

**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

**FAKULTA STROJNÍ**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**ANALÝZA ADHEZE KOLAGENOVÉ ELEKTROSTATICKY  
ZVLÁKNĚNÉ NANOVRSTVY POMOCÍ BLISTER TESTU**

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Konzultant práce:

Ing. Radek Sedláček, Ph.D.

*Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky*



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

### I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Holka** Jméno: **Matěj** Osobní číslo: **419919**  
 Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**  
 Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**  
 Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**  
 Studijní obor: **bez oboru**

### II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Analýza adheze kolagenové elektrostaticky zvlákněné nanovrstvy pomocí blister testu**

Název bakalářské práce anglicky:

**Analysis of collagen electrospun nanolayer adhesion by means of blister test**

Pokyny pro vypracování:

- (1) Vysvětlíte motivaci k vývoji funkčních povrchových vrstev implantátů
- (2) Vysvětlíte stručně principy používaných mechanických metod pro hodnocení adheze
- (3) Popíšete způsob přípravy a nanášení kolagenové nanovrstvy na kovový substrát
- (4) Provedte mechanickou zkoušku adheze kolagenové vrstvy pomocí blister testu, optimalizujte podmínky zkoušky a přípravu zkušebních vzorků
- (5) Zhodnotte výsledky provedených zkoušek a formulujte závěry platné pro aplikaci vrstvy

Seznam doporučené literatury:

1. FRATZL, Peter. Collagen, structure and mechanics. New York: Springer, 2008.
2. Raphael J, Holodniy M, Goodman SB, Heilshorn SC. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. Biomaterials 2016; 84: 301-314.
3. Chen Z, Zhou K, Lu X, Lam YC. A review on the mechanical methods for evaluating coating adhesion. Acta Mechanica 2014; 225(2): 431-452.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

**Ing. Tomáš Suchý, Ph.D., ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky FS**

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

**Ing. Radek Sedláček, Ph.D., ústav mechaniky, biomech.a mechatr. FS**

Datum zadání bakalářské práce: **25.10.2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19.01.2018**

Platnost zadání bakalářské práce:

  
Podpis vedoucí(ho) práce


  
Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

  
Podpis děkana(ky)

### III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

31.10.2017  
Datum převzetí zadání

  
Podpis studenta

## Anotáční list

<b>Jméno autora:</b>	Matěj Holka
<b>Název BP:</b>	Analýza adheze kolagenové elektrostaticky zvlákněné nanovrstvy pomocí blister testu
<b>Anglický název:</b>	Analysis of collagen electrospun nanolayer adhesion by means of blister test
<b>Fakulta:</b>	Fakulta strojní
<b>Ústav/odbor:</b>	Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
<b>Studijní program:</b>	Teoretický základ strojního inženýrství
<b>Studijní obor:</b>	bez oboru
<b>Rok:</b>	2018
<b>Vedoucí:</b>	Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
<b>Konzultant:</b>	Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
<b>Bibliografické údaje:</b>	počet stran 44 počet obrázků 18 počet tabulek 4

**Klíčová slova:** kolagen, osteomyelitida, povrchové úpravy, adheze, blister test

**Keywords:** collagen, osteomyelitis, surface treatment, adhesion, blister test

### Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na analýzu adheze kolagen-hydroxyapatitové nanovrstvy na titanových modelových vzorcích, která by mohla sloužit jako lokální nosič antibiotik. Cílem je porovnat výsledky mechanické zkoušky před a po různé chemické úpravě povrchu vzorků z hlediska velikosti maximálních sil nutných k oddělení povlaku od podkladu a zároveň optimalizovat metodiku testu.

### Abstract

The bachelor thesis is focused on analysis of adhesion of collagen nanolayer on titanium samples which could be used as a local antibiotic carrier. The objective was to compare the results of the mechanical test before and after the different chemical treatment of the samples surface in terms of the maximum force required to separate the coating from the substrate, also to optimize the test methodology.

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité prameny a literaturu, ze kterých jsem čerpal.

V Praze dne:

.....

Matěj Holka

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Tomášovi Suchému, Ph.D. za skvělé vedení, cenné rady a veškerý jeho čas, který mi věnoval. Dále děkuji Ing. Radku Sedláčkovi, Ph.D. za pomoc při mechanických zkouškách, doc. Ing. Lukáši Hornému, Ph.D., že mě přivedl k tématu a představil mi jej.

# Obsah

<b>Seznam zkratk a symbolů.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
1.1 Cíle práce .....	9
<b>2 Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
2.1 Osteomyelitida .....	11
2.1.1 Pooperační záněty a jejich léčba.....	11
2.2 Materiály užívané pro lokální nosiče antibiotik.....	13
2.2.1 Kolagen.....	15
2.2.2 Hydroxyapatit .....	17
2.3 Adheze .....	17
2.3.1 Fyzikálně-chemické úpravy povrchu pro zvýšení adheze.....	17
2.3.2 Metody testování adheze .....	19
<b>3 Experimentální část.....</b>	<b>23</b>
3.1 Příprava a optimalizace vzorků pro odtrhovou zkoušku.....	23
3.1.1 Postup chemické úpravy povrchu vzorků.....	23
3.1.2 Optimalizace podmínek mechanických testů adheze kolagenové vrstvy na titanovém povrchu .....	24
3.1.3 Příprava finálních vzorků pro mechanické testy adheze kolagenové vrstvy .....	27
3.2 Průběh experimentu .....	28
3.3 Statistické vyhodnocení experimentálních dat.....	30
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>32</b>
4.1 První testovaná sada vzorků.....	32
4.2 Druhá testovaná sada vzorků .....	33
4.3 Třetí testovaná sada vzorků .....	33
4.3.1 Výsledky statistického vyhodnocení .....	34
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>Seznam literatury.....</b>	<b>41</b>
<b>Seznam obrázků a tabulek.....</b>	<b>43</b>

## Seznam zkratek a symbolů

AC	Aceton-polární aprotické rozpouštědlo
AMK	Aminokyselina
ATB	Antibiotikum
BA	Bioapatit
CI	Interval spolehlivosti
COL	Kolagen
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]karbodiimid hydrochlorid
HA	Hydroxyapatit
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	Fosfátový pufr použitý jako polární protický roztok
PMMA	Polymethylmethakrylát
SD	Směrodatná odchylka
THA	Totální náhrada kyčle (Total Hip Arthroplasty)
TKA	Totální náhrada kolene (Total Knee Arthroplasty)
TPS	Plazmový nástřík titanu (Titanium plasma spraying)
HCl	Kyselina chlorovodíková
HF	Kyselina fluorovodíková
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kyselina sírová
KCl	Chlorid draselný
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogenfosforečnan draselný
NaCl	Chlorid sodný
NaF	Fluorid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan sodný
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogenfosforečnan sodný
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosforečnan sodný
TiO <sub>2</sub>	Oxid titaničitý
<i>a</i>	Poloměr oddělování [mm]
<i>E</i>	Modul pružnosti [Pa]

$F_{max}$	Maximální síla [N]
$G$	Rychlost uvolňování deformační energie [N/m]
$h$	Tloušťka vrstvy [mm]
$hm.$	Hmotnostní podíl [%]
$n$	Počet hodnot [-]
$P$	Aplikovaná zátěž [N]
$w_0$	Centrální deformace [mm]



# 1 Úvod

Biomechanika a biomedicínské inženýrství jsou interdisciplinární obory využívající poznatky napříč různými obory a vědami jako jsou biologie, chemie, fyzika, mechanika a další. Důležité propojení přichází s lékařstvím, ve kterém řada výzkumů a projektů dostává svůj praktický rozměr a skutečný přínos pro veřejnost. Metody, vynálezy a informace se dostávají na operační sály s úkolem usnadnit práci lékařům a pomoci pacientům.

Spojením dílčích znalostí z biomechaniky a biomedicínského inženýrství se otevřeli dveře pro nové specialisty, na tkáňové inženýrství a protetiku. A jedním z jejich významných úspěchů na poli ortopedie se stala kloubní náhrada. Dlouholetý vývoj endoprotéz vede k dnešním relativně funkčním implantátům. Omezení plynoucí z postižení jsou tak v současné době sníženy na minimum, což dokládá i fakt, že díky umělým kloubům je možné už i aktivně sportovat. Nicméně se implantací jakéhokoliv materiálu do těla jsou spojena různá rizika, jedním z nich je předoperační kontaminace, jež se může rozvinout v zánět zabraňující přijetí implantátu. Léčba zánětu, který vznikne po zavedení náhrady, je poměrně náročná a nákladná a vede k další zátěži pacienta. Ačkoliv existují způsoby, jak tomu předejít, nepodařilo se doposud najít ideální řešení.

## 1.1 Cíle práce

V rámci projektu „Vývoj resorbovatelné kolagen-kalcium fosfátové nanovrstvy s řízenou elucí antibiotik pro zvýšení životnosti implantátů“ finančně podpořeného Technologickou agenturou České republiky (TA04010330) je na Fakultě strojní ČVUT v Laboratoři mechanických zkoušek ve spolupráci s Ústavem struktury a mechaniky hornin AV ČR vyvíjena nanostrukturovaná vrstva, která imituje složení a strukturu lidské kosti, a měla by sloužit jako nosič antibiotik (ATB) v podobě povlaku implantátu z kovových slitin s cílem zamezit komplikacím především z hlediska rozšíření infekce a tvorby zánětu, osteomyelitidy.

