

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
STROJNÍ**



**DISERTAČNÍ  
PRÁCE**

**2018**

**ZDENĚK  
TOLDE**

## **Anotace**

Jméno autora: Ing. Zdeněk Tode

Název disertační práce: Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Rozsah: stran, obrázků, tabulek, příloh

Škola, Ústav: České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav materiálu

Školitel: prof. RNDr. Petr Špatenka, CSc.

Klíčová slova: oxidické vrstvy, lékařské implantáty, Ti39Nb

## Annotation

Name of author: Ing. Zdeněk Tolde

Title of Ph.D. thesis: Oxide layer on the titanium alloys for medical applications

Range: pages, figures, tables, annexes

University, department: Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Material

Supervisor: prof. RNDr. Petr Špatenka, CSc.

Key words: oxide layers, medical implants, Ti39Nb

## Poděkování

Rád bych poděkoval svým kolegům a všem ostatním, se kterými jsem spolupracoval při řešení otázek disertační práce.

Chci poděkovat prof. RNDr. Petru Špatenkovi CSc., za cenné rady a vedení jak v průběhu mého doktorského studia, tak i při zpracování této práce. Vážím si vstřícnosti, podpory a také možností podílet se na výzkumných projektech.

Můj velký dík patří v neposlední řadě také doc. RNDr. Vladimíru Starému CSc. za četné metodické rady, připomínky, podporu a motivaci jak při experimentech, tak při zpracování výsledků. Velmi si vážím jeho odbornosti, ochoty, lidského a korektního jednání.

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2. LÉKAŘSKÉ IMPLANTÁTY</b>	<b>10</b>
2.1 <b>Obecný přehled</b>	<b>10</b>
2.1.1 <b>Mechanické vlastnosti a složení jednotlivých kostí</b>	<b>14</b>
2.2 <b>Pevné implantáty kostí (srůstající), dlahy, šrouby</b>	<b>17</b>
2.2.1 <b>Používaný materiál</b>	<b>17</b>
2.3 <b>Kluzné implantáty</b>	<b>21</b>
2.3.1 <b>Používaný materiál</b>	<b>22</b>
<b>Kluzné a třecí vlastnosti vybraných soustav</b>	<b>26</b>
<b>3. KOROZE A OXIDACE</b>	<b>29</b>
3.1 <b>Koroze stručný přehled</b>	<b>32</b>
3.1.1 <b>Koroze titanu a jeho slitiny</b>	<b>33</b>
3.2 <b>Oxidické vrstvy na titanových slitinách</b>	<b>33</b>
3.2.1 <b>Technologie přípravy titanových oxidických vrstev</b>	<b>34</b>
3.3 <b>Metody přípravy oxidických vrstev pro implantáty</b>	<b>35</b>
3.3.1 <b>Anodická oxidace</b>	<b>36</b>
3.3.2 <b>Termická oxidace</b>	<b>39</b>
3.3.3 <b>PVD příprava oxidické vrstvy</b>	<b>41</b>
3.3.4 <b>Další metody přípravy oxidických vrstev TiO<sub>2</sub></b>	<b>42</b>
3.4 <b>Oxidické vrstvy na titan-niobových (Ti39Nb) slitinách</b>	<b>44</b>
3.4.1 <b>Pourbaixův diagram pro Ti a Nb</b>	<b>45</b>
<b>4. METODY HODNOCENÍ OXIDACE POVRCHU</b>	<b>48</b>
4.1 <b>Vlastnosti povrchu kostních implantátů</b>	<b>48</b>
4.2 <b>Povrchová drsnost</b>	<b>48</b>
4.3 <b>Povrchová energie</b>	<b>49</b>

<b>5. BIOLOGICKÉ TESTY</b>	<b>50</b>
<b>6. CÍLE PRÁCE</b>	<b>53</b>
<b>7. EXPERIMENT</b>	<b>54</b>
7.1 Použité materiály	54
7.2 Příprava vzorků	54
7.3 Popis nejvýznamnějších použitých měřících zařízení	56
7.3.1 Elektronová mikroskopie	56
7.3.2 Tribometr	56
7.3.3 XPS	57
7.3.4 Ramanovo spektroskopie	57
7.3.5 AFM	58
7.3.6 Scratch test plus calotest	58
7.3.7 Nanoindentace	58
7.3.8 Měření drsnosti povrchu	59
<b>8. VÝSLEDKY, MECHANICKÉ VLASTNOSTI</b>	<b>60</b>
8.1 Příprava povrchu pomocí anodické oxidace	60
8.1.1 Anodická oxidace a nanostrukturování povrchu	61
8.2 Příprava povrchu termickou oxidací	65
8.2.1 Termická oxidace titanových slitin	66
8.3 Povrchové a strukturní vlastnosti povlaku	72
8.3.1 Proces nanášení povlaku Ti39Nb	73
8.3.2 X-ray difrakce	77
8.3.3 SEM a AFM povrchu Ti39Nb vrstvy	78
8.3.4 Drsnost povrchu povlaku a substrátu	80
8.4 Tribologické testy a mechanické vlastnosti oxidických vrstev	82
8.5 Biologické testy	87
<b>9. ZÁVĚR, CELKOVÁ DISKUSE</b>	<b>91</b>

*Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

9.1	Možnosti a vývoj do budoucna .....	93
10.	POUŽITÁ LITERATURA .....	94
11.	PŘÍLOHY .....	108
11.1	XPS spektra pro jednotlivé povlaky TiNb .....	108
11.2	Nejvýznamnější publikace autora se vztahem k disertační práci .....	111
	SEZNAM PUBLIKACÍ A JINÝCH VÝSTUPŮ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE	103
	Ostatní publikace a významnější výstupy .....	104
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	106
	SEZNAM TABULEK .....	107

# 1. Úvod

Tuto disertační práci píší na základě pěti publikací a jedné kapitoly v knize, které vyšly nebo vyjdou v impaktovaných časopisech, jejichž jsem buď prvním autorem či spoluautorem. Je založena na spolupráci mezi obory přírodních věd - chemie, fyziky a biologie. To z ní činí mezioborovou práci, která zahrnuje popis přípravy vzorků, otestování jejich fyzikálně chemických vlastností a záznam samotných biologických testů in vitro.

Titanové slitiny jsou díky svým vlastnostem, mezi které patří vysoká měrná pevnost, korozní odolnost a biokompatibilita, důležitými materiály v oblasti bioaplikací. Titanová  $\beta$  slitina TiNb (konkrétně se jedná o slitinu Ti39Nb (wt%), která je vhodná pro budoucí využití pro výrobu kostních implantátů), vykazuje nízký modul pružnosti ( $E = 60$  GPa) v porovnání například s klasickými korozivzdornými oceli AISI 316L ( $E = 200$  GPa) nebo titanovou  $\alpha + \beta$  slitinou Ti6Al4V ( $E = 115$  GPa), jenž jsou v současnosti nejpoužívanějšími materiály pro výrobu kostních a kloubních implantátů [1]. Modul pružnosti je důležitou materiálovou charakteristikou a cílem je dosažení co největší podobnosti s modulem pružnosti lidské kosti ( $E = 10\sim 30$  GPa), aby docházelo k přirozenému rozložení napětí mezi kostí a implantátem při zatěžování [2]. Při použití materiálů implantátu s vysokým modulem pružnosti přebírá tento implantát napětí při pohybu a okolní kost není namáhána, čím dochází k uvolňování implantátu.

Titan a jeho slitiny jsou schopné na svém povrchu vytvářet tenkou oxidickou vrstvu složenou s oxidů základního kovu (u slitiny TiNb se jedná především o oxid titaničitý  $TiO_2$  a oxid niobičný  $Nb_2O_5$ ), které chrání základní materiál před korozí. Této vlastnosti je využíváno při modifikaci povrchů titanových slitin metodou anodické oxidace, kdy jsme schopni vhodnými podmínkami procesu upravovat vlastnosti oxidické vrstvy (krystalická struktura, tloušťka, nanostruktura povrchu) dle pracovních požadavků na



konkrétní materiál. Jedním z důležitých parametrů oxidické vrstvy je její morfologie (nanopórovitost). Studiemi byla prokázána lepší adheze buněk na povrchu materiálu, který vykazoval porézní strukturu oxidické vrstvy. Nanopórézní struktura může sloužit i jako šablona pro ukládání léčiv a tím může výrazně urychlit proces vhojení implantátu do lidského těla.

Tato práce se zabývá přípravou a modifikací povrchu materiálu titan-niobové slitiny, které by sloužily k lepšímu zakotvení implantátů do kostní tkáně. Velmi slibnými úpravami je nanášení oxidických vrstev na materiál, jehož mechanické vlastnosti umožňují vtělení do kosti. Oxidické vrstvy mohou být nanášeny několika způsoby a výsledný efekt se může ve finále lišit, jak ve strukturálním složení tak i v morfologii povrchu. Tyto odlišnosti mají pak zásadní význam pro finální využití materiálu v implantologii.

## **2. Lékařské implantáty**

### **2.1 Obecný přehled**

V oblasti lékařských implantátů vznikají nově materiály se zcela odlišnými fyzikálními vlastnostmi (např. slitiny kovů, povrchové vrstvy, nanomateriály) určené zejména pro zdravotnictví a biotechnologie. Vývoj, vznik nových metod a postupů k vyjádření vztahu mezi povrchem neživého materiálu a buněčnou populací [3] řeší norma ISO 10993, která popisuje obecné principy biologického hodnocení zdravotnických prostředků v rámci procesu řízení, řazení zdravotnických prostředků do kategorií podle povahy a doby trvání jejich styku s tělem, hodnocení existujících důležitých dat ze všech zdrojů, stanovení dalších souborů dat nezbytných k analýze biologické bezpečnosti zdravotnického prostředku posouzení biologické bezpečnosti zdravotnického prostředku. [4]

Biomateriálové inženýrství se zajímá především o vzájemnou reakci mezi lidským organismem a implantátem. Pozoruje reakci v těsné blízkosti

## *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

organismu, zdali je zanícený nebo naopak se dobře hojí. A u materiálů se zkoumá především opotřebení, koroze, degradace, únava a lom. [5]

**Biomateriál** je materiál nahrazující části živé tkáně, tudíž je v kontaktu s jinými částmi této tkáně. Biomateriál interaguje s biologickým systémem.

**Biokompatibilita** je akceptování implantátu okolní tkání a celým tělem. Implantát by měl být kompatibilní s tkání po mechanické, chemické, povrchové a farmaceutické stránce. Příkladem jsou polymerní, kovové, keramické či kompozitní materiály, které lze vhodnou výrobou připravit do stavu s požadovanými vlastnostmi [6].

Z hlediska biologické tolerance lze rozčlenit biokompatibilní materiály do následujících kategorií [7]:

a) **materiál biotolerantní** - obecnou charakteristikou je tolerance materiálu z pohledu živé tkáně. Například při vhojování implantátů z biotolerantního materiálu dochází k distanční osteogenezi (postupný proces hojení kosti směrem dovnitř od hrany kostního lože ve směru k povrchu implantátu. Kost se nevytváří bezprostředně na povrchu implantátu). Významným problémem biotolerantních kovů je hlavně koroze, kdy v případě implantačního materiálu dochází vlivem elektrochemické interakce k povrchové dezintegraci. Ionty materiálů získávají volnost pro přechod do tkáně, kde mohou negativně působit (a to toxicky, iritačně, senzibilizačně a je možná i prostupnost do vzdálenějších tkání-vznik metalózy).

b) **materiál bioinertní** - jedná se o biologicky neaktivní materiál, který je tkání plně akceptovaný. Oproti biotolerantním se bioinertní materiály vhojují bez vzniku vazivové vrstvy. To znamená, že nedochází k osteogenezi distanční, ale ke kontaktní osteogenezi nazývané rovněž oseointegrace (přímá migrace vazebných buněk skrz krevní matrix k povrchu implantátu. Kost se rychle formuje bezprostředně na povrchu implantátu).

c) **materiál bioaktivní** - definovaný jako biologicky reaktivní materiál, vyvíjen ve snaze dosáhnout vyšší biokompatibility zejména u aloplastických materiálů. V případě implantace do kostí se z kosti samotné uvolňují především kalciové a fosfátové ionty. Tento proces nazýváme termínem vazební osteogeneze neboli biointegrace. Pro doplnění a přehlednost rozdělení materiálů zde jen

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

vyjmenujme nejčastěji používané: hydroxyapatitová keramika, bioaktivní sklokeramika. [7].

**Biodegradabilní materiál** se po určitém časovém úseku rozkládá v organismu a ustupuje tak nově vzniklé tkáni. Slouží jako dočasná náhrada chybějící tkáně.

Z uvedeného vyplývá řada požadavků na vlastnosti pro materiál implantátů po obecné stránce uvedené v Tabulka 1. Konkrétní používané biomateriály jsou pak uvedeny v Tabulka 2.

Tabulka 1: Rozdělení a požadované vlastnosti materiálu pro implantáty [8]

Faktory	Popis		
	Chemické/biologické vlastnosti	Fyzikální vlastnosti	Mechanické/strukturní vlastnosti
1. Úroveň materiálových vlastností	Chemické složení (objem a povrch)	Hustota	Modul pružnosti
			Pevnost ve stříhu
			Mez kluzu
			Mez pevnosti v tahu
			Mez pevnosti v tlaku
2. Úroveň materiálových vlastností	Adheze	Povrchová topografie (textura a drsnost)	Tvrдость
			Odolnost proti otěru a tření
			Lomová houževnatost
			Modul pružnosti v ohybu
			Pevnost v ohybu
Specifické funkční požadavky (založené na aplikaci)	Biofunkčnost (netrombogenní, buněčná adheze atd.)	Struktura (masivní, porézní, povlaky, filmy, vlákna, tkanina, prášek)	Tuhost a nepoddajnost
			Únavová pevnost
			Odolnost proti creepu
	Bioinertnost (netoxicity,	Geometrie	Modul pružnosti ve stříhu

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

	nedráždivost, nealergičnost, nekarcigennost atd.)	Koef. teplotní roztlačnosti Elektrická vodivost	Adhezní pevnost
	Biostabilita (odolnost proti korozi, hydrolýze, oxidaci atd.)	Barva a estetičnost	Vrubová houževnatost
		Index lomu	
	Bioaktivita	Průsvitnost nebo neprůhlednos t	Odolnost proti abrazi
Biogradace			
Výroba a zpracování	Reprodukovatelnost, kvalita, sterilizace, balení, sekundární zpracovatelnost		
Charakteristika pacienta: tkáň, orgán, druh, věk, pohlaví, rasa, zdravotní stav, aktivita, systémové reakce			
Medicínské/chirurgické procedury, perioda aplikace/použití			
Cena			

Tabulka 2: Rozdělení implantátů dle materiálu [9]

Rozdělení biomateriálů	
Materiály	Hlavní použití
<b>Kovy a slitiny</b>	
316L Nerezová ocel	Fixace zlomenin, stenty, chirurgické nástroje
CP-Ti, Ti-Al-V, Ti-Al-Nb, Ti- 13Nb-13Zr, Ti-Mo-Zr-Fe	Kostní a kloubní náhrady, fixace zlomenin, dentální implantáty, srdeční stimulatory
Co-Cr-Mo, Cr-Ni-Cr-Mo	Kostní a kloubní náhrady, dentální implantáty, dentální náhrady, srdeční chlopně
Ni-Ti	Kostní štítky, stenty, ortodontická vedení
Slitiny zlata	Dentální náhrady
Produkty stříbra	Antibakteriální látky
Amalgámy Hg-Ag-Sn	Zubní náhrady
<b>Keramika a sklo</b>	
Oxid Titaničitý	Kloubní náhrady a dentální implantáty
Oxid Hlinitý	Kloubní náhrady a dentální implantáty
Oxid Zirkoničitý	Kloubní náhrady
Fosforečnan vápenatý	Kostní opravy a rozšíření, krycí povlaky na kovech

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Bioaktivní sklo	Kostní náhrady
Porcelán	Zubní náhrady
Uhlík	Srdeční chlopně, dentální implantáty, perkutánní
<b>Polymery</b>	
Polyethelyn	Kloubní náhrady
Polypropylen	Sutury (šití)
PET	Cévní protézy, stehy
Polyamidy	Stehy
PTFE	Cévní protézy, rozšíření měkké tkáně
Polyester	Cévní protézy, systémy na doručování léků
Polyuretany	Zařízení, která jsou v kontaktu s krví
PVC	Trubičky, dutiny
PMMA	Dentální náhrady, nitrooční čočky, kloubní náhrady (kostní pojivo)
Silikony	Náhrady měkké tkáně, oční lékařství
Hydrogely	Oční lékařství, systémy na doručení léčiv
<b>Kompozity</b>	
BIS-GMA- Křemenné / Křemičité výplně	Dentální náhrady
PMMA – Skleněné výplně	Dentální náhrady (dentální pojiva)

### 2.1.1 Mechanické vlastnosti a složení jednotlivých kostí

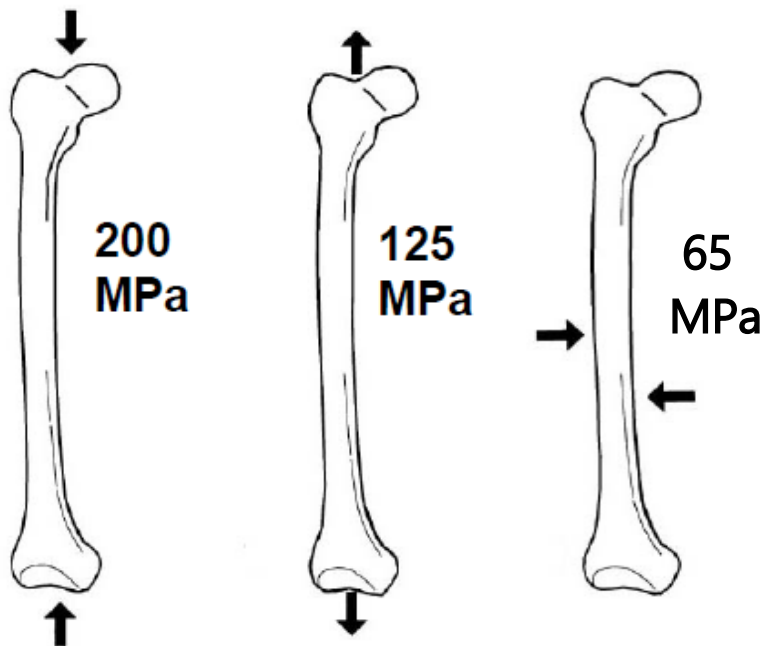
Kostra (skeleton) tvoří pevnou a pohyblivou oporu těla. Spolu se soustavou spojů tvoří pasivní pohybový aparát (aktivní pohybový systém představuje svalstvo). Kosterní soustava tvoří také ochranná pouzdra pro důležité orgány jako je mozek, smyslové orgány, srdce, plíce a další. Kosterní systém má rovněž důležitou funkci jako depozitum minerálních látek - červená kostní dřeň je krvetvorným orgánem, tukové buňky žluté kostní dřeně jsou významným energetickým zdrojem. [10]

Kostra člověka je složena z 202 kostí, u dospělého člověka váží asi 12 až 14 kg, tj. asi 16% váhy těla. [10]

## Mechanické vlastnosti kosti

Tabulka 3: Mechanické vlastnosti kosti v závislosti na poloze [11]

	Mez pevnosti v tahu [MPa]	Maximální deformace [%]	Elastický modul $10^4$ [MPa]
Femur	124	1,41	1,76
Tibia	143	1,50	1,18
Fibula	149	1,59	1,89
Humerus	125	1,43	1,75
Radius	152	1,50	1,89
Ulna	151	1,49	1,88



Obrázek 1: Mechanické vlastnosti (tah, tlak, stříh) kosti v závislosti na druhu namáhání

## Chemické složení kosti

Kostní tkáň je z jedné třetiny tvořena organickými látkami a ze dvou třetin látkami anorganickými. [12]

### Organické látky

- kolagen I. typu – 90% všech organických sloučenin kosti, tvořen trojitou šroubovicí ze

## *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

tří  $\alpha$ -helixů s příčnými můstky, celý komplex dotvářen extracelulárně

- osteokalcin – je produkován osteoblasty, jeho zvýšená přítomnost v krvi signalizuje vyšší metabolický obrat kosti
- osteonektin, proteoglykany, sialoproteiny – přesná funkce těchto proteinů není doposud známa

## Anorganické látky

- 85 % - krystaly fosforečnanu vápenatého ve formě krystalů hydroxyapatitu  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
- 10 % uhličitan vápenatý
- 0,3 % - fluorid vápenatý
- 1 % - fosforečnan hořečnatý

## Hojení kostních defektů

Osteosyntéza je operační léčba zlomenin jejich stabilizací spojením kostních fragmentů kovovými implantáty, jako jsou dlahy, šrouby, dráty hřeby a nebo zevní fixatéry. Kostní fragmenty jsou znehybněny tak, že je umožněn pohyb přilehlých kloubů za současného zamezení působení pohybu svalů na vychýlení úlomků. Používá se zpravidla pro fixaci komplikovaných zlomenin nebo u zlomenin, kde došlo k fraktuře na více namáhaném místě (zlomenina kosti stehenní pod krčkem apod.) [13]

- Zevní fixace – mimotělní montáž. Požívají se Schanzovy šrouby, Steinmannovy hřeby nebo Kirschnerovy dráty (K-dráty). Zavádí se do kosti z vnějšku skrz kůži (perkutánně) nebo z malých naříznutí a ze zevní konstrukce.
- Vnitřní fixace - operační přístup, implantát je krytý měkkými tkáněmi nebo uložen v kosti, (minidlahy, fixační šrouby) [14]

## **2.2 Pevné implantáty kostí (srůstající), dlahy, šrouby**

Tato kapitola se zabývá implantáty, které používáme jako náhradu, oporu či element pro spojování kostí, pro jednoduchost jsem je nazval kostní implantáty, které jsou trvalou náhradou kosti (endoprotézy).

Osteointegrace je složitý a dlouhodobý proces, který je ovlivňován řadou faktorů. Jedním ze způsobů, jak osteointegraci urychlit je úprava povrchu implantátu vhodnými modifikacemi. Kostní implantát by měl být navržen tak, aby napodoboval strukturu kosti, která je organizovaná v makro a mikro nanostrukturu. Cílem povrchových modifikací je tak dosáhnout podobné nanostruktury kosti. Posledních 50 let byly v implantologii používány implantáty s hladkým mechanicky opracovaným povrchem. Další modifikace povrchu implantátů byly zavedeny hlavně k podpoře osteointegrace, urychlení růstu a stabilní tvorby kosti.

### **2.2.1 Používaný materiál**

#### **Kovové implantáty**

##### **Korozivzdorná ocel**

Austenitické oceli se tvářením zpevňují velmi rychle, a proto nemohou být tvářeny za studena bez mezioperačního tepelného zpracování. Tepelné zpracování by však nemělo indukovat tvorbu karbidu  $\text{Cr}_{23}\text{C}_6$  na hranicích zrn, což způsobuje mezikrystalovou korozi. Při tepelném zpracování se může též objevit deformace komponent, které však může být snadno řízeno rovnoměrností ohřevu. Jiným nežádoucím efektem tepelného zpracování je tvorba oxidických šupin, které musí být odstraňovány buď chemicky (kyselina) nebo mechanicky (pískováním) [15]. Používá se stále pro zevní fixátory jako ekonomicky výhodný materiál.

##### **Slitiny na bázi Co**

Tyto materiály jsou v implantologii zastoupeny v kobalt-chromovým slitinám. Jsou obvykle dvojího typu: slitiny CoCrMo (F76), obvykle používané v litém stavu, a slitiny kované, které slouží také k výrobě dřívků umělých částí



## *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

pro náhradu poškozených kloubů jako koleno a kyčel, a jsou desítky let používány také dentisty. Pro chirurgické implantátové aplikace jsou doporučovány následující kované slitiny CoCrMnNi (F90), CoNiCrMo (F562) a CoNiCrMoWFe (F563). V současnosti pouze dvě z těchto slitin jsou při zhotovování implantátů široce používány litá CoCrMo a kovaná CoNiCrMo.

Výbornými vlastnostmi se projevuje další slitina MP 35N (CoNiCrMo – 35 % Co, 35 % Ni). Je korozi vzdorná za napětí vůči mořské vodě, obtíže se objevují při zpracování za studena. Mo je přidáván k zjemnění zrna. Co slitiny jsou náchylné ke zpevňování při tváření [15]

## **Titan a jeho slitiny**

Právě titan je považován za nejvhodnější materiál pro kostní inženýrství. Existuje pro to několik důvodů. Jsou to zejména jeho mechanické vlastnosti, chemická stabilita a biokompatibilita.

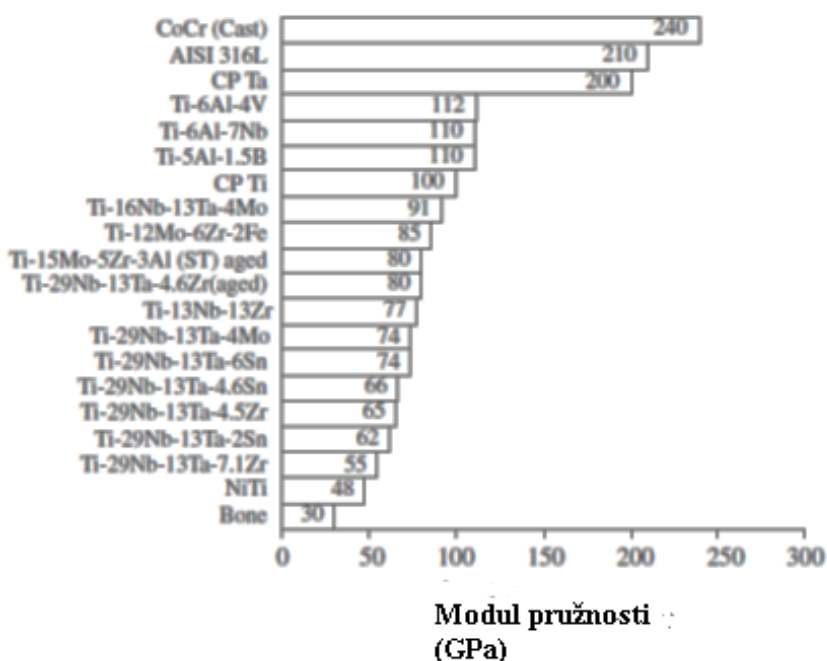
Titan a jeho slitiny dělíme dle typu krystalické mřížky. CP titan (commercially pure – nelegovaný) a slitiny  $\alpha$  disponují hexagonální krystalovou mřížkou. Nad teplotou alotropické přeměny (882 °C) dochází k transformaci z hexagonální (HCP) na kubickou prostorově středěnou mřížku (BCC), která je typická pro krystalickou strukturu  $\beta$  titanových slitin. Dále se vyskytují slitiny titan- $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$  a metastabilní  $\beta$ . Na fázové složení v titanových slitinách má vliv především druh a obsah legujících a intersticiálních prvků, které ovlivňují výši teploty alotropické transformace.

Tyto prvky lze rozdělit do čtyř skupin na  $\alpha$  stabilizátory (Al, O, N, C),  $\beta$  stabilizátory isomorfní (V, Mo, Nb, Ta),  $\beta$  stabilizátory eutektoidní (Fe, Mn, Cr, Ni, Cu, Si, H) a neutrální (Zr, Sn). Prvky stabilizující fázi  $\alpha$  zvyšují transformační teplotu, a tím rozšiřují oblast  $\alpha$ . Naopak  $\beta$  stabilizátory transformační teplotu snižují a dochází k rozšíření oblasti  $\beta$ , jak je patrné z fázových diagramů. Prvky, jako je Fe, Cu, Ni, Si, a B, jsou často přidávány do slitin pro zjemnění zrna, zlepšení mechanických a chemických vlastností [2; 1].

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Pokud titanová slitina obsahuje 10 - 15%  $\beta$  stabilizátorů, při pokojové teplotě se struktura slitiny nachází v metastabilním stavu. Tyto slitiny označujeme jako metastabilní  $\beta$ . Dle fázového diagramu (Obrázek 3) jsou tyto slitiny tvořené buď nestabilní fází  $\beta'$  a fází  $\omega$ , která vzniká rozpadem nestabilní fáze  $\beta'$ , nebo při vyšších koncentracích  $\beta$  stabilizátorů nestabilní fází  $\beta'$  a stabilní  $\beta$  [2; 1].

S rostoucím podílem  $\beta$  fáze ve slitině se zvyšuje pevnost slitin při pokojové teplotě. Díky jejich nízkému modulu pružnosti v tahu, výborné korozní odolnosti a možnosti tepelného zpracování se jedná o slitiny s největším potenciálem ze všech titanových slitin [2; 1]



Obrázek 2: Přehled modulů pružnosti slitin pro biomateriály [16]

Metastabilní a stabilní slitiny  $\beta$  tvoří nejuniverzálnější skupinu ze všech titanových materiálů. Disponují širokým množstvím variant zpracování, dosažené mikrostruktury a mechanických vlastností. [17; 18].

Z hlediska použití v medicíně jsou  $\beta$  slitiny zajímavé především chemickým složením, výbornou korozní odolností a nízkým modulem pružnosti

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

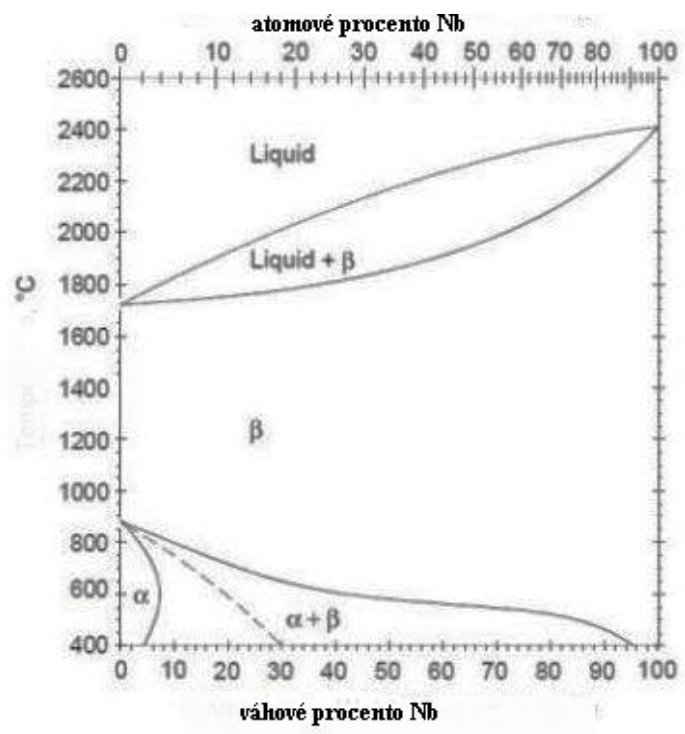
v tahu a tvažitelností za studena [19] ve srovnání s ostatními dosud používanými materiály pro implantáty.

Současným trendem je snaha nahrazovat potenciálně toxické prvky hliník a vanad jinými prvky, jako je niob, tantal, hafnium a zirkonium. Tyto prvky s živou tkání nereagují na rozdíl od již zmíněného hliníku a vanadu [17; 18].

Pro aplikaci slitiny jako kloubní a kostní implantát je důležité, aby hodnota modulu pružnosti v tahu slitiny byla co nejbližší hodnotě lidské kosti, a zamezilo se tak nepříznivému rozložení napětí. Nejnižší hodnoty modulů pružnosti v tahu byly zaznamenány po stárnutí při pokojové teplotě u slitin Ti-Nb s vyššími obsahy legujících prvků, neboť zde dochází ke zpomalení či přímo potlačení vyloučení fáze  $\omega$  (přechodná fáze s hexagonální mřížkou), která má za následek zvýšení modulu pružnosti v tahu E. Přísadou cínu výsledná slitina vykazovala modul pružnosti 40 GPa [20].

Obrázek 2 nabízí přehled modulů pružnosti nejpoužívanějších biomateriálů pro výrobu kloubních a kostních náhrad [1]. Pro představu je v posledním řádku tabulky uveden i modul pružnosti lidské kosti.

Mechanické vlastnosti těchto slitin jsou ovlivněny především výskytem nestabilních a martenzitických fází, které závisí na koncentraci  $\beta$  stabilizujících prvků a rychlosti ochlazování slitiny při tepelném zpracování. Na Obrázek 3 je zobrazen fázový



Obrázek 3: Fázový diagram Ti-Nb slitiny [104]

diagram, typický pro slitiny Ti-Nb [21].

Pevné implantáty urychlují tvorbu kostní tkáně na povrchu implantátu a výrazně zkracují dobu hojení a tím i celý proces ošetření.

V některých případech je možné implantáty zatěžovat okamžitě po jejich zavedení. Tento přínos potvrzují klinické testy uveřejněné v řadě odborných publikací. Například u zubních implantátů se uvádí 98,8% úspěšnost vhojení implantátu [22].

### **2.3 Kluzné implantáty**

V předchozí kapitole jsou popsány implantáty, které slouží jako opora kostry, v této kapitole pojednávám o implantátech sloužících jako kluzná plocha např. kloubní spoje. Tyto implantáty mají specifické požadavky na vlastnosti jako je otěr či koeficient tření.

Otěr můžeme definovat jako progresivní úbytek materiálu spojený s uvolňováním otěrových částic v důsledku vzájemného pohybu dvou protilehlých ploch za působení tlaku. Třecí prvky společně s vrstvou maziva a okolním prostředím vytvářejí tribologickou soustavu. Procesy probíhající v této soustavě mohou být rozděleny na procesy kontaktní, procesy tření, procesy opotřebení a procesy mazání. Všechny tyto procesy jsou determinovány provozními podmínkami, jako jsou např. druh pohybu, rychlost, zatížení a teplota a vedou ke změnám struktury a funkce tribologické soustavy. Ty mohou za určitých podmínek způsobit vznik některého z mezních stavů, mezi které patří například nadměrné tření nebo opotřebení [23].

Kloubní implantáty jsou dennodenně vystavovány vysokému zatížení. Přesto má umělý kloub stabilně fungovat po mnoho let. Snížení otěru na kontaktních plochách implantátu hraje u umělého kolenního kloubu důležitou roli, protože otěr materiálu může vést k předčasnému

opotřebení příslušných komponentů a představuje nejčastější příčinu výměny protézy, a zároveň produkty opotřebení se mohou usazovat v okolních tkáních a organech.

Endoprotézy můžeme rozdělit na totální a částečné. Totální endoprotéza nahrazuje obě dotykové části kloubu, zatímco částečná endoprotéza nahrazuje povrch jenom jeden.

### **2.3.1 Používaný materiál**

Párování materiálů (čili kontakt dvou třených materiálů) rozdělujeme do dvou základních skupin. Tzv. párování hard-on-hard, tedy párování dvou tvrdých povrchů (keramika-keramika nebo kov-kov). A tzv. párování hard-on-soft, tedy párování tvrdého a měkčího povrchu (keramika-UHMWPE nebo kov-UHMWPE). Podle dostupných informací ve většině zemí převažuje párování hard-on-soft [24]

#### **UHMWPE**

Pro vysokomolekulární polyethylen se používá zkratka UHMWPE se odvozuje z anglického názvu „Ultra High Molecular Weight Polyethylene“. Tento typ polyethylenu používaný pro výrobu kloubních náhrad má výjimečné fyzikálněchemické vlastnosti jako je chemická inertnost, lubricita, stálost a odolnost vůči opotřebení [24].

K výrobě artikulačních komponent kloubních náhrad pomocí konsolidace jsou v současnosti užívány dva typy vysokomolekulárního práškového medicínálního UHMWPE:

1. UHMWPE konsolidovaný z prášku GUR 1020. Jeho molekulová hmotnost je  $4,4 \times 10^6$  g/mol. Je vyráběn buď pomocí „compression molding“ (firma MediTech jej označuje jako Chirulen 1020) nebo pomocí „ram extrusion“ (firma MediTech jej označuje jako Extrulen 1020). Udávaná míra otěru je 49 mm<sup>3</sup>/milión pohybových cyklů

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

2. UHMWPE konsolidovaný z prášku GUR 1050 o mírně vyšší molekulové hmotnosti-  $7,3 \times 10^6$  g/mol. Udávaná míra otěru je mírně nižší – 45 mm<sup>3</sup>/milión pohybových cyklů [25].



Obrázek 4: Poškození UHMWPE jamky náhrady kyčelního kloubu různými mechanismy otěru: a) adhezivní otěr, b) abrazivní otěr, c) otěr z přítomnosti třetího tělesa, d) únavový otěr (delaminace) [24].

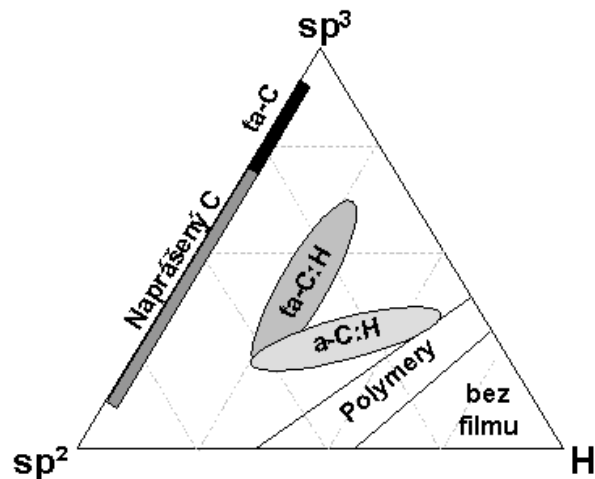
## Keramika

Keramika se používá pro výrobu třecí části náhrad kyčelních, kolenních a jiných kloubů. Kovové hlavice byly nahrazeny hlavicemi keramickými na bázi  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a později  $\text{ZrO}_2$ , které mají výrazně lepší tribologické vlastnosti. Další zajímavou možností je použití  $\text{TaO}_2$  pro korozní a tribologické aplikace [26].

## Kluzné povlaky

Tribologické vlastnosti lze zlepšit i tenkými povlaky nanášenými na základní materiál jedním z nejvýznamnějších z této skupiny je DLC (Diamond Like Carbon).

Povlaky DLC vykazují vysokou tvrdost (více než 70 GPa), jsou chemicky inertní a mají velmi nízký součinitel tření proti oceli a proti sobě samým.



Obrázek 5: Ternární fázový diagram povlaků DLC [27]

Tenké vrstvy DLC jsou tvořené amorfní strukturou složenou hlavně z grafitického či diamantového uhlíku a z vodíku v různých poměrech Obrázek 5. Tyto vrstvy mohou být tvořeny různými postupy, jako je obloukové napařování, iontové nanášení, fyzikální nanášení par (PVD) nebo plazmově obohacené nanášení chemických par (PECVD). Způsob výroby je pravděpodobně to, čím se odlišují povlaky DLC od různých dodavatelů. [27]. K hlavní skupině patří:

- Hydrogenované povlaky DLC (a-C:H): získávají se použitím nosiče C a H, jako je meta nebo acetylen, a jejich rozkladem v plazmě.
- Bezvodíkové povlaky DLC (ta-C a a-C): získávají se použitím grafitového targeťu pro laserovou rozrušení nebo pro obloukové napařování.

Hlavním úkolem kluzných vrstev je vytváření kluzného povrchu. Čistý titan má špatné tribologické vlastnosti, jako je například: vysoký a nestabilní koeficient tření [28], nízká abrazivní a adhezivní odolnost proti opotřebení, nízká tvrdost nebo silný sklon k zadření.

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Lepší vlastnosti pro tribologické použití má oxid TiO<sub>2</sub>, jeho aplikace (s dalšími materiály) ukazuje Tabulka 4. Vytvářejí se proto speciální kluzné vrstvy, které mají nižší tvrdost než běžné otěruvzdorné vrstvy. Do této skupiny patří tzv. „měkké“ vrstvy (např. vrstvy na bázi grafitu), které se aplikují v kombinaci s tvrdými vrstvami na bázi TiN, TiAlN, TiCN

Tabulka 4: Tribologické vlastnosti oxidovaného povrchu titanu a jeho slitin

Tribologické povrchy	Met. oxidace*	Použitá metoda a jednoduchý popis	Koef. tření	Otěr / objem po otěru	Odkaz
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V	AO	Ball-on-flat, Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> kulička Ø 2mm, pracovní prostor 6 mm, čas 30 min.	-	2.1×10 <sup>-5</sup> [m <sup>3</sup> /Nm]	[29]
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V /SiC	AO		-	0.3×10 <sup>-5</sup> [m <sup>3</sup> /Nm]	
UHMWPE/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V na sucho	TO	Pin-on-disk, UHMWPE kulička Ø 2mm, Ra=0.88±0.09 µm, zátěž 90N, čas 6 hod., rychlost otáčení 0.05 m/s	0.17	2.93×10 <sup>6</sup> [m <sup>3</sup> ]	[30]
UHMWPE/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V 25 % wt., Bovine serum			0.05	1.1×10 <sup>6</sup> [m <sup>3</sup> ]	
UHMWPE/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V destilovaná voda			0.1	2.32×10 <sup>6</sup> [m <sup>3</sup> ]	
ZrO <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V	TO	Pin-on-disk, ZrO <sub>2</sub> kulička Ø 6.25 mm, zátěž 3N, čas 1 hod., rychlost otáčení 0.08m/s	0.413	3.77×10 <sup>8</sup> [m <sup>3</sup> ]	[31]
ZrO <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V 25 % wt., Bovine serum			0.197	7.34×10 <sup>7</sup> [m <sup>3</sup> ]	
Ocel 100Cr6/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V	PEO	Pin-on-disk, 100Cr6 kulička Ø 3 mm, Ra=0.85µm, zátěž 2N, dráha 300m, rychlost otáčení 0.075m/s	0.8	1.7×10 <sup>5</sup> [m <sup>3</sup> /Nm]	[32]
Ocel 100Cr6/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V	PBII	Pin-on-disk, 100Cr6 kulička Ø 6 mm, Ra=3.78 nm (AFM), zátěž 0.784 N, čas 1000 s, průměr dráhy 14mm, rychlost otáčení 0.12m/s	0.4	0.39×10 <sup>-6</sup> [m <sup>3</sup> /Nm]	[33]
Ocel 100Cr6/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V	PBII	Pin-on-disk, 100Cr6 kulička Ø 5 mm, Ra=1.54 nm (AFM), zátěž 0.196 N, čas 35	0.7	2.5×10 <sup>-4</sup> [m <sup>3</sup> /Nm]	[34]



## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

		min., průměr dráhy 7 mm, rychlost otáčení 73.3m/s			
WC-Co/TiO <sub>2</sub> Ti6Al4V		Ball-on-plate, WC-Co kulička Ø 10 mm, Ra=1.54 nm (AFM), zátěž 4 N, dráha 1600m, průměr dráhy 10 mm, rychl.ot.0.1m/s	0.9	9.05×10 <sup>6</sup> [ m <sup>3</sup> ]	[35]
Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> Ti		Pin-on-disk, Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> kulička Ø 5 mm, Ra=0.42 mm, zátěž 2 N, čas 1200s., průměr dráhy 10 mm, rychlost otáčení 0.078 m/s	0.26	0.55×10 <sup>-3</sup> [ m <sup>3</sup> /Nm]	[36]
Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> AISI 316L		Pin-on-disk, Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> kulička Ø 6 mm, zátěž 1N, dráha 200m., rychlost ot. 5 cm/s	0,38	0.22×10 <sup>-4</sup> [ m <sup>3</sup> /Nm]	[37]
Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> AISI 316L		Pin-on-disk, Al <sub>2</sub> O <sub>4</sub> kulička Ø 6 mm, zátěž 3N, dráha 200m., rychlost otáčení 5 cm/s	-	0.33×10 <sup>-4</sup> [ m <sup>3</sup> /Nm]	

\* AO – anodická oxidace, TO - termická oxidace, PEO - plasma elektrolitická oxidace, PBII- plasma based ion implantation, TPO - Triode Plasma Oxidation, MS - magnetron sputtering

## Kluzné a třecí vlastnosti vybraných soustav

V Tabulka 5 jsou uvedeny příklady použití materiálů vhodných k implantologii a jejich vlastnosti v rámci tribologických aplikací.

