993	4186.999	4219.952	3865.021	4822.626	5559.99	5288.678	7323.511	4504.346	5539.684	3261.715	5136.252	3310.604	4349.319
n	310	383	345	200	133	169	163	92	142	101	69	82	58	99	81	100	118	85	58	47	86	57	81	85	111	96	54
Odm n	17.60682	19.57039	18.57418	14.14214	11.53256	13	12.76715	9.591663	11.91638	10.04988	8.306624	9.055385	7.615773	9.949874	9	10	10.86278	9.219544	7.615773	6.855655	9.273618	7.549834	9	9.219544	10.53565	9.797959	7.348469
SEM	284.0745	241.0957	337.5729	395.3576	429.2464	416.8772	337.3783	360.0293	476.6415	577.6245	531.7752	460.6401	592.0352	499.9051	465.2221	421.9952	355.8041	523.0872	730.0625	771.4329	789.7145	596.6152	615.5205	353.7826	487.5114	337.8871	591.8674
SEM mikr	27.916	23.69247	33.17329	38.85179	42.18204	40.96652	33.15417	35.38008	46.83956	56.76316	52.25755	45.26711	58.1793	49.12567	45.71738	41.46947	34.96486	51.40378	71.74324	75.80871	77.60524	58.62938	60.4872	34.76622	47.90775	33.20417	58.16281

	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
průměr	7865.493	9309.373	7853.676	8115.346	7483.2	8938.759	8230.512	9219.488	6578.904	8943.958	9454.773	9073.752	7182.6	8520.648	7965.457	7805.052	7010.682	7952.034	6933	7556.539	7835.815	8842.122		8132.157	8269.177	7531.262	8409.877
Mikrony	772.942	914.8321	771.7807	797.4951	735.3741	878.4119	808.8124	905.9991	646.5089	878.9227	929.1206	891.6776	705.8341	837.3241	782.7654	767.0025	688.9397	781.4463	681.3059	742.5811	770.0255	868.9154		799.1471	812.6121	740.0971	826.4386
SD	3904.33	4544.999	3471.712	4287.756	4183.502	3977.157	4067.371	4890.738	2725.139	4457.223	4269.312	5055.686	2860.474	3999.281	3607.491	4031.02	3239.564	3368.631	3457.644	4127.352	3295.532	3728.247		4411.355	4171.045	3387.807	3392.963
n	75	83	71	52	55	54	41	84	115	118	119	137	110	125	127	96	88	119	92	115	54	139		121	124	130	138
Odm n	8.660254	9.110434	8.42615	7.211103	7.416198	7.348469	6.403124	9.165151	10.72381	10.86278	10.90871	11.7047	10.48809	11.18034	11.26943	9.797959	9.380832	10.90871	9.591663	10.72381	7.348469	11.78983		11	11.13553	11.40175	11.74734
SEM	450.8332	498.8785	412.0164	594.6048	564.1032	541.2225	635.2166	533.6233	254.1206	410.3206	391.3672	431.9364	272.7354	357.7065	320.113	411.4143	345.3387	308.8019	360.4843	384.8776	448.4651	316.2258		401.0323	374.5709	297.1303	288.8282
SEM mikr	44.30338	49.02479	40.48885	58.43181	55.43443	53.18593	62.42274	52.43916	24.97243	40.32221	38.45965	42.44639	26.80171	35.15182	31.45751	40.42968	33.93644	30.34596	35.42479	37.82192	44.07066	31.07551		39.40945	36.80908	29.19899	28.38315

Příloha 5 - Vyjádření významu projektu pro praxi - společnosti Beznoska

Význam projektu pro praxi

Náhrady velkých kloubů jsou celosvětově stále častěji prováděnou operací. Odhaduje se, že počet implantací přesahuje každoročně 500.000. V České republice je to více než 10.000 za rok.
Zásadním a stále významnějším problémem je ale fakt, že jsou stále častěji operováni biologicky mladší pacienti (kteří jsou také mnohem pohybově aktivnější) a to samozřejmě klade větší nároky na kvalitu všech komponentů náhrad. Dochází mnohem více k časnému selhání náhrad a nutnosti reoperací, které jsou pro pacienta velkou zdravotní zátěží a jsou také nákladnější než primoimplantace.
Jedním z kritických míst je rychlost sekundární fixace implantátu aplikovaného bez použití kostního cementu. V případě pozdní stabilizace implantátu vede neadekvátní zatěžování k uvolnění implantátu a jeho selhání.
Jedním z významných výstupů projektu může být technologie nanášení bioaktivní vrstvy na plochy kotvících prvků náhrad, které jsou v přímém kontaktu s kostní tkání a u nichž je rozhodujícím faktorem kvality právě schopnost rychlého spojení s kostí v etapě tzv. sekundární fixace. Využití povrchové úpravy prodlužující životnost endoprotézy bude mít přínos společenský (ekonomický) a také lidský.

Připravenost f. Beznoska

Firma Beznoska s.r.o. je výrobcem implantátů velkých kloubů již více než 30 let a až do r.1987 v ČR dokonce monopolním (tehdy ještě pod značkou Poldi). Zabýváme se však nejen výrobou, ale také vývojem a tak je nám problematika dostatečně známá.
Naše firma již delší dobu hledá možnost zvýšení kvality implantátů pro aloplastiku použitím materiálů hodnotitelných jako stimulátory růstu kostních struktur.
Omezující faktory – především nevhodné technologie nanášení, cena a případně i složitost kooperace (většinou zahraniční dodavatel) včetně obtížnějšího prokazování odpovědnosti za vzniklé vady a samozřejmě nutnost provedení zkoušek biokompatibility způsobily, že jsme se pro použití speciálních povrchových vrstev zatím nerozhodli.
Pro další období však předpokládáme, pokud budou alespoň některé nepříznivě působící faktory zmírněny, že možnost zhodnocení našich výrobků touto cestou opět otevřeme a alternativou může být i některá s navrhovaných povrchových úprav.
V úvahu pro modifikaci by připadaly zejména necementované dříky a jamky totálních náhrad kyčelního kloubu a komponenty necementovaných totálních náhrad kolenního kloubu, případně i další. Celkem by se mohlo jednat o 1500÷3000 ks implantátů ročně
Z uvedeného je zřejmé, že naše firma má o projekt zájem (zejména pokud výstupem bude cenově dostupná technologie potřebných parametrů) a jsme proto ochotni se na projektu v přiměřené míře podílet.

Vypracoval: 15.3.2005 Ing Fencl Jaroslav