Individuálním cílem této bakalářské práce je řešit jeden z důležitých parametrů pro správnou funkci – přilnavost kolagen-hydroxyapatitové nanovrstvy (dále také

kolagenová či kompozitní vrstva) k titanovému podkladu. Pro mechanické testování adheze na rozhraní dvou materiálů (organický-kovový) byl zvolen blister test, u kterého však nebyl doposud navrhnout optimální postup při použití kolagenového povlaku na titanový podklad. Snahou bylo metodiku postupně optimalizovat tak, aby se dosáhlo požadovaného odlepení kolagenové vrstvy od titanového substrátu, namísto jiné nežádoucí deformace vedoucí k protržení vrstvy. Dalším faktorem pro funkčnost mechanické zkoušky bylo navrhnout vyhovující kompozitní nanovrstvu z hlediska tloušťky, pevnosti a koncentrace, a metodu její aplikace na kovový substrát. Pro zvýšení adheze prošly vzorky různou chemickou úpravou povrchu se záměrem data porovnat, a optimalizovat nejvhodnější postup vedoucí k dosažení určených cílů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Osteomyelitida

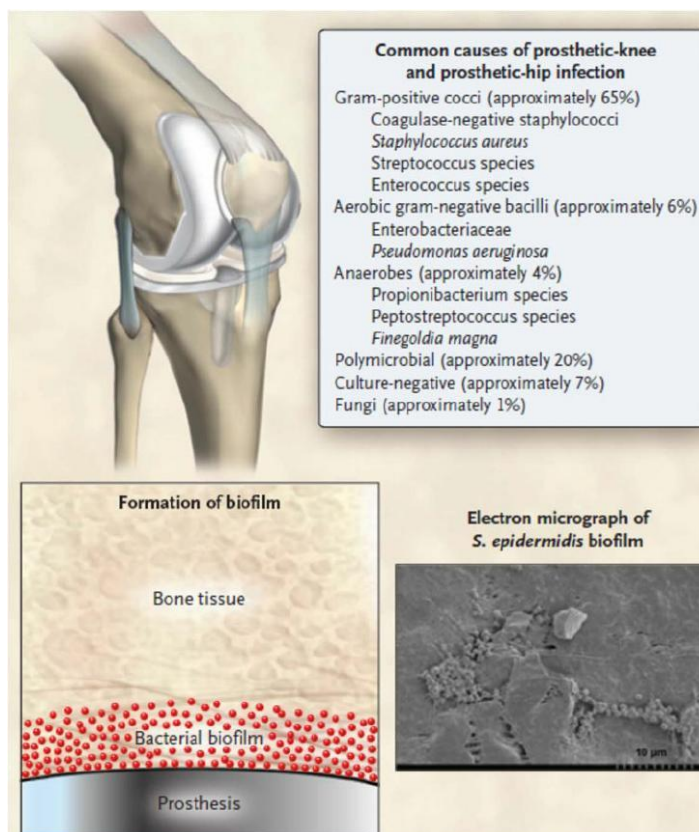
Osteomyelitida neboli zánět kostní tkáně, je infekční onemocnění způsobené mikroorganismy, ve většině případů bakteriemi – nejčastěji ze skupiny stafylokoků – a mykobakteriemi. Vzácně nastane i mykózou. Místem infekce může být mimo vlastní kostní tkáně i kostní dřev. Pro pacienty, kteří prošli ortopedickým zákrokem (např. lidé po totálních endoprotézách apod.), je riziko infekce výrazně vyšší, případně hrozí nepřijetí implantátu a následná imunitní reakce organismu [1].

#### 2.1.1 Pooperační záněty a jejich léčba

Navzdory stále lepší funkčnosti a biokompatibilitě, implantáty s sebou nesou značný risk infekce, která se vyskytuje v rozmezí 0,9-2,5 % pro totální náhradu kolenního (TKA) nebo kyčelního kloubu (THA). U revizí tento údaj stoupá až na 3,2 % u THA, respektive 5,6 % u TKA [2]. Při počtu operací provedených za rok se nejedná o zanedbatelnou část populace. Dle mezinárodního šetření se ročně provede okolo 100–200 procedur výměny kolenního kloubu (primární + revize) na 100 000 obyvatel. Z výsledků studie rovněž vyplývá, že zájem o TKA od roku 1997 výrazně stoupá a všechny indicie naznačují růstovou tendenci i nadále. Do průzkumu publikovaného v prosinci 2011 bylo zahrnuto 18 zemí s celkovým počtem 755 milionů lidí [3].

Infekce je hlavním problémem v ortopedii vedoucí k selhání protézy a následně k celé reoperaci. Pokud při zanesení mikroorganismů do rány dojde k jejich adhezi dříve než k regeneraci tkáně, začnou se na povrchu slitiny objevovat kolonie bakterií, které postupně vytvoří biofilm. Důsledkem toho vznikne akutní pooperační zánět v kosti. Biofilm je extrémně rezistentní jak vůči imunitnímu systému, tak i proti antibiotikům. Dále slouží jako zásobárna bakterií. Tělo se i s odbornou pomocí v mnoha případech nedokáže vypořádat s onemocněním a zánět se může stát chronickým. Proto je zamezení adheze bakterií jedním z nezbytných cílů pro prevenci infekcí a zánětů spojených s implantáty [2].

Další případ vytvoření zánětu může nastat u pacientů s poruchou obranyschopnosti, kdy imunita negativně reaguje na implantát a iniciuje zánět jako obranu proti cizorodému tělesu. Neschopnost kostních buněk, osteoblastů, „obyvatelnosti“ povrchu náhrady (adheze + proliferace) vede ke zmíněným autoimunitním reakcím i potenciálním problémům s infekcí.



**Obr. 1 Příčiny vzniku infekce a znázornění bakteriálního biofilmu na povrchu protézy [4]**

Léčba pooperačních zánětů je velmi komplikovaná, zdlouhavá a nákladná. Podávají se při ní nitrožilně vysoké dávky antibiotik, které jsou velkou zátěží pro organismus – jde totiž o systémovou zátěž. ATB nepůsobí lokálně pouze v místě zasažené infekcí či zánětem, ale v celém těle. Avšak častokrát bez žádoucího efektu, protože mnohé mikroorganismy mají schopnost vytvořit si účinnou rezistenci proti antibakteriálním léčivům, zejména v případě bakterie *Staphylococcus aureus* (zlatý stafylokok), která je vůči nim velmi rezistentní a na léčbu některými ATB nereaguje [2]. Pokud tedy pacient nevykazuje zlepšení po neinvazivní terapii, musí se přejít k chirurgickému zákroku – odstranění implantátu a vyčištění infikované tkáně. K doléčení, popřípadě zamezení rychlé recidivě, se mohou použít spacers

z polymethylmethakrylátu (PMMA) napuštěné gentamicinem [5]. Ideální cestou k prevenci či léčbě pooperačních komplikací spojených s infekcí se jeví lokální nosiče ATB (více v další kapitole), které mohou zamezit rozmnožení bakterií a následovně zánětlivé reakci hned v počátku.

## 2.2 Materiály užívané pro lokální nosiče antibiotik

Lokální nosiče antibiotik mají schopnost dostat se i do avaskulárních zón, jestliže je koncentrace léčiva dosti vysoká. To vede ke zlepšení terapeutického potenciálu, omezení vedlejších účinků systémové aplikace a regulace dopadů nepříznivého vývoje rezistence k antibiotikům [6].

Materiály užívané pro lokální nosiče ATB se obecně rozdělují dle dvou parametrů – schopnosti biodegradovat (biologicky se rozložit) a složení.

### Syntetické polymery

Syntetické polymerní materiály se dají snadno funkcionalizovat a vzájemně kopolymerovat, čímž se mohou jejich vlastnosti různě nastavit pro potřeby biomedicínských aplikací. Vyrábějí se z látek na bázi uhlovodíků nebo jejich derivátů a hlavním představitelem je kostní cement. Ten se produkuje z PMMA např. ve formě spacerů, které se následně impregnují zvoleným antibiotikem. Považuje se v současnosti za jeden z nejpoužívanějších lokálních nosičů, nicméně jeho velkou nevýhodou je, že není biodegradabilní, a proto se musí po uvolnění antibiotik operativně odstranit. Mezi další zástupce ze skupiny syntetických nosičů patří polyaktid a polyglykolid, polymery klasifikované jako biodegradabilní. Používají se *in vivo* v klinické praxi jako např. vstřebatelné stehy a dlahy [7].

### Přírodní polymery

Ačkoliv mají horší mechanické vlastnosti než syntetické polymery, přírodní polymery jsou biologicky přirozené, biokompatibilní a vykazují vhodnou míru biodegradability. Některé biopolymery však mohou vyvolat odezvu imunitního systému. Zároveň jsou obtížněji modifikovatelné, případně jejich modifikace mohou zabránit biologické aktivitě, a proto se často kombinují s dalším

neimunogenním materiálem. Mezi biopolymery patří polypeptidy, polysacharidy (chitosan) či proteiny (kolagen a materiály na jeho bázi, např. želatina) [7].

### **Biokeramika**

Předpona “bio“ v tomto případě odkazuje na vysokou schopnost materiálu dokázat splynout s živou složkou organismu. Jedná se o anorganické nekovové materiály, které se staly v dnešní době velmi populární a používají se samostatně pro kloubní nebo kostní implantáty, případně jako jedna ze složek kompozitů určených pro biomedicínské aplikace. V *in vivo* prostředí jsou velmi chemicky stabilní, ale jejich použití je limitováno vyšší křehkostí a účinnost se mění v závislosti na místě implantace a pohybu implantátu. Patří sem hydroxyapatit,  $\beta$ -trikalcium fosfát, kalcium sulfát [8].

### **Kompozity**

Kompozity jsou v tkáňovém inženýrství velmi perspektivní skupinou nosičů ATB. Ve srovnání s ostatními materiály jdou jejich vlastnosti snadněji optimalizovat a díky různým kombinacím biologických a syntetických substancí lze dosáhnout požadovaných mechanických vlastností a časově ideálního rozkladu látky. Obvykle se používají dvousložkové kompozity, které se skládají z pevnější nespojitě složky, výztuže, a spojitě části plnící funkci pojiva, matrice. Ověřeným zástupcem je hydroxyapatit s kolagenovou maticí [8].

### **Kostní štěpy**

Jedná se o lidskou kostní tkáň, tedy přirozený biologický materiál, který byl odebrán pacientovi nebo vhodnému dárci, a následně použit na jiném místě, např. v kostních defektech po revizích umělých kloubních náhrad. Velkou výhodou kostních štěpů je, v případě autologní implantace, snadné přijetí organismem a schopnost silné osteoindukce, osteokonduce i osteointegrace [6].

V dnešní době jsou nové materiály, které přicházejí na trh nebo figurují v současných výzkumech, biodegradabilní, biokompatibilní a bioaktivní. V důsledku působení enzymů v lidském těle, hydrolýzy a aktivní fagocytózy

se materiál po implantaci časem biologicky rozloží a nezanechá po sobě nežádoucí stopy nebo účinky. Samotné uvolňování ATB probíhá u většiny nosičů obdobně. Po aplikaci se nejdříve iniciuje uvolnění velkého množství antibiotika následováno postupným uvolněním zbytku léčiva v nižších koncentracích v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech nosiče [6].