Tabulka 5: Vlastnosti tribologických povrchů pro kloubní náhrady

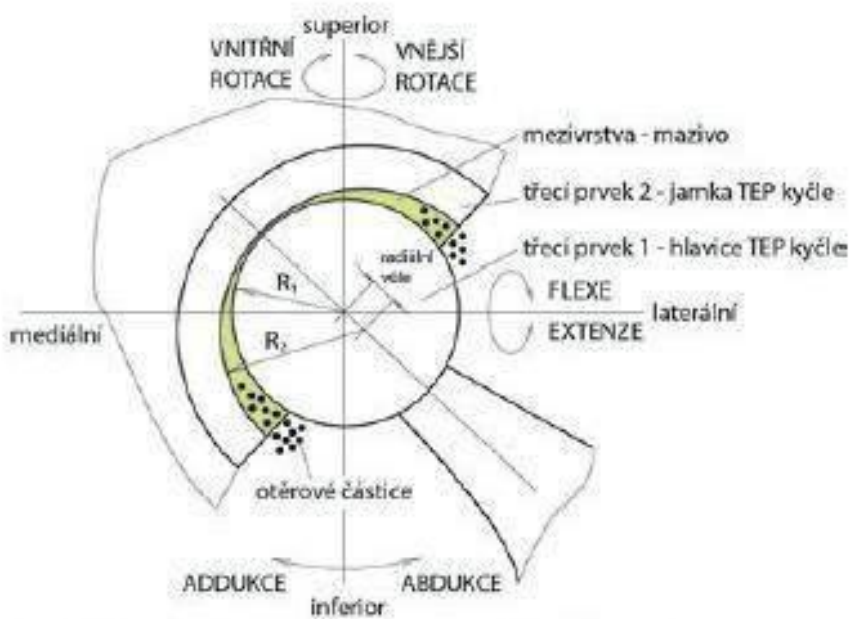
Vzorek, třecí materiály	Použitá metoda a jednoduchý popis	Otěr (mm <sup>3</sup> /Nmm)	Koeficient tření	Literatura
Ta povlak na CoCrMo / kulička polyethylen	Pin-on-disk, F=7 N rychlost otáčení =10 cm s <sup>-1</sup> , počet otáček=25 000, průměr dráhy=5 mm, mazivo= bovine serum	4×10 <sup>-7</sup> až 5×10 <sup>-7</sup>	-	[38]
Ta-Biodur (slitina CoCrMo) / kulička Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Pin-on-disk, F=5 a 7 N, rychlost otáčení =10 cm s <sup>-1</sup> , počet otáček=25 000, průměr dráhy=3, dráha 785 m, mazivo= bovine serum	1.249×10 <sup>-4</sup> až 0.755×10 <sup>-4</sup>	0.24	[39].
Graphit-iC (CrC-C povlak) / kulička 100Cr6 7mm	Pin-on-disk, F=10-80 N, rychlost otáčení =20 cm s <sup>-1</sup> , rychlost otáček 318-477rpm, poloměr dráhy=3, mazivo= bovine serum	3×10 <sup>-7</sup>	0.07 (mazivo) 0.04 (voda)	[40]
Graphit-iC (CrC-C povlak) na ocel / kulička Karbid wolframu 5 mm	Pin-on-disk, F=10-100N, rychlost otáček 318-477rpm, průměr dráhy=3, mazivo= bovine serum	-	0.1-0.06	
DLC na CoCr / kulička 100Cr6 5 mm	Pin-on-disk, F=2N na kov a 10N na povlaky, rychlost otáčení =0.075 m s <sup>-1</sup> , počet otáček 60tis, dráha 750m, mazivo Hanks'	Na sucho 4.6×10 <sup>-8</sup> HBSS 1.2×10 <sup>-8</sup> DLC 1.7×10 <sup>-6</sup> DLC HBSS 6×10 <sup>-7</sup>	Na sucho 0.72 HBSS 0.35 DLC 0.07 DLC HBSS 0.06	[41]

Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

DLC na Ti6Al4V / kulička 100Cr6 $\varnothing$ 5 mm	balanced salt solution (HBSS)	Na sucho $1 \times 10^{-6}$ HBSS $0,8 \times 10^{-6}$ DLC $4 \times 10^{-7}$ DLC HBSS $6 \times 10^{-7}$	Na sucho 0.5 HBSS 0.32 DLC 0.11 DLC HBSS 0.05	
DLC nanesený na UHMWPE / kulička SiC, $\varnothing$ 6 mm)	Pin-on-disk, , F=N, rychlost otáčení = $20 \text{ mm s}^{-1}$ , dráha 189 m, průměr dráhy=3,	$2.75 \times 10^{-7}$	0.02–0.04	[42]
DLC nanesený na Ti / kulička $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\varnothing$ 5 mm	Pin-on-disk, , F=2N, rychlost otáčení = $2 \text{ mm s}^{-1}$ , poloměr dráhy=2,5, počet otáček=10 000, vzdálenost 157 m.	$9.55 \times 10^{-7}$	0.1	[43]
DLC na Ti6Al4V / disk UHMWPE, $\varnothing$ 10 mm)	Test povrch-plocha, Frekvence posuvu 40 Hz na dráze 1 mm, F=200N, vzdálenost 2000m.	Bez povlaku DLC $1.2 \times 10^{-6}$ S povlakem DLC $0.5 \times 10^{-6}$	Bez povlaku DLC 0.181 S povlakem DLC 0.137	[44]
Gradient DLC -Ag nanesený na Ti6Al4V a gradient DLC-Ti nanesený na Ti6Al4V / kulička 100Cr6, $\varnothing$ 6 mm	Pin-on-disk, , F=3 a 7N, rychlost otáčení = $3 \text{ cm s}^{-1}$ , poloměr dráhy=3 mm, počet otáček=300 000,	$10^{-7} - 10^{-8}$	DLC/Ti 3N = 0.107 DLC/Ti 7N = 0.136 DLC/Ag 3N = 0.149	[45]
Cr/DLC na 100Cr6/ kulička 100Cr6, $\varnothing$ 10 mm	Pin-on-disk, , F=10N, rychlost otáčení = $5 \text{ cm s}^{-1}$ , poloměr dráhy=2,5, počet otáček=150 000,	$1.2 \times 10^{-8} - 2.5 \times 10^{-7}$	0.05–0.15	[46].

TiN / UHMWPE	Pin-on-disk, , F=67.5N, rychlost otáčení =4.6 cm s <sup>-1</sup> , poloměr dráhy=2,5, počet dráha=1000m, mazivo HBSS (Hanks' balanced salt solution) a HBSS + BSA (bovine serum albumin)	HBSS 7.8×10 <sup>-4</sup>	HBSS 0.35	[47].
Ti39NbN / UHMWPE		HBSS + BSA 1.2×10 <sup>-4</sup>	HBSS + BSA 0.23	
TiCN / UHMWPE		HBSS 9.7×10 <sup>-4</sup>	HBSS 0.38	
		HBSS + BSA 0.4×10 <sup>-4</sup>	HBSS + BSA 0.12	
		HBSS 9.6×10 <sup>-4</sup>	HBSS 0.41	
		HBSS + BSA 0.9×10 <sup>-4</sup>	HBSS + BSA 0.18	

### 3.Koroze a oxidace



Obrázek 6: Biotribologická soustava náhrady kyčelního kloubu,  $R_1$  - poloměr hlavice,  $R_2$  poloměr jamky [16]

Jak bylo uvedeno výše, nejčastějším systémem je UHMWPE proti kovu. U těchto systému se uvolňují částice což je považováno za hlavní příčinu aseptického uvolnění endoprotéz a důvodem pro reoperace.

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Vznik otěru závisí na druhu vzájemného pohybu dvou povrchů. Lineární pohyb vede k velmi nízkým otěrovým rychlostem, zatímco víceosý k vysokým. Po testech na kloubních simulátorech byly v jamkách objeveny i oblasti s rozsáhlými plastickými deformacemi. Na povrchu byly lamely přednostně orientovány kolmo ke směru hlavního pohybu. Na otíraných površích byla pozorována tvorba fibril, které mají vyšší pevnost ve směru orientace, ale nižší pevnost ve směru kolmém na tento směr a jsou tak náchylnější k uvolňování otěrových částic Obrázek 6. Nejdůležitější materiálovou vlastností určující odolnost vůči otěru je právě odolnost vůči povrchové orientaci materiálu při namáhání [48].

Vzájemným pohybem dvou komponent vzniká relativně velké množství UHMWPE otěrových částic (dále jen polyethylenových otěrových částic), které jsou jednou z hlavních příčin selhání implantátu. Organismus na tyto částice reaguje jako na cizorodý materiál, snaží se ho ohraničit nebo eliminovat. Částice se jednak hromadí v okolí kloubu, mohou být ale lymfatickou nebo krevní cestou transportovány např. do uzlin, jater nebo sleziny.

Tyto biologicky aktivní částice stojí na počátku aseptického zánětlivého procesu v organismu. V závislosti na své velikosti jsou pohlcovány makrofágy (nejčastěji jsou fagocytovány částice různých tvarů o velikosti 0,1 – 10  $\mu$ m s tím, že byly zjištěny částice v 0,2-0,4 mm), aktivují lymfocyty a iniciují tak produkci řady zánětlivých mediátorů [49; 50]. Interakcí mezi makrofágy a lymfocyty dochází k imunologicky zprostředkovaným procesům. Důsledkem je pak vznik zanícené tkáně bohaté na polyethylenové granulomy Obrázek 7: Granulomová tkáň v okolí kosti. Vystupňovaná tvorba takového



Obrázek 7: Granulomová tkáň [51]

granulomu vede k rozsáhlé kostní resorpci – osteolýze a následnému uvolnění implantátu.

### **Význam oxidace pro kostní implantáty**

Největším problémem implantátů je časově omezená životnost. K selhání vedoucímu k revizní operaci může dojít z několika příčin: infekcí, mechanicky po technicky nesprávné implantaci protézy, recidivující luxací (vymknutí), zlomeninou implantátu, korozi implantátu, periprotetickou zlomeninou a aseptickým uvolněním (*Obrázek 8*). Zatímco dříve uvedené příčiny selhání jsou vzácné a lze jim předcházet správným výběrem implantátu, povrchovou úpravou (např. oxidací) a správnou operační technikou, aseptické uvolnění je po delším průběhu častější [52]. Pokud by nemocný žil dostatečně dlouho, došlo by pravděpodobně k selhání (např. protézy) u každého nemocného.

V další práci se budu zabývat oxidací povrchu spolu jejím vlivem na povrchové vlastnosti titanových slitin. Před tím považuji za potřebné uvést rozdíl mezi korozi a oxidací.

Oxidaci kovu můžeme dělit na:

- nechtěnou oxidaci (koroze)
- žádanou(oxidační metody a postupy)

### 3.1 Koroze stručný přehled

Koroze ortopedických biomateriálů je komplexní multifaktoriální jev, který závisí na geometrických, metalurgických, mechanických, chemických parametrech. [53]

Koroze je postupné, samovolné rozrušování kovů následkem jejich chemického nebo elektrochemické reakce s okolním prostředím. Je to jev nežádoucí, který způsobuje postupně snižování užitečných vlastností materiálu.



*Obrázek 8: ukázka aseptického uvolnění kyčelního kloubu [105]*

Podle prostředí, kde oxidační a redukční děje probíhají, dělíme korozi na chemickou (oxidace za zvýšené teploty) a elektrochemickou (oxidace za pokojové teploty). Chemická koroze probíhá v elektricky nevodivých prostředích – většinou za vysokých teplot. Rozsah použití titanu a jeho slitin pro bioaplikace lze hodnotit dle schopnosti odolávat především elektrochemické korozi – v elektricky vodivém prostředí. Lze si totiž představit slitinu, obklopenou tělními tekutinami (elektrolytem), a živou tkáň jako jeden elektrochemický systém.

V současné době se při řešení korozních dějů implantátů hovoří i o tzv. Frettingu – vibrační korozi. Jedná se proces opotřebení, který se vyskytuje na kontaktních plochách mezi dvěma materiály, na které působí vnější zatížení a zároveň jsou kontaktní plochy vystavené vzájemnému opakovanému pohybu způsobenému vibracemi nebo nějakou jinou vnější silou, ačkoli tyto plochy nejsou určeny ke vzájemnému pohybu [54; 55].

Korozní děje probíhají i na ostatních materiálech používaných pro implantáty (CoCrMo, ocel, atd.), ale já se budu dále věnovat pouze korozi a oxidaci titanu a titanových slitin.

### 3.1.1 Koroze titanu a jeho slitiny

Aktuálním korozním problémem při použití na ortopedické náhrady je koroze na zkosených spojích modulárního kloubu s dalšími přiléhajícími díly. Titan a jeho slitiny sice vykazují velmi dobrou odolnost proti korozi, ale podléhají snadno otěru a opotřebení (viz další kapitoly). Největší riziko, takzvané štěrbinové koroze může u tohoto materiálu dojít při spojení kov na kov v konickém zúžení implantátu. [56]. Gilbert, et al, uvádějí, že přibližně 16-35% ze 148 získaných implantátů kyčelních kloubu vykazovaly známky středně těžké až těžké koroze zúženém spojení (v krčku) Obrázek 9 [57]

Koroze titanových slitin je popsána i u dentálních implantátů. Kyselé prostředí vyvolané bakteriálními filmů a/nebo zánětlivých procesů může vyvolat oxidaci povrchu. Korozivní proces může vést k trvalému rozrušení pasivační vrstvy oxidu. Tehdy se uvolňují kovové ionty a nečistoty in vivo a mohou bránit opětovnému vhojení povrchu implantátu s okolní kostí. [58]

### 3.2 Oxidické vrstvy na titanových slitinách

Oxidická vrstva na povrchu titanových slitin obecně zlepšuje korozní odolnost a také biokompatibilitu

v případě užití v medicíně. Korozní odolnost a biokompatibilita titanu a jeho slitin je způsobena dobře adhezí, stabilní ochrannou oxidickou vrstvou, která je odolná i ve zhoršených korozních prostředích. Tvorba této vrstvy je



Obrázek 9: Ukázka koroze dentálních implantátů [58]



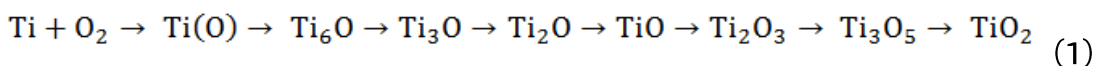
## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

podmíněna reaktivností titanu s atmosférou, či vlhkostí a nastává několik mikrosekund po kontaktu prostředím. Rychlost tvorby a kvalita oxidické vrstvy je závislá na teplotě a chemickém složení prostředí [59]

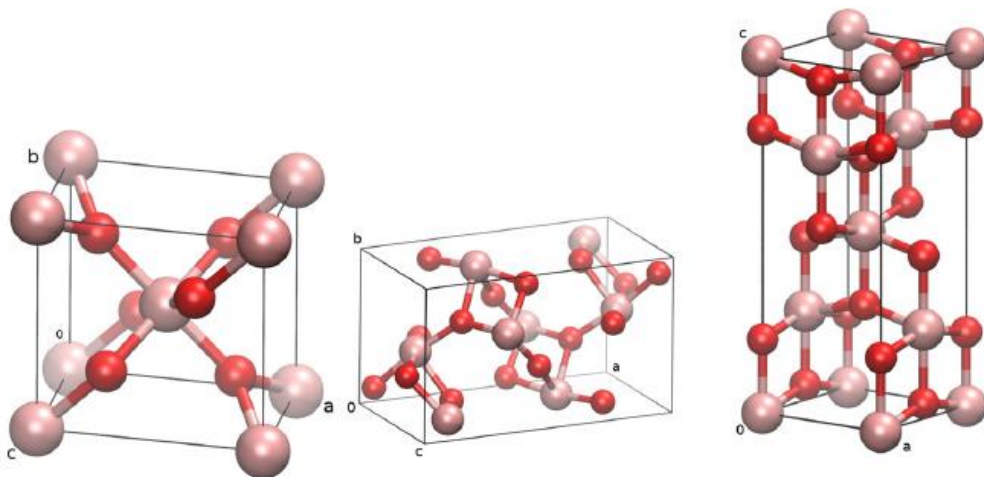
### 3.2.1 Technologie přípravy titanových oxidických vrstev

Titan patří mezi velice reaktivní kovy, který si na svém povrchu vytváří kompaktní vrstvu oxidů, pokud dojde ke kontaktu povrchu s okolní atmosférou. Tvorba oxidické vrstvy je způsobená vysokou afinitou titanu ke kyslíku. Vzniklá vrstva (3-7nm) je primárně tvořena oxidem titaničitým ( $\text{TiO}_2$ ) a slouží jako ochrana proti korozi [60; 61]. Tloušťka vrstvy závisí na typu slitiny, prostředí, teplotě během výroby a konečné povrchové úpravě. Při umělé přípravě vrstvy  $\text{TiO}_2$  jsme schopni dosahovat tloušťky i několik mikrometrů [62].

Formace oxidů na vzduchu na povrchu titanu se mění v závislosti na postupu oxidace a rostoucí teplotě dle následující chemické rovnice (1):



Z těchto oxidů je termodynamicky nejstabilnější oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), který se může vyskytovat jak v amorfní formě, tak i ve třech různých krystalických strukturách - anatas, rutil a brookit.



Obrázek 10: Krystalické modifikace  $\text{TiO}_2$  zleva: rutil, brookit, anatas [63]

### **Anatas**

Anatas je černý, šedý, šedomodrý, modrý, zelený, hnědý až hnědočervený, silně polokovově až diamantově lesklý, v jednom směru krystalové mřížky dokonale štěpný, ve druhém dobře štěpný. Je průsvitný až neprůhledný [64].

### **Brookit**

Brookit je žlutohnědý až černý, diamantově lesklý. Krystaluje obvykle v tabulkovitých, kosočtverečných krystalech diamantového lesku [64].

### **Rutil**

Rutil je šedý, hnědý, červenohnědý až černý, dokonale štěpný, na štěpných plochách silně kovově lesklý. Obvykle tvoří krátké, či dlouhé sloupcovité až jehlicovité krystaly, které bývají slámově žluté. Drobná zrna rutilu jsou v málem množství běžnou součástí různých magmatických hornin. Rutil je poměrně odolný a těžký, takže se hromadí v mořských a říčních naplaveninách, v nichž může tvořit i ložiska. [64].

### **Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Oxid titanity, který je také nazýván tristarite, je granulovité struktury a černé barvy. Teplota tání je 2130 °C [64].

### **TiO**

Oxid titanitý je anorganická chemická sloučenina, která může být připravena z oxidu titaničitého, nebo samotného titanu při 1500 °C. Teplota tání je 1750 °C

## **3.3 Metody přípravy oxidických vrstev pro implantáty**

V této kapitole se budu věnovat jednotlivým metodám přípravy oxidických vrstev.

### **3.3.1 Anodická oxidace**

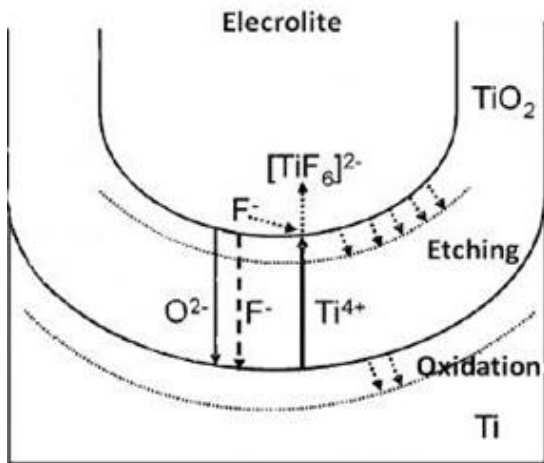
Anodická oxidace je po desetiletí osvědčená, univerzální a cenově příznivá metoda pro tvorbu ochranných protikorozních vrstev na přechodových kovech (Al, Ti, Nb, Zr, atd.). Vytvořené stabilní oxidické vrstvy zabraňují dalšímu vylučování kovových iontů ze základního materiálu a zpomalují jeho degradaci. Na základě nastavených parametrů anodické oxidace (anodické napětí, proudová hustota, typ elektrolytu, teplota) jsme schopni kontrolovat tloušťku vrstvy a její strukturu. Dosažené oxidické vrstvy mají často porézní strukturu, která dle studií výrazně přispívá ke zlepšení přilnavosti povlaků [17; 18].

Pro dosažení lepší bioaktivity byl proto vyvinut hydrotermální proces. Ten spočívá v anodické oxidaci v elektrolytu obsahujícím ionty Ca a P kdy se poté slitina vloží do autoklávu se silně zásaditým roztokem NaOH, kde se nechá několik hodin při teplotě kolem 250°C. To směřuje ke vzniku funkčních skupin Ti-OH a Nb-OH na povrchu oxidu, což vede k tvorbě HAP, a tím k bioaktivitě. Bylo také zjištěno, že hydrotermální proces zvyšuje adhezi oxidové vrstvy k substrátu.

V posledních letech přibýlo prací, jež se snaží hlouběji porozumět procesům během anodické oxidace. Zkoumán je hlavně vliv parametrů anodické oxidace, jako je anodické napětí, proud, doba oxidace, složení a koncentrace roztoku, ap., na fázovou strukturu, morfologii a tloušťku oxidové vrstvy.

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Přítomnost fluoridových iontů a jejich působení na oxidickou vrstvu má význam pro aplikace titanu a jeho slitin. Například stomatologické implantáty



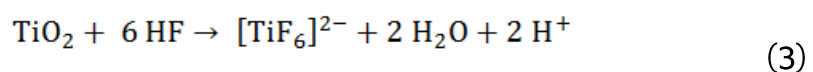
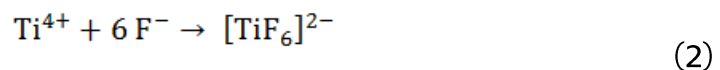
Obrázek 11: Vliv fluoridových iontů na tvorbu nanostruktury oxidické vrstvy [106]

přichází do styku se zubní pastou, která obsahuje fluoridové ionty, tudíž je nezbytné zkoumat chování titanových slitin v jejich přítomnosti. Výskyt fluoridových iontů je pro většinu aplikací titanových slitin nežádoucí.

Složení a koncentrace elektrolytu ovlivňuje růst oxidické vrstvy na povrchu titanových materiálů. Složení elektrolytu má podstatně větší vliv na tvorbu porézních oxidů na povrchu titanových slitin než parametry, jako

teplota, proudová hustota a drsnost povrchu oxidovaného vzorku [65]. Stejně jako aktivní koroze titanu v prostředí  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byla do značné míry ovlivněna přítomností malého množství (do 5,8 hm%) chloridu sodného NaCl. Chloridové ionty působí jako zpomalovače pasivace titanových slitin a snižují jejich pasivační proudovou

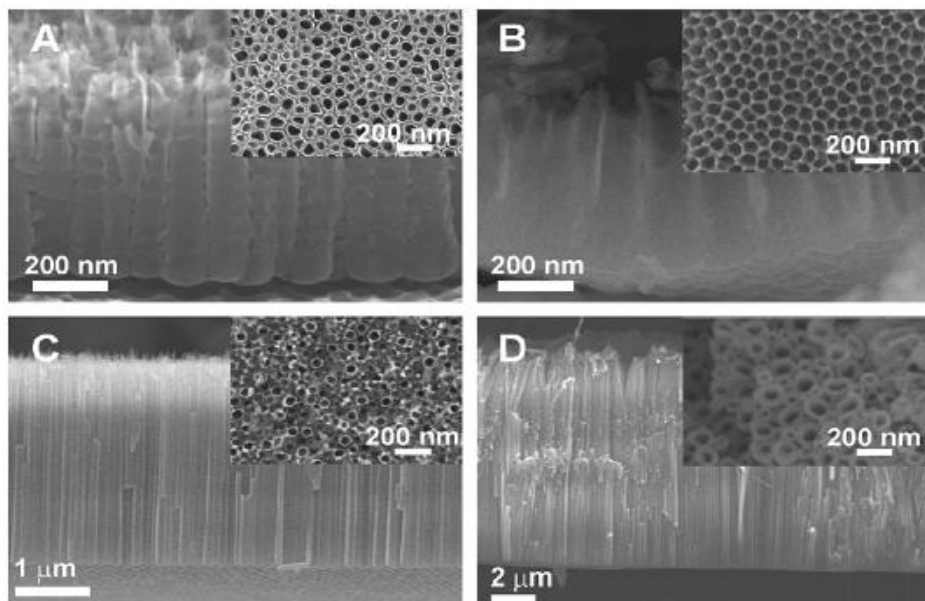
hustotu. Fluoridové anionty v nízkých koncentracích naopak urychlují aktivní i pasivní korozní děje. Pokud je titanový povrch vystaven prostředí elektrolytu s fluoridovými ionty, tvořící se oxidická vrstva je zároveň rozpouštěna působením fluoridových iontů. Tento proces rozpouštění lze popsat chemickými rovnicemi (2) a (3). Oba tyto procesy oxidace a rozpouštění se nachází v dynamické rovnováze a rychlost reakcí je ovlivněna především koncentrací obou reakčních složek [66]



## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Chemické procesy, které probíhají na anodě v prostředí elektrolytu s fluoridovými ionty, jsou velice složité. Fluoridové ionty pronikají do kritických míst v oxidické vrstvě, jako jsou například povrchové mikrotrhliny, a dochází k rozpouštění tvořící se vrstvy. Za určitých podmínek tohoto procesu mohou způsobit růst nanostrukturované oxidické vrstvy ve formě nanopórů nebo nanotrubic (Obrázek 11) [66].

V elektrolytu bez přítomnosti fluoridových iontů vykazuje proudová hustota klesající charakter a ustálí se na minimální proudové hustotě. V elektrolytu s přídavkem fluoridových iontů dochází po dosažení minima proudové hustoty k jejímu opětovnému navýšení v důsledku interakce fluoridových iontů s vytvořenou oxidickou vrstvou. Toto navýšení proudové hustoty nám signalizuje tvorbu nanostruktury na povrchu oxidovaného vzorku (Obrázek 12) [67].



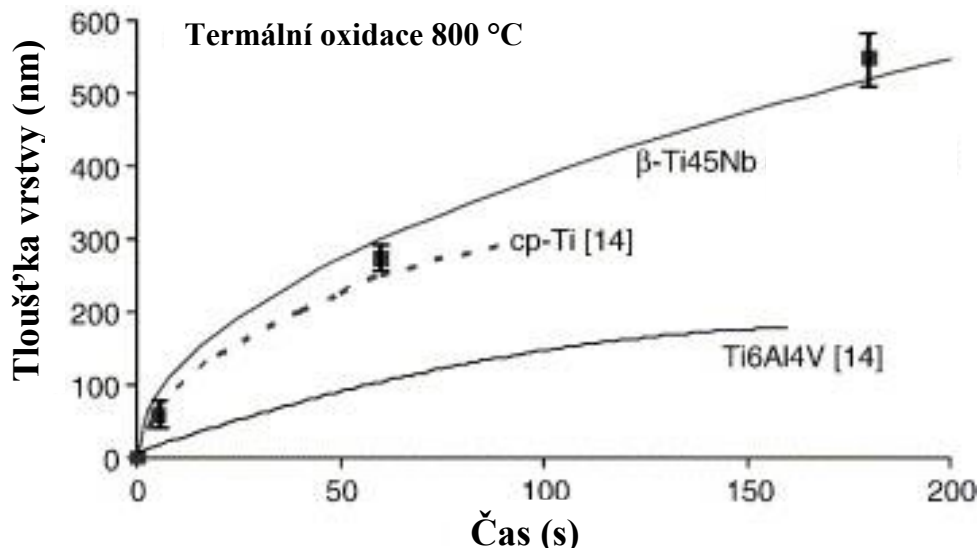
Obrázek 12: Příklady nanostruktur vytvořených v prostředí elektrolytu 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> s přítomností fluoridových iontů: A) slitina Ti6Al7Nb, B) slitina Ti6Al4V, C) slitina Ti39Nb, D) slitina TiZr [67].

### **3.3.2 Termická oxidace**

Jedním z nejjednodušších způsobů k vytvoření pasivační vrstvy na titanu je jeho tepelná oxidace v peci se vzdušnou atmosférou. Takto připravená vrstva je za teplot oxidace vyšších než 500 °C tvořena především rutilem [68]. Příprava termickou oxidací může nabídnout oxidické vrstvy s tloušťkou i v desítkách nanometrů spolu s vysoce krystalickou strukturou. Na oxidickou vrstvu na povrchu materiálu navazuje přechodová vrstva s difuzním kyslíkem. Metoda termické oxidace byla vyzkoušena pro mnoho biomateriálů, s cílem vylepšení jejich povrchových vlastností.

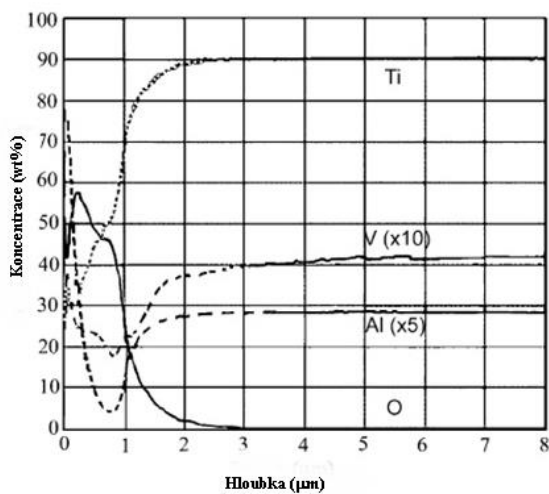
Hlavním parametrem oxidované vrstvy je její tloušťka a chemické složení, to rozhoduje o mechanických a dalších vlastnostech povrchu. Při měření tloušťky vrstev (a posléze EDS analýzou) byla prokázána přítomnost jak oxidické vrstvy na povrchu materiálu, tak difuzní vrstvy v základním materiálu. Tloušťky obou vrstev se s rostoucí teplotou zvětšovaly. V případě oxidace za 500 °C nebylo možné rozlišit oxidickou vrstvu od přechodové a jejich společná tloušťka byla cca 5.5  $\mu\text{m}$ ; v případě oxidace za 650 °C byla tloušťka oxidické vrstvy 4.5  $\mu\text{m}$  a tloušťka přechodové vrstvy cca 6.5  $\mu\text{m}$ ; v případě oxidace za 800 °C byla tloušťka oxidické vrstvy 18.3  $\mu\text{m}$  a tloušťka přechodové vrstvy 38  $\mu\text{m}$ . [69]. Obrázek 13

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace



Obrázek 13: Tloušťka oxidické vrstvy v závislosti na době oxidace pro materiály CP Ti, Ti-6Al-4V a Ti45Nb; termická oxidace za teploty 600 °C [69].

Při měření koncentračních profilů se používá například metoda GDOES (glow discharge optical emission source) optická emisní spektroskopie – interakce iontů s povrchem a následná optická analýza.



Obrázek 14: Hloubka profilu získaná metodou GDOES tepelně oxidované slitiny Ti6Al4V při 700 °C po dobu 1 hodiny [70]

Na vnějším povrchu jsou pozorovány zóny bohaté na oxid hliníku, naopak ve vnitřních zónách vrstvy je koncentrace hliníku i vanadu nízká (Obrázek 14).

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Se stoupající teplotou oxidace, dochází k nárůstu drsnosti povrchu i tvrdosti ve vrstvě. Drsnější povrch oxidovaných vzorků může být připsán mechanismu růstu oxidické vrstvy [71]. Mikrotvrdost termicky oxidovaných vzorků zaznamenala významný nárůst díky tvorbě tvrdých oxidických vrstev Tabulka 6 a změnou napětí během rozpouštění kyslíku pod oxidickou vrstvou.

Tabulka 6: Drsnost a mikrotvrdost vzorků z CP Ti grade 1 – neoxidovaných a oxidovaných po 24 hodin [68]

Stav	Drsnost povrchu Ra [ $\mu\text{m}$ ]	Mikrotvrdost povrchu [HV0.2]
Neoxidovaný	0.15	178 $\pm$ 6
Oxidovaný za 500 °C	0.35	200 $\pm$ 7
Oxidovaný za 650 °C	0.39	443 $\pm$ 20
Oxidovaný za 800 °C	0.45	1186 $\pm$ 42

### 3.3.3 PVD příprava oxidické vrstvy

Metoda PVD (Physical Vapour Deposition) povlakování je založena na kondenzaci částic, které byly získány odpařením, resp. odprášením (některé metody užívají také klasického odporového ohřevu), pevné látky ze zdrojů (cílů, targetů) za sníženého tlaku (0,1-1,0 Pa). Uvolněné částice jsou ionizovány, reagují s atmosférou komory tvořenou inertním (argon) a reaktivním (dusík) plynem a záporným předpětím jsou urychlovány k povrchu substrátu. Zde se usazují ve formě tenkého a homogenního povlaku [72].

Povlak je vytvořen jednotlivými dopadajícími atomy, které jsou na povrchu nejdříve zachyceny procesy sorpce, pohybují se po povrchu a následně jsou buď zachyceny trvalou vazbou, nebo zpětně uvolněny. Další dopadající atomy se díky pohybu po povrchu mohou spojit s již dříve zachycenými atomy a tím postupně tvořit ionizované zárodky a ostrůvky rostoucí vrstvy. Tyto se následně spojují, až dochází k vytvoření souvislé vrstvy, která nadále roste a zvětšuje svoji tloušťku [72]. Patent [73] popisuje



přípravu  $\text{TiO}_2$  pomocí PVD na různé typy titanových slitin pro lékařské aplikace takto:

Podle předloženého vynálezu může mít bioaktivní krystalický povlak  $\text{TiO}_2$  jakoukoliv krystalickou fázi, ale jsou s výhodou ve formě rutilu nebo anatasu.

Zajímavá varianta z pohledu biokompatibility je kombinace PVD nanášení spolu s anodickou oxidací pro přípravu nanostrukturovaného  $\text{TiO}_2\text{-Nb}_2\text{O}_5\text{-Al}_2\text{O}_3$  povrchu Ti-6Al-7Nb [74].

### 3.3.4 Další metody přípravy oxidických vrstev $\text{TiO}_2$

Příprava vrstev z roztoku tzv. mokrou cestou je velmi využívána. Jejími hlavními výhodami jsou energetická nenáročnost, příprava za normální teploty a tlaku, možnost řízení a kontroly stechiometrie apod. Těmito metodami lze také řídit strukturu vrstev, velikost částic, ovlivnit mezoporézní charakter, vytvořit homogenní vrstvy atd. Bohužel jsou tyto procesy mnohdy zdlouhavé a některé prekursorů velmi drahé.

Těchto „mokrých“ metod je celá řada, mikroemulzní, sol-gel, hydrotermální, solvotermální, elektrochemická, pyrolytická atd.). [75; 76],

#### **Hydrotermální příprava**

Příprava nanočástic při hydrotermálních podmínkách ve vodním prostředí může být použita k transformaci amorfního  $\text{TiO}_2$  na krystalický. Tento způsob syntézy oxidu titaničitého poskytuje variabilní modifikace v závislosti na reakčních podmínkách (výchozí látky, teplota, čas nebo pH). Obecně je hydrotermální syntéza nejlepší technikou na přípravu částic požadované velikosti a tvaru částic s homogenním složením a vysokým stupněm krystalinity [75].

Podobnou metodou je tzv. **solvotermální metoda**, která je v principu stejná jak metoda hydrotermální, ale místo vodného prostředí je využito prostředí organických látek [77].

## **Sol-gel**

Metodou sol-gel lze připravit homogenní, transparentní, porézní krystalické a velmi čisté tenké vrstvy. Umožňuje snadné řízení a kontrolu složení či struktury vrstvy a nevyžaduje složité technické vybavení [78].

Dnes jsou známy dvě metody procesu: alkoxidová a nealkoholátová. Nealkoholátová cesta využívá solí anorganických kyselin (nitráty, chloridy, acetáty), což vyžaduje následné odstranění anorganického aniontu, zatímco alkoxidová metoda využívá alkoxydu kovu jako výchozího materiálu. Tato metoda přípravy sol-gelu zahrnuje hydrolýzu a následně kondenzaci alkoxydu titanu. Pro kontrolu vývoje vznikající mikrostruktury je důležité oddělit a zpomalit jednotlivé kroky probíhající hydrolýzy a následné kondenzace. Aby se toho dosáhlo, je nutné přijmout několik opatření. Jedním z nich je modifikace alkoxydu koordinačními činidly, jako jsou karboxyláty nebo  $\beta$ -diketony, které hydrolyzují mnohem pomaleji než ligandy alkoxydů. Pro separaci jednotlivých kroků může být použita i acidobazická katalýza. Kyselá hydrolýza zvyšuje rychlost hydrolýzy, čímž vzniká z plně hydrolyzovaného prekurzoru krystalický prášek. Zásaditá hydrolýza podporuje kondenzaci, čímž se získá amorfni prášek obsahující nehydrolyzované alkoxydové ligandy. Na povrchovou modifikaci případně další vlastnosti má vliv způsob kalcinace [79]. Jako zdroj titanu se nejčastěji používají  $Ti(O-nBu)_4$ ,  $Ti(i-OP)^4$  a  $Ti(O-E)^4$ . [80]. Blokované kopolymery se používají jako činidla řídící tvorbu mezoporézní vrstvy a povrchově neaktivní organické látky (glycerin) se používají pro formování pórů. Vrstvy připravené metodou sol-gel je nutné po nanesení na substrát kalcinovat při relativně vysokých teplotách. Je tedy omezen výběr substrátu, ten musí být teplotně stabilní [77].

### **Plazmový nástřik**

Od svého vzniku v polovině 50tých let minulého století je plazmový nástřik, podmnožina termických nástřiků často používána k vytvoření keramických povlaků [65].

Plazmový nástřik je dobře zavedená povlakovací technika, která se používá na biomedicínských implantátech. Bylo potvrzeno, že tyto povlaky  $\text{TiO}_2$  (i jiných keramických variant), mají dobré mechanické vlastnosti, vysokou přilnavost na podkladu a dobrou biologickou kompatibilitu, což naznačuje potenciálně vhodný materiál pro implantáty [81].

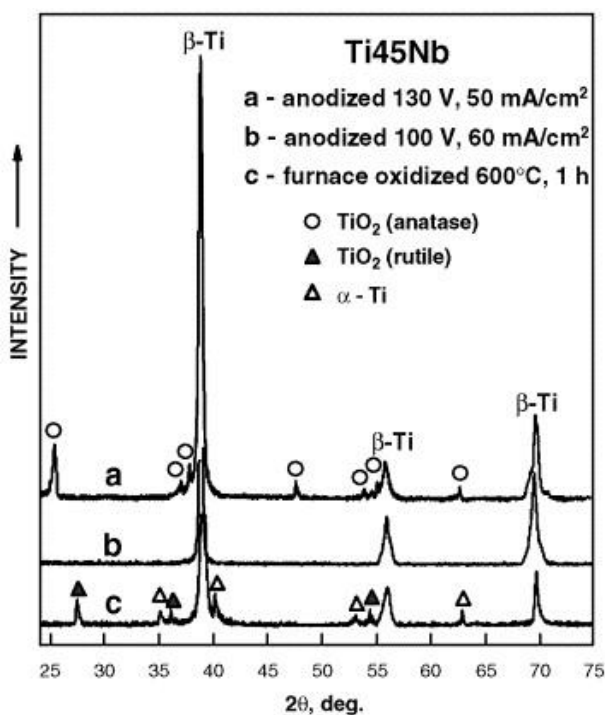
### **3.4 Oxidické vrstvy na titan-niobových ( $\text{Ti39Nb}$ ) slitinách**

Na povrchu titanu a veškerých jeho slitin vzniká oxidická vrstva, která je nositelkou protikorozních, třecích a biokompatibilních vlastností. Primárním prvkem pro tvorbu oxidické vrstvy je tedy titan. V celkovém složení povrchové vrstvy se ovšem mohou vyskytovat komplexní oxidy, a to v závislosti na složení slitiny (např.  $\text{Al}_2\text{TiO}_5$  na slitině  $\text{Ti6Al4V}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  a  $\text{NbO}_2$  na slitinách  $\text{Ti39Nb}$ , či  $\text{NiTiO}_3$  na slitině  $\text{NiTi}$ ). Případně mohou vznikat titanové oxidy, které jsou dopované stopovým množstvím prvků slitiny. Tato malá množství prvků, která jsou obsažena v oxidech titanu, následně ovlivňují vlastnosti vzniklých vrstev. [2].

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Tabulka 7: XPS složení povrchu elektrolyticky leštěné slitiny Ti45Nb po různém oxidačních ošetření [69].

prvek	Vazeb. energi e, eV	vrstva	Koncentrace, at. %				
			Elektrol. leštění	Anodická oxidace			termická oxidace 600 °C, 1 h
				60 mA/c m <sup>2</sup> , 70 V	45 mA/c m <sup>2</sup> , 100 V	60 mA/c m <sup>2</sup> , 100 V	
Ti 2p <sub>3/2-1/2</sub>	458.6–464.4	TiO <sub>2</sub>	11.8	11.2	12.0	12.0	18.0
Nb 3d <sub>5/2-3/2</sub>	207.2–210.0	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6.1	6.8	6.4	7.0	0.3
O 1s	530.1	TiO <sub>2</sub> , Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	49.2	51.2	50.0	40.6	38.6
	531.9	contamination				11,1	12.2



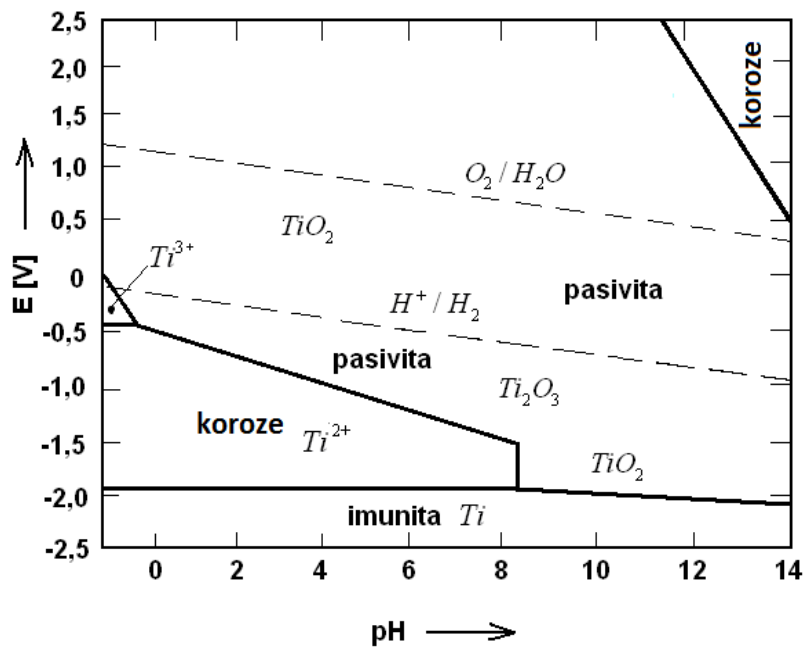
Obrázek 15: Spektra rentgenové difrakce slitiny Ti45Nb po různých oxidačních způsobů: (a) anodická oxidace, 130 V, 50 mA / cm<sup>2</sup>; (b) anodická oxidace, 100 V, 60 mA / cm<sup>2</sup>; (c) termická oxidace pece (600 °C, 1 h) [69].