	PMMA	Kostní štěpy	Kolagen	Kalcium sulfát
Biodegradace	Nebiodegradabilní	Biodegradabilní	Biodegradabilní	Biodegradabilní
Typ antibiotika	Aminoglykosidy, glykopeptidy, ostatní	Gentamicin, vancomycin	Gentamicin	Tobramycin
Farmakokinetika	Pomalá, dlouhodobá eluce	Rychlá eluce	Rychlá eluce	Pomalá eluce
Výplň	Ano	Ano	Ne	Ano
Osteindukce	Ne	Ano	-	Ne
Osteokondukce	Ne	Ano	-	Ano
Profylaxe	Ano	Ano	Ano	-
Léčba	Ano	Ano	Ano	Ano
Nevýhody	Lomivost cementu, neresorbovatelnost	Limitované použití, cena, virová kontaminace	Málo klinických studií, cena, rezistentní kmeny	Dlouhá doba resorbce

**Obr. 2 Porovnání vlastností nejčastěji používaných lokálních nosičů ATB [6]**

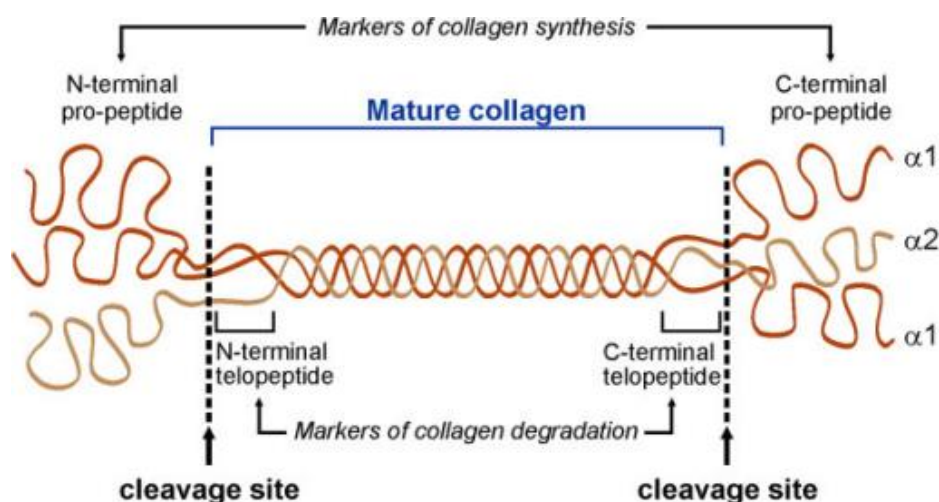
*Aminoglykosidy = gentamicin, tobramycin, amikacin, ...*

*Glykopeptidy = vancomycin, teicoplanin*

### 2.2.1 Kolagen

V posledních letech si kolagen vydobyl velkou pozornost ve vědecké sféře hlavně díky jeho skvělým fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem. Kolagen je bílkovina, která tvoří základní složku pojivových tkání a má obrovský vliv na jejich integritu a strukturu. Tvoří až 30 % všech bílkovin v lidském těle. Produkci kolagenu zajišťují různé buňky, především ty pojivových tkání, např. fibroblasty, chondroblasty a osteoblasty. Jako důležitá součást mezibuněčné hmoty se zúčastňuje významných chemických procesů v organismu.

Charakteristickou vlastností molekuly kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální (spirálovitá) struktura. Tři kolagenové polypeptidové makromolekuly, nazývané  $\alpha$ -řetězce (z nichž každý obsahuje kolem 1000 aminokyselinových (AMK) zbytků a měří asi 280 nm), se společně stáčí do pravidelné pravotočivé superšroubovice (Obr. 3). Úplná otáčka trojitě spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Superšroubovice tak tvoří kolagenovou molekulu s délkou asi 300 nm a průměrem 1,5 nm [9].



**Obr. 3** Struktura molekuly kolagenu typu I [10]

Do dnešního dne je známo okolo 30 typů kolagenu lišících se převážně spektrem a rozložením AMK a vnitřní stavbou. Z toho nejrozšířenější a také zároveň pro účely vytvoření vrstvy imitující složení kosti nejvhodnější je kolagen typu I. Jeho výskyt je hojný zejména v kostech, kůži, vazivu, zubovině a další organické hmotě. Získává se nejčastěji z hovězí, prasečí či rybí tkáně, zejména kůže. Díky své nízké antigenicitě, schopnosti nevyvolat imunitní reakci, je tedy vhodný k použití jako lokální nosič ATB. A zároveň splňuje kritéria pro materiály vyhovující tkáňovému inženýrství – je biokompatibilní a biodegradabilní. Jeho velký vnitřní povrch mu dává schopnost vysoké absorpce, jež zároveň ve spojení s dalšími fyziologickými vlastnostmi vede k dobré proliferaci a transportu látek. Ačkoliv se nedokáže rozpustit ve vodě nebo v běžných proteolytických enzymech, tak kolagenáza (enzym schopný štěpit bílkoviny) ho *in vivo* prostředí velmi rychle a efektivně rozkládá, což by mohlo mít značně nepříznivý dopad na účinek lokálního nosiče léčiv. Také v závislosti na porušení jeho struktury vlivem zpracování podléhá odbourávání a degraduje. Z těchto důvodů je výhodné kolagen ještě dodatečně zesíťovat (vytvořit příčné vazby mezi jednotlivými řetězci jeho molekuly) nebo zkombinovat s jiným biomateriálem, např. elastinem, chitosanem, kyselinou hyaluronovou a dalšími. O velkou pozornost se zasloužilo vytvoření kompozitu s kolagenovou maticí spojenou s anorganickou látkou. Volbou poměru těchto dvou materiálů lze ve výsledném kompozitu dosáhnout na „míru šitých“ vlastností (morfologie, degradace, mechanické vlastnosti) a splnění požadovaných charakteristik. Nejčastěji bývají v tomto směru používány anorganické sloučeniny



jako hydroxyapatit  $[HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  nebo  $\beta$ -trikalciem fosfát  $[\beta-TCP, Ca_3(PO_4)_2]$  [7][11].

### 2.2.2 Hydroxyapatit

Kostní tkáň tvoří primárně krystalická minerální složka (~60-70 % hmotnosti), která je velmi podobná strukturou a složením hydroxyapatitu. Bioapatit (BA), jak se tento minerál nazývá, patří do skupiny kalcium fosfátů a ve srovnání s HA je přirozeně obohacen o další ionty – uhlík, hořčík aj. [12].

Hydroxyapatit, anorganický materiál označován jako bioaktivní keramika (biokeramika), disponuje vysokou biokompatibilitou a schopností osteoindukce. Kost je schopná s HA vytvářet pevné chemické vazby a reagovat na něj jako na živou tkáň. Proto si našel široké uplatnění v tkáňovém inženýrství. Používá se hojně v ortopedii pro náhrady kostní tkáně či ve stomatologii na zubní augmentace.

Organickou složku kostní tkáně tvoří z velké většiny (~90 %) kolagen typu I. Při sloučení nanočástic HA a kolagenu tak vzniká materiál strukturálně velmi podobný kosti, a to na makroskopické i mikroskopické úrovni. Pouze ve vzácných případech se organismus brání imunitní reakcí proti kompozitu kolagen-HA [12].

## 2.3 Adheze

Adhezi lze zjednodušeně definovat jako soudržnost dvou různých substancí pomocí sil (vazebných i fyzikálních) působících na jejich rozhraní. Velikost závisí na povrchové energii a tvaru materiálu a typu převládajících sil či vazeb.

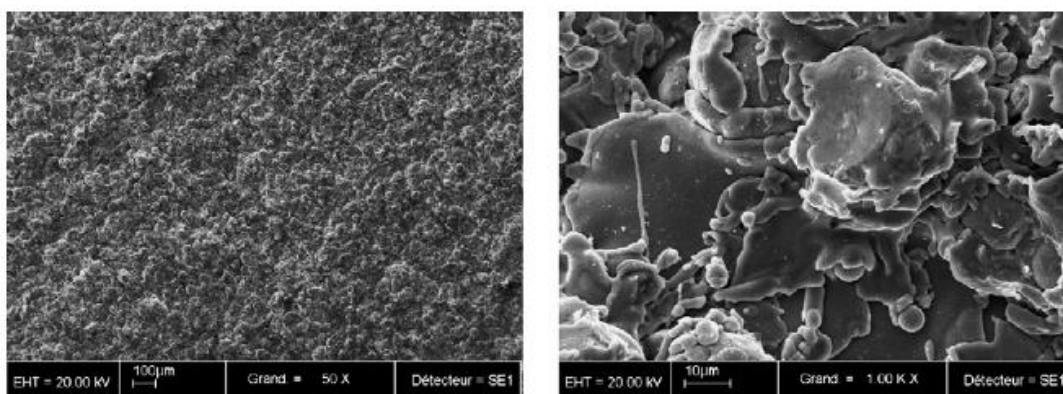
### 2.3.1 Fyzikálně-chemické úpravy povrchu pro zvýšení adheze

Přilnavost je důležitým faktorem pro úspěšnou aplikaci kolagenové vrstvy na povrch implantátu. Nízká adheze způsobí například otěr nanesené vrstvy již při usazování protézy do kosti, a tím dojde k znehodnocení celého nosiče, nesprávné odezvě na antibiotika a dalším komplikacím. Titanová slitina a kolagen jsou vůči sobě velmi chemicky nereaktivní a nedokážou mezi sebou vytvořit pevnou vazbu, která by odolala třecím silám při ortopedickém zákroku. Z tohoto

důvodu se musí plocha kovu ošetřit způsobem, jímž se napomůže zvýšení přilnavosti.