### **3.4.1 Pourbaixův diagram pro Ti a Nb**

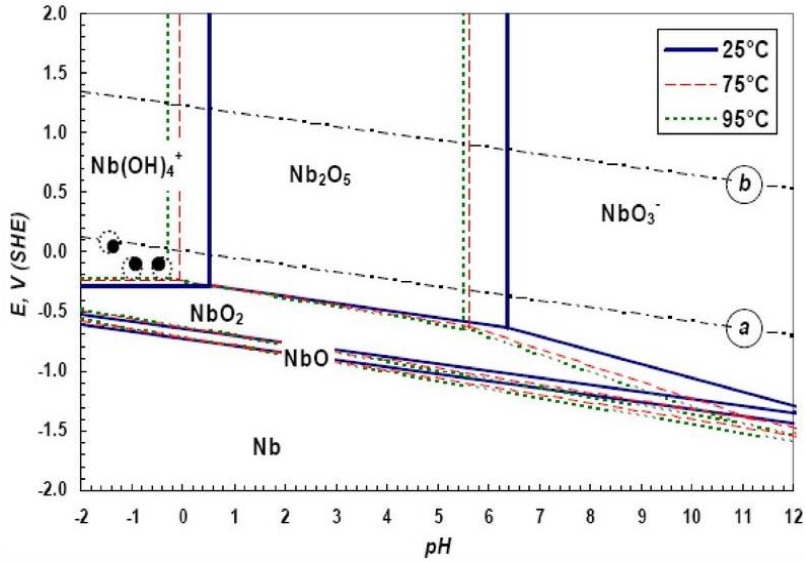
Chování kovu v roztoku s určitým pH lze předpovídat pomocí termodynamických rovnic. Výsledky těchto výpočtů jsou prezentovány v závislosti potenciálu kovu  $E$  na pH prostředí zobrazených v Pourbaixově diagramu (Obrázek 16 a Obrázek 17) [82].

Z diagramu lze vyčíst, zda se kov nachází v inertním stavu, aktivně se rozpouští, nebo je plně pasivován. V anodické oblasti nad čarou  $H^+/H_2$ , je povrchová vrstva tvořená pouze pasivním oxidem titaničitým v celém intervalu hodnot pH. Pod čarou  $H^+/H_2$  se nachází oblast metastabilních oxidů titanu, ze kterých se má titan tendenci separovat v celém rozsahu pH. Pokud roste potenciál, po odtržení dochází k reakci Ti na kationt  $Ti^{4+}$  a formaci stabilní vrstvy  $TiO_2$  s výbornými korozivzdornými vlastnostmi [66].

Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace



Obrázek 16: Pourbaixův diagram pro systém Ti – H<sub>2</sub>O při teplotě 25°C [82]



Obrázek 17: Pourbaixův diagram pro systém Nb-H<sub>2</sub>O, při teplotě 25, 75 a 95 °C [83]

## **4. Metody hodnocení oxidace povrchu**

### **4.1 Vlastnosti povrchu kostních implantátů**

Kvalita povrchu oxidovaného implantátu je kvalifikovaná třemi parametry: mechanickými vlastnostmi vrstvy, povrchovými vlastnostmi a fyzikálně chemickými vlastnostmi [84].

Mezi nejvýznamnější povrchové vlastnosti oxidické vrstvy pro biomateriály patří: povrchová drsnost, polarita, smáčivost, elektrický náboj a vodivost, tuhost či pružnost povrchu. [85].

### **4.2 Povrchová drsnost**

Podle míry nepravidelností povrchu materiálu lze rozlišovat makrodrsnost (nerovnosti o rozměrech 100  $\mu\text{m}$  – milimetry), mikrodrsnost (100 nm - 100  $\mu\text{m}$ ) a nanodrsnost (méně než 100 nm). Každá z těchto úrovní drsnosti má na buňky specifický vliv.

Makrodrsnost se jeví příznivě, protože zlepšuje upevnění implantátu v přirozené tkáni a obvykle nijak negativně neovlivňuje např. adhezi a rozprostření buněk. Mikrodrsnost na jednu stranu příznivě stimuluje rostoucí osteoblasty směrem k jejich diferenciaci, jak ukázala genová exprese navozující osteogenní diferenciaci a vyšší stupeň mineralizace extracelulární matrix ve srovnání s buněčným růstem na hladkých površích [86; 87]. Na druhou stranu byla zpozorována snížená adheze a proliferace buněk rostoucích na mikrodrsném povrchu. Což může být zapříčiněno tím, že velikost adhezní plochy je limitována topografií povrchu materiálu. Jinými slovy, buňky, jejichž plocha adheze má obvykle rozměry řádově v desítkách mikrometrů, jsou na mikrostrukturovaných površích nuceny vyhýbat se nerovnostem (např. adherovat jen v prohlubních mezi nimi) či nerovnosti přemostřovat, což omezuje kontakt jejich povrchu s materiálem. [88] [89]

### **4.3 Povrchová energie**

Jedním z důležitých parametrů adheze buněk je smáčivost povrchu. Smáčivost neboli hydrofilie povrchu, či naopak jeho hydrofobie, se obvykle měří pomocí kontaktního úhlu kapek polárních kapalin (např. voda) a kapalin nepolárních (např. benzylalkohol) na povrchu materiálu. Hydrofilie či hydrofobie povrchu materiálu totiž vyplývá z jeho polaritu tzn. výška polární složky povrchové energie materiálu je přímo úměrná jeho hydrofilii.

Kontaktní úhel je důležitý parametr v povrchové energii. Je běžnou mírou hydrofobicity pevném povrchu. Kontaktní úhel je pak použit (je přímo úměrný) při výpočtu povrchového napětí [90].

Menší kontaktní úhel udává výraznější rozprostření tekutiny na povrchu, tzv. hydrofilitu materiálu, zatímco vyšší kontaktní úhel odpovídá stavu hydrofobnímu, kdy tekutina sníží svůj kontakt s povrchem materiálu, který je tedy tzv. hydrofobní. Různé modifikace povrchů mohou ovlivnit jeho smáčivost. Např. oxygenace polymerů zvýší podíl polárních skupin a tím i smáčivost, která umožní adsorpci molekul zprostředkujících adhezi buněk, jako je např. vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin.

Buňky obvykle nejpříznivěji reagují na středně hydrofilní povrch, který umožní adhezi specifických proteinů v dostatečném množství, výhodném spektru a zejména výhodné geometrické konformaci, tj. blízké konformaci fyziologické. Pokud je však materiál silně hydrofilní (kontaktní úhel blízký  $0^\circ$ ) anebo je vysoká hydrofilie navíc kombinována s mechanickou nestabilitou povrchu materiálu (např. pohyblivé řetězce polyetylénu oxidu), uchycené na materiálu pouze jedním koncem, proteiny se k materiálu neadsorbují buď vůbec, nebo jen velmi slabě. Naproti tomu na silně hydrofobních materiálech (kontaktní úhel kolem  $100^\circ$ ) se proteiny sice adsorbují v dostatečném množství (dokonce i vyšším než na materiálech přiměřeně hydrofilních), ale adsorbují se v rigidní a denaturované formě, což rovněž brání adhezi buněk [87; 91].



## 5. Biologické testy

U nových typů biomateriálů je třeba brát v úvahu, aby tyto materiály podporovaly uchycení, životaschopnost a správnou funkci konkrétních buněk. Adheze buněk k materiálu a jejich následující osud je zprostředkován molekulami extracelulární matrix, jako je vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin a fibrin - tedy molekulami, které se účastní při procesu hojení ran. Tyto molekuly se proto často používají pro vhodnou modifikaci povrchu biomateriálu [51].

Materiály navržené pro implantaci do kostí jsou nejprve testovány *in vitro* a následně *in vivo* - na laboratorních zvířatech (v této práci se nezabýváme). *In vitro* testování zpočátku pracuje s buněčnými liniemi. Tyto linie představují homogenní, jasně definované a relativně dobře dostupné a snadno kultivovatelné buněčné populace, které umožňují testování mnoha typů vzorků a přitom dávají reprodukovatelný výsledek. Lidské buněčné linie odvozené z kostí jsou linie osteoblastů CPC-2, TE-85, MG-63, SaOS-2, U-2OS. [89]

Cytotoxicita je potenciál chemické látky způsobit buněčnou smrt pomocí změn v buněčném chování a v buněčných procesech. Testy *in vitro* cytotoxicity se používají ke stanovení účinků chemických a toxických látek na buňkách rozmnožujících se *in vitro*. Tyto testy zahrnují jednoduché metody, které měří viabilitu neboli životaschopnost buněk vystavených testované látce. Takové metody sledují účinek léčiv na růst neboli proliferaci buněk a integritu jejich membrány, metodou barevné diference mrtvých a živých buněk [92].

Konkrétní metody zkoušek pro hodnocení cytotoxicity zdravotních prostředků in-vitro jsou definovány v páté části souboru norem ČSN EN ISO 10993-5. Norma s názvem „Zkoušky na cytotoxicitu in vitro“ popisuje tři typy uspořádání zkoušek cytotoxicity:

- 1) zkoušku extraktu připraveného z testovaného materiálu,
- 2) zkoušku přímým kontaktem,
- 3) zkoušku nepřímým kontaktem.

Jedna z nejčastěji používaných metod pro určení viability buněk ve vzorku je barvení pomocí trypanové modři. Trypan B lue; (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftoldisulfonové kyseliny) [93]. Základem metody je odlišení živých buněk s neporušenou buněčnou membránou a buněk mrtvých, které mají narušenu strukturální integritu buněčné membrány.

Průtoková cytometrie slouží k analýze částic a buněk, které protékají přístrojem v proudu nosné kapaliny. Využívá princip rozptylu světla, excitace a emise fluorochromních molekul k získání dat z mikroskopických částic a buněk. Buňky jsou většinou značeny specifickými fluorochromy a hydrodynamicky soustředěny do tenkého proudu v kapiláře, kterou protékají vysokou rychlostí, přičemž jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením produkovaným laserem. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk pak odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barvivo (například propidium jodid vázající se na DNA po proniknutí narušenou membránou mrtvé buňky). Hlavními výhodami průtokové cytometrie jsou: jednoduchá příprava vzorků, vysoká rychlost analýz velkých souborů jednotlivých buněk nebo částic, nedestruktivnost, snadná detekce subpopulací a také relativně nízké finanční náklady na analýzu jednoho vzorku. Průtoková cytometrie má široké uplatnění v základním biologickém výzkumu. [94]

In vitro testy se provádí v simulovaných tělních tekutinách (SBF Simulated body fluid) jsou roztoky, které se svým chemickým složením

### *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

podobají lidským tekutinám (Tabulka 8). Tyto roztoky jsou užívány při imerzních zkouškách in vitro. Mezi SBF roztoky se řadí např. Ringerův roztok, Hankův roztok, salivační roztok a různě modifikované roztoky označované zkratkou SBF.

*Tabulka 8: Koncentrace anorganických iontů v krevní plazmě a SBF roztocích (mmol.l<sup>-1</sup>) [95]*

Ionty / roztoky	Krevní plazma (lidská)	SBF	Ringerův roztok	Hankův roztok
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0	39,1	141,7
K <sup>+</sup>	3,6 – 5,5	6,5	1,4	5,7
Ca <sup>2+</sup>	1,0	1,5	0	0,8
Mg <sup>2+</sup>	2,1 – 2,6	2,5	0,4	1,7
Cl <sup>-</sup>	95,0 – 107,0	148,0	40,7	145,6
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27,0	4,2	0,6	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,65 – 1,45	1,0	0	0,7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	0	0	0,8

## 6. Cíle práce

Tato práce se zabývá přípravou a modifikací povrchu materiálu titan-niobové slitiny, které by sloužily k lepšímu zakotvení implantátů do kostní tkáně. Pro tento účel je vhodné opatřit povrch základního materiálu oxidickou vrstvou, koncept umožňuje lepší integraci implantátu do kosti. Cílem práce je navrhnout vhodnou přípravu oxidické vrstvy a vyhodnotit její vlastnosti včetně morfologie. Zároveň pak, v rámci biologických in-vitro testů, prokázat lepší buněčnou aktivitu na připravených materiálech. Jelikož, je téma široké rozdělil jsem náplň do následujících cílů.

Prvním cílem bude dosáhnout modifikace povrchu titanových slitin pomocí anodické oxidace se záměrem připravit na materiálu Ti39Nb nanostrukturovaný povrch. Vzorky budou porovnávány s materiály komerčně používanými pro implantáty. Zároveň pak otestovat vhodnost zvolených základních materiálů, a to vzhledem k chemické stabilitě povrchu v porovnání s ostatními v implantologii používanými materiály. Vzorky budou testovány a oxidovány termickou oxidací spolu s dalšími postupy čištění povrchu. Byly měřeny úpravy povrchu ke změně průběhu zeta ( $\xi$ ) potenciálu a chemickému složení.

Druhým cílem bude dosáhnout definovaného povrchu základního materiálu (Ti, ocel (1.4404 nebo také označována X2CrNiMo, 316L), TiAlV a Ti39Nb, naneseným povlakem Ti39Nb (metodou PVD)). Důvodem pro volbu tohoto procesu je snížení pořizovací ceny základních materiálů k implantaci, spolu se získáním chemicky čistého povrchu. Následovalo porovnání povrchových vlastností povlaku se základním materiálem a jejich oxidických vrstev.

Třetím cílem bude ověření zlepšených mechanických vlastností jednotlivých povrchových úprav, hlavně pak měření otěrových charakteristik oxidických vrstev.

Posledním, čtvrtým cílem, bude tyto oxidické vrstvy otestovat in-vitro testy a porovnat se základním materiálem pro určení vhodnosti zvolených materiálů k přípravě implantátu.

## 7.Experiment

### 7.1 Použité materiály

Jako základní, podkladový materiál byla použita korozivzdorná ocel ISO 5832-1, čistý titan ISO 5832-2, ocel X2CrNiMo (316L) a titanová slitina Ti6Al4V ISO 5832-3 dodané firmou Beznoska s.r.o. a firmou Prospan s.r.o..

Vzorky slitiny Ti39Nb byly připraveny obloukovým tavením 61 hm.% Titanu, (ingot o čistotě 99,55%), spolu s 39 hm% Nb (ingot o čistotě 99,85%). Tavení pokračovalo osmkrát při parametrech 800-100A/23V s následným žháním při 850°C po dobu 30 minut. Následovalo ochlazení ve vodě k dosažení potřebné homogenity materiálu, které bylo provedeno ve firmě UJP Praha.

### 7.2 Příprava vzorků

Jednotlivé vzorky byly rozřezány z válečků o průměru 14 a 10 mm. Tato operace byla prováděna pomocí rozbrušovací pily Mikron 3000 s diamantovým kotoučem [109,110]

Po rozřezání byly vzorky zalisovány na metalografickém lisu LECO PR-4x za teploty 170°C po dobu 5 minut do bakelitu. Po zchlazení následovalo broušení a leštění povrchu na přístroji LECO GPX 300.



Obrázek 18:Přístroje pro přípravy povrchu vzorků: a) pila Mikron 3000 (MTH), b) metalografický lis LECO PR – 4x, c) bruska-leštička LECO GPX 300

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Broušení probíhalo na ruční brusce při střídání zrnitostí brusných papírů od 120 po 4000 při rychlosti 200 ot/min. Vzorky byly chlazeny přívodem vody na povrch brusného kotouče. Sled všech operací je uveden v následující v Tabulka 9.

Tabulka 9: Parametry procesu broušení preparátů

Operace	Zrnitost kotouče	Chlazení	Přítlačná síla [N]	Rychlost [ot./min]	Čas [min]
1.	120	voda	20-30	200	1-2
2.	320				
3.	600				
4.	1000				
5.	2400				
6.	4000				

Leštění vzorků probíhalo na automatické brusce/leštičce od firmy LECO. Tato leštička disponuje nastavcem pro šest vzorků, tudíž byly vzorky leštěny stejnou přítlačnou silou vyvinutou strojem na rozdíl od předchozího ručního broušení vzorků. Jako leštící suspenze byl použit roztok Colloidal silica 0,05 micron. Detailní leštící parametry jsou obsaženy v Tabulka 10

Tabulka 10: Parametry procesu leštění preparátů

Operace	Abrazivo/ povrch		Přítlačná síla [N]	Rychlost [ot./min]	Čas [min]
1.	leštící plátno	Colloidal silica	35	kotouč – 150 vzorek - 70 (protisměrně)	20
2.	leštící plátno	Colloidal silica	20	kotouč – 150 vzorek - 70 (protisměrně)	20

Vzorky byly po vyleštění vyprány v ultrazvukové pračce v acetonu a poté v destilované vodě.

## 7.3 Popis nejvýznamnějších použitých měřících zařízení

### 7.3.1 Elektronová mikroskopie

Scanovací elektronový mikroskop s vysokým rozlišením JSM 7600F (obrázek 19), je doplněný o detektor difraktovaných zpětně odražených elektronů

a detektor energiového spektra charakteristického RTG záření. Má nízkouhlový detektor zpětně odražených elektronů, výsuvný objektivový



detektor zpětně odražených elektronů, výsuvný dělený detektor zpětně odražených elektronů, detektor difraktovaných zpětně odražených elektronů–EBSD (HKL Nordlys) a energiově disperzní X-ray detektor EDS (Oxford X-Max 50 mm<sup>2</sup>).

Schottkyho katoda SE, in-lens SE a BSE detektor EDS, EBSD analýza. Rozlišení 1,2 nm (15 kV). Zvětšení 25 až 1 000 000krát. Urychlovací napětí 100 V až 30 kV X-Y 140×80 mm,

Obrázek 19:Řádkovací elektronový mikroskop JSM 7600F od firmy JEOL

### 7.3.2 Tribometr

Test spočívá v interakci rotujícího vzorku se zatíženým indentorem ve tvaru kuličky Obrázek 20. Tím se vytvoří kruhová stopa, jejíž analýzou dostáváme informace o koeficientu tření a otěru, které jsou charakteristické pro danou materiálovou dvojici. Zkoušku lze provádět i za zvýšených teplot. Maximální otáčky vzorku: 500 ot/min, maximální třecí síla: 10 N, maximální

## *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

normálové zatížení: 10 N, průměr kuličky 6 mm je možné nastavit i měření při zvýšené teplotě a to do 800°C.



Obrázek 20: Zařízení High Temperature Tribometer.

### 7.3.3 XPS

Standardní elektronový spektrometr ESCA 3 Mk II (VG Scientific, Anglie), který umožňuje kromě spekter excitovaných měkkým rentgenovým zářením měřit i spektra excitovaná UV zářením s energií fotonů od 20 do 41 eV, spektra Augerových elektronů excitovaných fotony a elektrony a studovat složení plynné fáze (např. při zahřívání vzorků nebo jejich interakci s vybranými plyny) metodou hmotnostní spektrometrie.

Pro krystalografické pozorování struktury vrstvy byla použita rentgenová difrakce (paralelní paprsek (PB) a Brag-Brentano (BB) geometrie). Analýza byla provedena na difraktometrech Seifert XRD7 (Německo) a PANanalytical X'Pert MPD Pro (Nizozemsko), a to jak PB, tak BB geometrie, za použití  $\text{CuK}\alpha$  záření. PB byl nastaven na úhel incidence 1,0°.

### 7.3.4 Ramanovo spektroskopie

Ramanové spektra byly měřeny za použití spektrometru Labram HR (Horiba Jobin-Yvon) propojeným s mikroskopem Olympus BX-41. Spektra



byla buzena 633 nm laserem a výkon laseru pod objektem 50×2 mW. Ramanův spektrometr byl kalibrován pomocí F1g řádek Si při 520,5 cm<sup>-1</sup>.

### **7.3.5 AFM**

Obraz povrchu se zde sestavuje postupně, bod po bodu. Metoda dosahuje velmi vysokého rozlišení. Techniku AFM lze použít nejen k zobrazování, ale také k tvorbě struktur či zpracování povrchů v nanometrové oblasti. AFM mikroskop firmy NT-MDT Solver NEXT, jedním skenem lze skenovat velké plochy až do rozsahu 100×100 μm a zároveň získat obrázky povrchu s vysokým rozlišením včetně atomárního rozlišení díky speciálnímu nízkonapěťovému módu.

### **7.3.6 Scratch test plus calotest**

Scratch test neboli česky „škrábanec“ se využívá k porovnání adheze povlaku k základnímu materiálu. Na našem přístroji (od firmy CSM dnes Anton Paar), lze vedle běžného nastavení zatěžovací síly a délky měření, navolit i jednotlivé programy užívání a to např. skokové zatěžování nebo mapování povrchu indentorem atd. Zařízení je vybaveno i snímačem akustické emise, jehož záznam signalizuje praskání a lámání vrstvy a tím i místo na měřené dráze na, které se má obsluha zaměřit.

Calotest (od firmy CSM dnes Anton Paar) je zavedenou metodou pro stanovení tloušťky povlaku, může být také aplikován na různé ze souvisejících metod měření a použit k získání dalších informací.

### **7.3.7 Nanoindentace**

K měření nanotvrdosti povlaků používáme zařízení od německého výrobce „Nanotest“. Tento instrumentovaný nanotvrdoměr používá hrot typu Berkovich, má horizontální systém indentace, rozsah zatěžovacích sil je 1–500 mN, rozsah hloubek vpichu 10–10000 nm. Teoretické výpočty pak podle metody Olivera Pharra.

### **7.3.8 Měření drsnosti povrchu**

Pro měření pro drsnosti povrchu a vyhodnocení morfologie byl použit dotykový profilometr Hommel Tester T 1000, který využívá posunu hrotu o vrcholovém rádiu 0,05 mm po vhodně zvolené dráze vzhledem k předpokládané drsnosti povrchu. Naopak program Scandium, vyhodnocuje morfologii ze 3D modelů, které získává složením fotografií při různém stupni náklonu.

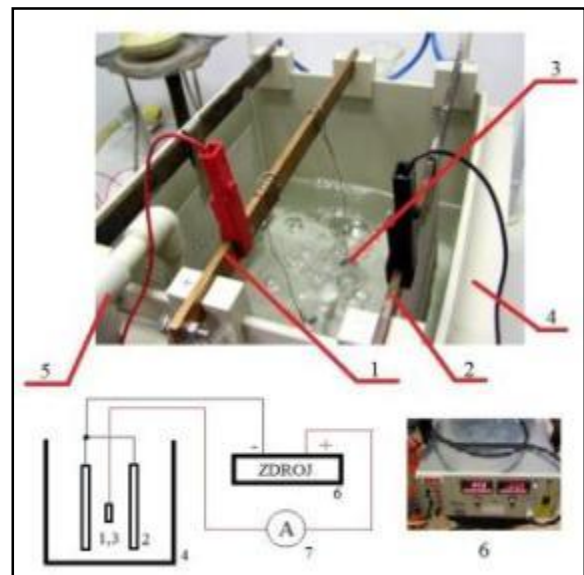
Neupravená data pro vyhodnocení makro- a mikrostruktury byly měřeny na konfokálním mikroskopu OLS3000 (Olympus Ltd., Japonsko). Pro makro-drsnost byl použit objektiv 10xZ1, takže celkové zvětšení objektivu bylo 10x. Pro mikrostrukturu byl použit objektiv 100x s digitálním zoomem Z2, takže celkové zvětšení objektivu bylo 200x.

## 8. Výsledky, mechanické vlastnosti

### 8.1 Příprava povrchu pomocí anodické oxidace

Anodická oxidace probíhala v home-made aparatuře, ve vaně s elektrolytem – viz obr. 21. zdroj stejnosměrného elektrického proudu (NES, Nová Dubnice), anoda – zkušební vzorek, elektroda katody zhotovena z poplatinovaného kovové mřížky. V procesu anodické oxidace byly nastavovány hodnoty anodického potenciálu v rozmezí 10-30 V pomocí zdroje stejnosměrného proudu. Anodický potenciál byl nastavován na konečnou hodnotu postupným náběhem přibližnou rychlostí 100 mV/s. Vzhledem k tloušťce PVD vrstvy a možnosti jejího odleptání byl čas oxidace stanoven na 1 h následně pak na 2h.

Obrázek 21: Schéma zapojení  
oxidační vany: 1- vzorek, 2 –  
platinová katoda, 3 – elektrolyt, 4 –  
vana 6 – zdroj elektrického proudu 7  
– stolní multimetr



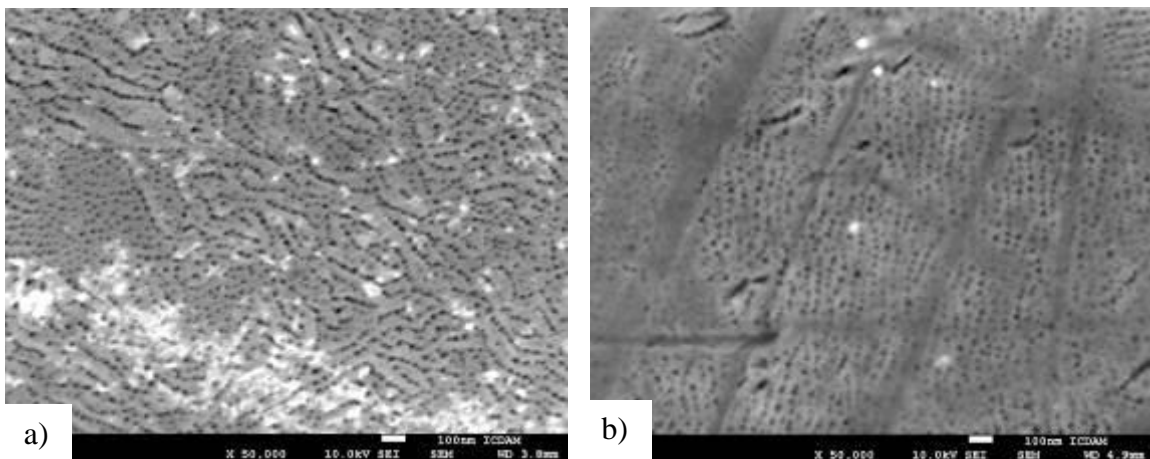
Pro přípravu elektrolytu byl použit roztok 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 0,5 hm%  $\text{NH}_4\text{F}$ . K dosažení této koncentrace bylo zapotřebí smíchání 1000 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 42,8 g  $\text{NH}_4\text{F}$  a 7,56 l destilované vody. Výsledný roztok měl pH 4,7.

### 8.1.1 Anodická oxidace a nanostrukturování povrchu

V této části se zabývám modifikací povrchu a nanostrukturováním oxidické vrstvy pomocí anodické oxidace. Porovnáním anodicky oxidované vrstvy na titan-niobovém povlaku naneseném na Ti, Ti6Al4V a Ti39Nb substrátech spolu se změnami oxidické vrstvy v závislosti na vstupním proudu v elektrolytu. Za pomoci elektronové mikroskopie vyhodnocuji nanostrukturu povrchu.

Byly porovnány snímky struktury z elektronového mikroskopu a morfologie oxidické vrstvy na masivní slitině Ti39Nb a na slitině nanesené PVD procesem na odlišných substrátech Ti (Ti39Nb/Ti) a Ti6Al4V (Ti39Nb/Ti6Al4V). Snímky jsou rozděleny dle velikosti anodického napětí a doby oxidace.

Při větším zvětšení je možné u povlaku na Ti pozorovat jednotlivé póry o velikosti přibližně 10 nm (obrázek 22 a), tvořící se v důsledku působení fluoridových iontů obsažených v elektrolytu. Oxidická vrstva na PVD povlaku na podložce Ti6Al4V vykazuje stejně jako u titanové podložky porézní strukturu se srovnatelně velkými jednotlivými póry (obrázek 22 b).

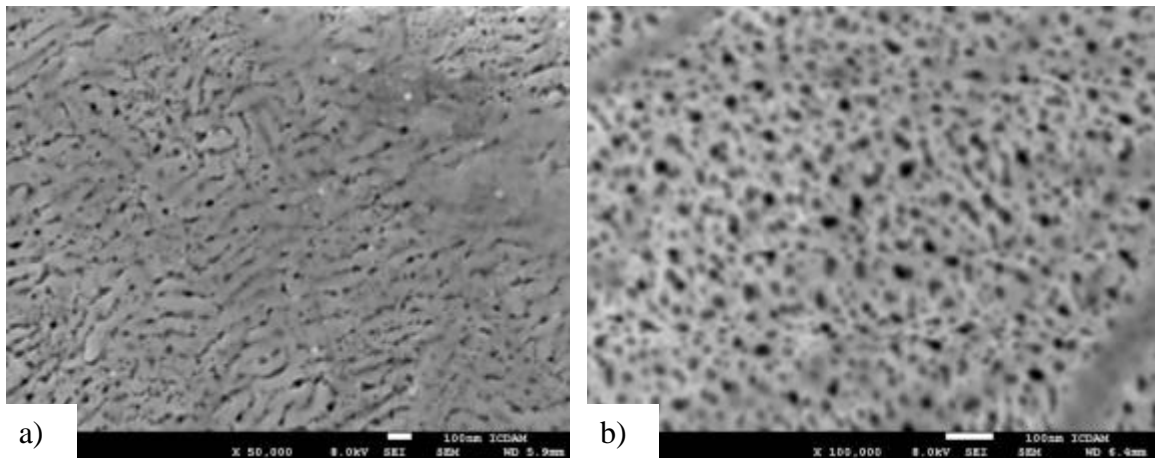


Obrázek 22: SEM snímek anodické oxidické vrstvy anodické napětí 10 V, čas oxidace 1 h, a) Ti39Nb/Ti zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm. b) Ti39Nb/Ti6Al4V zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm.

Po anodické oxidaci při konstantním napětí 20 V je možné pozorovat na povlaku naneseném na Ti substrátu porézní vrstvu oxidů titanu a niobu, která vykazuje podobnou povrchovou strukturu jako v předchozím pokusu

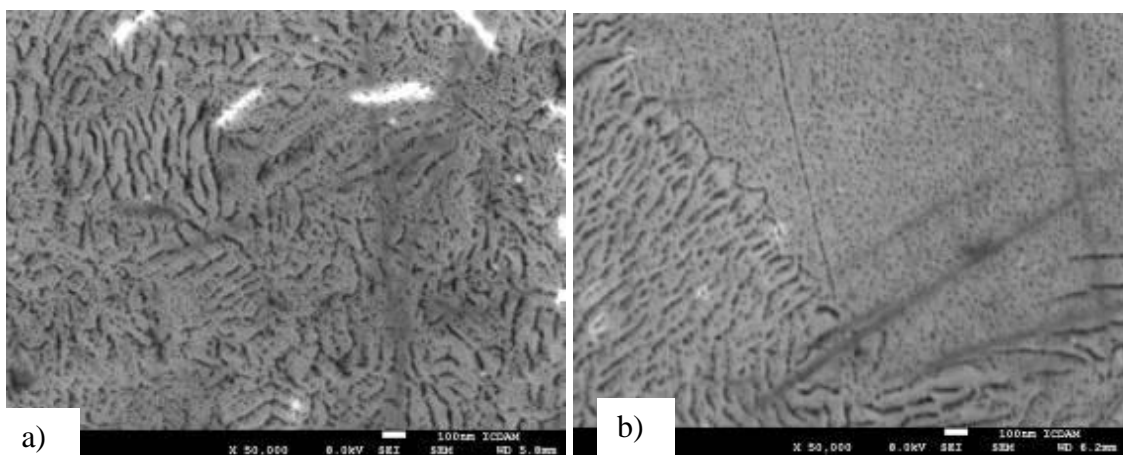
## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

při anodickém napětí 10 V (obrázek 23 a). Pro substrát Ti6Al4V je však již lépe viditelná pórovitá nanostruktura. (obrázek 23 b).



Obrázek 23: SEM snímek anodické oxidické vrstvy pro anodické napětí 20 V, čas oxidace 1 h.; a) Ti39Nb/Ti zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm. b) Ti39Nb/Ti6Al4V zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm.

Při anodické oxidaci povlaku Ti39Nb/ Ti při napětí 30 V (obrázek 24 a) je možné spatřit porézní oxidickou vrstvu, která se liší od předchozích struktur uspořádáním i geometrií. Jednotlivé póry se shlukují a tvoří na povrchu charakteristické zvrásnění, které je rovnoměrně rozprostřeno po celé ploše vzorku. Na SEM snímcích oxidické vrstvy u Ti39Nb/Ti6Al4V jsou patrné hranice zrn fáze  $\alpha$  a  $\beta$ , jenž byly zkopírovány Ti39Nb povlakem při PVD procesu (obrázek 24 b).

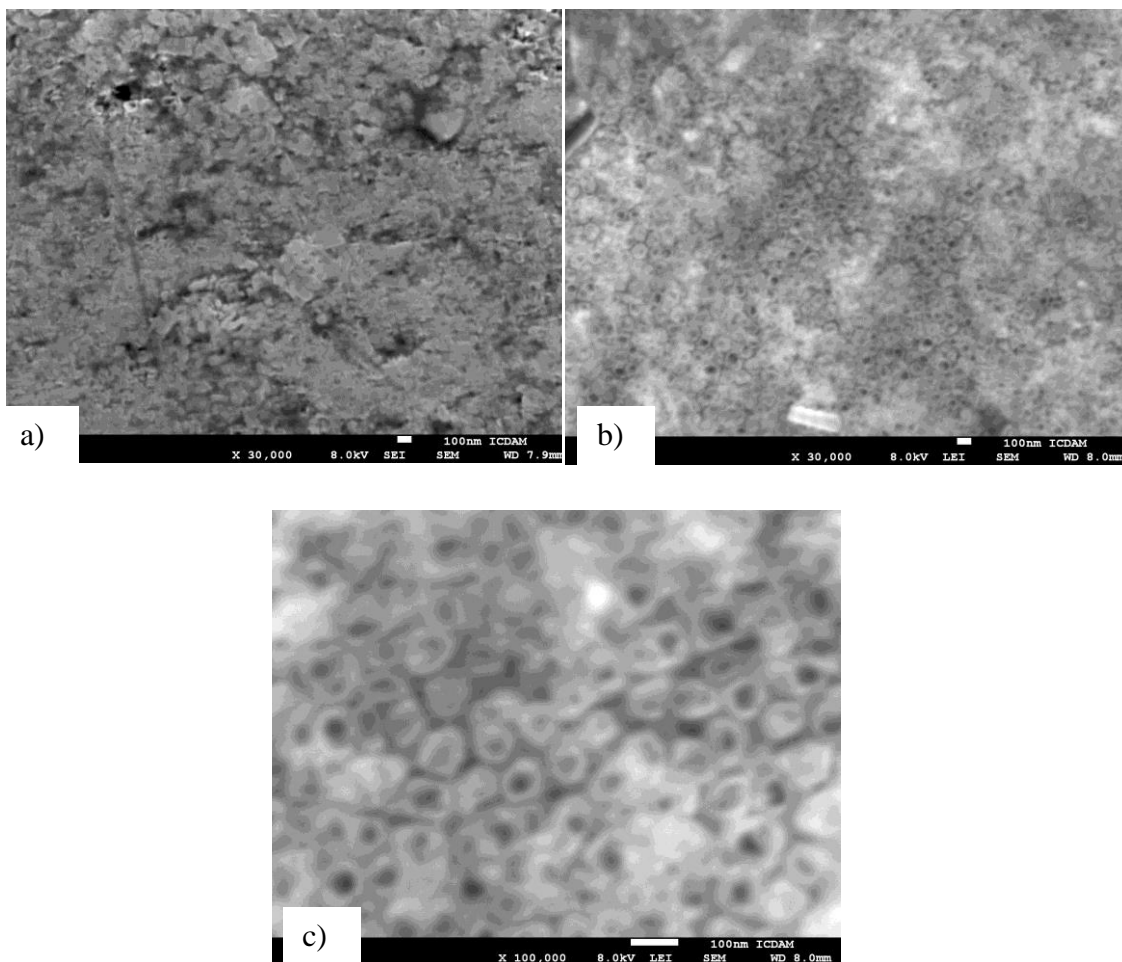


Obrázek 24: SEM snímek anodické oxidické vrstvy pro anodické napětí 30 V, čas oxidace 1 h.; a) Ti39Nb/Ti zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm. b) Ti39Nb/Ti6Al4V zvětšení 50 000x, měřítko 100 nm.

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Struktura vrstvy při anodickém napětí 20 V vykazuje největší hustotu a pravidelnost pórů z provedených experimentů. Na základě těchto zjištění byl čas oxidace prodloužen na 2 hodiny.

Oxidická vrstva na Ti substrátu po 2 hodinách oxidace nedisponuje velkou hustotou pórů, nicméně porézní struktura byla zachována. Na určitých místech je detekován růst nanotrubic  $\text{TiO}_2$  (obrázek 25 a). Oxidická vrstva na Ti39Nb/Ti6Al4V vykazuje naporézní až samoorganizovanou nanostrukturu ve formě nanotrubic (obrázek 25 b, c). Průměr nanotrubic se pohybuje v rozmezí přibližně 50 – 100 nm a rovnoměrně pokrývají povrch vzorku.



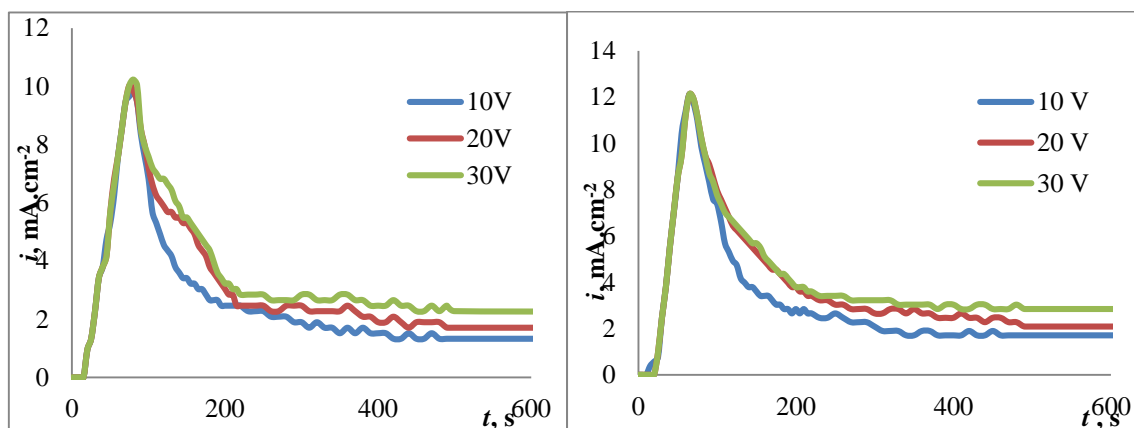
Obrázek 25: SEM snímek anodické oxidické vrstvy pro, anodické napětí 20 V, čas oxidace 2 h, detektor SEI i LEI: a) Ti39Nb/Ti zvětšení 30 000x, měřítko 100 nm. b) Ti39Nb/Ti6Al4V zvětšení 30 000x, měřítko 100 nm, c) Ti39Nb/Ti6Al4V zvětšení 100 000x, měřítko 100 nm

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Kritická pasivační proudová hustota  $i_{kp}$  dosahuje hodnot 11,9 - 12,2 mA.cm<sup>-2</sup> pro Ti39Nb/Ti, respektive 10,2 - 10,4 mA.cm<sup>-2</sup> pro Ti39Nb/Ti6Al4V. Z vypočítaných údajů vyplývá, že při takto zvolených parametrech procesu nemá velikost anodického napětí vliv na velikost kritické pasivační proudové hustoty  $i_{kp}$ .

Velikost anodického napětí ovlivňuje rychlost poklesu proudové hustoty, jejíž pokles je zpomalován s rostoucí hodnotou anodického napětí. Zároveň vyšší hodnota anodického napětí zvyšuje hodnoty pasivační proudové hustoty  $i_p$ .

Hodnota kritické pasivační proudové hustoty  $i_{kp}$  odpovídá v grafické závislosti časovému úseku 65 ÷ 75 s pro povlak Ti39Nb/Ti (Obrázek 26) a 75 ÷ 85 s pro povlak Ti39Nb/Ti6Al4V (Obrázek 27). Ze znalosti těchto údajů a z rychlosti nárůstu anodického napětí lze teoreticky spočítat, že k pasivaci Ti39Nb/Ti povlaku dochází při anodickém napětí 6,5÷7,5 V na Ti39Nb/Ti6Al4V pak při anodickém napětí 7,5 ÷ 8,5V.



Obrázek 26: Průběh proudové hustoty v závislosti na čase při oxidaci Ti39Nb/Ti6Al4V v elektrolytu 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> + 0,5 hm% NH<sub>4</sub> F.

Obrázek 27: Průběh proudové hustoty v závislosti na čase při oxidaci Ti39Nb/Ti v elektrolytu 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> + 0,5 hm% NH<sub>4</sub> F

**Diskuse ke kapitole anodická oxidace:**

Z výsledků anodicky oxidovaných povrchů slitiny Ti39Nb [96] byla prokázána možnost nanostrukturování povrchu oxidické vrstvy beta titanových materiálů, což před tím nebylo jednoznačně prokázáno. TiO<sub>2</sub> na titanových slitinách při přidání fluoridových iontů do elektrolytu při anodické oxidaci tvoří nanostrukturovaný povrch tzv. nanotrubky. Vznikají růstem oxidické vrstvy a zároveň odleptáváním, je možné jejich růst řídit jak do průměru, tak do velikosti trubek. Z výše uvedené diskuze vyplývá, že ve složení oxidické vrstvy beta-titanové slitiny není zastoupeno pouze TiO<sub>2</sub>, ale i oxidy dalších prvků. Tato skutečnost ovlivňuje i růst a formování oxidické vrstvy pro nanostrukturování. Zajímavé je zjištění chování oxidických vrstev na povlacích Ti39Nb nanosených na titanové slitiny. Tento postup byl zvolen pro zlepšení chemické čistoty povrchu, zanesené z předchozích operací (broušení, leštění, atd.). Dále také jako přechodová vrstva mezi základním materiálem a oxidickou vrstvou. Povlak Ti39Nb není neporézní a proto je i oxidická vrstva na povlaku ovlivněna základním materiálem. Další komplikací je změna morfologie povrchu povlaku ve vztahu k základnímu materiálu.

## **8.2 Příprava povrchu termickou oxidací**

Připravené (broušené a leštěné) vzorky Ti39Nb a čistého titanu byly oxidovány v peci při rychlosti ohřevu 10 °C za min<sup>-1</sup> až do 600 °C, přičemž byly vzorky na této teplotě udržovány 60 minut a potom se ochladí rychlostí 10 °C min<sup>-1</sup>. Teplota byla zvolena tak, aby byla nižší než β-přeměna slitiny β-TiNb, aby se zabránilo možnému vysrážení α-Ti (viz Obrázek 3). Některé vzorky Ti (TiNb) byly namočeny před žíháním po dobu 5 minut v čerstvém roztoku Piranha, připraveném z 35 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%, Aldrich) a 15 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, Aldrich) za intenzivního míchání. Podle stupně přípravy a ošetření byly označeny jako: TiNb600 (Ti600) - vzorky



žíhané při 600 ° C bez namáčení v Piranha roztok a TiNbPi600 (TiPi600) - vzorky namočené v roztoku Piranha před žíháním.