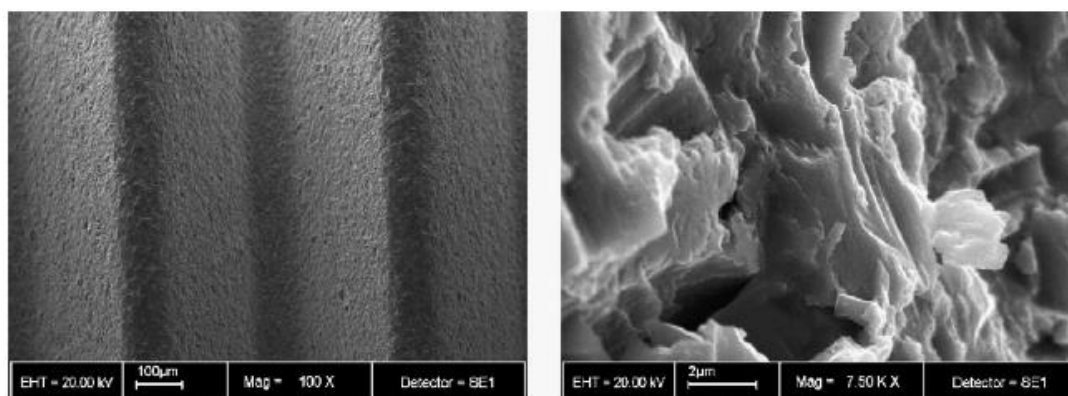
Prvním nezbytným krokem pro zvýšení schopnosti adheze kovového podkladu je odstranění všech nečistot z jeho povrchu – hlavně mastnoty, oleje a prachu. To se provádí očištěním, odmaštěním a následným vysušením. Takto upravený materiál může pokračovat v dalších procesech určených k ovlivnění činitelů působících na kvalitu adheze.

Technologie **plazmového stříkání titanového prášku** (TPS, titanium plasma spraying) patří do kategorie žárových nástřiků. Proces, při kterém se za vysokých teplot plazmovým hořákem ostřeluje povrch substrátu titanovým práškem, vede k lepší přilnavosti díky zdrsnění plochy materiálu pomocí vytvoření kovového filmu a zvětšení vnitřního povrchu. TPS umožňuje vytvářet funkční povlaky s unikátními vlastnostmi účelné v protetice a ortopedii. Běžně se pro plazmový nástřik dá vybrat z velkého množství přídatných materiálů (např. keramik, kovů a jejich slitin), nicméně k úpravám implantátů se používá nejčastěji biokompatibilní  $\text{TiO}_2$ . Nevýhodou metody je časová integrita samotných titanových částic, jež se mohou dostat do přilehlé kosti, případně i do krevního oběhu [13].



*Obr. 4 Povrch titanové sloučeniny opracované metodou TPS [13]*

**Tryskání**, též pískování, je metoda založená na opracování makrostruktur povrchu nejrůznějších substrátů proudem abrazivních částic. Dle zvoleného materiálu abraziva, velikosti a úhlu dopadu jeho zrn se tak dosáhne požadované drsnosti povrchu. Pro tvrdé kovy se používá korund, křemičitý písek, keramika atd. Vhodným zástupcem pro otryskávání lékařských nástrojů, díky chemické stabilitě a biokompatibilitě, je keramika.



**Obr. 5** Povrch titanové sloučeniny opracované tryskáním (keramické abrazivum) [13]

**Naleptání** kyselinou (např. fluorovodíková (HF), chlorovodíková (HCl), sírová (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)) se řadí mezi chemické metody úpravy povrchu. Dojde opět ke zvýšení drsnosti plochy především z hlediska mikrostruktur. Zároveň i k chemické změně povrchu, který se stává reaktivnějším, a to může vést k vytvoření pevnějších vazeb na rozhraní dvou materiálů.

Metodicky podobnou úpravou je **expozice** kovu různým roztokům a rozpouštědlům.

### 2.3.2 Metody testování adheze

Funkčnost povrchových vrstev definují převážně adhezní síly na rozhraní povlaku a substrátu. Správné a přesné vyhodnocení adheze je proto rozhodujícím faktorem pro posouzení kvality povlaku a jeho vhodnosti pro aplikaci. V současné době existují různé postupy mechanického charakteru, se kterými lze zjistit příslušné veličiny potřebné k posouzení celkové účinnosti, chování a kompaktnosti povlaku aplikovaného na podklad.

#### Scratch test

Tzv. vrypová zkouška byla široce využívána jako technika pro hodnocení adheze tvrdých vrstev a povlaků už od roku 1950 [14]. Při této metodě je sféricky zakončený diamantový hrot (indentor) při určitém zatížení tažen (lineární posuv) po povrchu povlaku. Postupně se navyšuje zatížení indentoru. Ten proniká stále hlouběji až do chvíle, kdy dojde k oddělení povlaku. Síla potřebná k jeho odtržení se nazývá kritické zatížení a považuje se za kvalitativní (popř. semikvantitativní) měřítko adheze povlaku [15].

### **Indentační test**

Indentační zkoušky se běžně používají pro měření mechanických vlastností homogenních materiálů, jako je tvrdost či redukovaný modul pružnosti. V poslední době byly tyto techniky rozvinuty a používají se k vyhodnocení adhezní síly povlaku nebo filmu ke substrátu. Zkoušku lze provést dvěma způsoby. Buď se diamantový indentor kolmo vtlačí přímo do povlaku, nebo na rozhraní povlak/substrát. Při kontrolovaném stlačení materiálu nastává delaminace vrstvy, ta se následně analyzuje. Test poskytuje kvalitativní i kvantitativní výsledky. Nevýhodou je velmi obtížná analýza [14].

### **Peel test**

Tzv. odlupovací zkouška, která v podstatě vychází z takzvaného „tape testu“. V nejjednodušší verzi je na film nebo povlak přitlačena lepicí páska, následně odstraněna nebo odtrhnuta, čímž se zjistí, zda-li se vrstva odloupala. Používá se převážně pro flexibilní vrstvy na rigidním substrátu. Příprava zkoušky není náročná, avšak vyhodnocení dat patří mezi složitější analýzy z důvodu nižší kontrolovatelnosti procesu odlepování [15].

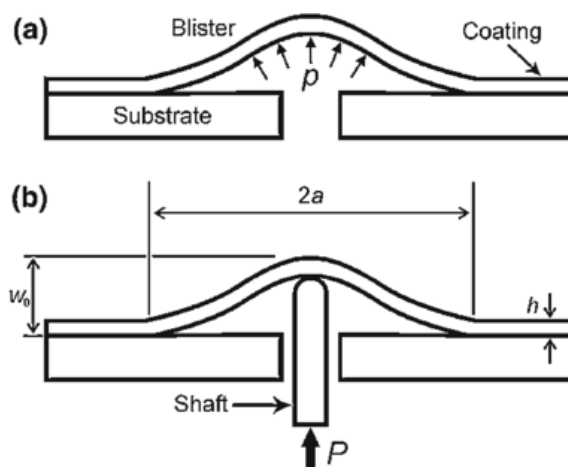
### **Protlačovací zkouška**

Principem zkoušky je – v rámci biomedicínských aplikací – protlačit povlakované těleso skrze otvor simulující organickou tkáň, například polyuretanová pěna simulující mechanické vlastnosti a strukturu kostní tkáně. Vyhodnocovanými parametry jsou síla působící při protlačování a hodnotí se také míra úbytku vrstvy.

### **Blister test**

Svým charakterem se jedná o kvantitativní odtrhovou (lomovou) mechanickou zkoušku. Blister test byl původně navržen Dannenbergem pro měření adheze organických povlaků na kovech [14]. Při standardním testu se zkušební geometrie skládá z překryvné vrstvy umístěné proti tuhému substrátu s kruhovým otvorem vytvořeným uprostřed. Poté je plyn nebo kapalina vpuštěna pod tlakem do otvoru proti nepovlakované straně vzorku. Tlak způsobí odlepení povlaku od substrátu a následném vytvoření „puchýřku“ (Obr. 6a). Adhezní síly na rozhraní povlak/substrát lze kvantitativně stanovit z geometrie puchýřku (blistru)

a aplikovaného tlaku. Velkou limitací zkoušky při použití natlakované tekutiny bylo časté roztržení povlaku před samotným odlepením od substrátu.



**Obr. 6 Schéma blister testu – standardní (a), verze s razníkem (b) [14]**

Ačkoliv během let došlo k mnohým vylepšením, použití testu bylo stále velmi omezeno, protože obvykle vyžadovalo komplikovaný systém kontroly tlaku a sofistikované experimentální uspořádání, které průběžně sleduje změny tlaku a rozměrů blistru. Až Malyshev a Salganik navrhli metodu, která se pro testování přilnavosti stala přijatelnější, což se projevilo v opětovném navýšení zájmu o blister test [14]. Tato verze zkoušky (Obr. 6b) adheze spočívá v osově souměrném zasouvání razníku (protlačovacího trnu) skrz středový otvor v terčičku až do kontaktu s vrstvou, kdy začne razník delaminovat povlak od povrchu a vytvářet kužel (puchýřek). Považuje se za vhodnou alternativu k původnímu tlakovému testu z důvodu snadnějšího experimentálního nastavení. Během stabilního růstu oddělování povlaku se předpokládá, že aplikovaná zátěž  $P$ , centrální deformace  $w_0$  a poloměr oddělení  $a$  se zvyšují lineárně. Ze sklonu  $P$  versus  $w_0$  lze vypočítat rychlost uvolňování deformační energie  $G$  (1).

$$G = \frac{1}{Eh\pi^2} \left( \frac{P}{w_0} \right)^2 \quad (1)$$

kde  $E$  a  $h$  je modul pružnosti, respektive tloušťka vrstvy povlaku. K výsledku  $G$  se jde dostat i ze sklonu  $w_0$  versus  $a$ :

$$G = \frac{Eh}{16} \left( \frac{w_0}{a} \right)^4 \quad (2)$$

Pro účely testování a porovnání vrstev po různých chemických úpravách nebylo třeba použít zmíněné výpočtové vztahy (1)(2). Aplikovaná zátěž se zvyšovala až do maximální hodnoty  $P_{max}$ , v mém případě  $F_{max}$ , při které došlo k oddělení vrstvy od podkladu. Hodnoty centrální deformace a poloměru oddělení jsou stejné pro všechny vzorky a vyhodnocení adheze je závislé pouze na maximální síle  $F_{max}$ .

## 3 Experimentální část

### 3.1 Příprava a optimalizace vzorků pro odtrhovou zkoušku

Pro odtrhové mechanické zkoušky byl navržen zkušební vzorek z titanového materiálu ve tvaru terčíku o průměru 15 mm a tloušťce 2,75 mm. Zkušební vzorek je ve středu opatřen průchozím otvorem o průměru 5,6 mm. Tento otvor byl před nanášením vrstvy elektrostatickým zvlákňováním zaslepen kolečkem z hliníkové folie proto, aby došlo k jeho rovnoměrnému překrytí a aby zkušební trn neprotrhl při testu jemnou nanovláknennou vrstvou. Titanové vzorky byly připraveny dvěma způsoby. Jednak dělením z kulatiny (povrch u tohoto typu byl upraven plasmaticky) a jednak 3D tiskem (povrch se strukturou simulující trabekulární kost nebyl dále speciálně upravován).

#### 3.1.1 Postup chemické úpravy povrchu vzorků

1) Všechny vzorky byly vyčištěny nejdříve mechanicky pro odstranění volných částic a poté v demi vodě ultrazvukem, dále opět čištěny v demi vodě v soxhletu a nakonec namočený v 100% ethanolu po dobu 24 hodin. Následně byly vysušeny v sušárně při teplotě 110 °C.

2) Vzorky byly rozděleny do čtyř skupin po 5 až 7 vzorcích typu „obráběný“ a „3Dtištěný“, a to:

- **0:** bez další úpravy povrchu;
- **HF:** kyselá úprava povrchu: ve vodném roztoku HF 1,6%hm. (50% kyselina), 0,9%hm. NaF a 5%hm. roztoku fosforečnanu sodného ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) po dobu 3 minut a následný oplach vodou a vysušení při 110 °C po dobu 20 minut;
- **AC:** expozice v rozpouštědle (aceton-polární aprotické rozpouštědlo): namočený na 24 hod. v acetonu a vysušeny při 70 °C v sušárně;

- **PBS:** expozice ve vodném roztoku fosfátového pufru (PBS) (polární protický roztok): namočený na 24 hod. v PBS ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) a vysušeny v sušárně při  $110\text{ }^\circ\text{C}$ .



*Obr. 7 Vzorky "PBS" připravené na aplikaci kolagenové vrstvy*

3) Dalším krokem přípravy vzorků byl pokryv kolagenovou nanostrukturovanou vrstvou, ta byla aplikována postupně několika způsoby, které posloužily pro optimalizaci podmínek mechanických zkoušek.

### **3.1.2 Optimalizace podmínek mechanických testů adheze kolagenové vrstvy na titanovém povrchu**

Před vlastním testem adheze kolagenových vrstev na titanových modelových vzorcích bylo potřeba optimalizovat uspořádání testu, a to jak z pohledu aplikace vrstev na kovový podklad, tak z pohledu konstrukce modelových vzorků a protlačovacího trnu. Tato optimalizace je popsána v následujících bodech.



### 3.1.2.1 Postup přípravy vzorků s kolagenovou vrstvou pomocí elektrostatického zvlákňování

Vzorky byly rozloženy na deskový stacionární kolektor v elektrospínovacím zařízení, bylo překontrolováno elektrické propojení terčků s kolektorem. Při napětí 24–27 kV byly následně pokrývány z 8%hm. roztoku kolagenu v roztoku PBS a ethanolu (1 : 1 hm.) elektrostaticky připravovanou nanovláknennou vrstvou po dobu 60 minut (Electrospunra ES-210, Mikrotools, Singapur) při dávkování roztoku 1ml/hod. na celkovou plochu 10 x 5 cm. Předběžnými zkouškami bylo zjištěno, že při delším spínování hmotnostní přírůstek vrstvy začíná být minimální, vrstva se usazuje již v okolí cílených terčků. Delší pokryv tedy nemá smysl. Vzorky s nanosenou vrstvou kolagenových nanovláken byly dále přemístěny do roztoku EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]karbodiimid hydrochlorid) a NHS (N-hydroxysukcinimid) v poměru 4 : 1 molárně v 95%hm. ethanolu. Síťovací reakce se nechala probíhat 24 hod./37 °C. Po dokončení této operace byly vzorky promyty dvakrát v 0,1M roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> po dobu 20 minut a následovalo promytí destilovanou vodou. Dále byly vzorky vysušeny v lyofilizátoru mezi dvěma přitlačovanými porézními deskami.

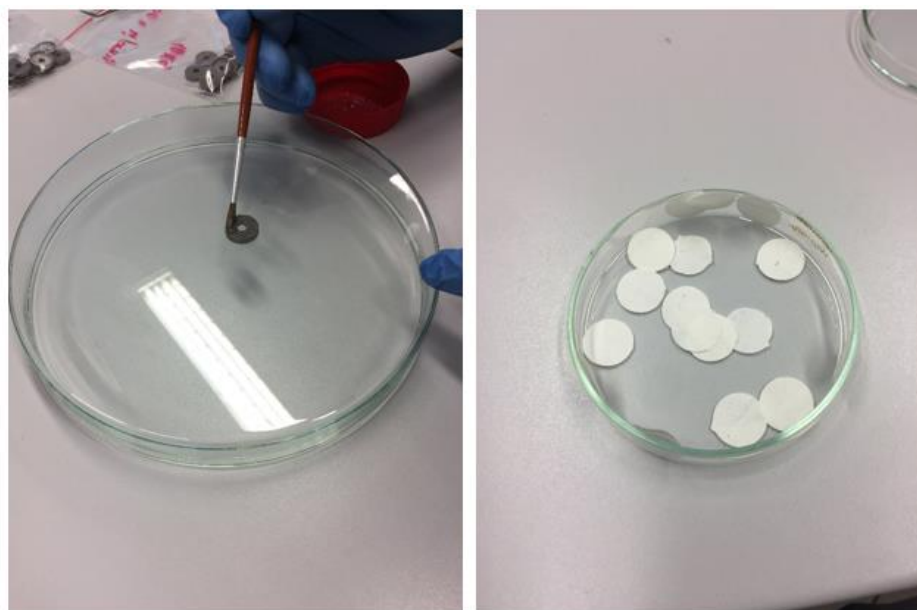


*Obr. 8 Postupný elektrostatický pokryv vzorků*

### 3.1.2.2 Postup přípravy vzorků s kolagenovou vrstvou pomocí impregnace

Vzhledem k nedostatečné tloušťce vrstvy deponované elektrostatickým zvlákňováním a jejímu protrhávání při mechanických zkouškách bylo nutné postup přípravy modelových vzorků optimalizovat. Cílem zkoušek bylo ověření chemické úpravy titanového podkladu, nikoliv procesu zvlákňování jako takového. Z těchto důvodů jsme přikročili k optimalizaci přípravy, která spočívala ve třech krocích. Prvním krokem byla samostatná příprava kolagenové vrstvy

elektrostatickým zvlákňováním na stacionární plošný kolektor. Pro její přípravu byl použit stejný roztok i podmínky procesu popsané v kapitole 3.1.2.1, stejně tak její zesílení v roztoku EDC/NHS a následné promytí i vysušení. Z takto připravené vrstvy byly vyraženy kruhové vzorky (Obr. 9) o průměru 15 mm, které byly na povrch vyčištěných a chemicky upravených vzorků (**0**, **HF**, **AC** a **PBS**) aplikovány po prosycení kolagenovým spinovacím roztokem, zatíženy závažím a konečně byly ponechány k proschnutí pod skleněnými zatíženými deskami v laminárním boxu.



**Obr. 9 (vlevo) Impregnace kolagenovým roztokem, (vpravo) kruhové vzorky kolagenové vrstvy**

### **3.1.2.3 Postup přípravy vzorků s kolagenovou vícenásobnou vrstvou pomocí impregnace**

Ani impregnace silnějších samostatně připravených kolagenových vrstev na titanový podklad nepřinesla při mechanických testech uspokojivé výsledky. Při protlačování trnu docházelo nadále k protrhávání vrstev a nebylo možné stanovit sílu při prostém odtrhu. Z těchto důvodů jsme se pokusili zvýšit tloušťku kolagenové vrstvy tak, že jsme na titanové vzorky přikládali tři prosycené vrstvy podle postupu popsaného v kapitole 3.1.2.2.

### **3.1.2.4 Postup přípravy modifikovaných vzorků s kolagenovou vrstvou pomocí impregnace**

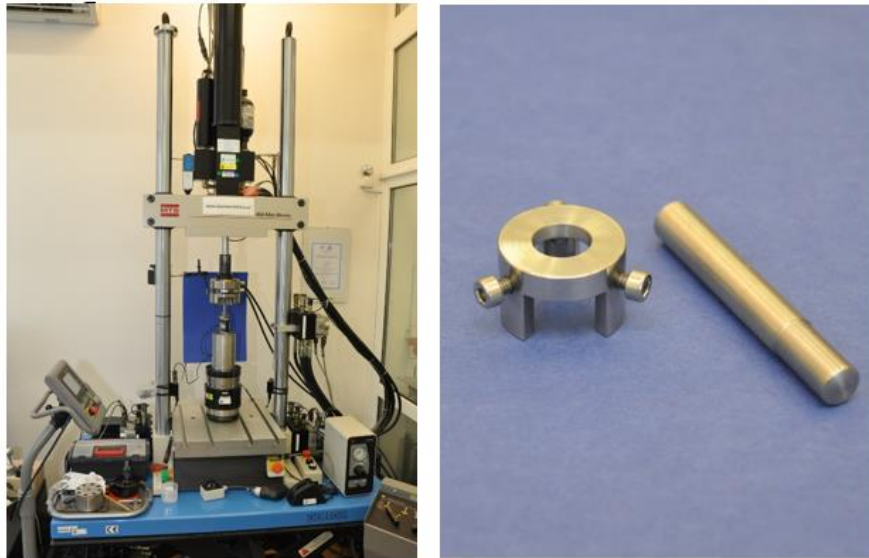
Mechanické zkoušky vícenásobných vrstev bohužel opět nepřinesly uspokojivé výsledky, při testech docházelo k jejich delaminaci a jen částečnému „odlupování“ kolagenových vrstev. Z těchto důvodů jsme přikročili k poslední úpravě uspořádání zkoušek, a to ke zvětšení otvoru v titanových modelových vzorcích z 5,6 mm na 8 mm. Odpovídajícím způsobem byl zvětšen i průměr protlačovacího trnu na 7,8 mm tak, aby došlo k příznivějšímu rozložení aplikované síly na odtrhovanou vrstvu. Kolagenové vrstvy na tyto vzorky byly opět nanášeny pomocí jejich prosycení kolagenovým roztokem (viz kapitola 3.1.2.2). Předběžné testy prokázaly, že toto uspořádání testu je vhodné, a proto jsme tento způsob přípravy zkušebních vzorků použili pro finální testy adheze.