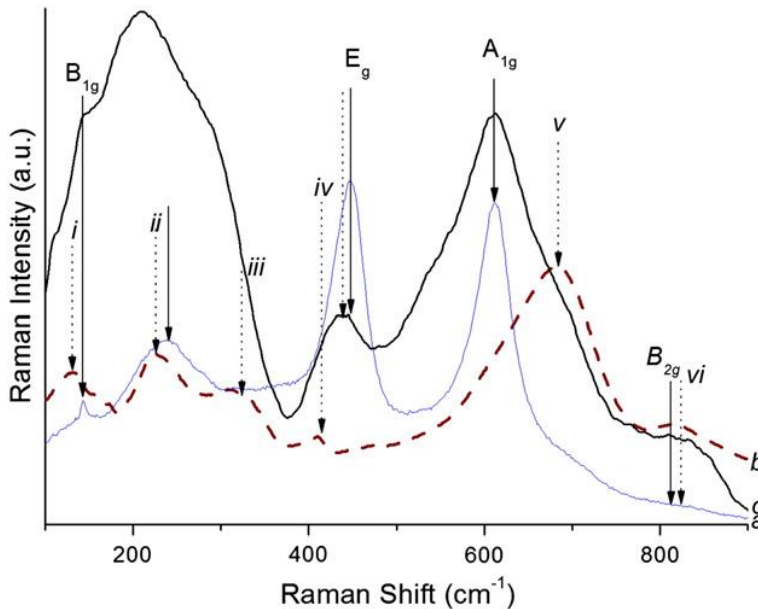
Dále byly použity ještě dvě teploty pro porovnání hlavně morfologie povrchu (165°C a 800°C). Při přípravě vzorků oxidovaných při 165 ° C byly vzorky vloženy do teflonového autoklávu, naplněného 40 ml deionizované vody. Oxidace probíhala za hydrotermálních podmínek při teplotě 165 ° C po dobu 24 hodin. Další série vzorků (Ti a TiNb) byla tepelně oxidována při teplotě 800 ° C v atmosférickém vzduchu v peci LAC LE 15/11. Vzorky byly udržovány uvnitř pece ohřáté na požadovanou teplotu po dobu 8 hodin. Po oxidační úpravě při nastavené teplotě a po zvolený čas probíhá v peci pomalé ochlazování.

### **8.2.1 Termická oxidace titanových slitin**

Povrchy vzorků Ti a slitiny Ti39Nb byly v různém stadiu přípravy oxidické vrstvy byly charakterizovány současným užitím fotoelektronové spektroskopie buzené rentgenovým zářením (XPS), Ramanovy spektroskopie (RS) a měřením závislosti zeta ( $\xi$ ) potenciálu na pH. Byly tak získány poznatky i o mechanismu oxidování povrchů vzorků Piranha roztokem a o závislosti užitého způsobu opracování na počet a aciditu vzniklých povrchových hydroxylových (OH) skupin.

Bylo dokázáno, že oxidované povrchy Ti a slitiny Ti39Nb jsou převážně pokryty oxidem niobičným ( $Nb_2O_5$ ) a oxidem titaničitým ( $TiO_2$ ) ve formě rutilu. Leptáním v Piranha roztoku byly na povrch vzorků zavedeny i sulfátové skupiny, které tvoří amorfní fázi. Na povrchu Ti lze tuto fázi při ohřevu na 600 °C termicky desorbovat za vzniku kladně nabitých poruch povrchové rutilové vrstvy, jež jsou kompenzovány bazickými OH skupinami. Leptání vzorku slitiny Ti39Nb v Piranha roztoku a následným ohřevem na 600 °C vzniká kompaktní termicky stabilní sulfátová vrstva o tloušťce větší, než je hloubka informace XPS (~3 nm). Tuto vrstvu lze odstranit sterilizací ve

vroucí vodě. Takto připravený vzorek slitiny obsahuje velmi málo povrchových OH skupin, jejichž koncentrace je zanedbatelná. Povrch slitiny Ti39Nb oxidovaný bez předchozího leptání v Piranha roztoku obsahuje nejvyšší koncentraci OH skupin, které jsou nejvíce acidické v studované sérii vzorků.

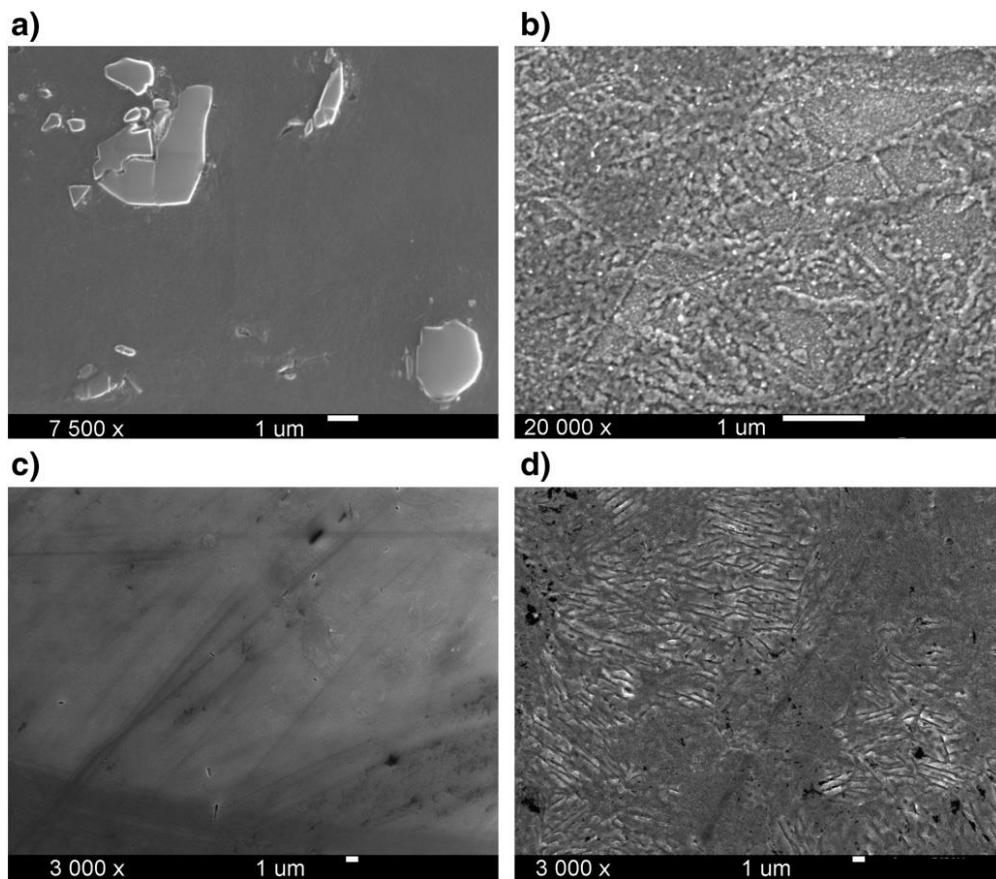


Obrázek 28: Ramanova spektra vzorku Ti600 (a), Nb600 (b) a Ti39Nb600 (c).

Ramanovo spektrum vzorku Ti39Nb600, ve srovnání se spektrem vzorků Ti600 a Nb600 (Obrázek 28). Pozorovaná spektra byla ve shodě s publikovanými údaji. Namáčení vzorků do "Piranha roztoku" a vaření v H<sub>2</sub>O nevyvolaly žádné změny v Ramanových spektrech. Hlavní spektrální vlastnosti ve vzorku Ti600 jasně patří rutilové fázi TiO<sub>2</sub>, slabý pás při 144 cm<sup>-1</sup> (B<sub>1g</sub> zvlnění), široký pás při 234 cm<sup>-1</sup> (multi-fononových procesů, v blízkosti pásu (ii) vzorku Nb600), intenzivní pás při 446 cm<sup>-1</sup> (E<sub>g</sub>), intenzivní pás při 612 cm<sup>-1</sup> (A<sub>1g</sub>) a slabý pás při rameno 825 cm<sup>-1</sup> (B<sub>2g</sub>).

Vzorek Nb600 ukazuje několik slabých široké pásy při 125, 232, 315 a 415 cm<sup>-1</sup>, intenzivní široký asymetrický pás při ~ 690 cm<sup>-1</sup> a slabý široký pás při ~ 830 cm<sup>-1</sup> (viz pásy (i) - (v) v spektra B. Přítomnost těchto skupin poukazuje jednoznačně na orthorhombickou strukturu Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

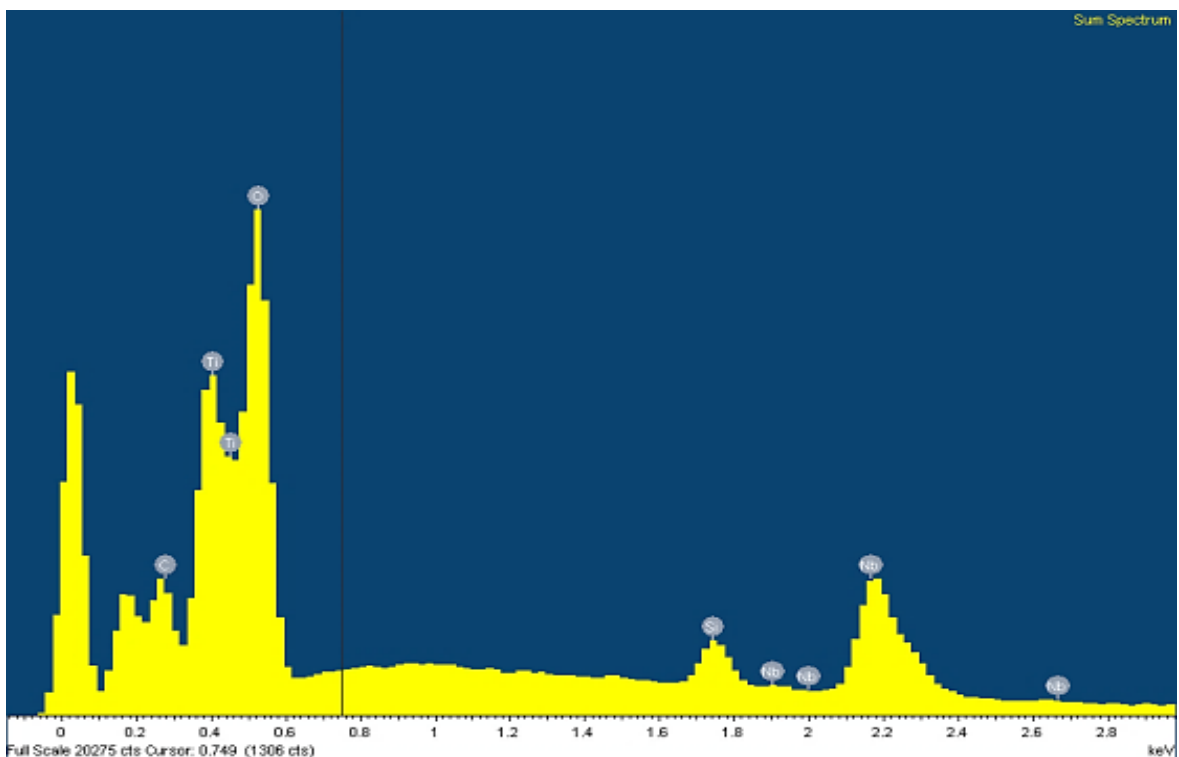
Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace



Obrázek 29: SEM obrázy vzorků (a)  $Ti_{39}Nb_{600}$ , (b)  $Ti_{600}$ , (c)  $Ti_{39}NbPi_{600}$ , (d)  $TiPi_{600}$ .

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Morfologie vzorků je ovlivňována hlavně substrátem materiálu a podle plánu přípravy, včetně všech fází povrchu modifikace. Typické SEM snímky zkoumaných vzorků jsou shrnuty na obrázku 29. Bez leptání roztokem Piranha a po oxidaci se povrchy vzorků Ti39Nb (Ti39Nb600, (a)) jsou hladké a bez struktury. Tento hladký povrch je pozorován až do zvětšení 100000 x. U některých snímků se objevily částičky oxidické vrstvy, která byla pravděpodobně odtrhána. Tyto občasné úlomky (světlé částice na povrchu materiálu) složené z oxidů Ti a Nb (jak odhaduje EDS analýza Obrázek 30). Nicméně, tyto vlastnosti zmizely po oxidaci přípravkem Piranha. Na povrchu vzorku Ti600 byla pozorována komplikovanější struktura na nepravidelnými zrny o rozměrech kolem ~ 100 nm, s malými póry okolo 50 nm.



Obrázek 30: EDS analýza povrchu Ti39Nb600 (termická oxidace při 600°C)

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Vyšší nerovnosti byly pozorovány také u povrchu oxidů na Piranha leptané vzorky. Zde je povrch vzorku TiPi600, (c) má opět výraznější morfologii než vzorek Ti v tomto případě je výraznější morfologie způsobena nejen povrchovou morfologií oxidu, ale také morfologií povrchu po leptání Piranha. Jemná struktura povrchu na obou vzorcích rozměry asi ~ 50-100 nm je velmi podobná jako na povrchu vzorku Ti39Nb.

Termicky oxidované povrchy mají větší plošnou drsnost, a to ve všech měřených rozsazích (makro, mikro i nano - rozměru). Plošná makro a mikro drsnost bylo měřena konfokálním mikroskopem a nanodrsnost bylo měřena pomocí AFM mikroskopu Tabulka 11.

Tabulka 11: Plošná drsnost povrchu Sa a Sds (hustota výstupků) na Ti a Ti39Nb před a po oxidaci.

Parametr	Rozměr	Jed.	Základní materiál		Oxidace 165°C		Oxidace 600°C		Oxidace 800°C	
			Ti	Ti39Nb	Ti	Ti39Nb	Ti	Ti39Nb	Ti	Ti39Nb
Sa	Macro	m	0.08	0.23	0.23	0.38	0.79	0.68	1.98	2.63
	Micro	m	0.009	0.005	0.017	0.080	0.025	0.015	0.096	0.133
	Nano	nm	0.6	2.2	5.8	5.3	5.8	2.0		
Sds	Macro	m <sup>-2</sup>	0.019	0.022	0.018	0.018	0.019	0.020	0.019	0.018
	Micro	m <sup>-2</sup>	6.8	7.5	5.6	7.2	6.6	7.3	6.6	7.2
	Nano	m <sup>-2</sup>			1886	701	1625	3350		

Drsnost se zvyšuje s oxidační teplotou a zároveň je větší na vzorcích Ti39Nb.

**Diskuse ke kapitole termická oxidace:**

Výsledky uvedené v publikaci [97] prezentují měření různých způsobů oxidace beta titanové slitiny Ti39Nbv porovnání s dalšími titanovými slitinami. Povrchy vzorků Ti a Ti39Nbbyly pokryty nativní vrstvou přírodních oxidů (bez úpravy) nebo oxidové vrstvy získanou tepelnou oxidací (v peci 600°C 1 hodina) a kontaminací složenou převážně z uhlovodíků absorbovaných z okolního vzduchu a v důsledku čištění. Jiné znečištění křemíkem (Si), dusíkem (N) a draslíkem (K) na povrchu některých vzorků byla zanedbatelná (~ 0,1%) a není proto zde diskutováno. V souladu s publikovanými výsledky je poměrně vysoká kontaminace uhlíkových sloučenin u vzorků „bez úpravy“ se podstatně snížila po tepelné oxidaci. Nicméně, žádný pozitivní vliv na koncentraci uhlíkových sloučenin v povrchové kontaminaci nebyly zjištěny u ponoření vzorků do Piranha roztoku. Po vaření vzorků v demineralizované H<sub>2</sub>O uhlovodíkové sloučeniny nebyly pozorovány.

Spektrální charakteristiky Ramanova spektra vzorku Ti600 jsou jasné, patří do rutilové fáze TiO<sub>2</sub> - slabého pásma při 144 cm<sup>-1</sup>, široký pás na 234 cm<sup>-1</sup>, intenzivní pás při 446 cm<sup>-1</sup>, intenzivní pás na úrovni 612 cm<sup>-1</sup> (A1g) a slabý pás na rameni 825 cm<sup>-1</sup> (B2g) (viz. Obrázek 28). Spektrum vzorku Nb600 ukazuje několik slabých širokých pásem při 125, 232, 315 a 415 cm<sup>-1</sup>, intenzivní široký asymetrický pás při ~ 690 cm<sup>-1</sup> a slabý široký pás při ~ 30 cm<sup>-1</sup>. Přítomnost těchto pásem jednoznačně ukazuje na orthorhombické Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Ve vlnové délce > 400 cm<sup>-1</sup> spektrum vzorku TiNb600 (Obrázek 28 spektrum c) je lineární kombinace obou výše popsanych spekter čistého TiO<sub>2</sub> (rutil) a T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Tepelná oxidace vzorků slitiny β-Ti39Nb způsobuje pokrytí povrchu dvěma odlišnými krystalickými oxidovými fázemi: T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a rutil. Nebyly nalezeny žádné důkazy o přítomnosti směsné oxidové fáze Ti-Nb, avšak nelze vyloučit podíl amorfni fáze. Povrch vzorku slitiny obsahuje místa spojená s Nb, které jsou obtížně identifikovatelné přímo, vzhledem k jejich poměrně nízké koncentraci. Jejich přítomnost však způsobuje pokles fyziologického potenciálu zeta (ζ)

pH. Lze usuzovat, že některé Nb lokality souvisejí s povrchovými vadami, tj. kladně nabitými tetrahedrálními koordinovanými Nb atomy, které působí jako vodě odolné tzv. Lewisovi centra. Snížení potenciálu zeta ( $\zeta$ ) má a pozitivní vliv na adhezi a následné proliferaci osteoblastové buňky MG 63 na slitině  $\beta$ -TiNb. Leptání Piranha roztokem nevede k dalšímu zlepšení buněčné kolonizace těchto vzorků. Na vzorcích Ti a Ti39Nb ošetřených Piranou, hustota buněčné populace byla dokonce výrazně nižší než na odpovídajících vzorcích oxidovaných pouze zahříváním. Tepelně oxidovaný vzorek Ti39Nb(600 ° C, 60 min) byl nejlepší pro kolonizaci buněk.

Výsledky elektrokinetického měření závislosti pH na Zeta ( $\zeta$ -) potenciálu byly použity k charakterizaci vrcholu povrch vzorků Ti600 a TiNb600, tj. vzorky s nejméně kontaminovaných povrchů. Podle odhadovaných hodnot izoelektrických bodů (IEP), povrchu vzorku TiNb600 (IEP =  $3,4 \pm 0,1$ ) byl více kyselý než povrch vzorku Ti600 (IEP =  $4,1 \pm 0,1$ ). Méně negativní hodnoty potenciálu byly nalezeny v oblasti fyziologické oblasti pH pro vzorek slitiny TiNb. Některé z atomů Nb tedy zůstávají v nejvyšším bodě povrchu vzorků TiNb600 i po žíhání na 600 ° C. Povrchový náboj vzorků TiNb600 je méně negativní ( $\zeta \sim -48$  mV) než povrchový náboj vzorku Ti600 ( $\zeta \sim -60$  mV) při fyziologickém pH. Tento účinek může být zodpovědný za vyšší hustotu buněčné populace zjištěné na vzorku TiNb600.

### **8.3 Povrchové a strukturní vlastnosti povlaku**

Byl studován vliv změny substrátu na povlakovaný materiál. Vzorky Ti, Ti39Nb, Ti6Al4V a Fe byly naprášeny povlakem Ti39Nb. Byly sledovány případné změny základních mechanických parametrů, jednak substrátu a pak i povlaku (metoda XPS a elektronová mikroskopie).

Tabulka 12 uvádí seznam a změřené základní charakteristiky používaných materiálů pro přípravu oxidických vrstev a zároveň slouží jako substrát pro

*Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

přípravu povlaku Ti39Nb. Mechanické vlastnosti spolu s morfologií povlaku Ti39Nb na různých substrátech se liší což ukazuje

Tabulka 13. Tuto změnu se snažím částečně ve své práci vysvětlit. Způsob označování pak je např. Ti (substrát)/ TiNb (povlak Ti39Nb slitiny)

### 8.3.1 Proces nanášení povlaku Ti39Nb

V experimentální části se byl nanášen povlak Ti39Nb technologií PVD (Physical Vapour deposition) a to magnetronovým naprašováním v zařízení Hauser Flexicoat 850 Obrázek 31. Jedná se o duplexní povlakovací zařízení, které umožňuje využití metody PVD, CVD a iontové nitridace.



Obrázek 31: Zařízení Hauser Flexicoat 850





Obrázek 32: Target, ze kterého se odprašuje materiál.

Povlak Ti39Nb byl nanášen technologií PVD ( Physical Vapour deposition) a to magnetronovým naprašováním. Výsledkem je tenký povlak v řádu mikrometrů, jehož mechanické vlastnosti byly také předmětem výzkumu.

Použité zařízení: Hauser Flexicoat 850 Techno coating

Proces povlakování probíhal v zařízení Hauser ve 4 stupních.

Stupeň 1 - Předehřev - (Heating): Dohází k vypumpování plynu z komory za daného tlaku a zároveň k zahřátí na pracovní teplotu 250 °C

Stupeň 2 - Čištění targetu - (Target cleaning):

Stupeň 3 - PSE – Plasma source etching - Type: Glow discharge (doutnavý výboj):

Produkt se čistí za pomoci plasmy, průtok plynu – Argonu je 50 [sccm].

-magnetrony

- doutnavým obloukem – ionty

Princip čištění spočívá v tom, že se zapne doutnavý výboj a za pomoci iontů se očistí substrát tzv. *Glow discharge* po dobu 20 minut.

Bias:

Je označení pro zápalné napětí přiváděné na stolek. Podle velikosti ve [V] se odprašuje. Pokud by byla malá energie, ionty by se neodrazily zpět, ale zůstaly by implementovány na vzorcích. Proto je zapotřebí velké energie, aby se odrazily zpět a došlo tak k očištění. Při tomto procesu se otáčí stůl se vzorky.

Síla plasmy se udává v ampérech [A], plasma current je pulsní napětí značené PLS bylo 60 A.

Stupeň 4- Povlakování - (Coating) -Depozice:

Tloušťka povlaku je určena výkonem katody a dobou depozice. DC = stejnosměrné napětí, použijeme napětí 75 V, jelikož nechceme odprášit více materiálu, proto nastavujeme nižší napětí. Průtok plynu je 90 cm<sup>3</sup> (Argon), ten udává pracovní tlak depozice, tj. 2.10<sup>-3</sup> mbar, což je ideální hustota, aby došlo k naprášení, čas povlakování 150min., rychlost otáčení vzorku v komoře 2 ot/min..

*Poznámka:* Menší průtok plynu by znamenal více kinetické energie, což způsobí více iontových srážek, nebrzdí se mezi sebou a lépe prochází plasmou.

Na katodě je našroubovaný target s kovem, nastavení katody je v kW, zde 4kW.

*UBM Coil* = Unbalanced magnetron coils (nevyvážená magnetronová cívka). Kolem katody je namotaná cívka 5 A, která vytváří uvnitř další magnetické pole, pomáhá směřovat ionty na stolek, aby došlo k lepšímu naprašování.

*Tabulka 12: Popis používaného základního materiálu (základní vybrané charakteristiky)*

Substrát	Fáze substrátu	Chemické složení	Drsnost povrchu substrátu Ra [ m]	Modul pružnosti E <sub>r</sub> [MPa]	Tvrdość substrátu (GPa)
Ti39Nb	Ti – beta	Ti + 39wt.%Nb	0.058+/- 0.006	95+/-2.5	3.1+/-0.09

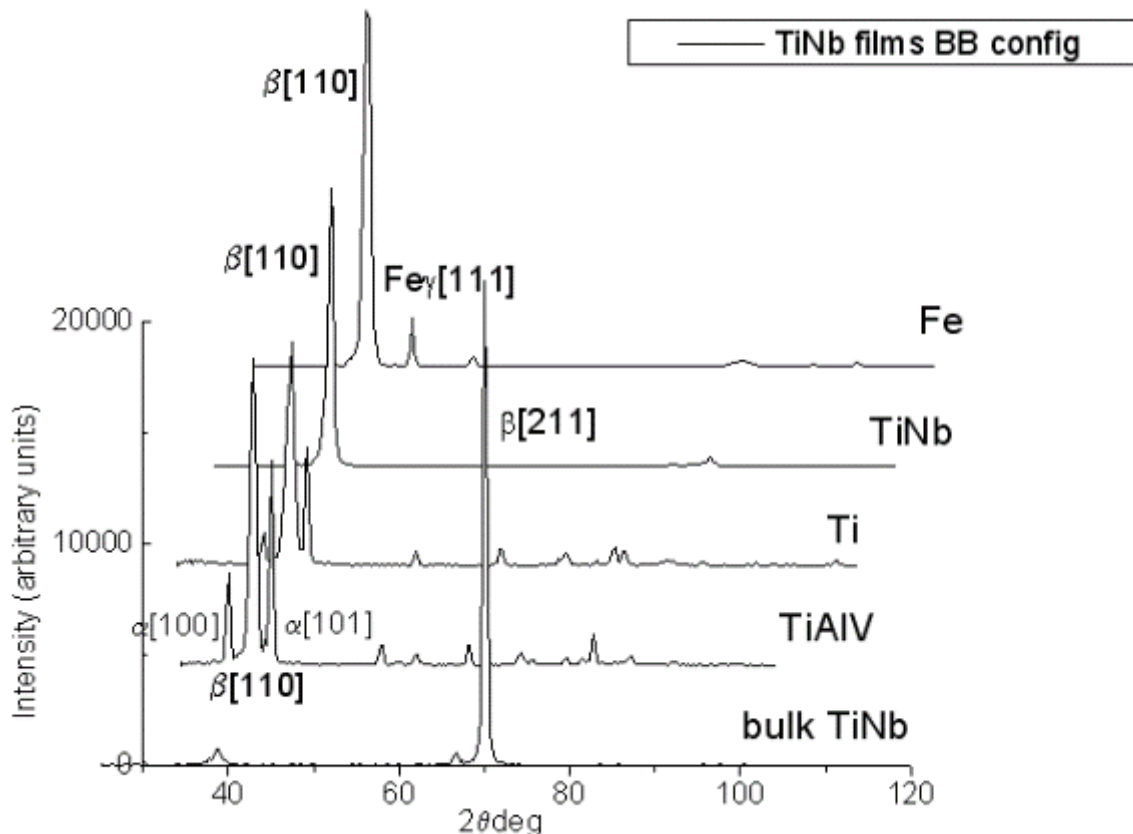
*Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

Ti	Ti –alpha	Ti	0.047+/- 0.005	135+/-2.1	2.3+/-0.1
Ti6Al4V	Ti – alpha+beta	Ti + 6wt% Al, 4wt.%V,	0.035+/- 0.003	143+/-1.3	4.0+/-0.11
Steel	Austenite	Cr 17-19, Ni 13-15, Mo 2.25- 3.0, C 0.03	0.013+/- 0.005	216+/-2.6	4.5+/-1.18

*Tabulka 13: Tabulka vybraných parametrů a vlastností Ti39Nb povlaků pro různé substráty*

Substrát	Modul pružnosti E <sub>r</sub> [MPa]	Tvrdość povlaku [GPa]	Drsnost povlaku Ra [ m]
Ti39Nb	100+/-2.5	3.8+/- 0.14	0.093+/- 0.047
Ti	116+/-3.37	4.1+/-0.22	0.13+/-0.008
Ti6Al4V	115+/-3.15	4.1+/-0.19	0.10+/-0.005
Steel	127+/-3.88	4.38+/-0.28	0.08+/-0.012

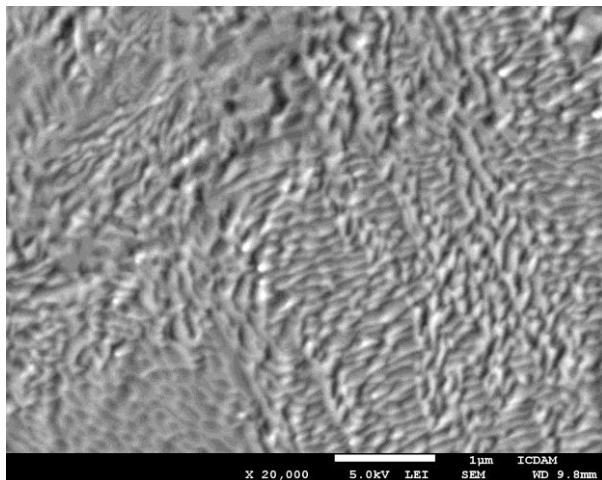
### 8.3.2 X-ray difrakce



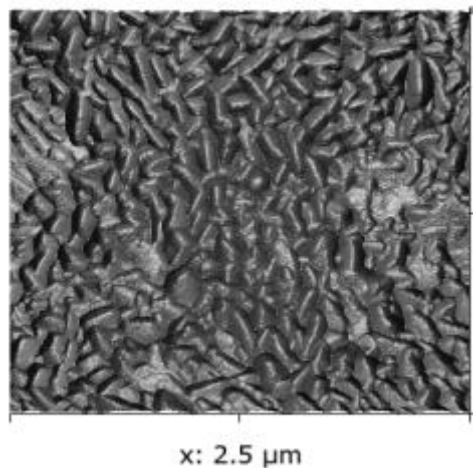
Obrázek 33: X-ray difrakce Ti39Nb vrstev na různých substrátech [98]

Uspořádání BB rentgenového měření přednostně zobrazuje krystalografické roviny rovnoběžné se substrátem. Difraktogramy BB (Obrázek 33) ukazují strukturu BCC a silnou (110) texturu na všech povlacích. To je obvyklé pro vrstvy TiNb a pro jiné podobné povlaky [99]. PB geometrie využívá konstantní úhel dopadu primárního paprsku a bylo provedeno pouze snímání detektoru (2 $\theta$  skenování). To umožňuje stálou penetrační hloubku rentgenového paprsku do vzorku. V PB geometrii se v difraktogramech objevily zejména linie  $\beta$ -fáze TiNb vrstev (viz příloha této práce) a pro konfiguraci BB se objevila stejná struktura. Kromě toho se pro všechny filmy měřené pomocí geometrie PB (obr. 1b) objevily linky (002) a (112)  $\omega$  fáze Ti.

### 8.3.3 SEM a AFM povrchu Ti39Nb vrstvy

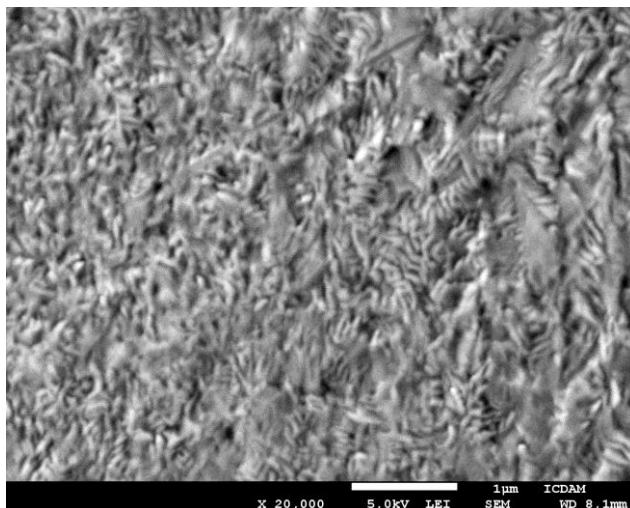


Obrázek 34: SEM Ti39Nb/Ti39Nb

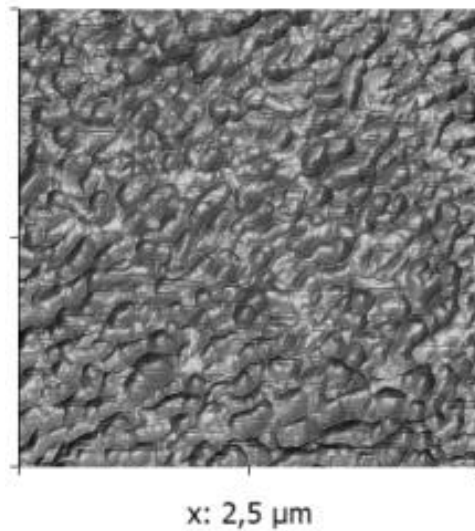


Obrázek 35: AFM Ti39Nb/Ti39Nb

Morfologie na Ti39Nb vrstvě je zvlněná s pravidelnými vzdálenostmi jednotlivých "vln" (odlišné Ti39Nb a ocelovém substrátu Obrázek 40 a 41). Při vyšším zvětšení je vidět i jiný charakter vlny na Ti39Nb, namísto vln jsou přítomny plochá místa a málo poklesů.

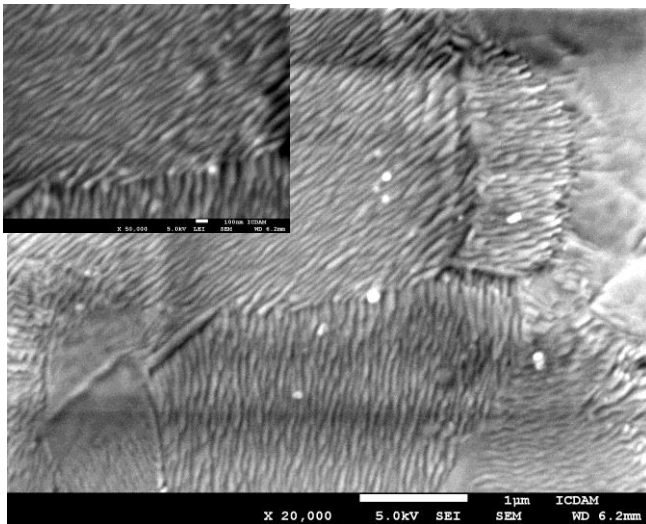


Obrázek 36: SEM Ti39Nb/Ti

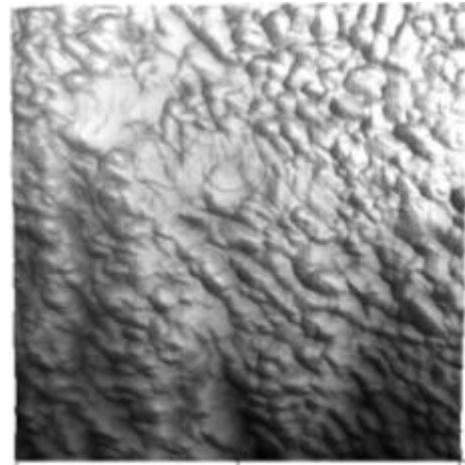


Obrázek 37: AFM Ti39Nb/Ti

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

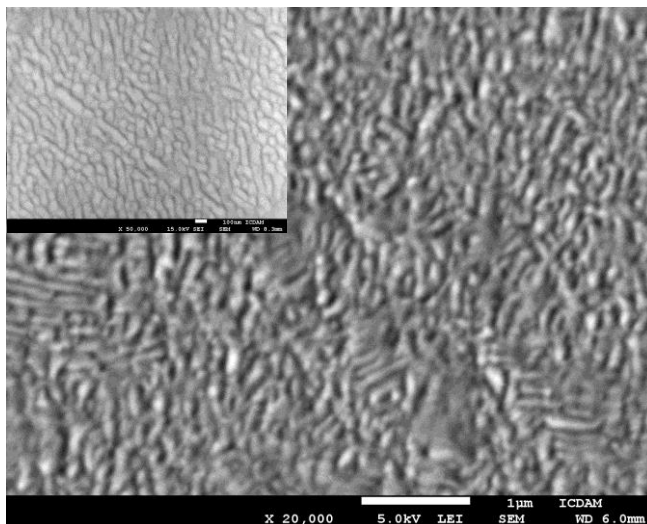


Obrázek. 38: SEM Ti39Nb/Ti6Al4V ve výřezu  
50 000x

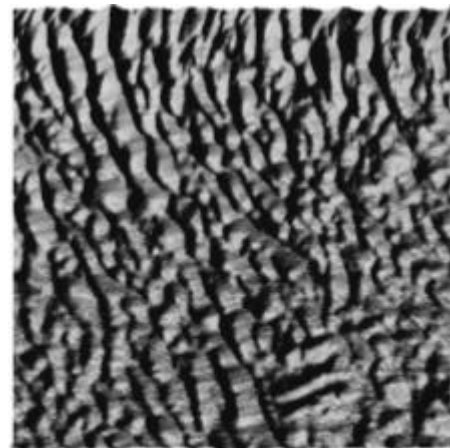


Obrázek. 39: AFM Ti39Nb/Ti6Al4V

y: 2,5 µm



Obrázek 40: SEM Ti39Nb/Fe ve výřezu  
zvětšení 50 000x



Obrázek 41: AFM Ti39Nb/Fe

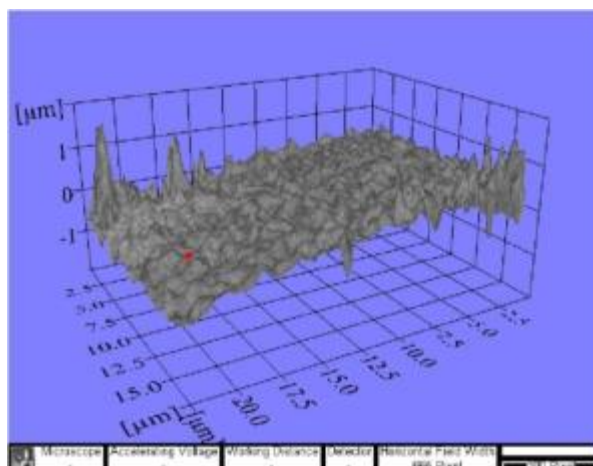
x: 2,5 µm

Je třeba vzít v úvahu, že se fázové struktury substrátů značně liší (alfa titan má krystalovou strukturu hexagonální (HCP) a beta titan kubickou prostorově středěnou mřížku (BCC)), a to může silně ovlivňovat růst vrstvy. Například při Ti39Nb / Ti6Al4V Obrázek. 38 a 39 to může být dobře vidět, že typ růstu zrn souvisí s různými fázovými změnami podkladu.

### 8.3.4 Drsnost povrchu povlaku a substrátu

Cílem bylo zhodnotit změnu drsnosti povrchu základního materiálu před povlakováním a na povlaku Ti39Nb. Porovnat vybrané parametry drsnosti při měření dotykovou a bezdotykovou metodou na povlaku Ti39Nb.

Leštěné základní materiály bez povlaku (Fe, Ti a Ti6Al4V) a následně ty samé podklady povlakované Ti39Nb. Měřeno



Obrázek 42: Ukázka 3D povrchu z programu Scandium

dotykovým profilometrem Hommel tester a bezdotykovou metodou v programu Scandium Obrázek 42 v rámci elektronového skenovacího mikroskopu při zvětšení 3000x a 5000x.

Tabulka 14: Aritmetické průměry vybraných parametrů drsnosti povrchu pro všechny vzorky (základní materiál versus povlak) měřené dotykovou a bezdotykovou metodou

Vzorek	Metoda	Parametry ( $\mu\text{m}$ )				
		$R_t$	$R_a$	$R_q$	$R_z(\text{DIN})$	$R_{Sm}$
Fe	Dotyková	0,1900	0,0133	0,0167	0,1133	0,0063
	Bezdotyková 3000x	0,1623	0,1860	0,2520	0,6096	0,5823
	Bezdotyková 5000x	0,1517	0,2177	0,2647	0,6287	0,4433
Ti39Nb na Fe	Dotyková	0,1633	0,0100	0,0167	0,0967	0,0063
	Bezdotyková 3000x	0,7367	0,1030	0,1297	0,5037	1,0390
	Bezdotyková 5000x	0,1737	0,0243	0,0310	0,1193	0,5720
Ti	Dotyková	1,7033	0,0467	0,0767	0,7133	0,0203
	Bezdotyková 3000x	0,6283	0,0773	0,1060	0,4267	0,8867
	Bezdotyková 5000x	0,3307	0,0633	0,1017	0,4100	0,6077
Ti39Nb na Ti	Dotyková	0,8600	0,0300	0,0400	0,4067	0,0157
	Bezdotyková 3000x	0,2267	0,0200	0,0300	0,1133	0,8833
	Bezdotyková 5000x	0,2133	0,0200	0,0300	0,1200	0,6000
Ti6Al4V	Dotyková	0,4533	0,0300	0,0400	0,2800	0,0160
	Bezdotyková 3000x	0,4990	0,3217	0,4890	0,4457	3,3433
	Bezdotyková 5000x	1,3383	0,1307	0,1940	0,6897	0,6173
Ti39Nb na Ti6Al4V	Dotyková	0,1667	0,0200	0,0200	0,1467	0,0091
	Bezdotyková 3000x	1,0977	0,1073	0,1547	0,6310	1,0800
	Bezdotyková 5000x	0,3227	0,0280	0,0387	0,1540	0,7217

V Tabulka 14 porovnávám změnu v drsnosti povrchu povlaku Ti39Nb v závislosti na změně substrátu na který byl daný povlak nanášen.

Měřením bylo zjištěno, že aplikací povlaku Ti39Nb metodou PVD vykazují všechny vzorky mnohem nižší hodnoty všech parametru drsnosti.

Hodnota  $R_t$  udávající součet nejvyššího výstupku a nejnižší prohlubně profilu je u vzorků s povlakem Ti39Nb nižší než u vzorků bez povlaku. Parametr  $R_q$ , který udává střední kvadratickou úchylku profilu, je nižší u vzorků po aplikaci povlaku Ti39Nb. Výška nerovnosti profilu a střední hodnota nerovností profilu  $R_a$  v rozsahu vyhodnocované délky byla rovněž nižší u vzorků s povlakem.

#### **Diskuse pro kapitolu vlastnosti povlaku:**

Morfologie a struktura vrstev na kovových substrátech jsou obecně definovány materiálem povlaku [100], způsobem a podmínkami pro přípravu povlaku a také povrchem substrátu strukturou a chemickými vlastnostmi. V našem případě materiál povlaku a metoda přípravy byla pro všechny vrstvy identická a měnily se pouze substrátové materiály. I když krystalografická struktura Ti39Nb filmů je prakticky totožná liší se však morfologie povrchu vrstvy poměrně značně. Výsledky ukazují, že drsnost všech Ti39Nb filmů je až pětikrát vyšší než drsnost podkladu. Mohou pro to být různé důvody. Pravděpodobně může být způsobena i tzv. bucklingem neboli pravidelným narušením plochého povrchu, který se obvykle objevuje jako pole hřebenů a údolí přítomných na povrchu [101]. Tyto procesy mohou být způsobeny i tahovým napětím, které může vznikat i různým koeficientem tepelné roztažnosti substrátu a filmu. „Buckling“ obvykle probíhá s delaminací nebo bez delaminace filmu. U filmů Ti39Nb na substrátech TiNb, TiAlV a Fe, kde se objevilo periodické zvlnění, je



předpoklad, že nedochází k delaminaci vrstev, protože tloušťka je větší než typická délka zvlněného povrchu. Vysoká plasticita materiálu vrstvy také snižuje možnost delaminace.

Nepravidelný růst vrstvy je druhou možnou příčinou změny morfologie povrchu [102]. Tento jev by mohl částečně vysvětlit odlišný průběh drsnosti povlaku na substrátu Ti. Morfologie filmů Ti<sub>39</sub>Nb na substrátu Ti je poněkud odlišná od morfologie filmu na substrátu TiNb. Jeho povrch se skládá z poměrně plochých oblastí (asi 1  $\mu\text{m}$  veliké) místy s jemným zvlněním a oblasti s nanostrukturovaným systémem pórů a vrcholků (cca 100 nm). Tento rozdíl v růstu povlaku Ti<sub>39</sub>Nb může být způsoben nižší teplotou povrchu tohoto substrátu vzhledem k jeho vyšší vodivosti, vyššímu koeficientu tepelné vodivosti a vyššímu chlazení během růstu filmu (v tomto případě zejména na Ti). Vzhledem k nižší teplotě povrchu, průměrná kinetická energie Ti a Nb atomů klesá, to znamená, že jejich volná dráha na povrchu také klesá (což vede k nižšímu potenciálu zejména při nerovnostech povrchu a energetické mezery, např. na hranicích zrna). Kromě toho je naměřená drsnost Ti<sub>39</sub>Nb povlaku největší na substrátu Ti. Mohou se také objevit místa s jemným zvlněním kvůli vnitřní hodnotě napětí ve vrstvě, které je nejvyšší ze všech substrátů. Všechny naprášené Ti<sub>39</sub>Nb povlaky mají v souladu se složením slitiny Ti<sub>39</sub>Nb (39% hmotn. Nb) strukturu kubickou prostorově středěnou (BCC). Povlaky na všech použitých substrátech mají texturu (110), jak bylo změřeno rentgenovou difrakcí. U kovů s krystalografickou strukturou BCC, je rovina (110) rovina s nejnižší povrchovou energií.

## **8.4 Tribologické testy a mechanické vlastnosti oxidických vrstev**

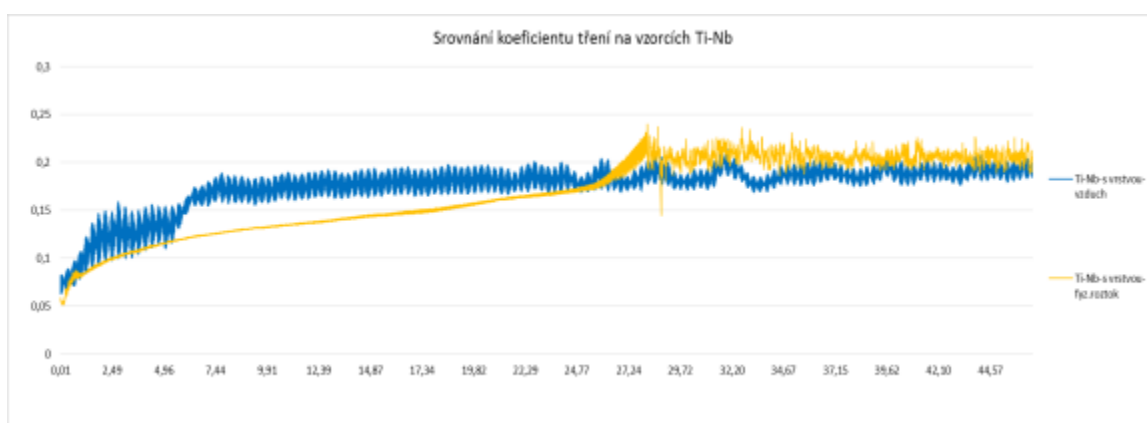
Cílem tohoto výzkumu byla příprava, oxidické vrstvy jako vhodné povrchové úpravy, metodou magnetronového naprašování na slitinu Ti<sub>39</sub>Nb, Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V a Ti a měření tribologických vlastností oxidické vrstvy metodou PIN-ON-DISK Tabulka 15.

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

Tribologická měření byla prováděna na tribometru THT-S-CE 0000 výrobce CSM. Pro lepší představu chování implantátu v ne-suchém prostředí bylo zvoleno porovnání výsledků s měřením ve fyziologickém roztoku Obrázek 43. Fyziologický roztok se vytvořil z tablet v prášku s názvem „Phosphate buffered saline“ od výrobce SIGMA-ALDRICH. Dávkuje se jedna tableta na 200 ml vody. Od každého materiálu (Ti, Ti39Nb, Ti6Al4V) byly k dispozici 2 vzorky bez oxidické vrstvy a 2 vzorky s oxidickou vrstvou. Celkem bylo k dispozici 12 vzorků. Od každého materiálu se jeden vzorek měřil na vzduchu a druhý vzorek ve fyziologickém roztoku.

Tabulka 15: Podmínky tribologické zkoušky

	Prostředí: vzduch	Prostředí: fyz. roztok
Poloměr stopy	4 mm	2 mm
Zatížení	5 N	5 N
Počet otáček	5000	5000
Obvod. rychlost	6 cm/s	6 cm/s
Průměr kuličky	6 mm	6 mm
Materiál kuličky	Al2O3	Al2O3

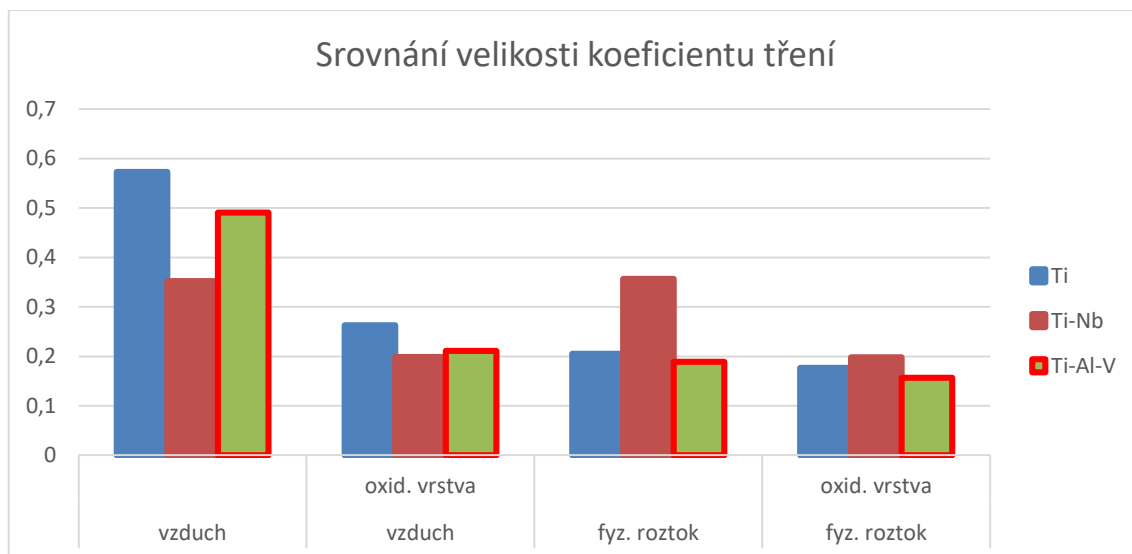


Obrázek 43: Ukázka srovnání koeficientu tření (materiálu Ti) s výraznou stopou porušení oxidické vrstvy

Na shora uvedeném grafu je zachycena pouze třetina celé tribologické zkoušky. Z důvodu porušení oxidické vrstvy je třeba porovnat

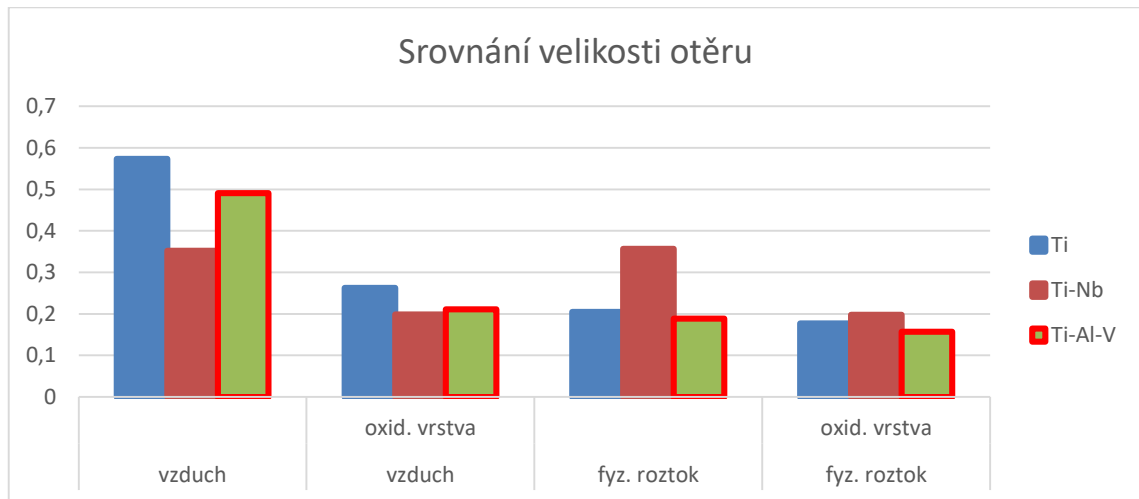
## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

počáteční stavy a najít místo porušení. Následně byly uvažovány pouze hodnoty do porušení oxidické vrstvy.



Obrázek 44: Srovnání průměrných naměřených hodnot koeficientu tření

Nejvyšší hodnotu ze srovnávaných tří materiálů má při měření na vzduchu první vzorek - materiál Ti. Při měření ve fyziologickém roztoku materiál Ti dosahuje nižšího koeficientu tření. Tento trend je patrný i u ostatních materiálů. Nižší hodnoty koeficientu tření se dosáhne vždy u materiálů, které jsou vloženy do fyziologického roztoku. Tento poznatek se týká nejen všech materiálů bez oxidické vrstvy, ale stejné chování je patrné i na vzorcích s oxidickou vrstvou. Tzn. materiál s oxidickou vrstvou měřený ve fyz. roztoku má nižší koeficient tření než tentýž materiál měřený na vzduchu Obrázek 44.



Obrázek 45: Srovnání objemu opotřebení na jednotlivých materiálech

Objem opotřebení byl počítán dle normy ASTM G99-04 z průměru stopy po kuličce Obrázek 45

Z porovnání je zřejmé jednak to, že kapalina napomáhá snížení velikosti opotřebení, jednak to, že oxidická vrstva, ať už na vzduchu nebo v kapalině snižuje otěr. Nižší hodnoty otěru u oxidických vrstev jsou dány vyšší tvrdostí; viz teoretická část. Např. materiál Ti39Nb s oxidickou vrstvou dosahuje polovičního otěru oproti materiálu bez oxidické vrstvy a totéž platí i pro materiál s vrstvou nebo bez ní ve fyziologickém roztoku. Rovněž tak při srovnání materiálu Ti39Nb bez oxidické vrstvy měřeného na vzduchu a ve fyziologickém roztoku je patrné, že vliv fyziologického roztoku na snížení opotřebení je značný.

### Diskuze pro kapitolu tribologické testy:

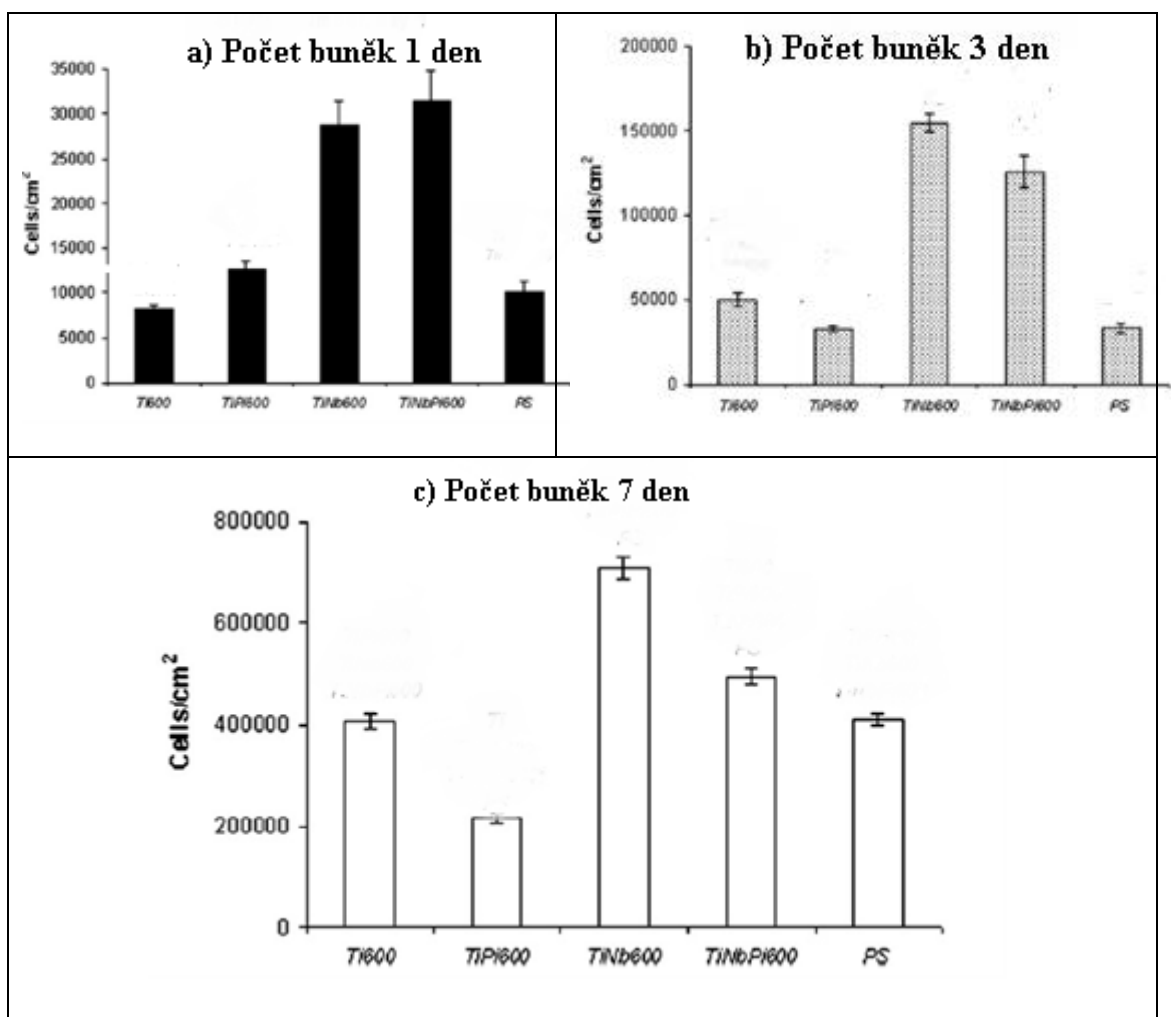
Řešení tribologických vlastností je důležité pro uplatnění implantátů v kluzných aplikacích. Z měření tribologických vlastností základních materiálů vyplývá, že vyšší hodnotu koeficientu tření má při měření na vzduchu materiál Ti oproti Ti39Nb a TiAlV. Zajímavé je, že při měření ve fyziologickém roztoku je to obráceně. Tento jev lze vysvětlit nižší tvrdostí oxidické vrstvy na vzorcích TiNb. Nižší hodnoty koeficientu tření se dosáhne vždy u materiálů, které jsou vloženy do fyziologického roztoku oproti tření

### *Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

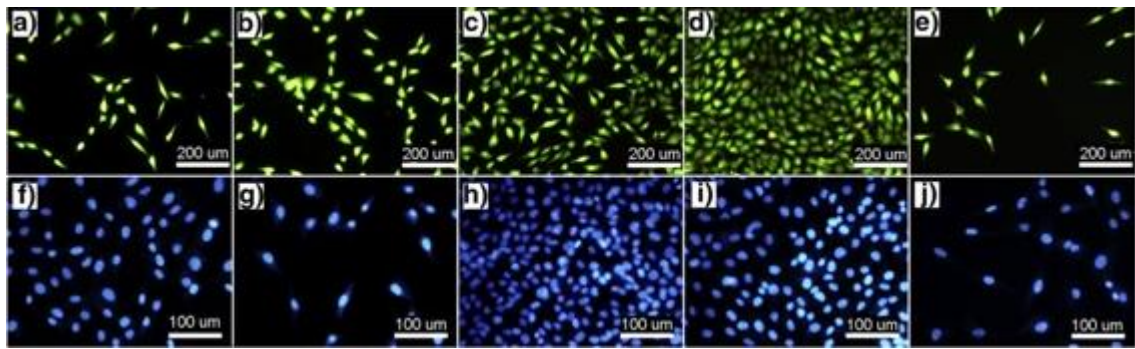
na vzduchu. Tento poznatek se týká nejen materiálů bez oxidické vrstvy, ale stejné chování je patrné i na vzorcích s oxidickou vrstvou. To znamená, že materiál s oxidickou vrstvou měřený ve fyziologickém roztoku má nižší koeficient tření než tentýž materiál měřený na vzduchu. Obecně lze sledovat snižující se hodnotu koeficientu tření od materiálů bez vrstvy a pouze na vzduchu až po materiál s oxid. vrstvou ve fyziologickém roztoku, který má nejnižší hodnotu koeficientu tření. Při pozorování materiálů s oxidickou vrstvou je patrné, že tato vrstva rovněž výrazně snižuje koeficient tření. To může být dáno vyšší tvrdostí oxidické vrstvy oproti základnímu materiálu.

## 8.5 Biologické testy

Z osteointegračních experimentů plyne pozitivní vliv přítomnosti Nb v povrchové vrstvě vzorku. K hodnocení byly použity počty buněk ve třech časových intervalech (1., 3. a 7. den po nasazení). Z výsledků vyplývá, že přítomnost Nb zlepšila počáteční adhezi a proliferaci kostních MG 63 buněk. Buňky byly dále 1. i 7. den po nasazení vysoce životaschopné (viabilita se pohybovala mezi 85-95%). Doba zdvojení se na těchto vzorcích v posledním sledovaném intervalu snížila, z čehož lze usuzovat, že buňky pravděpodobně vstoupily do fáze diferenciací [97].

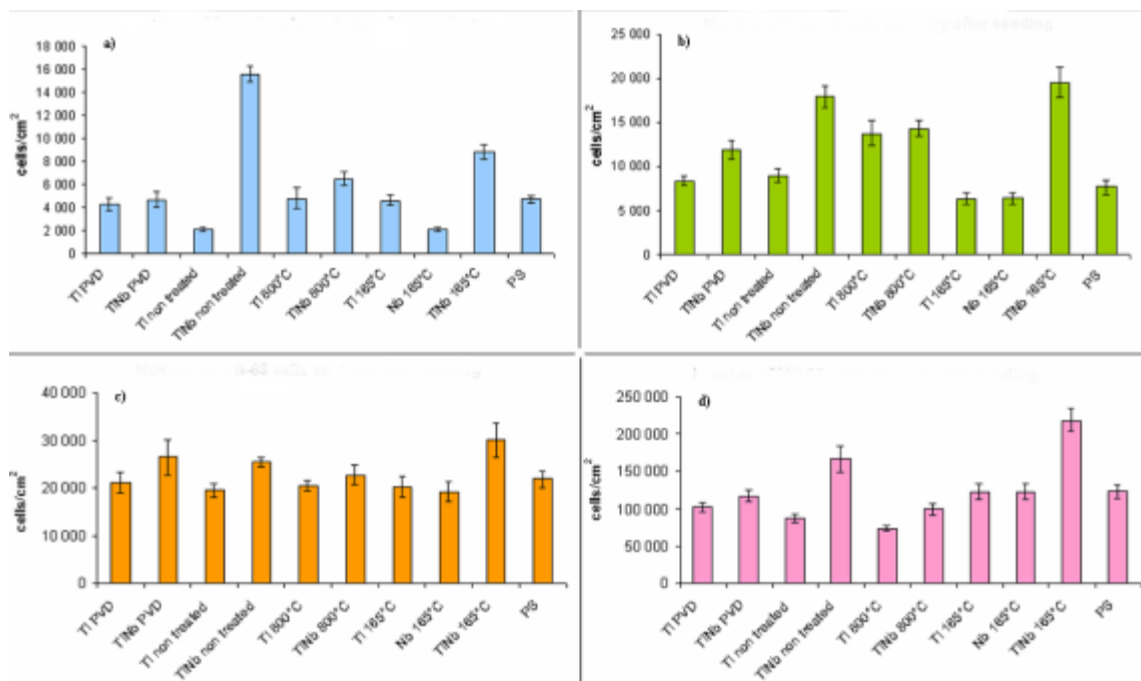


Obrázek 46: Počet lidským osteoblastům podobných MG 63 buněk ve dnech 1, 3 a 7 po nanesení na vzorky Ti a Ti39Nb a po tepelné oxidaci při teplotě 600 °C (Ti600 a Ti39Nb600), spolu s vzorky leptanými roztokem Piranha (Pi) před tepelnou oxidací (Ti600 + Pi a Ti39Nb600 + Pi, v uvedeném pořadí). Průměr ± SEM. (Standardní odchylka průměru) od 3 vzorky (celkem 9 měření)

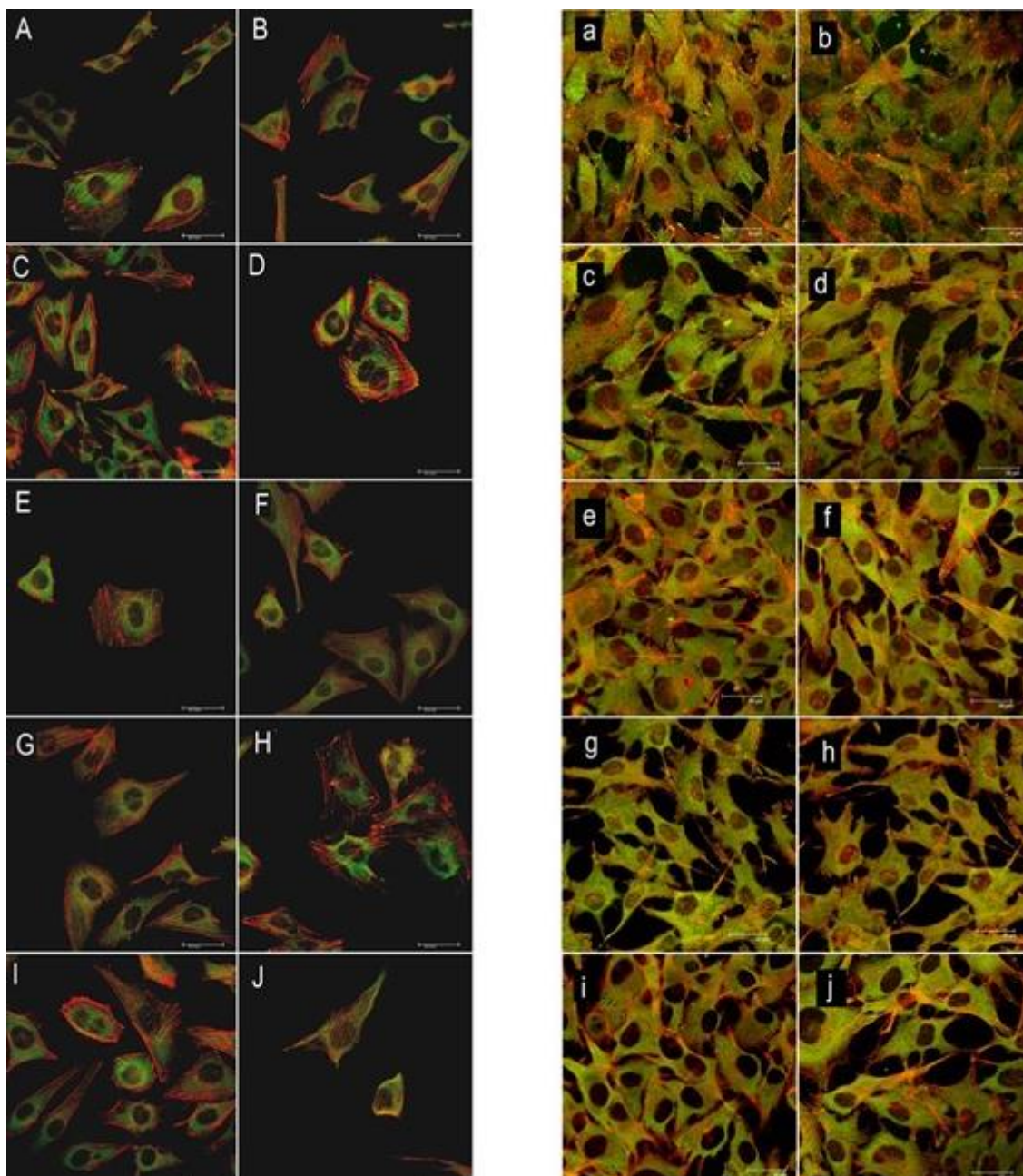


Obrázek 47: Morfologie, distribuce a životaschopnost lidským osteoblastům podobných MG 63 buněk v den 1 (A až E) a v den 3 (F-J) po vysetí na vzorcích Ti600 (A, F), TiPi600 (B, G), Ti39Nb600 (C, H), Ti39NbPi600 (D, I) a polystyrenové kultivační misky (E, J). Obarvené soupravy LIVE / DEAD životaschopnosti / cytotoxicity pro savčí buňky (A-E) nebo fluorescenční barvivo (Hoechst33342) (F-J).

Dále byly testovány povrchy Ti, Ti39Nb a Nb termicky oxidovaných při teplotě 800 °C (8 hodin). Povrchy Ti a Ti39Nb oxidované v autoklávu při teplotě 165 °C a povlaky Ti a Ti39Nb byly zároveň připraveny i metodu PVD. K experimentu byly použity dva typy buněk MG 63 spolu s Saos-2 (Sarcoma osteogenic) lidská buněčná linie získaná z kostní matrix Obrázek 46,47,48,49.



Obrázek 48: Počet MG-63 a Saos 2-buněk ve dni 1 a 3 po nanesení. a) a b) jsou počty buněk Saos 2 1 a 3 den, c) a d) pak buňky MG-63.



Obrázek 49: vlevo = Saos-2 buňky na 3-denní kultury na testovaných materiálech; vpravo = MG-63 buňky na 3-denní kultury na testovaných materiálech. Imunofluorescenční barvení vinkulin (zelená) a aktin (červená). Ti PVD (A), Ti39Nb PVD (B), základní materiál Ti (C), základní materiál Ti39Nb (D), Ti 800 ° C (E), Ti39Nb 800 ° C (F), Ti 165 ° C (G), Nb 165 ° C (H), Ti39Nb 165 ° C (I), kontrolní mikroskopické skleněné krycí sklíčko (J).



**Diskuse pro kapitolu biologické testy:**

Základním předpokladem všech nových typů materiálů pro implantáty a jejich povrchy je, aby tyto materiály podporovaly uchycení, migraci, proliferaci, diferenciaci, dlouhodobou životaschopnost a správnou funkci konkrétních buněk. Adheze buněk k materiálu a jejich následující osud je zprostředkován molekulami extracelulární matrix, jako je vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin a fibrin – tedy molekulami, které se účastní při procesu hojení ran. Tyto molekuly se proto často používají pro vhodnou modifikaci povrchu biomateriálu [103; 87]. Jsou obsaženy v biologických roztocích (kultivační médium, krev, intercelulární tekutina), spontánně se adsorbují na povrch materiálů, a poté jsou jejich specifická aktivní místa (např. specifické aminokyselinové sekvence) rozpoznána buněčnými receptory (především integriny).

V rámci práce bylo zjištěno, že Ti39Nb vzorky podporovaly adhezi buněk a růst osteogenních buněk více, než čistý Ti, a to i bez oxidace. Tyto účinky byly výraznější, když byly vzorky tepelně oxidovány za nižších teplot (165°C) nebo za vyšších teplot (600°C). Dle zjištěných výsledků byly Ti a Nb druhy povrchového oxidu, vytvořené žíháním Ti39Nb slitiny v suché atmosféře při 600°C, identifikovány jako směs převážně nízko krystalické TNb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a rutilové fáze s podílem amorfní oxidické fáze. Bylo prokázáno, že část Nb zůstává na povrchu vzorku. Přítomnost smíšené Ti-O-Nb oxidické fáze nebyla prokázána. Čisté Ti a Ti39Nb povrchy a oxidační teplota 600°C podporují osteogenní diferenciaci buněk projevující se produkcí kolagenu I a zejména osteokalcinu. Experimenty s osteointegrací prokázaly, že zlepšení biokompatibility bylo ovlivněno minimálně přítomností Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na povrchu vzorku.

## **9. Závěr, celková diskuse**

Hlavní diskuse byla provedena v rámci jednotlivých kapitol, v této kapitole se budu věnovat již jen souhrnu a propojení jednotlivých poznání se zaměřením na cíle práce. Rozbor jednotlivých kapitol vychází z naplánovaného výzkumu, tak jak byl celý koncept oxidických vrstev průběhu let řešen. Jednotlivé výstupy jsou zaměřeny na povrchovou modifikaci beta-titanové slitiny a její oxidické vrstvy. Pro porovnání je vždy použitý titan případně jeho slitiny. Tam, kde to mělo smysl, byla pro porovnání použita i ocel 316L používaná pro implantáty. Veškeré materiály a povrchy které byly v rámci výzkumu vytvořeny a analyzovány, se připravovali pro inženýrství kostní tkáně. Materiály a povrchy vykazovali adhezi a růst kostních buněk, neovlivňovaly negativně jejich životaschopnost a podporovaly jejich diferenciaci.

V této práci byl hodnocen vliv povrchových úprav materiálů na mechanické vlastnosti, tribologické chování a růst kostních buněk pozornost byla věnována chemické stabilitě, charakteristice a opakovatelnosti přípravy výroby chemicky čistého povrchu na titanových slitinách i na oxidovaném povrchu. Bylo zjištěno, že beta titanová slitina ve složení Ti39Nb je vhodná (na základě testů in vitro) pro uplatnění v implantologii. Její výsledky jsou jednoznačně lepší než používané materiály na bázi titanu jako je čistý titan, případně slitina TiAlV. Toto zjištění dalo základ dalšímu výzkumu v oblasti Ti39Nb slitiny a navazovali další projekty základního výzkumu.

V rámci práce byli vyhodnocováni a porovnávány materiály s oxidovaným a neoxidovaným povrchem a byly testovány pomocí elektronové mikroskopie a podrobeny měření drsnosti. Morfologie povrchu je jedním z hlavních parametrů pro výběr vhodného nastavení přípravy implantátu. Buňky rozeznávají mezi makroskopickou a mikroskopickou drsností povrchu. V případě makroskopického vnímání preferují mírně

zvlněné prostředí a v případě mikroskopické drsnosti preferují drobné neostré nerovnosti (rozměr okolo 100 nm) kde se mohou schovat.

Bylo dokázáno, že působy přípravy oxidických vrstev na jednotlivé titanové slitiny mají vliv na výsledné biologické testy i jejich povrchovou charakteristiku. Metoda přípravy vrstev anodickou oxidací vykazovala perspektivní výsledky. Při správném zvolení elektrolytu (za pomoci fluoridových iontů) byly připraveny nanostrukturované povrchy (nanotrubky) jejichž velikost je možné měnit nastavením vhodných parametrů přípravy v závislosti právě na preferenci in vitro testů. Výrazně pozitivní výsledek experimentů je příprava nanostrukturovaného povrchu na beta-titanové slitině Ti39Nb což se zatím pokládalo za obtížné. Takto připravený povrch pak tvoří základ jednak pro přímé použití biologického rozhraní implantát-kost, nebo jako vhodný nosič dalších povrchových úprav např. kolagenu či hydroxyapatitu.

Byla zjištěna zajímavá změna orientace a růstu povlaku Ti39Nb (PVD) na odlišných základních materiálech. Hodnocení bylo provedeno především na základě morfologických změn. Na odlišných fázích (alfa, beta titanu) dochází k rozdílnému růstu povlaku a zároveň se projevuje i závislost na krystalografické orientaci, což potvrdila metoda EBSD.

Podrobně byla analyzována změna vlastností oxidických vrstev na základním materiálu Ti39Nb a povlaku Ti39Nb. Již na začátku práce byla zjištěna chemická nestálost související s přípravou vzorků a to hlavně dělením a broušením. Povlakování bylo dosaženo vyšší čistoty povrchu a zároveň možnosti využívat výhod slitiny Ti39Nb na levnějších titanových slitinách.

K porovnání tribologických vlastností oxidické vrstvy na titanových slitinách, byly vzorky testovány metodou PIN-ON-DISK na vzduchu a ve fyziologickém roztoku. Fyziologický roztok splňuje mazací funkci a tak dle předpokladu byl otěr menší. Výzkum ukázal i prokazatelné zlepšení třecích vlastností titanových slitin s oxidickou vrstvou.

Biologické testování a porovnání jednotlivých materiálů metodou *in vitro* probíhalo ve spolupráci s fyziologickým ústavem a jeho výsledky jasně ukazují na lepší růst buněk jednak na slitině Ti39Nb a jednak na oxidické vrstvě této slitiny. Vysvětlením tohoto jevu je pravděpodobně přítomnost niobu, který podporuje růst i diferenciaci buněk. V oxidické struktuře je pak přítomen ve formě Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

## **9.1 Možnosti a vývoj do budoucna**

V současnosti pokračuje výzkum beta-titanových slitin nanášením povlaků z BaTiO<sub>3</sub> jenž má feroelektrické vlastnosti. Povrchový náboj může také pocházet z polarizovaných dielektrik, piezoelektrik a feroelektrik. Elektrická aktivita biomateriálů může zlepšit jejich integraci s okolní živou tkání. Je dobře známo, že kost je elektricky aktivní pod mechanickým zatížením vlivem piezoelektricity kolagenu a pohybu iontových tekutin uvnitř struktury kosti (proudový potenciál). Elektrický potenciál v mechanicky zatížené kosti je spojován s mechanickým přizpůsobením kosti v reakci na zatížení což vede k úvaze, že přidání elektricky aktivní složky k implantovanému materiálu může zlepšit léčení a adaptaci okolní tkáně. Nedávno vzrostl zájem ve využití tohoto jevu k vyvinutí elektricky aktivní keramiky pro implantaci tvrdé tkáně, což může vyvolat vylepšenou biologickou odezvu.

Firma pro výrobu implantátů Beznoska s.r.o. zavádí v současnosti linku na anodickou oxidaci a nanostrukturované oxidické vrstvy pro implantáty.

Novým fenoménem je 3D tisk součástí. Příprava materiálu beta-titanové slitiny spolu se zachováním vhodných mechanických vlastností včetně povrchových vlastností pro kostní implantáty je náplní výzkumu s firmou Prospan s.r.o.

## 10. Použitá literatura

- [1] LÜTJERING, G. a J. WILLIAMS. *Titanium*. 2nd ed. New York: Springer, 2007. ISBN 978-354-0713-975.
- [2] OSHIDA, Y. *Bioscience and bioengineering of titanium materials*. 2nd ed. Waltham, MA: Elsevier, 2013. Elsevier insights. ISBN 04-446-2625-5.
- [3] HOMOLKOVÁ, M. a V. BŘEZINA. Interakce slitiny kovu a buněčné linie. *Chem. Listy*. 2015, 109, 151-154.
- [4] ČSN EN ISO 10993: *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků*. Česká republika, 2010.
- [5] BLACK, Jonathan. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. 4th ed. Boca Raton: CRC Taylor, 2006. ISBN 08-493-3959-6.
- [6] LOSERTOVÁ, M. *Progresivní materiály*. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, 2012.
- [7] KLUSÁK, O. *Biokompatibilní materiály na bázi kovů a jejich aplikační využití*. Vysoké učení technické v Brně, 2010.
- [8] RAMAKRISHNA, S., J. MAYER, E. WINTERMANTEL a K. LEONG. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*. 2001, 61(9), 1189-1224. DOI: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4. ISSN 02663538.
- [9] RATNER, B. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 01-258-2463-7.
- [10] BACHMAYER, M. *Kostní implantáty na bázi železa*. Brno, 2015. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií ústav elektrotechnologie.
- [11] ŠTOHANSLOVÁ, B. *FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MĚŘENÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ*. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ Katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2012. Vedoucí práce Mgr. Monika Kuchařová, PhD.
- [12] KOŠÍČEK, A. *Kompozitní materiály na bázi železa a hořčíku*. VUT v Brně, 2016.
- [13] DUNGL, P. *Ortopedie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0550-8.
- [14] *Beznoska s.r.o* [online]. b.r. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.beznoska.cz/pro-odborniky/produkty/traumatologie/>
- [15] MIKULÍKOVÁ, Z. *Degradace biomateriálů v modelovém fyziologickém prostředí*. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, 2008. FAKULTA CHEMICKÁ ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ.

- [16] GEETHA, M., A.K. SINGH, R. ASOKAMANI a A.K. GOGIA. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*. 2009, 54(3). DOI: 10.1016/j.pmatsci.2008.06.004. ISSN 00796425.
- [17] ABDEL-HADY, M. Texturing Tendency in  $\beta$ -Type Ti-Alloys. *Recent Developments in the Study of Recrystallization*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53588. ISBN 978-953-51-0962-4.
- [18] EISENBARTH, E, D VELTEN, M MÜLLER, R THULL a J BREME. Biocompatibility of  $\beta$ -stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*. 2004, 25(26), 5705-5713. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.021.
- [19] KUDRMAN, J, R CHLUBNOVÁ, J VESELÝ, F HNILICA a B PODHORSKÁ. *PROPERTIES OF TITANIUM BETA ALLOYS SUITABLE FOR USE IN HUMAN MEDICINE* [online]. 2008, 2008 [cit. 2017-04-11].
- [20] JOSHI, V.A. *Titanium alloys: an atlas of structures and fracture features*. Boca Raton: CRC/Taylor, 2006. ISBN 978-084-9350-108.
- [21] BÖNISCH, M., M. CALIN, T. WAITZ, A. PANIGRAHI, M. ZEHETBAUER, A. GEBERT, W. SKROTZKI a J. ECKERT. Thermal stability and phase transformations of martensitic Ti–Nb alloys. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2016, 14(5), 055004-. DOI: 10.1088/1468-6996/14/5/055004. ISSN 1468-6996.
- [22] ŠTĚPÁNEK, A, J STRNAD a Z STRNAD. Časné zatížení (4 týdny) dentálních implantátů Implast v horní a dolní čelisti - monitoring vhojovací fáze pomocí metody resonanční frekvenční analýzy. *Quintessenz*. 2005, 14(9).
- [23] GALLO, J., M. HARTL, M. VRBKA, T. NÁVRAT a I. KŘUPKA. Co by měl vědět ortoped o biotribologii totální endoprotézy kyčelního kloubu. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae čechosl.* 2013, 80, 377-385.
- [24] FULÍN, P. *Vliv kvality artikulačních UHMWPE vložek na životnost kloubních náhrad*. Praha, 2015. Univerzita Karlova v Praze 1. Lékařská fakulta.
- [25] POKORNÝ, D, M ŠLOUF a P FULÍN. Současné poznatky o vlivu technologie výroby a sterilizace na strukturu, vlastnosti a životnost UHMWPE v kloubních náhradách. *ACTA CHIRURGIAE ORTHOPAEDICAE ET TRAUMATOLOGIAE ČECHOSL.* 2012, 79, 213-221.
- [26] RAHMATI, B., A. SARHAN, W. BASIRUN a W.A.B.W. ABAS. Ceramic tantalum oxide thin film coating to enhance the corrosion and wear characteristics of Ti6Al4V alloy. *Journal of Alloys and Compounds*. 2016, 676, 369-376. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.03.188. ISSN 09258388.
- [27] YETIM, A.F. Investigation of wear behavior of titanium oxide films, produced by anodic oxidation, on commercially pure titanium in vacuum conditions. *Surface and Coatings Technology*. 2010, 205(6), 1757-1763. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2010.08.079. ISSN 02578972.

- [28] YETIM, A.F., A. CELIK a A. ALSARAN. Improving tribological properties of Ti6Al4V alloy with duplex surface treatment. *Surface and Coatings Technology*. 2010, 205(2), 320-324. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2010.06.048.
- [29] LI, S., X. YU, J. LIU, M. YU, L. WU a K. YANG. Microstructure and abrasive wear behaviour of anodizing composite films containing SiC nanoparticles on Ti6Al4V alloy. *Journal of Central South University*. 2014, 21(12), 4415-4423. DOI: 10.1007/s11771-014-2443-0. ISSN 2095-2899.
- [30] WANG, S., Y. LIU, C. ZHANG, Z. LIAO a W. LIU. The improvement of wettability, biotribological behavior and corrosion resistance of titanium alloy pretreated by thermal oxidation. *Tribology International*. 2014, 79, 174-182. DOI: 10.1016/j.triboint.2014.06.008. ISSN 0301679x.
- [31] WANG, S., Z. LIAO, Y. LIU a W. LIU. Different tribological behaviors of titanium alloys modified by thermal oxidation and spraying diamond like carbon. *Surface and Coatings Technology*. 2014, 252, 64-73. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2014.05.008. ISSN 02578972.
- [32] MU, M., J. LIANG, X. ZHOU a Q. XIAO. One-step preparation of TiO<sub>2</sub>/MoS<sub>2</sub> composite coating on Ti6Al4V alloy by plasma electrolytic oxidation and its tribological properties. *Surface and Coatings Technology*. 2013, 214, 124-130. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2012.10.079. ISSN 02578972.
- [33] LI, J., M. SUN, X. MA a G. TANG. Structure and tribological performance of modified layer on Ti6Al4V alloy by plasma-based ion implantation with oxygen. *Wear*. 2006, 261(11-12), 1247-1252. DOI: 10.1016/j.wear.2006.03.010.
- [34] FENG, X., M. SUN, X. MA a G. TANG. Structure and tribological performance by nitrogen and oxygen plasma based ion implantation on Ti6Al4V alloy. *Applied Surface Science*. 2011, 257(23), 9904-9908. DOI: 10.1016/j.apsusc.2011.06.105. ISSN 01694332.
- [35] BANFIELD, S., J.C. AVELAR-BATISTA WILSON, G. CASSAR, A. LEYLAND, A. MATTHEWS a J. HOUSDEN. An investigation into the effect of Triode Plasma Oxidation (TPO) on the tribological properties of Ti6Al4V. *Surface and Coatings Technology*. 2011, 206(7), 1955-1962. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2011.08.024. ISSN 02578972.
- [36] YETIM, A.F. Investigation of wear behavior of titanium oxide films, produced by anodic oxidation, on commercially pure titanium in vacuum conditions. *Surface and Coatings Technology*. 2010, 205(6), 1757-1763. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2010.08.079. ISSN 02578972.
- [37] KRISHNA, D., Y. SUN a Z. CHEN. Magnetron sputtered TiO<sub>2</sub> films on a stainless steel substrate: Selective rutile phase formation and its tribological and anti-corrosion performance. *Thin Solid Films*. 2011, 519(15), 4860-4864. DOI: 10.1016/j.tsf.2011.01.042. ISSN 00406090.