### **3.1.3 Příprava finálních vzorků pro mechanické testy adheze kolagenové vrstvy**

Po optimalizaci podmínek mechanických zkoušek byly tedy kolagenové vrstvy nanášeny pouze na 3D tištěné vzorky s kruhovým otvorem o velikosti 8 mm. Pro testy byly vybrány kolagenové vrstvy určené pro přímé nanášení na implantáty s aplikovaným antibiotikem. Nejprve byla samostatně připravena kolagenová vrstva. Ta byla připravena na bázi kolagenu (typ I, telecí kůže, VUP Medical, Brno) a 5% hydroxyapatitu (průměrná velikost částic 150 nm, Sigma-Aldrich, Německo) elektrostatickým zvlákňováním 8%hm. roztoku kolagenu ve směsi PBS/ethanol (1/1hm.). Roztok byl modifikován 8%hm. (na kolagen) polyethylen oxidu ( $M_w$  900 000, Sigma-Aldrich, Německo) pro usnadnění zvlákňovacího procesu vysoko-objemových vrstev. Vrstvy byly zvlákňované (4SPIN, Contipro, a.s., Česká republika) při napětí 45 kV a dávkování 130  $\mu$ l/min a relativní vlhkosti 20-25 %. Následně byly zesít'ovány pomocí EDC/NHS a promyty (viz kap. 3.1.2.1). Při promývání je z vrstvy kompletně vyplaven také polyethylen oxid. Posledním krokem přípravy vrstvy byla impregnace antibiotikem vankomycin (vankomycin hydrochlorid, Mylan S.A.S., Francie). Z takto připravených vrstev byly připraveny kruhové vzorky o průměru 15 mm a po jejich prosycení kolagenovým roztokem byly aplikovány na chemicky upravené titanové vzorky (viz kap. 3.1.2.1).

### 3.2 Průběh experimentu

Hodnocení adheze povrchové vrstvy na kovovém substrátu proběhlo vždy na ČVUT Fakultě strojní v Laboratoři mechanických zkoušek při pokojových a stabilních hodnotách teploty a relativní vlhkosti pro všechny sady vzorků. K mechanické odtrhové zkoušce – blister testu – posloužil testovací systém MTS 858.2 Mini Bionix (Obr. 10) se siloměry od firmy MTS s měřicími rozsahy 10 N (PM 00/08) a 100 N (PM 00/16) pro první a druhé, respektive třetí měření. Dále byly použity přípravky pro testování adheze pomocí blister testu, protlačovací trn (razník) a speciální úchytné zařízení na modelové vzorky (Obr. 10).



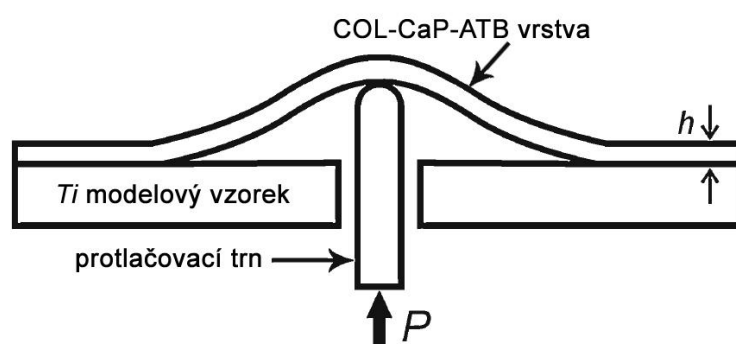
**Obr. 10 (vlevo) Testovací systém MTS 858.2 Mini Bionix, (vpravo) speciální zařízení na uchycení titanových vzorků a protlačovací trn**

#### Poznámky k provozu zkoušky

rychlost zatěžování:	5,0 mm/min
rychlost odlehčení:	10,0 mm/min
vzorkování dat:	20,0 Hz
přítlak v čelistech:	5,0 MPa

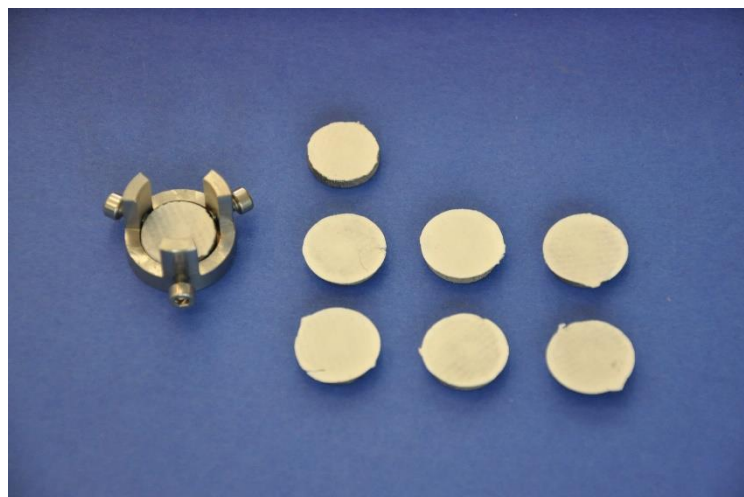
Pro měření adheze kolagenové nanostrukturované vrstvy na titanovém podkladu byly použity povlakované titanové modelové vzorky připravené postupem

popsaným v kapitole 3.1. Před samotným experimentem se u všech vzorků přeměřily parametry a vizuálně zkontrolovaly možné nesrovnalosti či defekty vrstvy. Do úchytného zařízení se vložil modelový vzorek, zajistilo se upevnění pomocí postranních šroubů a celý preparát se položil do testovacího systému (zatěžovací stroj) tak, aby protlačovací trn pronikal do středu osově souměrného vzorku nepovlakovanou stranou způsobem schematicky ukázaným na Obr. 11.

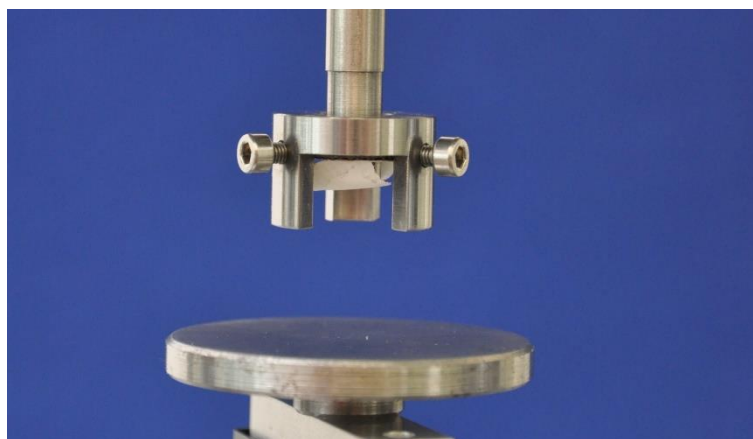


**Obr. 11 Schéma mechanického testování kolagen-hydroxyapatit nanovrstvy pomocí blister testu**

Po správném usazení úchytného zařízení a nastavení všech parametrů testovacího systému se přešlo k zatěžování vzorku konstantní rychlostí posuvu 5,0 mm/min. až do oddělení povrchové vrstvy. Stejným způsobem se provedla odtrhová zkouška pro všechny testované skupiny vzorků (bez úpravy, HF, AC, PBS) během všech tří měření. Pro třetí měření se změnil průměr díry a razníku jako součást optimalizace testu (viz kap. 3.1.2.4). Nicméně ve výrobě nastala chyba a hodnota průměru razníku neodpovídala navrženým parametrům. Protlačovací trn nedokázal projít otvory bez nežádoucího tření (Obr. 13) a bylo jej třeba zbrousit o 2 mm na požadovanou hodnotu. Po provedení potřebné úpravy nástroje se pokračovalo v testování vzorků.



*Obr. 12 Skupina titanových vzorků s povlakem připravená k testování*



*Obr. 13 Protlačovací trn zaseknutý v testovacím preparátu*

### 3.3 Statistické vyhodnocení experimentálních dat

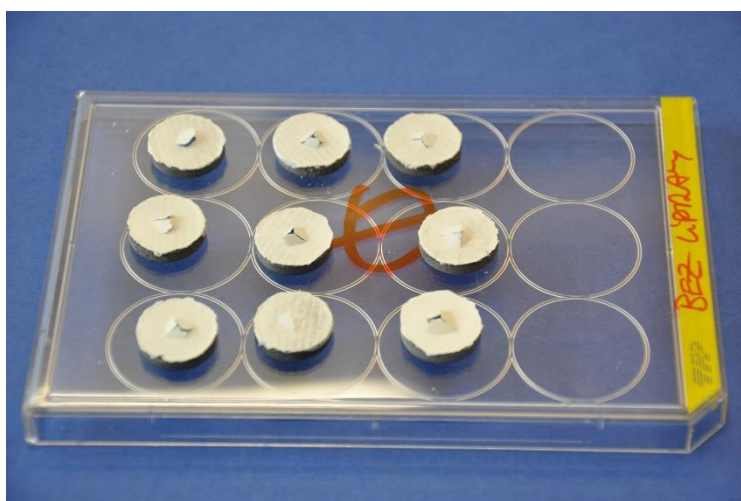
Statistická analýza získaných dat byla provedena pomocí programu STATGRAPHICS Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc., VA, USA). Jakékoliv hodnoty ležící za trojnásobkem mezikvartilového rozpětí (v krabicovém grafu na *Obr. 17* jsou označeny jako čtverce s křížkem) byly vyloučeny jako chyby měření (extrémní odchylky). Normalita jednotlivých souborů dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Na jeho základě byla u všech souborů dat prokázána. Dále byla testována shoda rozptylů, a to pomocí Cochranova a Levenova testu. Protože u jednotlivých souborů dat byla splněna podmínka normality, jsou střední hodnoty (*Tab. 2*) prezentovány jako aritmetický průměr a jejich rozptyl jako směrodatná odchylka (*SD*), případně interval spolehlivosti (*CI*). Vzhledem k normalitě dat a vzhledem ke splnění podmínky shody rozptylů byl pro testy

vícenásobného porovnání použít Student-Newman-Keulsův test (*Tab. 3*). Vzhledem k tomu, že po vyloučení extrémních odchylek byla velikost souborů dat malá (4-6 hodnot), byly statisticky významné odchylky ověřeny ještě neparametrickým testem vícenásobného porovnání, jmenovitě Kruskal-Wallisovým testem s Bonferoniho korekcí, jehož výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4*. Pro všechny statistické testy byla akceptována hladina spolehlivosti  $\leq 0,05$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 První testovaná sada vzorků

Adhezní síly se ukázaly být vyšší, než je pevnost kompozitní vrstvy. U všech skupin došlo k protrhnutí povlaku (Obr. 14 a 15). Z kvalitativního hlediska adheze povlaky uspěly, ale srovnat různé úpravy povrchu bylo nemožné, a tak bylo třeba upravit metodiku (viz kap. 3.1).



Obr. 14 Skupina modelových vzorků "0" s viditelným protrhnutím vrstev



Obr. 15 Skupina modelových vzorků "PBS" s protrhnutím vrstev

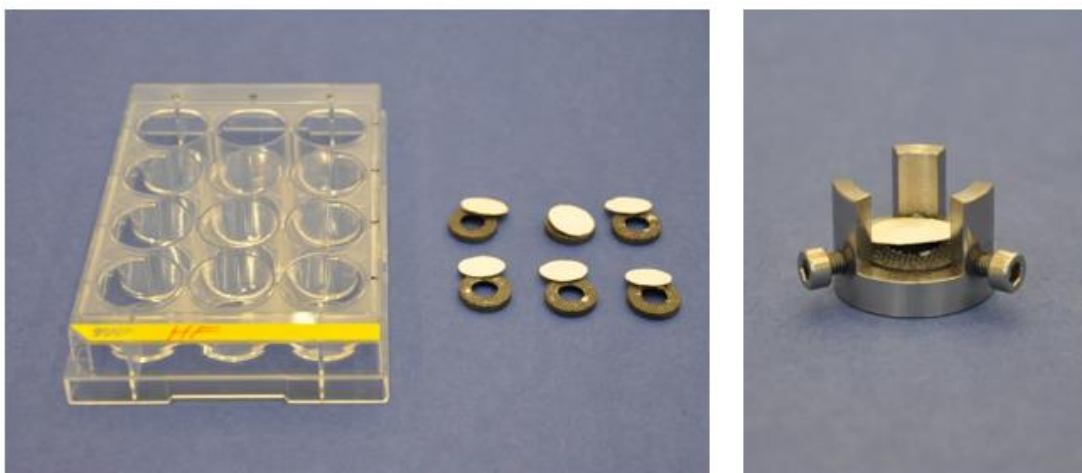


## 4.2 Druhá testovaná sada vzorků

Po optimalizaci vzorků na vícenásobnou vrstvu (viz *kap. 3.1.2.4*) se přešlo k druhému měření, jehož výsledek byl opět neuspokojivý. Docházelo k protrhnutí první vrstvy a následné delaminaci horních vrstev povlaku. Optimalizace se jevila jako dosti nevhodná a nepřinesla žádné nové poznatky či výsledky, se kterými by bylo možné porovnat různé úpravy povrchu.

## 4.3 Třetí testovaná sada vzorků

Po zvětšení průměru otvoru a razníku proběhlo mechanické testování úspěšně. Povlaky se pod zatížením oddělily od povrchu substrátu (*Obr. 16*) a povedlo se naměřit hodnoty maximálních sil.



***Obr. 16 Ukázka odloupenutí vrstev po odtrhovém testu***

U všech skupin vzorků došlo k přerušení adhezních sil a k odlepení vrstvy namísto k jejímu strukturálnímu porušení. Navržená metodika zkoušky adheze se ukázala jako optimální, i přestože došlo k několika chybám měření a přípravy nanovrstev. Oranžově označené hodnoty (buňky) v *Tab. 1* byly připraveny s odlišnou tloušťkou kolagenové vrstvy než zbytek vzorků, jejich vyloučení bylo provedeno na základě statistického vyhodnocení.

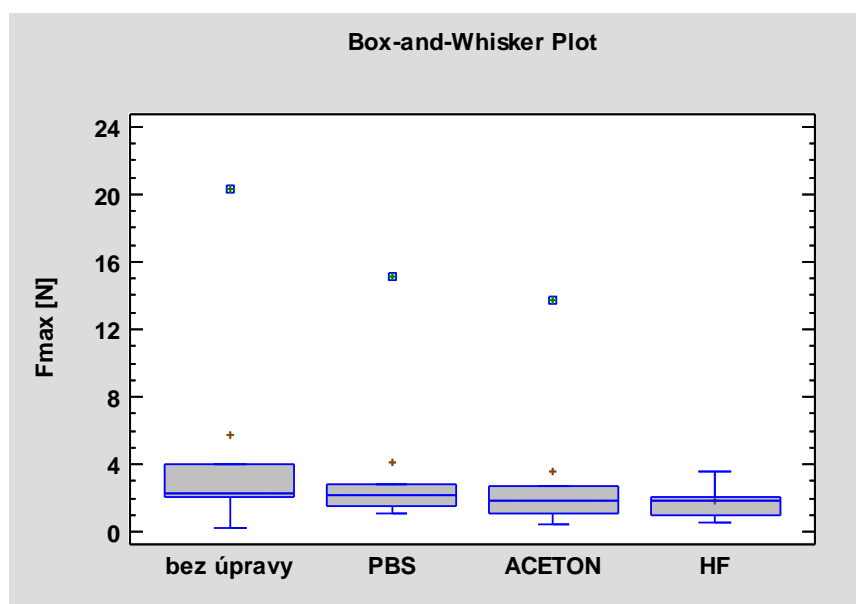
**Tab. 1** Naměřené maximální hodnoty síly  $F_{max}$  [N] při delaminaci kolagenové vrstvy

bez úpravy	PBS	ACETON	HF
20,30	1,49	1,50	0,57
4,00	1,13	13,69	1,85
2,10	15,14	2,66	3,61
2,30	1,99	2,13	1,03
0,20	2,34	1,05	2,11
	2,80	0,44	1,79

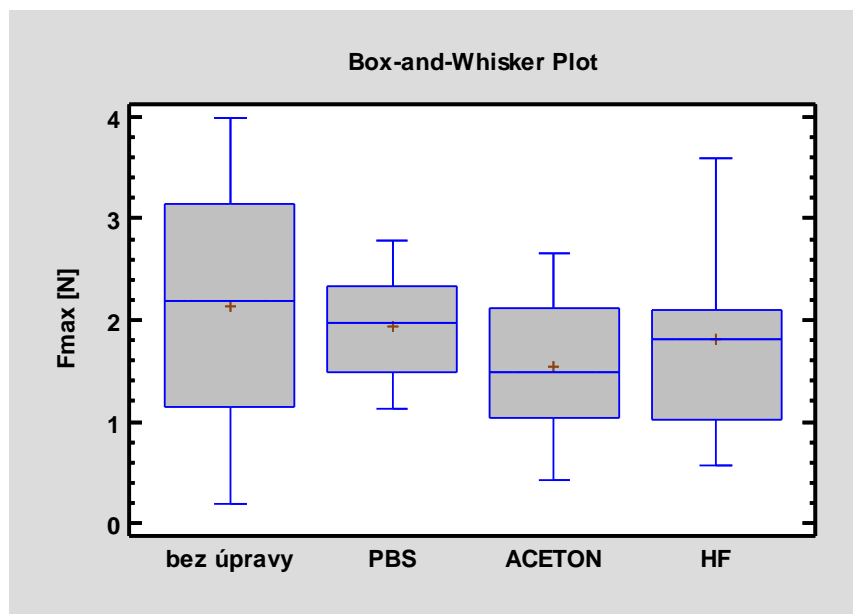
Jiná tloušťka vrstvy kolagenu

#### 4.3.1 Výsledky statistického vyhodnocení

Vzhledem k optimálnímu průběhu měření se mohlo u třetí testované sady vzorků přejít ke statistickému vyhodnocení metodou popsanou v kapitole 3.3 a zároveň získané hodnoty maximálních sil nutných k delaminaci povlaku zanalyzovat a porovnat v rámci různých skupin úprav.



**Obr. 17** Krabicový graf stanovených hodnot maximální síly při odtržení vrstvy před vyloučením extrémních odchylek



**Obr. 18** Krabicový graf stanovených hodnot maximální síly při odtržení vrstvy po vyloučení extrémních odchylek

**Tab. 2** Výsledné hodnoty maximální síly působící při odtržení z různě upravených povrchů

	bez úpravy	PBS	ACETON	HF
střední hodnota	2,15	1,95	1,56	1,83
SD	1,56	0,66	0,87	1,05
CI (95%)	2,47	0,82	1,09	1,10
<i>n</i>	4	5	5	6

**Tab. 3** Výsledky Student-Newman-Keulsova testu vícenásobného

porovnání	signifikance	rozdíl
bez úpravy - PBS	<i>ne</i>	0,20
bez úpravy - ACETON	<i>ne</i>	0,59
bez úpravy - HF	<i>ne</i>	0,32
PBS - ACETON	<i>ne</i>	0,39
PBS - HF	<i>ne</i>	0,12
ACETON - HF	<i>ne</i>	-0,27

**Tab. 4 Výsledky Kruskal-Wallisova testu s Bonferoniho korekcí**

porovnání	signifikance	rozdíl
bez úpravy – PBS	<i>ne</i>	0,40
bez úpravy – ACETON	<i>ne</i>	2,80
bez úpravy – HF	<i>ne</i>	2,33
PBS – ACETON	<i>ne</i>	2,40
PBS – HF	<i>ne</i>	1,93
ACETON – HF	<i>ne</i>	-0,47

Na hladině spolehlivosti 95% nebyl mezi jednotlivými úpravami povrchu prokázán žádný statisticky významný rozdíl, a to ani při porovnání před a po úpravě. Znamená to tedy, že ani jedna povrchová úprava nezvýší přilnavost vrstvy.

## 5 Diskuze

Průběh experimentu mě přiměl “v běhu” optimalizovat metodiku přípravy jak modelových vzorků, tak kolagenové vrstvy, a rovněž správné nastavení a rozměry použitých zařízení. První dvě měření nepřinesla výsledky, které by mohly vést k očekávaným výstupům a dokázaly by naplnit zadané cíle projektu. Při úvodní mechanické zkoušce se hlavním problémem ukázala vhodnost návrhu kolagenové vrstvy přidělané na titanový terčík. Ta sice z hlediska adheze projevila velmi dobré vlastnosti, protože přilnavost k podkladu u všech skupin vzorků nebyla narušena, nicméně naměřené výsledky mi nemohly povědět nic o vlivu různých chemických úprav povrchu na velikost adheze. Také z hlediska jejich vzájemného porovnání jsem se nikam neposunul. Přestože jsem došel ke zjištění, že proces zvlákňování vrstvy a její následné aplikace (impregnace) na substrát se ukázal v metodice zkoušky jako ideální, cíl práce jsem nebyl schopen bez další optimalizace naplnit. Proto se kolagenová vrstva udělala silnější – vícenásobná. Ani druhá odtrhová zkouška nevedla k žádoucím výsledkům. Ukázala však nutnost zaměřit se i na úpravu nástroje a terčíku.