- [38] BALAGNA, C., M.G. FAGA a S. SPRIANO. Tantalum-based multilayer coating on cobalt alloys in total hip and knee replacement. *Materials Science and Engineering: C*. 2012, 32(4), 887-895. DOI: 10.1016/j.msec.2012.02.007.
- [39] SPRIANO, S., E. VERNÈ, M.G. FAGA, S. BUGLIOSI a G. MAINA. Surface treatment on an implant cobalt alloy for high biocompatibility and wear resistance. *Wear*. 2005, 259(7-12). DOI: 10.1016/j.wear.2005.02.011.
- [40] FOX, V, A JONES, N.M RENEVIER a D.G TEER. Hard lubricating coatings for cutting and forming tools and mechanical components. *Surface and Coatings Technology*. 2000, 125(1-3), 347-353. DOI: 10.1016/S0257-8972(99)00611-8.
- [41] CHEN, Y., J. WU, X. NIE a S. YU. Study on failure mechanisms of DLC coated Ti6Al4V and CoCr under cyclic high combined contact stress. *Journal of Alloys and Compounds*. 2016, 688, 964-973. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.07.254. ISSN 09258388.
- [42] XIE, D., H. LIU, X. DENG, Y.X. LENG a N. HUANG. Deposition of a-C: H films on UHMWPE substrate and its wear-resistance. *Applied Surface Science*. 2009, 256(1), 284-288. DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.08.017. ISSN 01694332.
- [43] MANHABOSCO, T.M. a I.L. MULLER. Electrodeposition of diamond-like carbon (DLC) films on Ti. *Applied Surface Science*. 2009, 255(7), 4082-4086. DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.10.087. ISSN 01694332.
- [44] JIANG, S., B. JIANG, Y. LI, Y. LI, G. YIN a Ch. ZHENG. Friction and wear study of diamond-like carbon gradient coatings on Ti6Al4V substrate prepared by plasma source ion implant-ion beam enhanced deposition. *Applied Surface Science*. 2004, 236(1-4), 285-291. DOI: 10.1016/j.apsusc.2004.04.032.
- [45] NARAYAN, R. Pulsed laser deposition of functionally gradient diamondlike carbon–metal nanocomposites. *Diamond and Related Materials*. 2005, 14(8), 1319-1330. DOI: 10.1016/j.diamond.2004.12.047. ISSN 09259635.
- [46] PASKVALE, S., M. KAHN, M. ČEKADA, P. PANJAN, W. WALDHAUSER a B. PODGORNIK. Tribological properties of diamond-like carbon coatings prepared by anode layer source and magnetron sputtering. *Surface and Coatings Technology*. 2011, 205. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2011.01.043. ISSN 02578972.
- [47] SERRO, A.P., C. COMPLETO, R. COLAÇO et al. A comparative study of titanium nitrides, TiN, TiNbN and TiCN, as coatings for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*. 2009, 203(24), 3701-3707. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2009.06.010. ISSN 02578972.
- [48] ZOLOTAREVOVÁ, E. *Otěrové částice polyethylenu v okolí kloubních náhrad*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta katedra biochemie, 2010. Disertační práce.



- [49] INGHAM, E a J FISHER. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials*. 2005, 26(11), 1271-1286. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.035. ISSN 01429612.
- [50] KIENLE, A., N. GRAF a H.J. WILKE. Does impaction of titanium-coated interbody fusion cages into the disc space cause wear debris or delamination?. *The Spine Journal*. 2016, 16(2), 235-242. DOI: 10.1016/j.spinee.2015.09.038.
- [51] FILOVÁ, E, E BRYNDA, T RIEDEL, L BAČÁKOVÁ, J CHLUPÁČ, V LISÁ, M HOUSKA a J DYR. Vascular endothelial cells on two-and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, 90(1), 55-69. DOI: 10.1002/jbm.a.32065.
- [52] BJURSTEN, L, L RASMUSSEN, S OH, G SMITH, K BRAMMER a S JIN. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, 9999, -. DOI: 10.1002/jbm.a.32463. ISSN 15493296.
- [53] JACOBS, JJ, JL GILBERT a RM URBAN. Corrosion of metal orthopaedic implants. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-AMERICAN VOLUME*. 1998, 2(80), 268-282.
- [54] ROYHMAN, D, M PATEL, M RUNA, M. WIMMER, J. JACOBS, N. HALLAB a M. MATHEW. Fretting-corrosion behavior in hip implant modular junctions: The influence of friction energy and pH variation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016, 62, 570-587. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.024. ISSN 17516161.
- [55] DEL BALSIO, Ch., M.G. TEETER, S. TAN, J. HOWARD a B. LANTING. Trunnionosis: Does Head Size Affect Fretting and Corrosion in Total Hip Arthroplasty?. *The Journal of Arthroplasty*. 2016, 31(10), 2332-2336. DOI: 10.1016/j.arth.2016.03.009. ISSN 08835403.
- [56] HANSEN, DC. Metal Corrosion in the Human Body: The Ultimate Bio-Corrosion Scenario. *The Electrochemical Society Interface*. 2008, ( ), 31-34.
- [57] GILBERT, JL., Ch BUCKLEY a J JACOBS. In vivo corrosion of modular hip prosthesis components in mixed and similar metal combinations. The effect of crevice, stress, motion, and alloy coupling. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1993, 27(12), 1533-1544. DOI: 10.1002/jbm.820271210.
- [58] RODRIGUES, D, P VALDERRAMA, T WILSON et al. Titanium Corrosion Mechanisms in the Oral Environment: A Retrieval Study. *Materials*. 2013, 6(11), 5258-5274. DOI: 10.3390/ma6115258. ISSN 1996-1944.
- [59] KRAUS, V. *Povrchy a jejich úpravy*. 1. vyd. Plzeň: Západočeská univerzita, 2000. ISBN 80-708-2668-1.
- [60] KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983, 49(6), 832-837. DOI: 10.1016/0022-3913(83)90359-1. ISSN 00223913.

- [61] WANG, X, S XU, S ZHOU et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*. 2016, 83, 127-141. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012. ISSN 01429612.
- [62] MINAGAR, S, Ch BERNDT, J WANG, E IVANOVA a C WEN. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8(8), 2875-2888. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.04.005. ISSN 17427061.
- [63] MOELLMANN, J, S EHRLICH, R TONNER a S GRIMME. A DFT-D study of structural and energetic properties of TiO<sub>2</sub> modifications. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2012, 24(42), 424206-. DOI: 10.1088/0953-8984/24/42/424206. ISSN 0953-8984.
- [64] *Dalibor Velebil* [online]. Národní muzeum v Praze, mineralogicko-petrologické oddělení, b.r. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.velebil.net/>
- [65] LIU, X., P.K. CHU a Ch. DING. Surface nano-functionalization of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2010, 70(3-6), 275-302. DOI: 10.1016/j.mser.2010.06.013. ISSN 0927796x.
- [66] MACÁK, J. *Growth of anodic self-organized titanium dioxide nanotube layers*. Der Technischen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg zur Erlangung des Grades, 2008. Disertační práce.
- [67] MACAK, J.M., H. TSUCHIYA, A. GHICOV, K. YASUDA, R. HAHN, S. BAUER a P. SCHMUKI. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2007, 11(1-2), 3-18. DOI: 10.1016/j.cossms.2007.08.004.
- [68] KUMAR, S., T.S.N.. NARAYANAN, S. RAMAN a S.K. SESHADRI. Thermal oxidation of CP Ti — An electrochemical and structural characterization. *Materials Characterization*. 2010, 61(6), 589-597. DOI: 10.1016/j.matchar.2010.03.002. ISSN 10445803.
- [69] ZORN, G., A. LESMAN a I. GOTMAN. Oxide formation on low modulus Ti45Nb alloy by anodic versus thermal oxidation. *Surface and Coatings Technology*. 2006, 201(3-4), 612-618. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2005.12.009.
- [70] GARCÍA-ALONSO, M.C a SALDAÑA. In vitro corrosion behaviour and osteoblast response of thermally oxidised Ti6Al4V alloy. *Biomaterials*. 2003, 24(1), 26. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00237-5. ISSN 01429612.
- [71] KRČIL, Jan. *Vlastnosti a struktura oxidických vrstev na slitinách titanu*. Praha, 2014. ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE Fakulta strojní.
- [72] HUMÁR, A. *Materiály pro řezné nástroje*. Praha: MM Publishing, 2008. ISBN 978-80-254-2250-2.

- [73] *Method of making a coated medical bone implant and a medical bone implant made thereof.* 2009. US20090187253 A1. Zapsáno 23. červenec 2009.
- [74] RAFIEERAD, A., A. BUSHROA, B. NASIRI-TABRIZI, J. VADIVELU, S. BARADARAN, E. ZALNEZHAD a A. AMIRI. Optimized fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mixed oxide nanotube arrays on Ti-6Al-7Nb. *RSC Adv.* 2016, 6(13), 10527-10540. DOI: 10.1039/C5RA20493C. ISSN 2046-2069.
- [75] BYRAPPA, K. a M. YOSHIMURA. *Handbook of hydrothermal technology: a technology for crystal growth and materials processing.* Norwich, N.Y.: Noyes Publications, 2001. ISBN 978-0-8155-1445-9.
- [76] ZEMTSOVA, E., A. ARBENIN, R. VALIEV, E. OREKHOV, V. SEMENOV a V. SMIRNOV. Two-Level Micro-to-Nanoscale Hierarchical TiO<sub>2</sub> Nanolayers on Titanium Surface. *Materials.* 2016, 9(12), 1010-. DOI: 10.3390/ma9121010.
- [77] YOON, K.H., J. NOH, Ch. KWON a M. MUHAMMED. Photocatalytic behavior of TiO<sub>2</sub> thin films prepared by sol-gel process. *Materials Chemistry and Physics.* 2006, 95(1), 79-83. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.06.001.
- [78] RAHMANI, E., A. AHMADPOUR a M. ZEBARJAD. Enhancing the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> nanocrystalline thin film by doping with SiO<sub>2</sub>. *Chemical Engineering Journal.* 2011, 174(2-3), 709-713. DOI: 10.1016/j.cej.2011.09.073. ISSN 13858947.
- [79] KAJITVICHYANUKUL, P., J. ANANPATTARACHAI a S. PONGPOM. Sol-gel preparation and properties study of TiO<sub>2</sub> thin film for photocatalytic reduction of chromium(VI) in photocatalysis process. *Science and Technology of Advanced Materials.* 2005, 6(3-4), 352-358. DOI: 10.1016/j.stam.2005.02.014. ISSN 1468-6996.
- [80] BURNAT, B., J. ROBAK, D. BATORY, A. LENIART, I. PIWOŃSKI, S. SKRZYPEK a Mariola BRYCHT. Surface characterization, corrosion properties and bioactivity of Ca-doped TiO<sub>2</sub> coatings for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology.* 2015, 280, 291-300. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2015.09.018. ISSN 02578972.
- [81] ZHAO, X., J. YANG a J. YOU. Surface modification of TiO<sub>2</sub> coatings by Zn ion implantation for improving antibacterial activities. *Bulletin of Materials Science.* 2016, 39(1), 285-291. DOI: 10.1007/s12034-015-1127-1.
- [82] HADZIMA, B a T LITÁKOVÁ. *Základy elektrochemickej korózie kovov.* 1. Zilina: Žilinská univerzita, 2008. ISBN 978-80-8070-876-4.
- [83] DMYTRO VASILIOVYCH, Ch. *Surface Treatments for Industrial Applications: Attempts for the electrodeposition of niobium from ionic liquids.* Università degli studi di Padova, 2010.
- [84] LIU, X, P CHU a C DING. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials*

- Science and Engineering: R: Reports*. 2004, 47(3-4), 49-121. DOI: 10.1016/j.mser.2004.11.001. ISSN 0927796x.
- [85] BACAKOVA, L, E FILOVA, F RYPACEK, V SVORCIK a V STARY. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. 2004, 53, 35-45.
- [86] LE GUÉHENNEC, L., A. SOUEIDAN, P. LAYROLLE a Y. AMOURIQ. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*. 2007, 23(7), 844-854. DOI: 10.1016/j.dental.2006.06.025.
- [87] VANDROVCOVÁ, M. *Interakce kostních a cévních buněk s materiály pro tkáňové náhrady a cílenou dodávku léčiv*. 2011. UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA.
- [88] STARÝ, V., L. BAČÁKOVÁ, V. HORNÍK a V. CHMELÍK. Bio-compatibility of the surface layer of pyrolytic graphite. *Thin Solid Films*. 2003, 433(1-2), 191-198. DOI: 10.1016/S0040-6090(03)00309-2. ISSN 1802-9973.
- [89] VANROVCOVÁ, M a L BAČÁKOVÁ. Adhesion, Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface- Modified Materials Developed for Bone Implants. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. 2011, 60(), 403-417. ISSN 1802-9973.
- [90] LAM, C.N.C, R WU, D LI, M.L HAIR a A.W NEUMANN. Study of the advancing and receding contact angles: liquid sorption as a cause of contact angle hysteresis. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2002, 96(1-3), 169-191. DOI: 10.1016/S0001-8686(01)00080-X. ISSN 00018686.
- [91] BACAKOVA, L., E. FILOVA, M. PARIZEK, T. RUML a V. SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6), 739-767. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004. ISSN 07349750.
- [92] ŠAFAŘÍKOVÁ, K. *In vitro testování toxicity, proliferace a viability buněk*. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko - technologická, 2014.
- [93] NETÍK, K. *In vitro stanovení toxicity koloidního polyanilinu*. UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, 2013.
- [94] SLATINOVÁ, I., J. SLATINA a E. TÁBORSKÁ. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo-fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy*. 2008, 102, 427433.
- [95] HELEBRANT, A., L. JONASOVA a L. SANDA. The influence of simulated body fluid composition on carbonated hydroxyapatite formation. *CERAMICS-SILIKATY*. 2002, 46(1), 9-14.
- [96] TOLDE, Z, V STARÝ a P KOZÁK. Nanostructure Formation in Anodic Films Prepared on a  $\beta$  Alloy Ti39Nb PVD Layer. *Nanomaterials and Nanotechnology journal and Nanobiomedicine journal*. 2016, (), 8.

- [97] JIRKA, I, M VANDROVCOVÁ, O FRANK, Z TOLDE, J PLŠEK, T LUXBACHER, L BAČÁKOVÁ a V STARÝ. On the role of Nb-related sites of an oxidized  $\beta$ -TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, 33(3), 1636-1645. DOI: 10.1016/j.msec.2012.12.073. ISSN 09284931.
- [98] STARÝ, V., L. CVRČEK, S. DANIŠ, J. KRČIL, J. MÁLEK a Z. TOLDE. Characterization of TiNb Films on Ti Alloys for Hard Tissue Replacement. *Solid State Phenomena*. 2016, 258, 345-349. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.258.345.
- [99] ACHACHE, S., S. LAMRI, M. ARAB POUR YAZDI, A. BILLARD, M. FRANÇOIS a F. SANCHETTE. Ni-free superelastic binary Ti–Nb coatings obtained by DC magnetron co-sputtering. *Surface and Coatings Technology*. 2015, 275, 283-288. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2015.05.005.
- [100] TOLDE, Z, V STARÝ, L CVRČEK et al. Growth of a TiNb adhesion interlayer for bioactive coatings. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 80, 652-658. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.013.
- [101] FREUND, L. a S. SURESH. *Thin film materials: stress, defect formation, and surface evolution*. Cambridge, [England] ; New York: Cambridge University Press, 2003. ISBN 05-218-2281-5.
- [102] PETROV, I., P. BARNA, L. HULTMAN a J. GREENE. Microstructural evolution during film growth. *American Vacuum Society*. 2003, 21(5). DOI: 10.1116/1.1601610.
- [103] FILOVÁ, E., E. BRYNDA, T. RIEDEL, L. BAČÁKOVÁ, J. CHLUPÁČ, V. LISÁ, M. HOUSKA a J. DYR. Vascular endothelial cells on two-and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, 90(1), 55-69. DOI: 10.1002/jbm.a.32065. ISSN 15493296.
- [104] MURRAY, Joanne. The Nb–Ti (Niobium-Titanium) system. *Bulletin of Alloy Phase Diagrams*. 1981, 2(1), 55-61. DOI: 10.1007/BF02873704.
- [105] JOSEPH, S. Revision of a cemented charnley stem with exactex 'm' series (similar to depuy s-rom). In: *Revision THR* [online]. , 2012 [cit. 2017-02-14]. Dostupné z: <http://revisionthr.blogspot.cz/>
- [106] MORAVEC, H, J FOJT, V FILIP a L JOSKA. Modifikace povrchu titanu pro medicínské aplikace. *Chem. Listy*. 2014, 108, 40-45.
- [107] FUKADA, E a I YASUDA. On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan*. 1957, 12(10), 1158-1162. DOI: 10.1143/JPSJ.12.1158. ISSN 0031-9015.
- [108] HASTINGS, G. a F. MAHMUD. The electromechanical properties of fluid-filled bone: A new dimension. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1991, 2(2), 118-124. DOI: 10.1007/BF00703470.

## Seznam publikací a jiných výstupů autora disertační práce

### Publikace se vztahem k dané studii

- [100] Tolde, Z, V Starý, L Cvrček, M. Vandrovcová, S. Daniš, J, Krčil, J Remsa, S Daniš A P Špatenka. Growth of a TiNb adhesion interlayer for bioactive coatings. *Materials Science and Engineering: C*, Volume 80, 2017, Pages 652-658. IF – 4,16
- [96] Tolde, Z, V Starý A P Kozák. Nanostructure Formation in Anodic Films Prepared on a  $\beta$  Alloy Ti39Nb PVD Layer. *Mechanics, Materials Science & Engineering*, 2016, ISSN 2412-5954
- [109] V. Stary, I. Kunka A Z. Tolde; A growth and characterisation of thermal oxide layers on beta Ti39Nb alloys; *Novel Biomaterials in Regenerative Medicine*; Herausgegeben von Tri-State Bionanotechnology Center e.V., in Zittau, 2017 (**kapitola v knize**)
- [97] I. Jirka, M. Vandrovcová, O. Frank, Z. Tolde, J. Pišek, T.Luxbacher, L. Bačáková, V.Starý. On the role of Nb-related sites of an oxidized  $\beta$ -Ti39Nb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, 33(3), 1636-1645. IF – 3,33
- [98] V.Starý, L.Cvrček, S. Daniš, J. Krčil, J. Málek, Z. Tolde; Characterization of Ti39Nb Films on Ti Alloys for Hard Tissue Replacement; *Solid State Phenomena*, Vol. 258, pp. 345-349, 2017 **Scopus**
- [110] Mikšovský, J, P Kutílek, J Lukeš, Z Tolde, J Remsa, T Kocourek, F Uherek, M Jelinek. Adhesion properties of DLC and TiO<sub>2</sub> thin films using scratch test methods. *Chem. Listy*. 2011, ,(105), 692-695. IF – 0.278

### **Publikace ve Wos bez vztahu ke studii**

Jelinek, M., Zemek, J., Kocourek, T., Remsa, J., Miksovsky, J., Pisarik, P., Jurek, K., Tolde, Z., Travnickova, M., Vandrovцова, M., Filova, E., Dual laser deposition of Ti: DLC composite for implants; *LASER PHYSICS*, 26,(10) 2016, IF – 1,102

Vlčák, P, F Cerny, Z Weiss, S Danis, J Šepitka, Z Tolde A V Jech. The Effect of Nitrogen Ion Implantation on the Surface Properties of Ti6Al4V Alloy Coated by a Carbon Nanolayer. *Journal of Nanomaterials*. 2013, 2013, 1-8. ISSN 1687-4110. IF – 1,798

Vlčák, P, F Cerny, J Drahekoupil, J Šepitka, Z Tolde. The microstructure and surface hardness of Ti6Al4V alloy implanted with nitrogen ions at an elevated temperature. *Journal of Alloys and Compounds*. 2015, 620, 48-54. ISSN 09258388. IF – 2.999

Tolde, Z, V Starý A Z Kubart. Tribological properties of carbon-carbon composite and of a surface layer of pyrolytic carbon. *CERAMICS-SILIKATY*. 2008, 52(1), 37-44. IF – 0,641

Glogar, P, M Černý, Z Tolde. Fracture behaviour of the basalt fibre reinforced composites with polysiloxane-derived matrix. *Acta Geodyn. Geomater.* 2007, 4(2), 27-37. IF – 0,606

### **Ostatní publikace a významnější výstupy**

K. Moriová, Z. Tolde, P. Vaněk, V. Starý, V. Nehasil; BaTiO films deposited onto TiNb and stability of barium, *Biomaterials and Surfaces*, 2016 Acta Polytechnica, ISBN 978-80-01-06135-0 Scopus

Vlčák P., Černý F., Tolde Z., Šepitka J; Mechanical and Tribological Properties of Carbon Thin Film with Tungsten Interlayer Prepared by Ion Beam Assisted Deposition, *JOURNAL OF MATERIALS*, 2013

Tolde, Z., Cvrček, L., Starý, V.; Tribologické metody testování povrchu biomateriálů, Příspěvek na konferenci - Biomateriály a jejich povrchy VII, 2014

Jech, V., Šepitka, J., Tolde, Z., Weiss, Kronek J.; Využití tenkých uhlíkových vrstev v medicíně, *MM Spektrum*, 2012

Douděrová, M., Starý, V., Tolde, Z., Bačáková L.; 3D Evaluation of Surface Roughness using Stereo Images Made in SEM - Influence on Osteoblast Cell Growth, *Inżynieria Biomaterialów*, 2008

Tolde Z.; Slitina Ti39Nb, oxidické vrstvy možnosti přípravy a testování, *Biomateriály a jejich povrchy VI*, 2013

*Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace*

Douděrová,M., Starý,V., Tolde,Z., Bačáková L.;Elektronová mikroskopie povlaků pro biomateriály, Mikroskopie, 2008

Tolde,Z., Starý,V.; Tribological Properties of Carbon-Carbon Composite and of a Surface Layer of Pyrolytic Carbon, Czech-Polish Workshop on Advanced Composites, 2005

Válová,M., Suchánek,J., Tolde,Z.; Measurement of Tribological Characteristic of Duplex Coated Steels, Proceedings of International Conference on Innovative Technologies IN-TECH, 2010

Horník,J., Tolde,Z., Kamenská,M.; Roughness analyses, Oponovaná technická zpráva cizojazyčně, TRW - Carr s.r.o.

Starý,V., Dohnal,L., Hlavatý,M., Říhová Z. Tolde Z.; Vlastnosti biokompatibilních povlaků nC a DLC na kovových materiálech, 12. česko-slovenská konference "Přínos metalografie pro řešení výrobních problémů" 2011



## Seznam obrázků

Obrázek 1: Mechanické vlastnosti kosti v závislosti na druhu namáhání	15
Obrázek 2: Přehled modulů pružnosti slitin pro biomateriály	19
Obrázek 3: Fázový diagram Ti-Nb slitiny [108]	20
Obrázek 4: Poškození UHMWPE jamky náhrady kyčelního kloubu	23
Obrázek 5: Ternární fázový diagram povlaků DLC	24
Obrázek 6: Biotribologická soustava náhrady kyčelního kloubu,	
Obrázek 11: Vliv fluoridových iontů na tvorbu nanostruktury oxidické vrstvy	37
Obrázek 12: Příklady nanostruktur vytvořených v prostředí elektrolytu	38
Obrázek 13: Tloušťka oxidické vrstvy v závislosti na době oxidace pro materiály	40
Obrázek 14: Hloubka profilu získaná metodou GDOES	40
Obrázek 15: Spektra rentgenové difrakce slitiny Ti45Nb po různých oxidačních způsobů:	45
Obrázek 16: Pourbaixův diagram pro systém Ti – H <sub>2</sub> O při teplotě 25°C	47
Obrázek 17: Pourbaixův diagram pro systém Nb-H <sub>2</sub> O, při teplotě 25, 75 a 95 °C	47
Obrázek 18: Přístroje pro přípravu povrchu vzorků:	54
Obrázek 19: Zařízení Hauser Flexicoat 850	74
Obrázek 20: Target, ze kterého se odprašuje materiál.	74
Obrázek 21: Schéma zapojení oxidační vany:	75
Obrázek 22: Řádkovací elektronový mikroskop	75
Obrázek 23: Zařízení High Temperature Tribometer.	76
Obrázek 24: X-ray difrakce Ti <sub>39</sub> Nb vrstev na různých substrátech	77
Obrázek 25: SEM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti <sub>39</sub> Nb Obrázek 26: AFM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti <sub>39</sub> Nb	78
Obrázek 27: SEM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti	
Obrázek 28: AFM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti	78
Obr. 29: SEM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V ve výřezu zvětšení 50 000x	
Obr. 30: AFM Ti <sub>39</sub> Nb/Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V	79
Obrázek 31: SEM Ti <sub>39</sub> Nb/Fe ve výřezu zvětšení 50 000x	
Obrázek 32: AFM Ti <sub>39</sub> Nb/Fe	79
Obrázek 33: Ukázka 3D povrchu z programu Scandium	80
Obrázek 34: Ramanova spektra vzorku Ti <sub>600</sub> (a), Nb <sub>600</sub> (b) a Ti <sub>39</sub> Nb <sub>600</sub> (c).	79
Obrázek 35: SEM obrazy vzorků (a) Ti <sub>39</sub> Nb <sub>600</sub> , (b) Ti <sub>600</sub> , (c) Ti <sub>39</sub> NbPi <sub>600</sub> , (d) TiPi <sub>600</sub> .	
	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 36: EDS analýza povrchu Ti <sub>39</sub> Nb <sub>600</sub>	79Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 37: SEM snímek anodické oxidické vrstvy	80
Obrázek 38: SEM snímek anodické oxidické vrstvy	80
Obrázek 39: SEM snímek anodické oxidické vrstvy	80

## Oxidické vrstvy na titanových slitinách pro lékařské aplikace

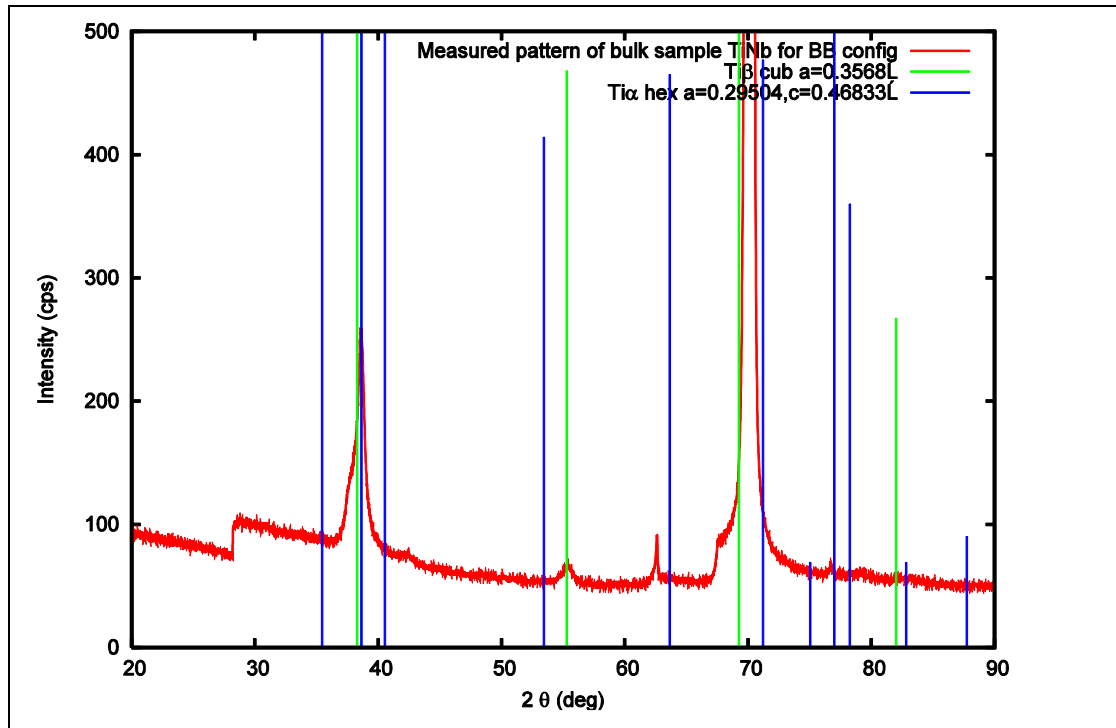
Obrázek 40: SEM snímek anodické oxidické vrstvy	80
Obrázek 41: Průběh proudové hustoty v závislosti na čase definována.82	Chyba! Záložka není
Obrázek 42: Průběh proudové hustoty v závislosti na čase definována.82	Chyba! Záložka není
Obrázek 43: Ukázka srovnání koeficientu tření	83
Obrázek 44: Srovnání průměrných naměřených hodnot koeficientu tření	84
Obrázek 45: Srovnání objemu opotřebení na jednotlivých materiálech	85
Obrázek 46: Počet lidským osteoblastům podobných MG 63 buněk	87
Obrázek 47: Morfologie, distribuce a životaschopnost lidským osteoblastům podobných MG 63 buněk	88
Obrázek 48: Počet MG-63 a Saos 2-buněk ve dni 1 a 3 po nanesení.	88
Obrázek 49: Saos-2 buňky	89

## Seznam tabulek

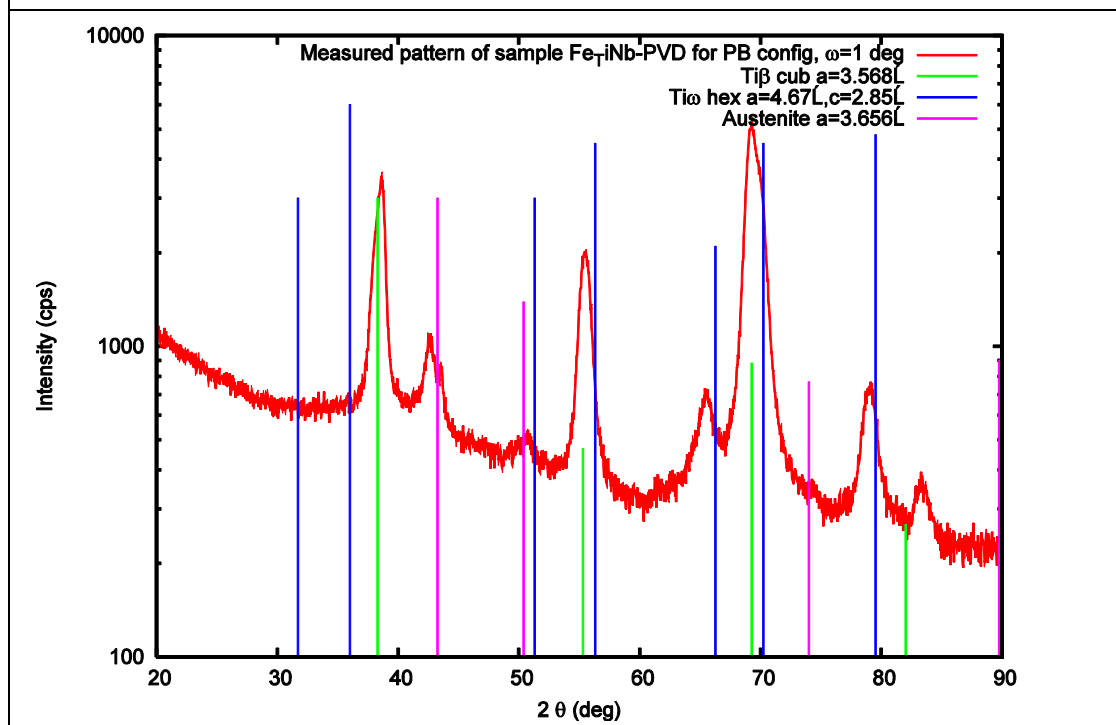
Tabulka 1: Rozdělení a požadované vlastnosti materiálu pro implantáty [8]	
Tabulka 2: Rozdělení implantátů dle materiálu [9]	
Tabulka 3: Mechanické vlastnosti kosti v závislosti na poloze [11]	
Tabulka 4: Tribologické vlastnosti oxidovaného povrchu titanu a jeho slitin	
Tabulka 5: Vlastnosti tribologických povrchů pro kloubní náhrady	
Tabulka 6: Drsnost a mikrotvrdomost vzorků z CP Ti grade 1 – neoxidovaných a oxidovaných po 24 hodin [68]	
Tabulka 7: XPS složení povrchu elektrolyticky leštěné slitiny Ti45Nb po různém oxidačních ošetření [69].,	
Tabulka 8: Koncentrace anorganických iontů v krevní plazmě a SBF roztocích (mmol.l <sup>-1</sup> ) [95]	
Tabulka 9: Parametry procesu broušení preparátů	
Tabulka 10: Parametry procesu leštění preparátů	
Tabulka 11: Plošná drsnost povrchu Sa a Sds (hustota výstupků) na Ti a Ti39Nb před a po oxidaci.	
Tabulka 12: Popis používaného základního materiálu (základní vybrané charakteristiky)	
Tabulka 13: Tabulka vybraných parametrů a vlastností Ti39Nb povlaků pro různé substráty	
Tabulka 14: Aritmetické průměry vybraných parametrů drsnosti povrchu pro všechny vzorky (základní materiál versus povlak) měřené dotykovou a bezdotykovou metodou	
Tabulka 15: Podmínky tribologické zkoušky	

## 11. Přílohy

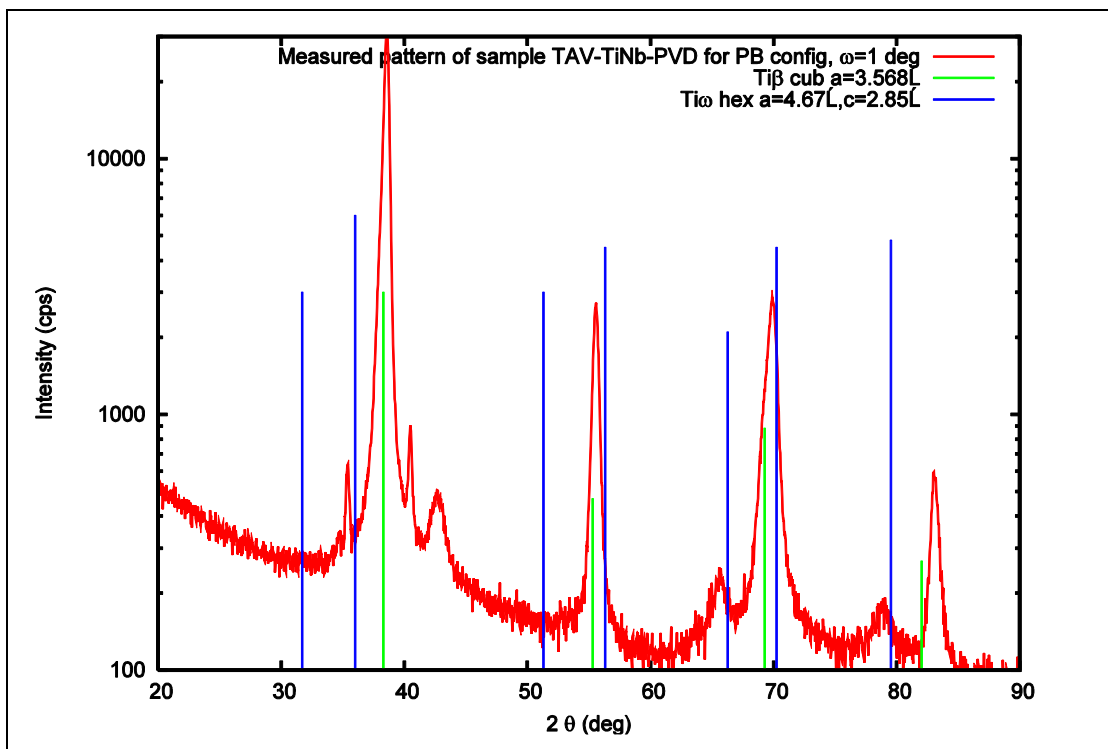
### 11.1 XPS spektra pro jednotlivé povlaky TiNb



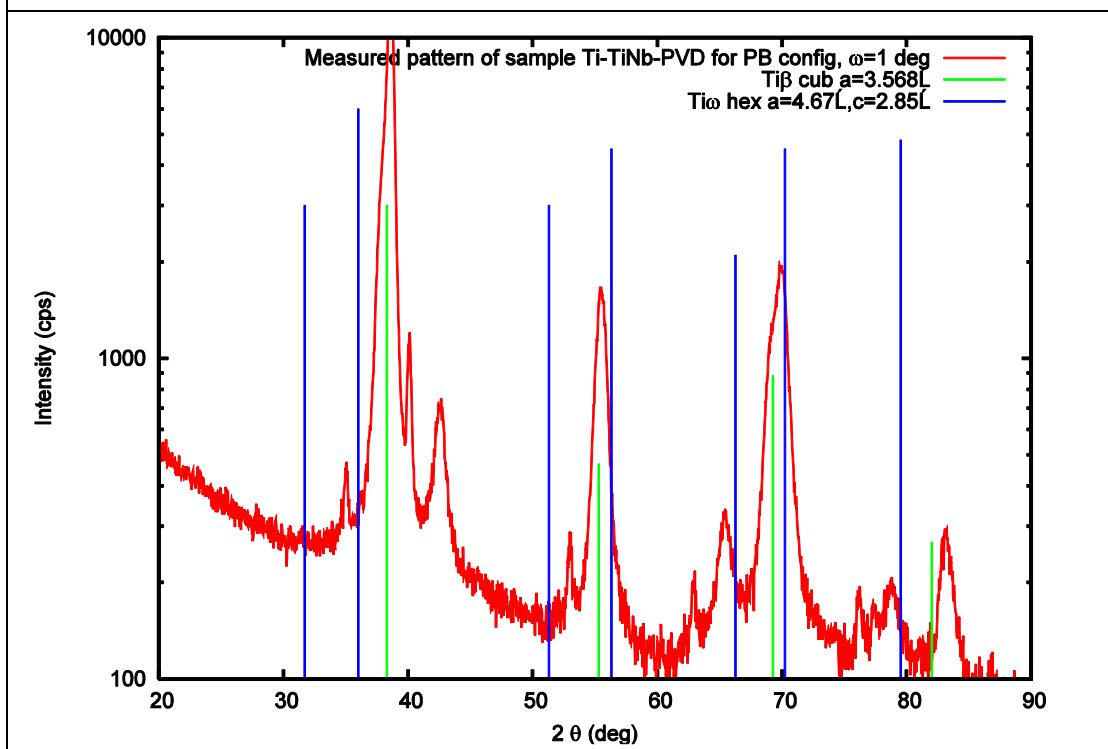
#### Bulk Ti39Nb



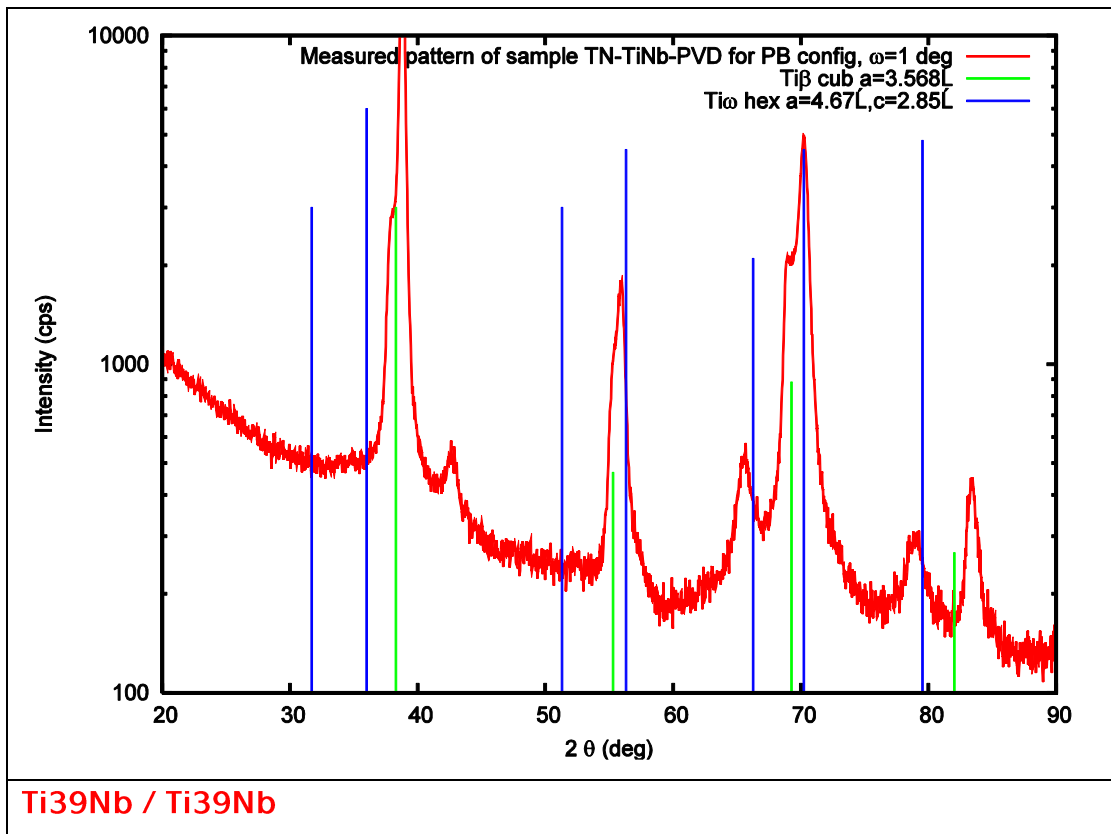
#### Ti39Nb/ Fe



Ti39Nb/ TiAlV



Ti39Nb/Ti



## 11.2 Nejvýznamnější publikace autora se vztahem k disertační práci

Materials Science and Engineering C 80 (2017) 652–658



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/msec](http://www.elsevier.com/locate/msec)



### Growth of a TiNb adhesion interlayer for bioactive coatings



Zdeněk Tolde<sup>a</sup>, Vladimír Starý<sup>a,\*</sup>, Ladislav Cvrček<sup>a</sup>, Marta Vandrovcová<sup>b</sup>, Jan Remsa<sup>c</sup>, Stanislav Daniš<sup>d</sup>, Jan Krčil<sup>a</sup>, Lucie Bačáková<sup>b</sup>, Petr Špatenka<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Karlovo Sq. 13, 121 35 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup> Dept. of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, Prague 4-Krc, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Sitna Sq. 3108, 21201 Kladno, Czech Republic

<sup>d</sup> Dept. of Condensed Matter Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 24 November 2016

Received in revised form 6 June 2017

Accepted 10 July 2017

Available online 12 July 2017

##### Keywords:

Biomaterials

PVD

TiNb

Surface properties

BaTiO<sub>3</sub>

#### ABSTRACT

Surface bioactivity has been under intensive study with reference to its use in medical implants. Our study is focused on coatings prepared from an electroactive material which can support bone cell adhesion. Until now, hydroxyapatite films have usually been utilized as a chemically-active surface agent. However, electrically-active films could set a new direction in hard tissue replacement. As a base for these films, it is necessary to prepare an intermediate film, which can serve as a suitable barrier against the possible diffusion of some allergens and toxic elements from the substrate. The intermediate film also improves the adaptation of the mechanical properties of the basic material to an electroactive film. The aim of our work was to select an implantable and biocompatible material for this intermediate film that is suitable for coating several widely-used materials, to check the possibility of preparing an electroactive film for use on a material of this type, and to characterize the structure and several mechanical properties of this intermediate film. TiNb was selected as the material for the intermediate film, because of its excellent chemical and mechanical properties. TiNb coatings were deposited by magnetron sputtering on various substrates, namely Ti, Ti6Al4V, stainless steel, and bulk TiNb (as standard), and important properties of the layers, e.g. surface morphology and surface roughness, crystalline structure, etc., were characterized by several methods (SEM, EBSD, X-ray diffraction, nanoindentation and roughness measurement). It was found that the structure and the mechanical properties of the TiNb layer depended significantly on the type of substrate. TiNb was then used as a substrate for depositing a ferroelectrically active material, e.g., BaTiO<sub>3</sub>, and the adhesion, viability and proliferation of human osteoblast-like Saos-2 cells on this system were studied. We found that the electroactive BaTiO<sub>3</sub> film was not only non-cytotoxic (i.e. it did not affect the cell viability). It also enhanced the growth of Saos-2 cells in comparison with pure TiNb and with standard tissue culture polystyrene wells, and also in comparison with BaTiO<sub>3</sub> films deposited on Ti, i.e. a material clinically used for implantation into the bone.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Titanium alloy Ti6Al4V ELI is one of the most widely-used materials for the manufacture of implants. It is used for example for a variety of fixation elements in contact with the bone. The main advantages of this alloy are its relatively low modulus of elasticity and its chemically resistant surface. However, its chemical composition containing Al and V may be problematic in some applications [1,2]. Attempts are therefore being made to find a material with a similar or lower modulus of elasticity and with a chemical composition based on non-toxic elements, such as Ti, Nb, Ta and Zr [3,4]. One possible option is to use  $\beta$ -Ti alloys based on a  $\beta$ -structure (with a BCC lattice). The  $\beta$ -structure mainly has a lower elastic modulus than the more usual  $\alpha$ - or  $\alpha + \beta$  structure. Titanium

alloys with lower moduli of elasticity can decrease the stress-shielding effect and can limit bone resorption and loosening of the implant. These alloys can be used in the form of a bulk material, or as a coating. Coating materials widely used for the production of implants (stainless steel, CoCrMo or Ti6Al4V) with a suitable film can also provide a diffusion barrier against the penetration of toxic ions, such as Co, Al, and V [5,6].