Optimalizace u třetího testu se ukázala být jako nejlepší varianta. Zvětšení průměru protlačovacího trnu a středového otvoru vzorků umožnilo vhodnější rozložení aplikované síly na povlak a nedocházelo k jejich nepřiměřené deformaci. Kolagen-kalcium fosfátové nanovrstvy impregnované na titanový substrát stejným způsobem jako při první zkoušce se velmi dobře oddělily a bylo tedy možné naměřit velikosti maximálních sil potřebných pro přerušování přilnavosti. Podmínky zkoušky se podařilo nastavit.

Množství vzorků bylo limitováno časovými důvody i jejich celkovým počtem. Opakování testů si vyžádalo použití většiny terčíků, především v prvních dvou zkouškách. Pro poslední optimalizovanou zkoušku tedy nezbyl velký počet vzorků, ale i tak bylo možné přejít k analýze naměřených hodnot a vytvořit důležité východisko v otázce ověření vlivu chemických úprav na schopnost adheze.

Získaná data prošla statistickým vyhodnocením, aby se zjistilo, která úprava povrchu vzorku vykazuje nejvyšší známky adheze kompozitního povlaku

---

na titanovém podkladu, a je tím pádem nejvhodnější pro aplikaci na ortopedický implantát. Vyhodnocení výsledků testu neprokázalo statisticky významný rozdíl mezi úpravami povrchu – rozdíl mezi skupinami povrchových úprav není nebo se ho nepodařilo prokázat, třeba z důvodu malého počtu vzorků a s tím souvisejícím vysokým rozptylem hodnot.

## 6 Závěr

Cílem této závěrečné práce bylo analyzovat přilnavost kolagen-hydroxyapatitové nanostrukturované vrstvy, jež by sloužila jako lokální nosič antibiotik, aplikované na titanové modelové vzorky, které prošly různou chemickou úpravou povrchu. Následně vyhodnotit a porovnat výsledky, aby se zjistil vliv těchto uspořádání, případně jaká chemická úprava je nejvhodnější pro ortopedické implantáty ke zlepšení jejich vlastností zejména z hlediska adheze. Také bylo třeba optimalizovat metodiku mechanického testování a metodiku přípravy modelových vzorků z titanové slitiny a kolagenových povlaků.

V teoretické části jsem zaměřil svoji pozornost k vysvětlení motivace pro vývoj funkčních povrchových vrstev implantátu, které by sloužily jako nosiče léčiv účinných v otázce potlačení potencionálních pooperačních komplikací – rozšíření infekce a následnou reakcí v podobě akutního zánětu. Shrnujím materiály užívané pro nosiče ATB s větším důrazem na kolagen a hydroxyapatit, jako hlavní složky testovaného povlaku, a stručně jsem se zmínil o chemicko-fyzikálních úpravách povrchu pro zvýšení přilnavosti a následném mechanickém testování adheze.

Metodika a průběh testování jsou popsány v kapitolách věnovaných experimentální části. Zmiňuji celý proces příprav a nastavování podmínek pro první až třetí měření. Testování se neustále muselo vhodně přizpůsobovat a optimalizovat k maximalizaci úspěchu zkoušky a k odstranění nežádoucích defektů a jevů. Až třetí měření se podařilo úspěšně nastavit.

Hodnocení získaných experimentálních dat proběhla metodou statistického vyhodnocení. V rámci předsevzatých cílů byla tato metoda dostačující k získání kvantitativního hodnocení adheze povlaků na modelových vzorcích a k následnému srovnání.

Podařilo se srovnat různé chemické úpravy povrchu, i když se neprokázalo, že by statisticky významně navýšily adhezi na rozhraní povlaku a substrátu. Dále se podařilo optimalizovat průběh zkoušky tak, že se dá použít pro charakterizaci přilnavosti a v budoucnu by bylo vhodné testy zopakovat

na větším souboru vzorků, případně při aplikaci dalších chemických úprav. Cíle práce byly splněny.



## Seznam literatury

- [1] Osteomyelitis [online]. National Organization for Rare Disorders (NORD) [cit. 18.12.2017]. Dostupné z:  
<https://rarediseases.org/rare-diseases/osteomyelitis/>
- [2] RIBEIRO, M; Monteiro, FJ; Ferraz, MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter* [online]. 2012 Oct 1; 2(4): 176–194 [cit. 20.12.2017]. DOI: 10.4161/biom.22905. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3568104/#R51>
- [3] KURTZ, SM; Röder, C; Ong, K; Lau, E; Widmer, M; Maravic, M; Gomez-Barrena, E; Pina, MF; Manno, V; Geesink, R. International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop* [online]. 2011 Dec; 35(12): 1783–1789 [cit. 5.1.2018]. DOI: 10.1007/s00264-011-1235-5. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224613/>
- [4] DEL POZO, JL; Patel, R. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J med* [online]. 2009 Aug 20; 361(8):787-794 [cit. 5.1.2018]. DOI: 10.1056/NEJMcp0905029. Převzato z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850113/>
- [5] KANELLAKOPOULOU, K; Giamarellos-Bourboulis, EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* [online]. 2000 Jun; 59(6):1223-32 [cit. 6.1.2018]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882159>
- [6] MELICHERČÍK, Pavel; David Jahoda; Ivan Landor; David Pokorný; Tobiáš Judl; Antonín Sosna. Lokální nosiče antibiotik. *Ortopedie (Praha)* [online]. 2011, roč. 5, č. 4, s. 187-193 [cit. 5.1.2018]. ISSN: 1802-1727. Dostupné z:  
<http://kramerius.medvik.cz/search/pdf/web/viewer.html?pid=uuid:d52ab4da-69cb-11e3-93fe-d485646517a0>
- [7] WOLFOVÁ, Lucie; Lucy Vojtová; Lucie Jurečková; Lenka Kohoutová; ed. Úvod do tkáňového inženýrství. 1. Brno: MediaBros, 2015. ISBN 978-80-260-9720-4.

- [8] STEVENS, MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2008, 11(5), 18-25. DOI: 10.1016/S1369-7021(08)70086-5 [cit. 12.1.2018]. ISSN 13697021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702108700865>
- [9] PETERKOVÁ, Petra; Lubomír Lapčík, Jr. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chem. Listy* 94, 371-379 (2000)
- [10] FAN, D; Takawale, A; Lee, J; Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* [online]. 2012 Sep 3;5(1):15 [cit. 12.1.2018]. DOI: 10.1186/1755-1536-5-15. Převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464725/>
- [11] RÝGLOVÁ, Šárka; Martin Braun; Tomáš Suchý. Collagen and Its Modifications – Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromol. Mater. Eng.* 2017, 302, 1600460.
- [12] VILLA, MM; Wang, L; Huang, J; Rowe, DW; Wei, M. Bone tissue engineering with a collagen–hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* [online]. 2015 Feb; 103(2): 243–253 [cit. 13.1.2018]. DOI: 10.1002/jbm.b.33225. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380129/>
- [13] LE GUÉHENNEC, L; Soueidan, A; Layrolle, P; Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* [online]. 2007 Jul;23(7):844-54. Epub 2006 Aug 14 [cit. 18.1.2018]. DOI: 10.1016/j.dental.2006.06.025 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904738>
- [14] CHEN, Z., Zhou, K., Lu, X. et al. A review on the mechanical methods for evaluating coating adhesion. *Acta Mech* (2014) 225: 431. DOI: 10.1007/s00707-013-0979-y.
- [15] PLICHTA, T. Adheze vrstev plazmových polymerů připravených z monomeru tetra vinylsilanu. Brno, 2014. Bakalářská práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. Fakulta Chemická. Ústav Chemie Materiálů.

## Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

Obr. 1 Příčiny vzniku infekce a znázornění bakteriálního biofilmu na povrchu protézy [4] .....	12
Obr. 2 Porovnání vlastností nejčastěji používaných lokálních nosičů ATB [6] .....	15
Obr. 3 Struktura molekuly kolagenu typu I [10] .....	16
Obr. 4 Povrch titanové sloučeniny opracované metodou TPS [13] .....	18
Obr. 5 Povrch titanové sloučeniny opracované tryskáním (keramické abrazivum) [13] .....	19
Obr. 6 Schéma blister testu – standardní (a), verze s razníkem (b) [14] .....	21
Obr. 7 Vzorky “PBS” připravené na aplikaci kolagenové vrstvy .....	24
Obr. 8 Postupný elektrostatický povrch vzorků .....	25
Obr. 9 (vlevo) Impregnace kolagenovým roztokem, (vpravo) kruhové vzorky kolagenové vrstvy .....	26
Obr. 10 (vlevo) Testovací systém MTS 858.2 Mini Bionix, (vpravo) speciální zařízení na uchycení titanových vzorků a protlačovací trn .....	28
Obr. 11 Schéma mechanického testování kolagen-hydroxyapatit nanovrstvy pomocí blister testu .....	29
Obr. 12 Skupina titanových vzorků s povlakem připravená k testování.....	30
Obr. 13 Protlačovací trn zaseknutý v testovacím preparátu.....	30
Obr. 14 Skupina modelových vzorků “0” s viditelným protrhnutím vrstev.....	32
Obr. 15 Skupina modelových vzorků “PBS” s protrhnutím vrstev .....	32
Obr. 16 Ukázka odloupení vrstev po odtrhovém testu.....	33
Obr. 17 Krabicový graf stanovených hodnot maximální síly při odtržení vrstvy před vyloučením extrémních odchylek.....	34
Obr. 18 Krabicový graf stanovených hodnot maximální síly při odtržení vrstvy po vyloučení extrémních odchylek.....	35

### Seznam tabulek

Tab. 1 Naměřené maximální hodnoty síly $F_{\max}$ [N] při delaminaci kolagenové vrstvy.....	34
--	----

Tab. 2 Výsledné hodnoty maximální síly působící při odtržení z různě upravených povrchů .....	35
Tab. 3 Výsledky Student-Newman-Keulsova testu vícenásobného.....	35
Tab. 4 Výsledky Kruskal-Wallisova testu s Bonferoniho korekcí.....	36