It is obvious that cell adhesion and growth, and the consequent applicability of materials for bone implantation, can be dramatically enhanced if their surface structure (e.g., their nanoroughness) and/or their surface chemistry (e.g., the presence of oxygen-containing chemical functional groups) can be tuned by an appropriate modification. A possible surface modification method is to cover the surface with a functional coating to improve integration with the bone. This is currently often applied by coating the surface with a layer of hydroxyapatite (HAp) (which, however, involves some well-known disadvantages,

\* Correspondence author.

E-mail address: [stary@fsik.cvut.cz](mailto:stary@fsik.cvut.cz) (V. Starý).

especially poor adhesion between the coating and the substrate, the brittle characteristics and the low strength of HAp) [7]. The properties of HAp coatings depend strongly on the conditions and on the method of preparation. Nanostructured or nanocrystalline HAp has been successfully developed into a promising ceramic biomaterial, and is employed in many practical [8]. Piezoelectric ceramics, e.g. barium titanate ( $\text{BaTiO}_3$ ), can be used as coatings, due to the fact that natural bones are electrically active under mechanical loading, i.e., they behave as piezoelectric materials [9]. In vivo and in vitro investigations have indicated that piezoelectric ceramics are biocompatible and can, under appropriate mechanical loading, improve the bone formation around implants [10]. This type of coating can have more pronounced electroactive properties than HAp. It is not yet precisely known by which mechanism the creation of electrical activity has a positive effect on biological responses, but it is likely to result from preferential adsorption of proteins and ions to the polarized surface [11]. In recent years, the growth of barium titanate layers with some possible ferroelectric effect has been studied in an attempt to improve cell growth on some types of implants [12].

It can be supposed that a suitable adhesion/buffer interlayer improves the potential application of some functional coating on widely-used implant materials. A promising material that meets the conditions presented above is TiNb alloy, a binary system with a  $\beta$ -structure [4,13]. Firstly, it is a suitable material with mechanical properties close to those of the bone. Secondly, it is a binary alloy with a more simple composition and phase diagram than ternary or quaternary Ti  $\beta$ -alloys. Thirdly, it has better corrosion resistance than Ti. In our earlier studies, biological tests on TiNb were performed on native and oxidized TiNb surfaces [14, 15]. It has been stated that TiNb is a fully biocompatible material for human cell growth, and no negative reports have appeared in the literature.

The first aim of our present work was to compare  $\beta$ -TiNb alloy films prepared on various bulk substrates, especially on cpTi, on Ti6Al4V ELI alloy and on austenitic stainless steel (and  $\beta$ -TiNb as standard), for use in bio-applications. The structure and the surface morphology of these films were characterized by several methods, and reasons for the differences were suggested. TiNb alloy in the form of a coating is targeted for use as a barrier and adhesion interlayer, especially as a substrate for an electrically active  $\text{BaTiO}_3$  layer, which has the potential to enhance the adhesion and growth of bone cells, and thus to enhance the osseointegration of bone implants. The second aim of this study was therefore to test the adhesion, viability and proliferation of human osteoblast-like Saos-2 cells on  $\text{BaTiO}_3$  films deposited on TiNb substrates, i.e. materials that are promising for the construction of bone implants, and also on Ti substrates, i.e. materials that are in current clinical use. In addition, the cell behavior on these two material systems was compared with the cell behavior on standard tissue culture polystyrene (TCP) wells, i.e. on a material highly suitable for cell cultivation. We found that  $\text{BaTiO}_3$  films deposited on TiNb significantly enhanced the adhesion and subsequent growth of Saos-2 cells in comparison with  $\text{BaTiO}_3$  on Ti substrates and TCP.

## 2. Material and methods

### 2.1. Preparation and characterization of samples

The  $\beta$ -Ti39Nb alloy for bulk samples was supplied by UJP Ltd. (Prague, Czech Rep.), and was prepared by arc-melting of 61 wt% Ti with 39 wt% Nb. Melting was followed by solution annealing at 850 °C for 30 min and water quenching to achieve the specified homogeneity. Other substrates are standard commercial materials supplied by Beznoska Ltd. (Kladno, Czech Rep.).

Four types of materials with identically prepared surfaces were used as substrates for sputtering the TiNb layer. The substrates were cut from a rod into cylinders approximately 1–2 mm in thickness. Ground and polished coupons of  $\beta$ -Ti39Nb, cpTi ISO 5832-2 (cpTi grade2), Ti alloy

Ti6Al4V ISO 5832-3 and austenitic stainless steel AISI 316L ISO 5832-1 were used as substrates. In what follows, the substrates are usually denoted as TiNb, Ti, TiAlV and Fe (steel), respectively. A complete list of the samples is presented in Table 1.

### 2.2. Preparation of films/layers

The TiNb layers were prepared by magnetron sputtering in a Flexicoat 850 (Hauzer, Netherland) coating machine on prepared substrates. The deposition time was 2.5 h, the temperature of the samples was 350 °C, and the working pressure was 0.2 Pa. The samples were placed on a rotating tool. Before sputtering, the samples were ion etched in Ar for approximately 15 min. The thickness of the TiNb layer was measured with a Calotest (CSM, Switzerland), and was found to be  $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ .

### 2.3. Characterization of substrates and samples

The surface roughness of the substrates was measured with a T1000 Tester (Hommel, Germany). The morphology of the surface of the layer was evaluated with a JEM7600F scanning electron microscope (SEM) (Jeol, Japan), using SEI or LEI secondary electron detectors (magnifications ranging from  $5000\times$  to  $50,000\times$ ). The nanohardness near to the surface of the substrate was measured using the NanoTest system (Micro Materials Ltd., UK) with a Berkovich indenter. The applied load for the substrate was 200 mN, and for the film the load was 10 mN. The modulus of elasticity can also be specified using nanoindentation, and was determined by instrument software from the hardness test.

### 2.4. X-ray diffraction

The crystallographic structure of the substrates was studied by X-ray diffraction (XRD) on an X'Pert PRO diffractometer equipped with a 1D detector using  $\text{CoK}\alpha$  radiation. Phase analysis of the diffraction pattern was performed using the X'Pert HighScore programme.

X-ray diffraction was also used for crystallographic observation of the structure of the layers. The analysis was performed on a Seifert XRD7 (Germany) powder diffractometer in the Bragg-Brentano arrangement, using  $\text{CuK}\alpha$  radiation. This geometry provides reflection of the crystallographic planes parallel with the substrate surface. This allows a clear definition of the texture present in the film. Unfortunately, reflections of the substrate are usually also present.

### 2.5. Biotests

In order to test the biological performance of the materials that were used, we prepared the  $\text{BaTiO}_3$  layers on TiNb and Ti substrates, which had proved to be highly biocompatible in our earlier studies [14,15]). In addition, Ti is currently used in clinical practice for fabricating bone and dental implants. The layers were prepared by the pulsed laser deposition method (PLD), with a typical setup consisting of a stainless steel vacuum chamber with a basic pressure of  $10^{-4}$  Pa and a KrF<sup>+</sup> excimer laser (Compex Pro 205F). The fluence was set to  $2 \text{ J cm}^{-2}$ , the laser repetition rate was set to 10 Hz, and the target-substrate distance ( $d_{\text{TS}}$ ) was 35 mm. Deposition took place in a 1 Pa oxygen environment using 10,000 pulses. The substrate holder was held at 160 °C. The PLD method was followed by rapid thermal annealing (RTA process), during which the layers were annealed for 60 s at 750 °C in an oxygen flow.

TiNb samples covered with  $\text{BaTiO}_3$  were sterilized with 70% ethanol, inserted into 24-well tissue culture polystyrene (TCP) culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), internal well diameter 15.6 mm), and were seeded with human osteoblast-like Saos-2 cells (ECCC, Salisbury, UK) (for detailed information, see [14]). Pure TiNb,  $\text{BaTiO}_3$ -coated Ti and standard tissue culture polystyrene (TCP) wells were used as reference materials. The cells were cultured for 1 and 3 days (to evaluate the number and the viability of the cells) or for 7 days (to evaluate the

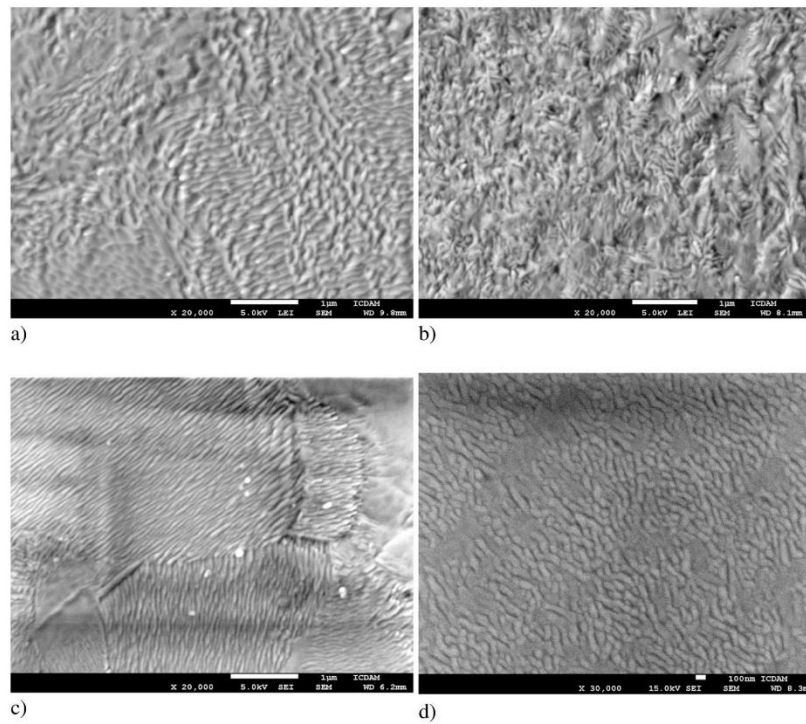


Fig. 1. SEM images of the surfaces of TiNb layers on various substrates, namely a) TiNb, b) Ti, c) TiAlV, d) Fe. Magnification 20,000× (Fe 30,000×).

of the cells on these materials (Fig. 5). On day 7, the final cell population density was highest on BaTiO<sub>3</sub>-coated TiNb, which indicated that the BaTiO<sub>3</sub> film significantly improved the proliferation of Saos-2 cells on the TiNb substrate.

#### 4. Discussion

The morphology and the structure of layers on metallic substrates are generally defined by layer material, by the method and the

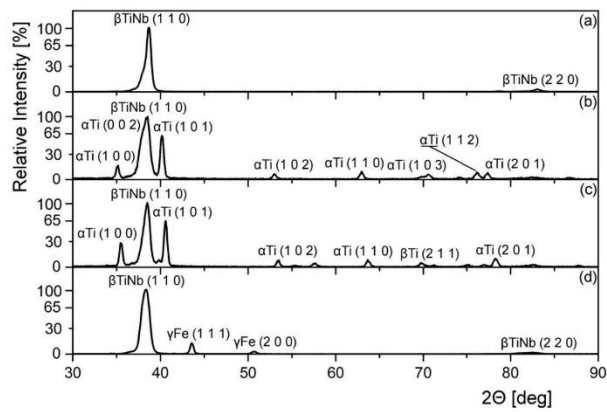


Fig. 2. X-ray diffraction in the Bragg-Brentano configuration of TiNb layers on various substrates, nonlinear scale on the y-axis. Substrate (a) Ti<sub>3</sub>Nb, (b) cp Ti, (c) Ti6Al4V, (d) austenitic steel.



**Table 3**  
Values of several parameters of BaTiO<sub>3</sub> layers.

Substrate material	BaTiO <sub>3</sub> film thickness [μm]	Film roughness Ra [μm]	Film hardness H (GPa)	Modulus of elasticity E <sub>r</sub> [MPa]
TiNb or Ti	0.99 ± 0.02	0.06 ± 0.01	8.5 ± 1.1	142 ± 12.6

conditions for preparing the layer, and also by the substrate surface structure and chemistry. In our case, the material and the preparation method for all the layers were identical, and only the substrate materials differed. Although the crystallographic structure of TiNb films is practically the same, however, the morphology of the layer surface varies quite considerably. The results show that the roughness of all the TiNb films is between two and five times higher than the roughness of the substrate (Tables 1 and 2). There can be various reasons for this. In our case, at least a part of this effect is caused by so-called buckling or by periodic perturbation of a flat surface, which usually appears as an array of ridges and valleys present on the surface [19]. Both of these processes can be caused by compressive stress. Compressive stress of differing intensity is present in the TiNb films on all tested substrates (Table 2). Compressive stress in thin films can first appear when the samples are cooled, due to the different coefficient of thermal expansion of the substrate and the film. The relation of the various thermal expansion coefficients (CTE) of the substrate and the layer (Table 4) shows that the CTE of the film is lower than the CTE of the substrates. During cooling, the dimension in the substrate, decreases more than the dimension in the film and this causes compressive stress in the film.

Buckling usually takes place with or without delamination of the film. The typical ripple wavelength for films of thickness ~ 1 μm is about 1 μm [19]. For our TiNb films on TiNb, TiAlV and Fe substrates, where periodic undulation appeared, we assume that no delamination of layers occurred, due to the thickness being greater than the typical wavelength of buckling waves. The high plasticity of the layer material also reduces the possibility of delamination.

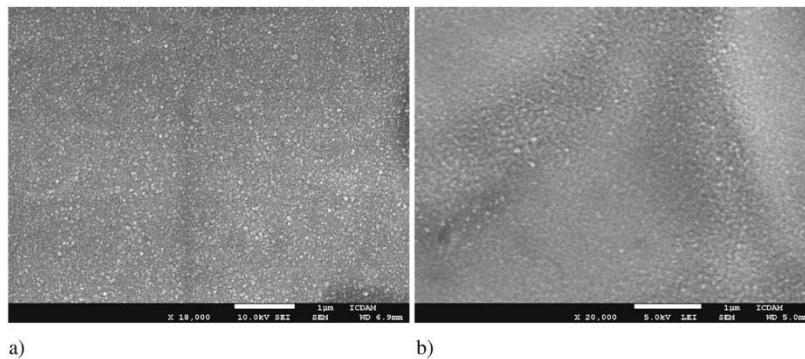
Very few substrate grain boundaries are visible on the surfaces of our TiNb layers sputtered on TiNb substrates. On these substrates, where there are only beta phase grains, the buckling is very fine and is not very regularly oriented. Even though the composition of material of substrate and film is in this case nominally the same, it is probable the CTE of the substrate and that of the sputtered layer is different and residual stress appears, the lowest of all the substrate materials.

The substrate surface of the TiNb film on the TiAlV substrate (Fig. 1c) is formed by grains with an alpha structure and a beta structure (Fig. 6). The undulation is much finer than on TiNb. We suppose the buckling tends to coincide mainly with the Ti-alpha grains that appear on the

surface. Additional measurements are needed in order to provide a more precise definition. The buckling of various grains of TiAlV changes the orientation, and the direction of undulation is probably influenced by the orientation of the basic grain. In some cases, some grains have no waves on the surface, or only small and relatively regular waves. This can be caused by the oriented matrix mismatch stress due to the lattice parameter mismatch [20]. This is usually observed on relatively thin films. However, the effect appeared here probably because of the suitable ratio of the matrix parameters of the substrate and the film. On most of the films (on Ti, Fe), the grain boundaries are not pronounced.

Fine undulations with a very well unified orientation can also be found on stainless steel (Fig. 1d), even when there is considerable cooling of the surface due to the CTC. We assume that this is due to the weak bonding of different type of atoms of the substrate and the film or the weak influence of the possible epitaxial mismatch of fully different crystallographic matrices on residual stress formation. In addition, the roughness of the layer is the lowest of all the TiNb layers.

Irregular growth of the layer is a second possible cause of surface roughness [21]. This could partly explain the morphology of the film on the Ti substrate. The morphology of TiNb films on a Ti substrate (Fig. 1b) seems to be rather different from the morphology of the films on a TiNb substrate. Its morphology consists of relatively flat regions (about 1 μm in size) sometimes with potential fine undulation, and regions with a nanostructured system of pores and hills (about 100 nm in size). This difference in TiNb layer growth can be caused by the lower temperature of the surface of this substrate due to higher conductive heat flow into the substrate, a higher coefficient of thermal conductivity (CTC), and higher cooling during film growth (in our case especially Ti, see Table 4). Due to the lower temperature of the surface, the average kinetic energy of Ti and Nb adatoms decreases, and their mean free path on the surface also decreases (resulting in lower potential for crossing steps and energy gaps, e.g. on grain boundaries). This causes irregular growth with a large number of closely situated peaks and holes. In addition, the measured roughness of the TiNb film is greatest on the Ti substrate. Places with fine undulation can also appear due to the internal stress value in the layer that is the highest of all the substrates.



**Fig. 3.** SEM images of a BaTiO<sub>3</sub> layer deposited a) on Ti and b) on a TiNb substrate.

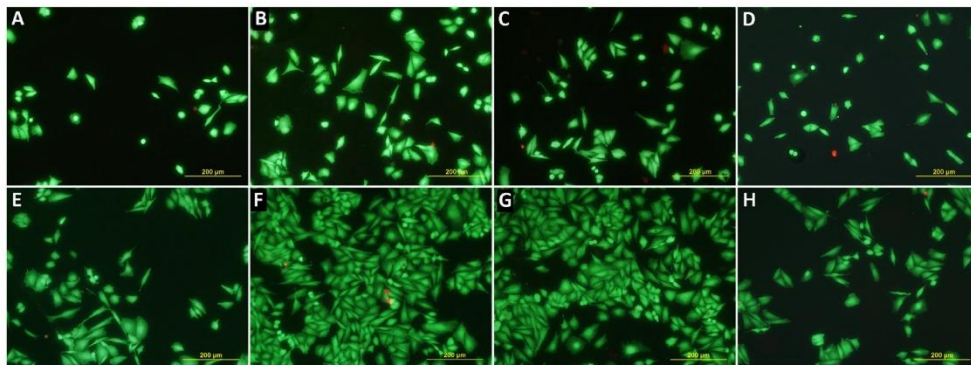


Fig. 4. Viability of Saos-2 cells on day 1 (A–D) and on day 3 (E–H) after seeding on Ti covered with BaTiO<sub>3</sub> (A, E), on TiNb covered with BaTiO<sub>3</sub> (B, F), on pure TiNb (C, G), and on TCP (D, H). Stained with the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells. The viable cells are stained in green, while the dead cells are stained in red. Bar = 200 μm. The cell viability values, obtained by counting cells on microphotographs, were between 97 and 99%. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

All the sputtered TiNb films have a beta (BCC) structure due to the composition of the target with TiNb composition (39 wt% of Nb). The layers on all of our substrates have a (110) texture, as was measured by X-ray diffraction. For metals with a BCC crystallographic structure, the (110) plane is the plane with the lowest surface energy [22]. In studies of BCC films on various substrates, the preferred orientation is usually (110) [23,24]. The orientation of the film is therefore controlled by the contact of the lowest surface energy plane with the substrate [23]. This means that a number of other conditions, especially adatom mobility connected with the different substrate surface composition, does not change the formation of the texture during the nucleation and coalescence process.

Since we were investigating TiNb as a potential interlayer for bioactive coating of bone implants, we coated it with a BaTiO<sub>3</sub> film. We found that the BaTiO<sub>3</sub> film deposited on TiNb improved the growth of human osteoblast-like Saos-2 cells, as indicated by a significantly higher cell

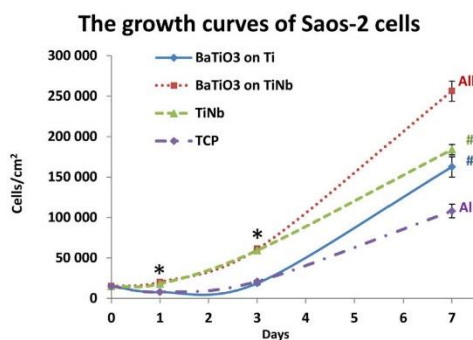


Fig. 5. The growth curves of Saos-2 cells on TiNb covered with BaTiO<sub>3</sub>, and on the reference materials, e.g. pure TiNb, BaTiO<sub>3</sub>-coated Ti, and tissue culture polystyrene (TCP)/wells during 7-day cultivation. Mean ± S.E.M. (Standard Error of Mean) from 48 microphotographs for each experimental group and time interval. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. The asterisks above day 1 and day 3 indicate statistical significance of BaTiO<sub>3</sub> on TiNb vs. BaTiO<sub>3</sub> on Ti and TCP, and simultaneously statistical significance of TiNb vs. BaTiO<sub>3</sub> on Ti and TCP. Differently-colored obelisks indicate groups significantly differing from BaTiO<sub>3</sub> on TiNb and TCP. "All" means significance in comparison with all remaining experimental groups.

number on BaTiO<sub>3</sub>-coated TiNb than on uncoated TiNb on day 7 after seeding, and even on standard TCP wells in all tested culture intervals (Fig. 5). However, in a study by Rahmati et al. [25], BaTiO<sub>3</sub> films deposited on Ti-6Al-4V alloy decreased the activity of mitochondrial enzymes (i.e., an indirect measure of cell proliferation and number) in human osteoblast-like MG-63 cells in comparison with the values obtained on pure Ti-6Al-4V. Nevertheless, this decrease was not explained by cytotoxicity of BaTiO<sub>3</sub>, because the cells were well-flattened (i.e., spread) on these surfaces [25]. Similarly, the cells on the BaTiO<sub>3</sub> coating on TiNb in our study were well-flattened, showing mostly a polygonal morphology. Moreover, as revealed by staining with a LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, the cells on BaTiO<sub>3</sub>-coated TiNb were highly viable (Fig. 4). The positive effect of BaTiO<sub>3</sub> on cell growth can be further enhanced by combining it with small amounts of hydroxyapatite (10 wt%), and particularly by mechanical stimulation. This can be attributed to the piezoelectric effect of the material [26]. The appropriate porosity of BaTiO<sub>3</sub>/hydroxyapatite composites (50%) also increased the adhesion, growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like MG-63 cells, though no differences in these parameters were found when the polarized and non-polarized BaTiO<sub>3</sub> were tested [27]. In our earlier studies performed on LiNbO<sub>3</sub>, another type of ferroelectric ceramic, the positive polarization to a slight extent promoted the adhesion, growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like Saos-2 cells [11], and particularly of human bone marrow mesenchymal stem cells [28]. In addition, BaTiO<sub>3</sub> promoted the formation of calcium phosphates, i.e. important components of the bone tissue, when immersed in simulated body fluid [25]. The biocompatibility of hydroxyapatite-BaTiO<sub>3</sub> nanoparticles was also tested in vivo after intraarticular injection of these particles into mice. A histopathological examination of the adjacent and remote tissues and a biochemical analysis of the blood serum did not reveal any systemic toxicity or inflammatory reaction [29].

Table 4

Values of several thermal parameters of different substrates [18].

Material	Coefficient of Thermal Expansion CTE [10 <sup>-6</sup> ·K <sup>-1</sup> ]	Coefficient of Thermal Conductivity CTC [W/(m·K)]
TiNb	~7	~8
Ti	8.6	16.4
TiAlV	9.5	6.6–6.8
Fe	16.0	16.2

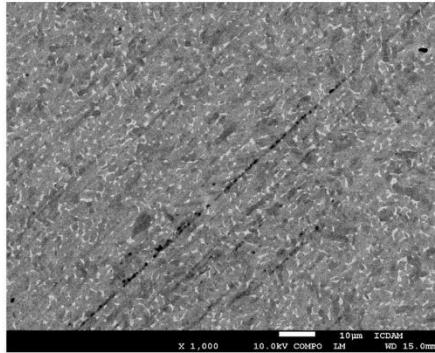


Fig. 6. SEM image of the phase structure of the TiAlV substrate. (Bright - beta phase, dark - alpha phase.)

Interestingly, the cell population densities on BaTiO<sub>3</sub> films were higher on TiNb than on the Ti substrate in all culture intervals (Figs. 4, 5), although the films seem fully continuous in the SEM images. The positive influence of Nb may be connected with the possibility of some cells finding a surface not covered by a BaTiO<sub>3</sub> film, or with the existence of some mechanism for transporting Nb ions through this film. In our earlier studies performed on MG-63 and Saos-2 cells, the cell population densities were higher on TiNb than on Ti, which was attributed mainly to the less negative zeta potential of TiNb surfaces [14,15]. Another possible explanation that should be further investigated is the surface morphology. Specifically, surfaces with similar R<sub>a</sub> can have a different profile (e.g., sharp or smooth irregularities), and also a different density of the irregularities on the material surface, which may influence the cell growth (for a review, see [30]).

### 5. Conclusion

We have used several substrate materials to obtain a β-TiNb layer with a physically and chemically defined surface. The substrate affects the properties of the layer, mainly its roughness and its morphology. We assume that the differences in the roughness and in the morphology of TiNb layers are strongly affected by the coefficient of thermal expansion and by the coefficient of thermal conductivity of the substrate. The surface orientation, especially the dependence of the thermal expansion coefficient on the orientation of the surface, can probably also change its roughness. In addition, the texture appearing in the coatings is due to the material of the coating, and is not due to the substrate material.

It is known that β-TiNb has excellent chemical resistance, and it can also have a relatively low modulus of elasticity. A PVD TiNb coating can cover various materials that have properties that may not be very suitable in terms of biocompatibility, but that have other favourable properties. TiNb can also be a promising substrate for active layers such as BaTiO<sub>3</sub>, which have very appropriate characteristics for medical applications. It was found that combinations of TiNb/BaTiO<sub>3</sub> and of Ti/BaTiO<sub>3</sub> are biocompatible and non-cytotoxic, but that significantly higher cell numbers were achieved on TiNb/BaTiO<sub>3</sub>.

### Acknowledgment

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 15-01558S), by the Agency for Czech Republic Health Research, Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. 15-27726A), and by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech

Republic (Program NPU1, project No. LO1207). Mr. Robin Healey (Czech Technical University in Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

### References

- [1] Y.J. Bai, Y.B. Wang, Y. Cheng, F. Deng, Y.F. Zheng, S.C. Wei, Comparative study on the corrosion behavior of Ti-Nb and TMA alloys for dental application in various artificial solutions, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 31 (3) (2011) 702–711.
- [2] R. Godley, D. Starosvetsky, I. Gotman, Corrosion behavior of a low modulus beta-Ti-45Nb alloy for use in medical implants, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 63–67.
- [3] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants, *Prog. Mater. Sci.* 54 (2009) 397–425.
- [4] M. Niinomi, Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 1 (1) (2008) 30–42.
- [5] Ch.Ch. Chien, K.T. Liu, J.G. Duh, K.W. Chang, K.H. Chung, Effect of nitride film coatings on cell compatibility, *Dent. Mater.* 24 (7) (2008) 986–993.
- [6] D. Bociaga, M. Kamińska, A. Sobczyk-Guzenda, K. Jastrzebski, L. Swiatek, A. Olejnik, Surface properties and biological behaviour of Si-DLC coatings fabricated by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for medical applications, *Diam. Relat. Mater.* 67 (2016) 41–50.
- [7] Kar, K.S. Raj, M. Misra, Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO<sub>2</sub> for implant applications, *Surf. Coat. Technol.* 201 (2006) 3723–3731.
- [8] S.M. Zakaria, S.H. Sharif, M.R. Othman, F. Yang, J.A. Jansen, Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review, *Tissue Eng. Part B Rev.* 19 (5) (2013) 431–441.
- [9] E. Fukada, I. Yasuda, On the piezoelectric effect of bone, *J. Phys. Soc. Jpn.* 12 (10) (1957) 1158–1162.
- [10] F.R. Baxter, C.R. Bowen, I.G. Turner, A.C.E. Dent, Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses, *Ann. Biomed. Eng.* 38 (6) (2010) 2079–2092.
- [11] P. Vaněk, Z. Kolská, T. Luxbacher, et al., Electrical activity of ferroelectric biomaterials and its effects on the adhesion, growth and enzymatic activity of human osteoblast-like cells, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 49 (2016) 175403 (12pp).
- [12] M. Jelínek, P. Vaněk, Z. Tolde, et al., PLD prepared bioactive BaTiO<sub>3</sub> films on TiNb implants, *Mater. Sci. Eng. C* 70 (2017) 334–339.
- [13] M. Niinomi, M. Nakai, J. Hieda, Development of new metallic alloys for biomedical applications, *Acta Biomater.* 8 (11) (2012) 3888–3903.
- [14] Jirka, M. Vandrovčova, O. Frank, Z. Tolde, J. Plšek, T. Luxbacher, L. Bacakova, V. Stary, On the role of Nb-related sites of an oxidized β-TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (1) (2013) 1636–1645.
- [15] M. Vandrovčova, J. Jirka, K. Novotna, V. Lisa, O. Frank, Z. Kolska, V. Stary, L. Bacakova, Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of titanium-niobium alloy, *PLoS One* 9 (6) (2014), e100475. (15pp).
- [16] V. Stary, L. Cvrček, S. Daniš, J. Krčál, J. Málek, Z. Tolde, Characterization of TiNb films on Ti alloys for hard tissue replacement, *Solid State Phenom.* 258 (2017) 345–349.
- [17] L. Bacakova, V. Lisa, C. Pellicciari, V. Mares, M.G. Bottoni, F. Kocourek, Sex related differences in the adhesion, migration, and growth of rat aortic smooth muscle cells in culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33 (6) (1997) 410–413.
- [18] Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Special-purpose Materials, 10th ed, ASM International, Materials Park, OH, 1990 1855–1859 (ISBN 0871703785).
- [19] L.B. Freund, S. Suresh, *Thin Film Materials*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2003 (Chapters 5 and 8).
- [20] E. Chason, P.R. Guduru, Tutorial: understanding residual stress in polycrystalline thin films through real-time measurements and physical models, *J. Appl. Phys.* 119 (2016) 191101, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4949263>.
- [21] I. Petrov, P.B. Barna, L. Hultman, J.E. Greene, Microstructural evolution during film growth, *J. Vac. Sci. Technol. A* 21 (5) (2003) 117–128.
- [22] S.G. Wang, E.K. Tian, C.W. Lung, Surface energy of arbitrary crystal plane of bcc and fcc metals, *J. Phys. Chem. Solids* 61 (2000) 1295–1300.
- [23] Y.C. Feng, D.E. Laughlin, D.N. Lambeth, Formation of crystallographic texture in sputter deposited Cr films, *J. Appl. Phys.* 76 (11) (1994) 7311.
- [24] X. Dai, A. Zhou, L. Feng, Y. Wang, J. Xu, J. Li, Molybdenum thin films with low resistivity and superior adhesion deposited by radio-frequency magnetron sputtering at elevated temperature, *Thin Solid Films* 567 (2014) 64–71.
- [25] S. Rahmati, M.B. Basiriani, M. Rafienia, J. Yaghini, K. Raesi, Synthesis and in vitro evaluation of electrodeposited barium titanate coating on Ti6Al4V, *J. Med. Signals Sensors* 6 (2) (2016) 106–111.
- [26] Y. Tang, C. Wu, Z. Wu, L. Hu, W. Zhang, K. Zhao, Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration, *Sci Rep* 7 (2017) 43360.
- [27] B. Liu, L. Chen, Ch. Shao, F. Zhang, K. Zhou, J. Cao, D. Zhang, Improved osteoblast growth on osteomimetic hydroxyapatite/BaTiO<sub>3</sub> composites with aligned lamellar porous structure, *Mater. Sci. Eng. C* 61 (2016) 8–14.
- [28] M. Vandrovčova, L. Bacakova, P. Vanek, J. Petzelt, Adhesion, growth and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on positively and negatively charged and uncharged ferroelectric crystal surfaces, *Eng. Biomater.* 19 (135) (2016) 2–7.
- [29] A.K. Dubey, C. Thiruvikraman, B. Basu, Absence of systemic toxicity in mouse model towards BaTiO<sub>3</sub> nanoparticulate based eluate treatment, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2) (2015) 103.
- [30] M. Vandrovčova, L. Bacakova, Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants, *Physiol. Res.* 60 (3) (2011) 403–417.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/msec](http://www.elsevier.com/locate/msec)

## On the role of Nb-related sites of an oxidized $\beta$ -TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells

Ivan Jirka<sup>a,\*</sup>, Marta Vandrovcová<sup>b</sup>, Otakar Frank<sup>a</sup>, Zdeněk Tolde<sup>c</sup>, Jan Plšek<sup>a</sup>, Thomas Luxbacher<sup>d</sup>, Lucie Bačáková<sup>b</sup>, Vladimír Starý<sup>c</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Acad. Sci. CR, v.v.i. Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Physiology, Acad. Sci. CR, v.v.i., Viděšská 1083, Prague 4, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Institute of Materials Engineering, Karlovo nám. 13, Prague 2, Czech Republic

<sup>d</sup> Anton Paar GmbH, Anton Paar Str. 20, 8054 Graz, Austria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 July 2012

Received in revised form 6 November 2012

Accepted 20 December 2012

Available online xxxxx

#### Keywords:

Osteoblast-like MG-63 cells

$\beta$ -TiNb alloy surface

Biocompatibility

Surface oxide phase

Surface acidity

### ABSTRACT

$\beta$ -Stabilized titanium (Ti) alloys containing non-toxic elements, particularly niobium (Nb), are promising materials for the construction of bone implants. Their biocompatibility can be further increased by oxidation of their surface. Therefore, in this study, the adhesion, growth and viability of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on oxidized surfaces of a  $\beta$ -TiNb alloy were investigated and compared with the cell behavior on thermally oxidized Ti, i.e. a metal commonly used for constructing bone implants. Four experimental groups of samples were prepared: Ti or TiNb samples annealed to 600 °C for 60 min in a stream of dry air, and Ti and TiNb samples treated in Piranha solution prior to annealing. We found that on all TiNb-based samples, the cell population densities on days 1, 3 and 7 after seeding were higher than on the corresponding Ti-based samples. As revealed by XPS and Raman spectroscopy, and also by isoelectric point measurements, these results can be attributed to the presence of T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oxide phase in the surface of the alloy sample, which decreased its negative zeta ( $\zeta$ )-potential in comparison with zeta ( $\zeta$ )-potential of the Ti sample at physiological pH. This effect was tentatively explained by the presence of positively charged defects acting as Lewis sites of the surface Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase. Piranha treatment slightly decreases the biocompatibility of the samples, which for the alloy samples may be explained by a decrease in the number of defective sites with this treatment. Thus, the presence of Nb and thermal oxidation of  $\beta$ -stabilized Ti alloys play a significant role in the increased biocompatibility of TiNb alloys.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The most widely-used Ti-based material for implant fabrication is an alloy composed of titanium (Ti), aluminum (Al) and vanadium (V) (Ti6Al4V) [1,2]. This alloy fulfills many requirements for an implant material, i.e. it has beneficial mechanical and chemical properties (a low Young modulus value, low density as well as fatigue and corrosion resistance), and high biocompatibility, i.e. it is tolerated by the human body and by regenerating tissue. However, a substantial drawback of TiAlV materials is the presence of small amounts of highly toxic Al and V oxide species in their surface region [3–5], which may be evolved into the body. This problem is of essential importance particularly after long-term exposure of an implant fabricated from Ti6Al4V alloy in the body. Great attention has therefore been paid to the development of new materials which contain no toxic elements and fulfill the fundamental requirements for their applicability as implants [1,2].  $\beta$ -Stabilized Ti alloys which contain non-toxic elements are therefore under extensive investigation [1,2,6–9]. In this context,

niobium (Nb) is promising as a non-toxic and moreover  $\beta$ -stabilizing agent.  $\beta$ -TiNb alloys are characterized by mechanical properties (especially by a lower Young modulus value than Ti6Al4V) which make them suitable for application as implant materials. However, only limited information is available on the role of Nb in the biocompatibility of  $\beta$ -TiNb alloy. For example, it has been reported that sol-gel-derived niobium oxide gels promoted the formation of apatite when a material was immersed in a simulated body fluid (SBF), and this supported the interaction of the implant with the surrounding bone tissue [10]. Similarly, immersion in SBF led to the deposition of an amorphous calcium phosphate layer on Nb pretreated in sodium hydroxide (NaOH) [11].

Biocompatibility of alloys and other materials is still not a well-understood phenomenon. It is affected by various material surface properties, which are often mutually interrelated, e.g. corrosivity, hydrophilicity/hydrophobicity, surface energy and charge, chemical composition (including the presence of surface functional groups), surface roughness and topography, etc. [1,2,12]. There is some range of these characteristics in which optimal cell-surface interactions appear. Various surface modifications for tailoring surface properties have been tested. These include acid and alkaline etching [13–16], thermal and anodic oxidation [17], and a combination of these two modifications: acid

\* Corresponding author. Tel.: +420 266 053 465; fax: +420 286 582 307.  
E-mail address: [Ivan.Jirka@jh-inst.cas.cz](mailto:Ivan.Jirka@jh-inst.cas.cz) (I. Jirka).

(alkaline) treatment of the material followed by calcinations [18,19], modification of the surface by polymer species [20,21], and modification by self-assembled monolayers [22] or by hydroxyapatite coatings [23], etc.

In our study, we tested the biocompatibility of  $\beta$ -TiNb alloy by *in vitro* experiments in which we investigated the responses of bone-derived cells on the surface of  $\beta$ -TiNb alloy covered by a thermally grown oxidic layer. Some of the samples were soaked in Piranha solution, i.e., in a mixture of sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), prior to thermal oxidation. The samples were finally boiled in deionized water (*dei*  $\text{H}_2\text{O}$ ). It has been shown by others that soaking Ti-based materials in Piranha solution (without subsequent annealing) induced the appearance of a nanostructure on their surface with characteristic dimension  $\sim 100$  nm. This nanostructure was found to be beneficial for adhesion and proliferation of cells [15]. A combination of soaking in Piranha solution and subsequent heat treatment of  $\beta$ -TiNb alloy and Ti is tested in the present work. Simultaneously, it is reasonable to assume that Piranha soaking may reduce surface contamination of Ti-based materials, which makes it difficult to discuss their chemical composition by surface-sensitive techniques.

The results obtained by *in vitro* experiments on the oxidized alloy samples were compared with analogous experiments on oxidized Ti surfaces. The samples were characterized in detail by various methods, including X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Raman spectroscopy (RS) Scanning electron microscopy (SEM), and electrokinetic measurements of the pH dependence of the zeta ( $\zeta$ ) potential. Using experiments designed in this way, we attempted to investigate the biocompatibility of  $\beta$ -TiNb alloy on a molecular level. A positive effect of the presence of the Nb oxidic phase in the  $\beta$ -TiNb alloy surface on its biocompatibility was proved, i.e. we observed higher adhesion, growth and viability of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on an oxidized  $\beta$ -TiNb alloy surface than on an oxidized Ti surface.

## 2. Experimental

### 2.1. Preparation of the TiNb samples

The  $\beta$ -TiNb alloy samples were prepared by arc-melting 74 at.% Ti (ingot, 99.55%, Frankstahl, Austria) with 26 at.% Nb (ingot, 99.85%, TIC, Brussels, Belgium). The melting proceeded eight times at 800–1000A/23V with subsequent solution annealing at 850 °C for 30 min and quenching in water to achieve the defined homogeneity. Using a SiC cutting wheel, the as-prepared ingot was sliced into coupons (diameter 10.5 mm, thickness  $\sim 1.5$  mm). The surfaces of the coupons were polished sequentially with abrasive paper (240, 600, 800, 1000 and 4000 grit) and with a suspension of colloidal SiC (0.05  $\mu\text{m}$ , Colloidal Silicat, Leco) into a mirror-like sheen, using a Buehler machine. The Ti and Nb coupons (9  $\times$  10 mm), used as standards, were cut from foil purchased from Goodfellow Metals, Ltd. (Ti: 99.6%, thickness 0.7 mm; Nb: 99.9%, thickness 0.1 mm). Their surfaces were polished in the same way as described above. The polished surfaces of the samples were cleaned by sonication in acetone, rinsed in deionized water (*dei*- $\text{H}_2\text{O}$ ) and dried in hot air. The surfaces of the sample were annealed in a stream of dry air (300 ml  $\text{min}^{-1}$ ). The following temperature program was used: heating rate 10 °C  $\text{min}^{-1}$  up to 600 °C, at which the sample is kept for 60 min and then cooled at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . The annealing temperature was selected to be above the  $\beta$ -transus of the  $\beta$ -TiNb alloy to avoid possible precipitation of  $\alpha$ -Ti (cf. phase diagram of Ti–Nb alloy in [24]). Some of the Ti (TiNb) samples were soaked prior to annealing for 5 min in fresh Piranha solution, prepared from 35 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%, Aldrich) and 15 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, Aldrich) under vigorous stirring. The samples, finally boiled for 30 min in copious amounts of deionized water (*dei*  $\text{H}_2\text{O}$ ), were assigned according to their composition and treatment as: TiNb600 (Ti600) – samples annealed at 600 °C without soaking in Piranha solution, and TiNbPi600 (TiPi600) – samples soaked in Piranha solution prior to annealing. The characterization results for the oxidized

samples used in the cell experiments were compared with the results for untreated samples, assigned as Ti as received and TiNb as received. The Nb foil annealed as the alloy, used as a standard for characterizing the samples by Raman spectroscopy, was referenced as Nb600. The sample characterization results refer to the samples boiled in *dei*  $\text{H}_2\text{O}$  (if not stated otherwise). Each experiment in which the investigated samples were characterized (as described below) was reproduced at least once.

### 2.2. Characterization of the samples

The XPS experiments were carried out using an ESCA 3 Mk 2 spectrometer (VG) with a hemispherical analyzer in fixed transmission mode, using a passing energy of 20 eV. The photoelectrons were excited by the Al  $K\alpha_{1,2}$  emission line (1486.6 eV). The vacuum during an experiment was of the order of  $\approx 10^{-9}$  mbar. Binding energies  $E_b$  were calibrated using the  $E_b$  of the Ti  $2p_{3/2}$  photoelectron line (458.7 eV) [25,26].

The concentrations  $c(x)$  [atoms  $\text{cm}^{-2}$ ] of oxygen ( $x=\text{O}$ ), titanium ( $x=\text{Ti}$ ), niobium ( $x=\text{Nb}$ ) and carbon ( $x=\text{C}$ ) were estimated from the integral intensities  $I(x)$  of O 1s, Ti 2p, Nb 3d and C 1s photoelectron lines after Shirley background subtraction and correction on probability of photoemission ( $\sigma(E_x)$  [barn]) [24], transmission function of the analyzer ( $T(E_x)$  [eV]) and inelastic mean free path of the photoelectrons ( $\lambda(E_x)$  [nm], where  $E_x$  stands for kinetic energy of the emitted photoelectrons of a given element  $x$  [26]):

$$c(x) = KI(x)/(\sigma(E_x)T(E_x)\lambda(E_x)) \quad (1)$$

$K$  in Eq. (1) is an instrumental constant.  $T(E_x)$  was checked to be  $\sim E_x^{-1}$ , and the value of  $\lambda(E_x)$  was  $\sim E_x^{-0.5}$ . The O, C and Nb concentrations of the TiNb (Ti) samples were discussed as atomic ratios  $c(x)$ :

$$c(x) = c(x)/(c(\text{Ti}) + c(\text{Nb})); (= c(x)/(c(\text{Ti}))) \quad (2)$$

A damped nonlinear least-square fitting procedure was used to distinguish partially resolved lines in O 1s, Ti 2p, Nb 3d and C 1s in the photoelectron spectra [27]. The spectra were approximated by a weighted sum of Gaussian and Lorentzian functions.

Raman spectra were measured using a Labram HR spectrometer (Horiba Jobin-Yvon) interfaced to an Olympus BX-41 microscope. Spectra were excited by a 633 nm laser, and the laser power under a 50  $\times$  objective was 2 mW. The Raman spectrometer was calibrated using the  $F_{1g}$  line of Si at 520.5  $\text{cm}^{-1}$ .

Electron microscopy was provided on the JEOL JSM-7600F in secondary electron mode at magnification 2000–100000 $\times$ . The microscope was equipped with an energy-dispersive X-ray spectroscopy system for microanalysis (EDS). The electrokinetic potentials ( $\zeta$ -potential) of the samples were determined using a SurPASS Instrument (Anton Paar, Graz, Austria). The samples were studied inside the adjustable gap cell in contact with the electrolyte (0.001 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  KCl). The pH dependence of the zeta potential for all samples was determined by titration with 0.1 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  HCl and 0.1 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  NaOH in the range from 2.5 to 9. The relative experimental error was 10%. Further details of the electrokinetic experiment can be found in [28].

### 2.3. Cell seeding and culture conditions

Samples TiNb600, Ti600, TiNbPi600 and TiPi600 used in the cell culture experiments were first sterilized in an autoclave (at 121 °C for 1 h) and then inserted into 12-well polystyrene cell culture plates (TPP, Switzerland; internal well diameter 21.4 mm). Then they were seeded with human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) and suspended in Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, USA, Cat. N° D5648) with 10% fetal bovine serum (FBS; Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) and gentamicin (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , LEK, Ljubljana, Slovenia). Each well contained 36000 cells (i.e., approximately 10000 cells/ $\text{cm}^2$ ) and

3 ml of the medium. The cells were cultured for 1, 3 and 7 days at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Three samples were used for each experimental group and time interval.

#### 2.4. Evaluation of the cell number and viability

Three samples for each experimental group were used for the analyses performed on day 1 after seeding. The samples were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, USA), and the cell number and viability were determined using the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Invitrogen, Molecular Probes, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the cells were incubated for 5 to 10 min at room temperature in a mixture of two of the following probes: calcein AM, a marker of esterase activity in living cells, emitting green fluorescence, and ethidium homodimer-1, which penetrated into dead cells through their damaged membrane and produced red fluorescence. The live and dead cells were then counted on microphotographs taken under an epifluorescence microscope (Olympus IX-51, DP-70 digital camera, Japan, obj. 20×).

On day 3 after seeding, the samples were rinsed with PBS, fixed with 70% frozen ethanol (room temperature, 20 min) and stained with Hoechst #33342, which stains the cell nuclei (excitation max. 346nm, emission max. 460nm; Sigma, USA; 5 µg/ml of PBS). This dye was applied for 2 h at room temperature. The number of cells was evaluated on microphotographs taken under an IX-51 microscope, equipped with a DP-70 digital camera (both from Olympus, Japan, obj. 20×).

On day 7 after seeding, when the cells reached high numbers and grew in multilayers (which hampered cell counting on the microphotographs), they were detached using trypsin-EDTA solution (Sigma, U.S.A., Cat. N° T4174) in PBS for 10 min at room temperature, and the cell number was evaluated using a Vi-CELL XR analyzer (Beckman Coulter, USA). Three samples were used for each experimental group, and 50 measurements were performed on each sample (i.e. 150 measurements in total). This experiment was also repeated three times.

#### 2.5. Statistical analysis

The quantitative data was presented as mean ± S.E.M. (Standard Error of the Mean). The statistical analyses were performed using SigmaStat (Jandel Corporation, USA). The multiple comparison procedures were carried out by the ANOVA, Student–Newman–Keuls method. The value  $p \leq 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Results of characterization

##### 3.1.1. X-ray photoelectron spectroscopy measurements

The surfaces of the Ti and TiNb samples were covered by a layer of the native oxides (*as received*) or by the oxide layer grown by thermal treatment, and by contamination composed mainly of hydrocarbons adsorbed from the ambient air and due to the cleaning procedure. Other contamination by silicon (Si), nitrogen (N) and potassium (K) found on the surface of some samples was negligible (~0.1 at.%), and is therefore not discussed here.

A typical simulation of the C 1s photoelectron spectrum of TiNb series is depicted in Fig. 1. Similar C 1s line shapes were observed for the Ti series. These results are in line with published values [29]. The line assigned as C(1) at  $E_b = 285.1\text{--}285.6$  eV is related to the presence of aliphatic hydrocarbon contamination. Lines C(2) at  $E_b = 286.7\text{--}287.3$  eV and C(3) at  $E_b = 289.0\text{--}289.5$  eV reflect the presence of C–OH and C=O functional groups of hydrocarbon contamination [29,30] (Fig. 1). The concentrations of various forms of hydrocarbon contamination  $c(C(x))$  ( $x$  stands for the number of the C 1s line (cf. Fig. 1) of the samples *as received* and heat treated with or without Piranha soaking are depicted in Fig. 2. In line with published results [29], the rather high

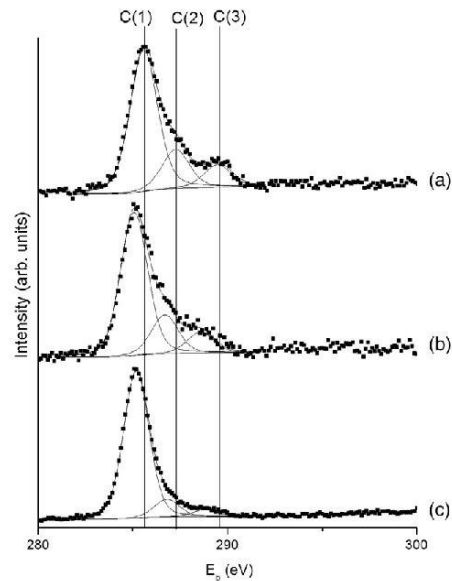


Fig. 1. Results of simulation of the C 1s spectra of samples TiNb *as received* (a), TiNb600 (b) and TiNbP600 (c). Lines 1 (assigned to C–C, C–H bonds), 2 (assigned to C–OH bonds) and 3 (C=O bonds) are distinguished.

contamination of the *as received* samples decreased substantially after heat treatment. However, no positive effect on the concentration of carbonaceous surface contaminants was found for the Piranha soaked samples.

It is generally accepted that Ti is present in the oxidized surfaces of Ti and TiNb samples in oxidation state 4+ [15,17]. Small amounts of Ti (~10%) in lower oxidation states (+2, 0), observed only in the *as received* samples, disappeared after boiling in *dei* H<sub>2</sub>O. Identical line

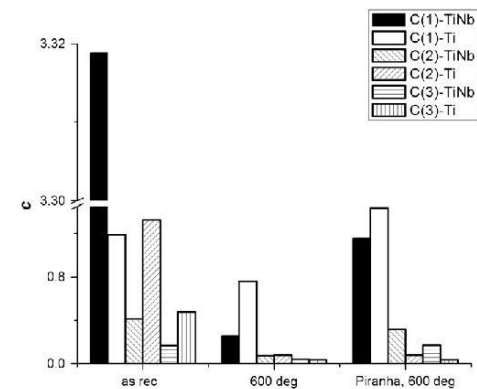


Fig. 2. Concentrations of aliphatic ( $c(C(1))$ ) and oxidized ( $c(C(2))$ ),  $c(C(3))$  carbonaceous contamination of samples TiNb600, TiNbP600, T600 and TP600. The concentrations of the Ti and TiNb samples before thermal oxidation are added for comparison (error bars: s.e.).

shapes of the Ti 2p spectra were observed along the two series of TiNb and Ti samples.

The Nb 3d<sub>5/2</sub> photoelectron line was found at E<sub>b</sub> = 207.35 eV (s.d. 0.18 eV) along the investigated series of alloy samples. Small concentrations of Nb species in lower oxidation states (~10%, low energy shoulder in the Nb 3d photoelectron spectrum) in the *as received* TiNb sample disappeared after boiling in *de* H<sub>2</sub>O. However, it was not straightforward to assign the Nb 3d<sub>5/2</sub> line. The estimated E<sub>b</sub> value was substantially lower than the value for Nb<sup>5+</sup> (207.85 eV, s.d. 0.44 eV [31]), and at the same time substantially higher than the value for Nb<sup>4+</sup> (206.0 eV, [31,32]). Nevertheless, the oxidation state of Nb in the surface oxide layer was assumed to be 5+ along the whole series of TiNb samples. This assumption is in accordance with the discussion presented below.

The treatments affected the surface concentration of Nb in the alloy samples. While the concentration of Nb in the non-calculated TiNb *as received* samples was slightly higher than the bulk concentration (corresponding value of c(Nb) = 0.34), it was observed to decrease upon heat treatment in sample TiNb600 (TiNbPi600) (c(Nb) = 0.21 (0.16), cf. Table 1). The observed slight lowering of the measured c(Nb) value in sample TiNbPi600 is readily explainable by rather high contamination of this sample (cf. Fig. 2).

To characterize the differences in abundance of variously coordinated O species in the treated surfaces of the samples, the pertinent line shapes of the O 1s photoelectron spectra will be discussed. The O 1s spectra are simulated by a minimal number of lines with full width at half maximum equal to ~1.5 eV. The results for simulation of the O 1s photoelectron spectra of the series of TiNb and Ti samples are depicted in Fig. 3. The low energy O 1s line (O(1)), can be related to the concentration of covalently bonded O atoms in the Ti (TiNb) oxide phase (mostly lattice oxygen of Ti (Nb) oxides [22,33]). The concentration of covalently bonded O atoms calculated from the O(1) lines (c(O1)) was discussed relative to the nominal concentration of skeletal O atoms (c(O)<sub>nom</sub>), equal to 2 for the Ti samples, and calculated for the TiNb alloy samples using the simple relation:

$$c(O)_{nom} = x_{Ti4+} \cdot c(Ti) + x_{Nb5+} \cdot c(Nb) \quad (3)$$

where  $x_{Ti4+}$ ,  $x_{Nb5+}$  were stoichiometric factors of oxygen bonded in TiNb oxides. Their values ( $x_{Ti4+} = 2$ ,  $x_{Nb5+} = 2.5$ ) were selected assuming lattice electroneutrality of the TiNb oxide phase and oxidation state 5+ of Nb. The corrections on the presence of Ti (Nb) in lower oxidation states in the evaluation of the c(O)<sub>nom</sub> of the samples *as received* were further included. The values of  $\Delta c(O) = c(O1) - c(O)_{nom}$  are summarized in Table 1 and in Fig. 4.

The high energy O 1s lines reflect the presence of Ti(Nb) –OH groups and O atoms bonded in oxidized hydrocarbon contamination on the investigated surfaces [33]. The O-containing groups bonded in carbonaceous contamination were identified using E<sub>b</sub> values of high energy C 1s lines (Fig. 1) as C–OH and C=O [30]. Their concentrations were calculated using intensities of pertinent C 1s lines by Eqs. (1), (2). The overall concentration of the O-containing functional groups on the surface of the TiNb (Ti) samples before (c(O)<sup>high</sup>) and after correction for the presence of C–OH (C=O) groups (c(O)<sup>high,corr</sup>) was discussed. The values of c(O)<sup>high</sup> and c(O)<sup>high,corr</sup> are summarized in Fig. 4 and Table 1. The hydrocarbon contamination functional groups participated dominantly in the intensity of the high energy O 1s spectra.

**Table 1**  
Δc(O), c(O)<sup>high</sup>, c(O)<sup>high,corr</sup> and c(Nb) values of the investigated samples.

Sample	Δc(O)	c(O) <sup>high</sup>	c(O) <sup>high,corr</sup>	c(Nb <sub>x</sub> )
TiNb <i>as received</i>	-0.16	1.69	0.25	0.34
Ti <i>as received</i>	0.00	0.99	0.22	0
TiNb600	0.24	0.39	0.14	0.21
Ti600	0.50	0.50	0.07	0
TiNbPi600	0.30	0.57	0.08	0.16
TiPi600	0.26	1.29	0.16	0

### 3.1.2. Raman spectroscopy

Fig. 5 shows the Raman spectrum of the TiNb600 sample, compared to the spectrum of the Ti600 and Nb600 samples. Featureless spectra were observed in agreement with published data [15] for the *as received* samples. Soaking the samples in Piranha solution and boiling them in *de*-H<sub>2</sub>O did not induce any changes in the Raman spectra.

The main spectral features in the spectrum of the Ti600 sample clearly belong to the rutile phase [34] of TiO<sub>2</sub> – a weak band at 144 cm<sup>-1</sup> (B<sub>1g</sub> vibration), a broad band at 234 cm<sup>-1</sup> (multi-phonon processes, close to band (ii) of the Nb600 sample), an intense band at 446 cm<sup>-1</sup> (E<sub>g</sub>), an intense band at 612 cm<sup>-1</sup> (A<sub>1g</sub>), and a weak shoulder band at 825 cm<sup>-1</sup> (B<sub>2g</sub>) (Fig. 5, spectrum a). This finding was in line with published diffraction (XRD) data (cf. JCPDS no.: 88-1175). The spectrum of the Nb600 sample shows several weak broad bands at 125, 232, 315 and 415 cm<sup>-1</sup>, an intense broad asymmetric band at ~690 cm<sup>-1</sup> and a weak broad band at ~830 cm<sup>-1</sup> (cf. bands (i)–(v) in spectrum b, Fig. 5). The presence of these bands points unambiguously to orthorhombic Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [35]. The band at 690 cm<sup>-1</sup> (band (v)) is assigned to the symmetric stretching vibration of the slightly distorted NbO<sub>6</sub> octahedra, while the weak bands in the lower wavenumber region belong to the Nb–O–Nb bending vibrations, and the weak band ((vi)) at 830 cm<sup>-1</sup> belongs to the symmetric stretch of the Nb=O surface sites [35]. The heat treatment temperature (600 °C) is thus fully reflected in the Raman spectrum – especially due to the appearance of weak but well resolved bands in the 400–500 and 800–900 cm<sup>-1</sup> regions, which probably mark the onset of the T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase, in contrast to the TT-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase, where these regions contain no clearly distinguished bands [35].

In the wavenumber region >400 cm<sup>-1</sup>, the spectrum of the TiNb600 sample (Fig. 5, spectrum c) is a linear combination of the two above-described spectra of pure TiO<sub>2</sub> (rutile, spectrum a) and T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (spectrum b) with the main bands as well as the shoulders indicated by arrows. It can be seen that the main bands correspond to the TiO<sub>2</sub> rutile phase; however, the bands are much broader, and are redshifted, especially in the case of the E<sub>g</sub> band at 446 cm<sup>-1</sup>. This indicates a substantial decrease in the rutile crystallite size, leading to phonon confinement [36] in the alloy compared to pure Ti600. The lower wavenumber region in the TiNb600 Raman spectrum shows a much stronger signal than what would be expected from pure compounds. However, their main features can be still recognized in the alloy spectrum, again labeled by the corresponding arrows. There is no clear evidence of any other ordered crystalline phase in the spectrum, but the presence of amorphous matter of some kind cannot be ruled out. The more intense-than-expected background in the Raman spectrum of TiNb600 could be a hint that some amorphous matter is present.

### 3.1.3. SEM results

The morphology of the samples is influenced mainly by the substrate material and by the preparation schedule, including all the stages of surface modification. Typical SEM images of the investigated samples are summarized in Fig. 6. Grinding and polishing generally provided very smooth samples, which were damaged, probably by the grains of polishing agent, only in some local places, mainly in the case of relatively soft Ti. Without etching with Piranha solution, and after oxidation, the surfaces of the TiNb samples (TiNb600, Fig. 6(a)) are smooth and structureless. This smooth surface is observed up to magnification 100 000 times. In some images, particles appeared that were probably torn off the oxide layer. This occasional debris composed of Ti and Nb oxides (as estimated by EDS) occurs on the material surface, as indicated by light-colored particles on the TiNb600 samples (Fig. 6A). However, these features disappeared after Piranha treatment (Fig. 6B). A rather rough surface was observed for the Ti sample (Ti600, Fig. 6(b)). A more complicated structure on the surface of the Ti600 sample is formed by irregular grains with dimensions around ~100 nm, with small pores of ~50 nm ~50 nm in dimensions among them (not shown). The presence of a pronounced morphology causes the appearance of a white (or light-colored) phase.

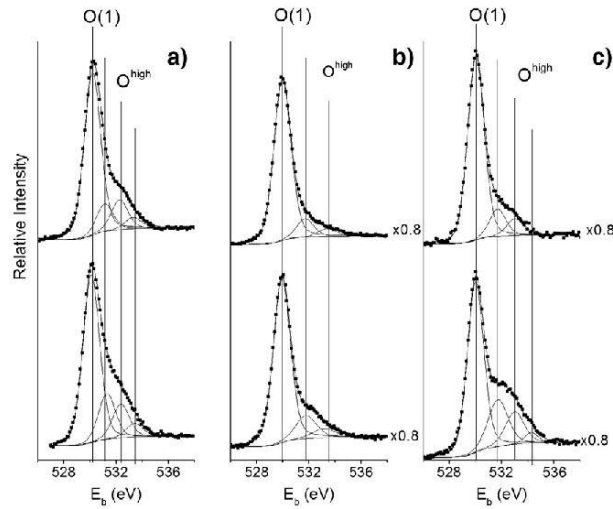


Fig. 3. Results of simulation of the O 1s spectra of the samples as received (a), calcinated at 600° (b), and soaked in Piranha solution prior to calcination (c). The simulated spectra of the TiNb samples (top of the Figure) were compared with the spectra of the Ti samples (bottom of the figure).

Higher roughness was also observed for the oxide surfaces on the Piranha etched samples. Here, the surface of the Ti sample (Ti600, Fig. 6(c)) again has a more pronounced (substantial, considerable, distinctive) morphology than the TiNb sample (TiNb600, Fig. 6(d)). In this case, the more pronounced morphology is caused not only by the surface morphology of the oxide, but also by the morphology of the surface after Piranha etching. The fine structure of the surface on both samples with dimensions of about ~50–100 nm is very similar. However, in range of ~0.5 μm, a large number of irregularities are seen on the surface of the Ti samples. These irregularities are copied into the morphology of the oxide layer (Fig. 6(d)); compare the size of the light-colored phase details in Fig. 6(d)). A comparison of the images of the morphology of the oxide layer on un-etched vs. etched metallic substrates indicates

that the etching influences the morphology on Ti, but does not influence the morphology on TiNb alloy.

3.1.4. Electrokinetic measurements

The results of the measurements of the pH dependences of the electrokinetic zeta (ζ-) potentials were used to characterize the topmost surface of samples Ti600 and TiNb600 (Fig. 7), i.e. the samples with the least contaminated surfaces. According to the estimated values of the isoelectric points (IEP), the surface of sample TiNb600 (IEP = 3.4 ± 0.1) was more acidic than the surface of sample Ti600 (IEP = 4.1 ± 0.1). Less negative ζ potential values were found in the region of physiological pH for the alloy sample.

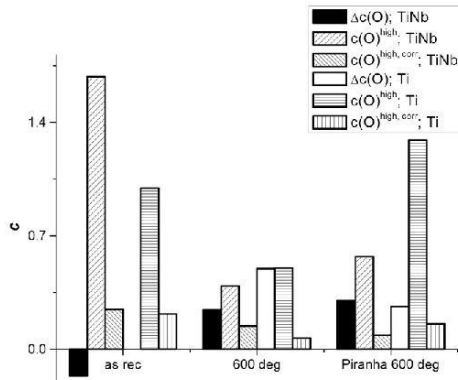


Fig. 4. The values of  $c(O)^{high}$  and  $\Delta c(O)$  of the investigated samples. The former values before and after correction for concentration of O bonded in carbonaceous contamination are distinguished (error bars: s.e.).

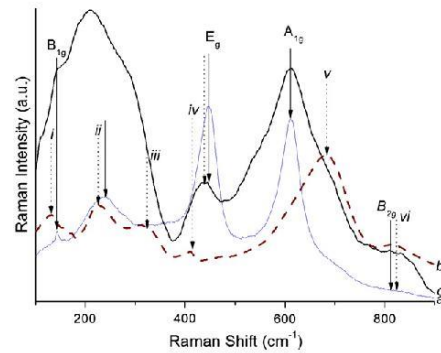


Fig. 5. Raman spectra of sample Ti600 (a), Nb600 (b) and TiNb600 (c).

Please cite this article as: I. Jirka, et al., Mater. Sci. Eng., C (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.073>



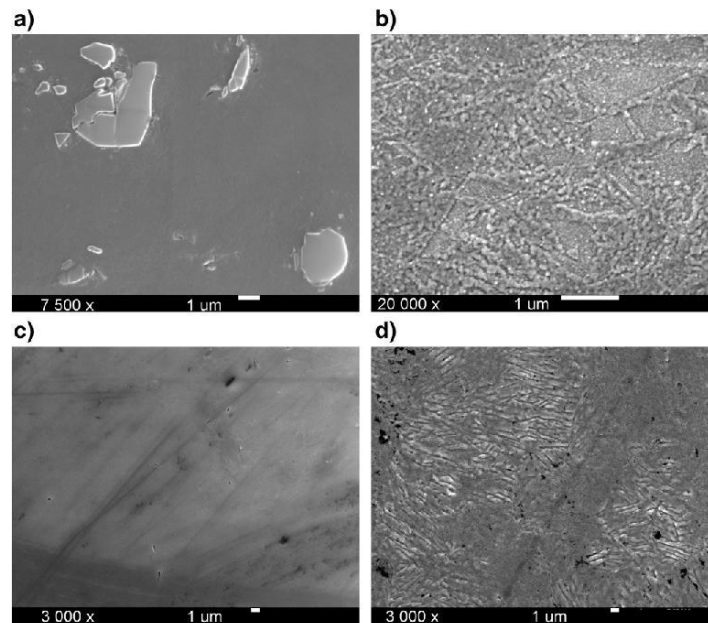


Fig. 6. SEM images of samples (A) TiNb600 (top) and Ti600 (bottom), (B) TiNbPi600 (top), and TiPi600 (bottom).

### 3.2. Adhesion, growth and viability of cells in cultures on the tested materials

On day 1 after seeding, the cell numbers on materials with different surface chemistry and surface modification were evaluated. The cells differed in number for materials with different chemical compositions, i.e. on the Ti and TiNb alloy surfaces. On an average, the highest number of initially adhered cells was found on the TiNbPi600 and TiNb600 samples ( $31500 \pm 3300$  cells/cm<sup>2</sup> and  $28800 \pm 2700$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively). These cell numbers were significantly higher than the values on the

bottom of the control polystyrene culture dishes ( $10300 \pm 1000$  cells/cm<sup>2</sup>) (Fig. 9A). The viability of the cells on all tested materials, evaluated by the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, was high, nearly 100%, and there were no significant differences among the tested groups (Fig. 10, Table 2).

From days 1 to 3 after seeding, the cells on the surfaces of the Ti600 and TiNb600 samples proliferated with significantly shorter cell population doubling times than on the Piranha-treated samples and on the control polystyrene culture dishes (Table 3). As a result, on day 3 after seeding, the cell population densities on only heated samples were significantly higher than on samples pretreated with the Piranha solution. Nevertheless, the cell population densities achieved on the TiNb-based samples (including Piranha-treated samples) still remained higher than the values obtained on the corresponding Ti samples. On day 3 after seeding, the highest cell population densities were reached on the TiNb600 and TiNbPi600 samples ( $154600 \pm 5600$  cells/cm<sup>2</sup> and  $125800 \pm 10000$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively). These values were significantly higher than those on the Ti600 and TiPi600 samples ( $49800 \pm 3900$  cells/cm<sup>2</sup> and  $32500 \pm 1500$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively) and on the control polystyrene culture dish ( $33000 \pm 2900$  cells/cm<sup>2</sup>) (Figs. 9B, 10).

From days 3 to 7, the cells on both groups of TiNb samples slowed down their proliferation significantly (Table 3). Nevertheless, on day 7 after seeding, the cell numbers on the TiNb600 and TiNbPi600 samples ( $708300 \pm 22600$  cells/cm<sup>2</sup> and  $493300 \pm 16200$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively) still remained significantly higher than the values on the Ti600 and TiPi600 samples ( $404900 \pm 14900$  cells/cm<sup>2</sup> and  $215700 \pm 8500$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively), and on the control polystyrene culture dish ( $409100 \pm 9600$  cells/cm<sup>2</sup>) (Fig. 9C).

On all tested materials, the cell viability, evaluated during automatic cell counting in the Vi-CELL XR Analyser using the trypan blue-exclusion test, ranged from  $76.9 \pm 2.2\%$  to  $87.3 \pm 1.0\%$ . The values for viability on

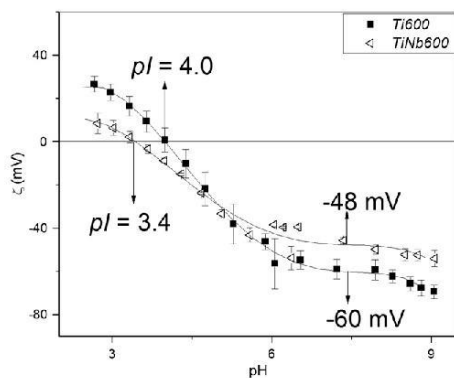


Fig. 7. Dependence of the zeta potential (mV) of sample TiNb600 and Ti600 on pH.

Please cite this article as: I. Jirka, et al., Mater. Sci. Eng., C (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.073>

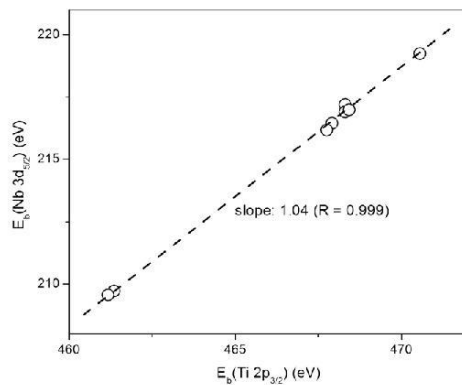


Fig. 8. Correlation of  $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2})$  (eV) of the alloy samples with their  $E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$  (eV) values.

day 7 were lower than the values obtained on day 1. The reason for this may lie in the different methods used for evaluating viability. Whereas on day 1 the cells were stained directly on the material with the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, on day 7 the cells were subjected to trypsinization and resuspension, which may have damaged the cells. At the same time, the cell viability on the Nb-containing samples, i.e. *TiNb600* and *TiNbPi600*, was significantly higher than on the corresponding samples containing only Ti (Table 2).

#### 4. Discussion

The attachment, proliferation, differentiation and other behavior of bone-derived cells on solid materials depends on the physico-chemical properties of the material surface. Cell adhesion is mediated by extracellular matrix (ECM) molecules. These molecules have to be adsorbed in an appropriate conformation, which is affected by surface properties such as surface energy, polarity, charging, wettability, topography, roughness, etc. The definite material properties result in the exhibition of specific sites in the adsorbed proteins and subsequent recognition and bonding by cell adhesion receptors [1,2,37,38].

The chemical composition of the material surface is an important factor. The properties of  $\beta$ -TiNb alloy are related to the presence of various oxygen-containing functional groups that increase the energy, polarity and wettability of the surface, and support the adhesion and growth of cells [39]. The surface morphology of the cell growth support can be another factor that favors cell adhesion. An enhanced nanostructure of the surface of Ti-based materials has been found to be beneficial for cell adhesion [15,40]. Both of these effects may promote the appearance of suitable conformations of ECM molecules, which support cell adhesion. However, our study has not proved any positive effect of the surface nanostructure in causing higher biocompatibility of  $\beta$ -TiNb alloy samples than of Ti samples. The SEM images show a structureless character of the *TiNb600* (*TiNbPi600*) alloy samples and a rather rough surface of the *Ti600* (*TiPi600*) samples (Fig. 6). No increase in surface roughness was observed on the *TiNbPi600* and *TiPi600* in comparison with the surface roughness of samples *Ti600* and *TiNb600* (Fig. 6). The rougher *Ti600* surface was found to be less bioactive, although the size of the irregularities on this surface is still within the nanoscale, i.e. 100 nm. The same conclusion was found for the *as received* samples (data not shown here).

A difference in the surface properties of Ti-based and TiNb-based samples, which may affect their biocompatibility, is the higher acidity of the surface of the TiNb-based samples. The increase in surface acidity is simply explainable as a consequence of the presence of Nb-related

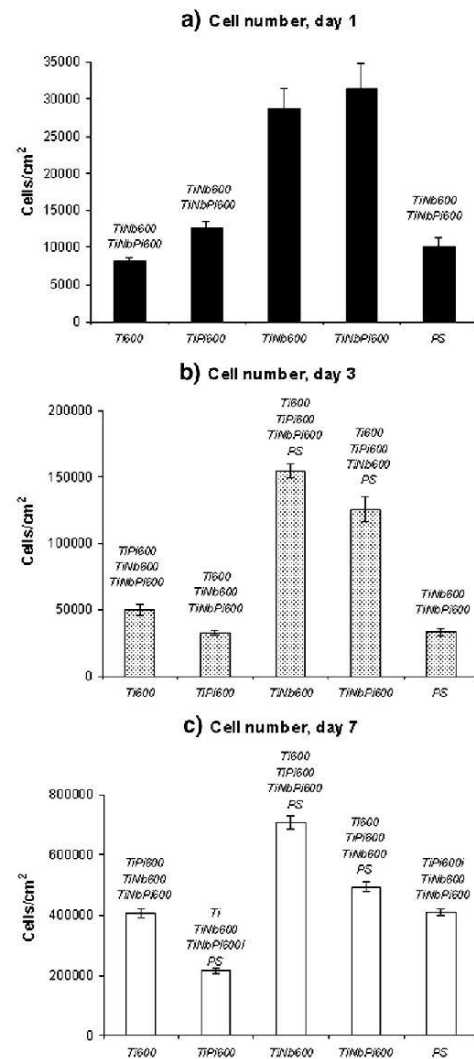
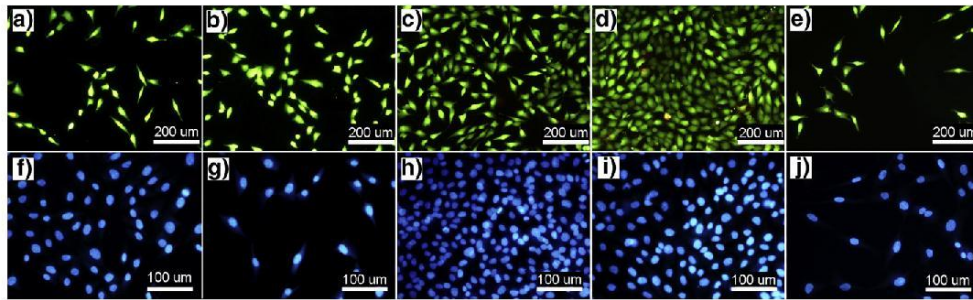


Fig. 9. Number of osteoblast-like MC G3 cells on days 1, 3 and 7 after seeding on Ti and TiNb samples subjected to thermal oxidation at 600 °C (*Ti600* and *TiNb600*), or samples pretreated by Piranha solution (Pi) prior to thermal oxidation (*Ti600+Pi* and *TiNb600+Pi*, respectively). Mean  $\pm$  SEM. (Standard Error of Mean) from 3 samples (in total 9 measurements) for each experimental group and time interval. ANOVA, Student–Newman–Keuls method. Above the columns, significantly different samples are mentioned ( $p \leq 0.05$ ).

species in the topmost surface of the alloy samples. The T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase (observed by Raman spectroscopy in the alloy samples) does indeed contain more acidic sites [41] than the amphoteric rutile phase [43]. In principle, however, the presence of Nb species in the topmost surface of the alloy samples may be questioned, particularly for the annealed samples. While no evidence is found by XPS for depletion of Nb in the



**Fig. 10.** Morphology, distribution and viability of human osteoblast-like MG 63 cells on day 1 (A–E) and on day 3 (F–J) after seeding on samples Ti600 (A, F), Ti600 (B, G), TiNb600 (C, H), TiNbTi600 (D, I) and polystyrene culture wells (E, J). Stained with LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (A–E) or Hoechst 33342 (F–J). Olympus IX 51 microscope, DP 70 digital camera. Obj. 10×, bar=200 μm (A–E); obj. 20×, bar=100 μm (F–J).

surface region in the non-oxidized TiNb sample, the surface concentration of Nb is lowered in the TiNb600 sample (cf. Table 1, last column). This effect can be explained mainly by coverage of the surface Nb sites by Ti species segregated into the topmost surface of the alloy samples upon annealing. In principle, all surface Nb sites of the alloy samples may be covered by this mechanism. Estimates of the surface concentration of Nb for TiNb600 sample are rather unambiguous, however, due to the rather high contamination by hydrocarbons (cf. Fig. 2). However, it follows from the results of the electrokinetic titration experiment that the acidity of the surface of the TiNb600 sample is higher than the acidity of the surface of the Ti600 sample. Indeed, the IEP value of the oxidized alloy samples estimated by measuring the dependence of the zeta potential on pH is equal to 3.4, while the IEP of the oxidized Ti samples is equal to 4.0 (Fig. 7). Thus, some of the Nb atoms remain in the topmost surface of the TiNb600 samples even after annealing to 600 °C. The surface charge of sample TiNb600 is less negative ( $\zeta \sim -48$  mV) than the surface charge of sample Ti600 ( $\zeta \sim -60$  mV) at physiological pH (Fig. 7). This effect may be responsible for the higher cell population densities found on the TiNb600 sample. The electrokinetic titration experiment was not performed for samples Ti600 and TiNbTi600 due to their high hydrocarbon contamination.

Raman spectroscopy identifies the Nb oxide phase as T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in the TiNb600 (TiNbTi600) alloy sample. However, a part of the Nb and Ti oxide species may in principle also be present in the surface region of the alloy samples in another form, including some amorphous Nb–Ti mixed oxide phases, and Nb species with an oxidation number lower than 5+, [44,45]. These effects may tune the acidobasic properties of the surface of the alloy sample. The appearance of these surface phase(s), which are not visible by Raman spectroscopy, would induce changes in the first coordination sphere of Nb and Ti atoms, i.e. they would induce shifts in the core level  $E_b$  values of Ti and Nb. For the  $E_b$  value of a given element  $A$  of the insulating sample, it holds [26]:

$$E_b = -kq_A + V_A + R + C \quad (3)$$

where  $-kq_A$  reflects the dependence of  $E_b$  on the amount of negative charge on atom  $A$ ,  $V_A$  is the Madelung potential, which describes the

electrostatic interaction of a single atom  $A$  and the other atoms coordinated around it,  $R$  is a relaxation term which includes the response of the solid to the creation of a core hole localized in atom  $A$ , and  $C$  reflects the reference level shift which includes the charging effects during photoemission.

Possible changes in the chemical composition of the first coordination sphere of Nb induced by the treatments that are applied can be tested simply by plotting the  $E_b$  of the Nb 3d<sub>5/2</sub> line ( $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2})$ ) of the alloy samples against the  $E_b$  of the Ti 2p<sub>3/2</sub> line ( $E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$ ) (Fig. 8). The data for all investigated alloy samples, including those before boiling in *de* H<sub>2</sub>O, is employed. The two  $E_b$  values are not calibrated, as every relevant pair of values of  $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2})$  and  $E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$  is estimated in a single experiment, i.e. they are systematically affected by  $C$ .

The values of  $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2})$  are linearly shifted with  $E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$  when their shifts are induced solely by the reference level ( $C$ ) shift, i.e. when no changes in the coordination mode of Ti and Nb and their oxidation state proceed. Indeed, the  $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2}) - E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$  dependence is linear with a high value of  $R^2$  and a unit slope (Fig. 8). Thus, no evidence is found from the values of  $E_b(\text{Nb } 3d_{5/2})$  and  $E_b(\text{Ti } 2p_{3/2})$  for any changes in the chemical composition of the first coordination sphere of Ti and Nb along the series of investigated samples. This finding is in accordance with the identical line shapes of the Nb 3d and Ti 2p photoelectron spectra (except some changes in the low energy region, which is limited to the *as received* samples only). Thus, the surfaces of all alloy samples are covered by an oxide phase, which differs significantly mainly in its thickness, which influences the value of  $C$ . Taking into account the Raman results, we can conclude that the whole series of alloy samples is covered by two distinct phases of Ti<sup>4+</sup> (rutile) and Nb<sup>5+</sup> (T Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) oxide phases. No evidence for a Ti–Nb mixed oxide phase is found.

Observed differences in the acidity of the Ti and TiNb surfaces may be related to the presence of various Brønsted Ti–OH and Nb–OH sites coordinated on these surfaces, as is evident from the values of  $\Delta c(\text{O})$  and the presence of high energy lines in the O 1s photoelectron spectra (Figs. 4, 5). Unfortunately, the Ti–O and Nb–O coordinations cannot be distinguished from the O 1s photoelectron spectra. Moreover, the intensities of the high energy O 1s lines are too low to discuss them separately (cf. Fig. 4). However, some qualitative findings can be drawn.

**Table 2**

Percentage of viable cells on all tested materials, evaluated by the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit on day 1 after seeding (from 36 microphotographs on day 1) and automatic cell counting in the Vi-CELL XR Analyser, using the trypan blue-exclusion test (from 200 measurements). Mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of Mean). \* $p \leq 0.05$  compared to the corresponding Ti samples.

	Ti600	Ti600	TiNb600	TiNbTi600	PS
Viability on day 1 after seeding	99.15 $\pm$ 1.36	99.52 $\pm$ 0.20	99.42 $\pm$ 0.22	99.59 $\pm$ 0.18	99.46 $\pm$ 0.24
Viability on day 7 after seeding	80.92 $\pm$ 1.68	76.89 $\pm$ 2.19	87.26 $\pm$ 0.99*	84.25 $\pm$ 1.15*	86.85 $\pm$ 0.72

Please cite this article as: I. Jirka, et al., Mater. Sci. Eng., C (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.073>

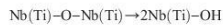
**Table 3**

Cell population doubling time (hours) of MG 63 cells between days 1 to 3 and 3 to 7 after seeding on Ti and TiNb samples treated by heat (600) and pretreated by Piranha solution (P) before heating.

Material/DT	Ti600	TiP600	TiNb600	TiNbP600	PS
Days 1 to 3 Significant $t_{\alpha}$	18.6 ± 0.8	36.0 ± 1.6	19.9 ± 2.0	27.6 ± 4.5	29.8 ± 2.1
Days 3 to 7 Significant $t_{\alpha}$	32.9 ± 0.6	35.9 ± 0.8	51.6 ± 4.6	52.6 ± 4.4	26.6 ± 0.7

Mean ± S.E.M. (Standard Error of Mean) from 9 measurements. ANOVA, Student–Newman–Keuls method, statistical significance:  $p < 0.05$ .

The values of  $\Delta c(O)$  may be related to the number of covalently bonded –OH groups, created by dissociation of the Nb–O–Nb (Ti–O–Ti) bridges in the oxidized samples, schematically described as follows:



i.e.  $\Delta c(O) > 0$ , or they may reflect the presence of defective sites in the lattice of the surface oxide ( $\Delta c(O) < 0$ ), as observed for the *as received* TiNb sample, cf. Table 1, Fig. 4). However, as indicated by our preliminary experiments (data not shown here), the number of initially adhering MG 63 cells was similar both for the oxidized alloy samples and for the *as received* alloy samples, and the subsequent cell proliferation, manifested by the cell population densities in the days after seeding, was even lower on the oxidized samples. The Ti(Nb) sites related to the value of  $\Delta c(O)$  thus do not increase the biocompatibility of the alloy samples.

The presence of other –OH groups induces changes in the line shapes of the high energy region of the O 1s photoelectron spectra. Their favourable effect on cell adhesion and functioning on the heat-treated Ti (rutile) surfaces has already been established [42]. The presence of both acidic and basic –OH groups on these surfaces [43] supported the adhesion of osteoblasts and the activity of alkaline phosphatase in these cells, although this effect was mediated more by the basic –OH groups than by the acidic –OH groups. The more pronounced effect of the basic OH groups is explained by the fact that they endowed the material surface with a positive charge, which facilitates the adsorption of cell adhesion-mediating proteins (mainly fibronectin and vitronectin) from the serum of the culture medium [42]. At the same time, the presence of OH groups on the material surface decreased the adsorption of albumin, i.e. a protein present in the serum supplement of the cell culture media, which is non-adhesive for cells [46]. This effect has been attributed to the increased wettability of OH-functionalized surfaces.

Last but not least, both acidic and basic –OH groups stimulate the formation of calcium phosphates, i.e. important components of the inorganic bone extracellular matrix, on the material surface. Acidic –OH groups on the material surface tend to act as cation exchange sites, while basic –OH groups may act as anion exchange sites. Thus, it has been suggested that the hydroxyl groups contribute to bone growth, as calcium ions bind with acidic groups and phosphate molecules bind with basic groups [47]. The source of both calcium and phosphate ions are biological fluids, including cell culture media.

According our results, the alloy surface is more biocompatible than the Ti surface (cf. Fig. 9). The IEP values in Fig. 7 show that the TiNb surface is more acidic than the Ti surface. This effect may be caused by the presence of more acidic –OH groups bonded on Nb sites. Other sites of the Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase may be related to defects. Nb atoms mostly have octahedral coordination, but they may also be coordinated tetrahedrally. Niobium sites in tetrahedral coordination act as water-tolerant strong Lewis acid sites [41]. Some high energy O 1s lines may thus be assigned to both Nb Lewis sites and Nb Brønsted sites. However, direct evidence for this assignment is complicated, due to very low concentration of the surface Ti (Nb) sites on the investigated samples. Indirect evidence for the presence of Nb-Lewis sites follows from the lowered biocompatibility

of sample TiNbP600, manifested by the lower cell numbers observed on days 3 and 7 than for the TiNb600 samples (Fig. 9). This lowering can be associated with the decrease in the number of Lewis sites in the case of oxidative treatment in Piranha solution.

## 5. Conclusions

Thermal oxidation of a  $\beta$ -TiNb alloy sample causes its surface to be covered by two distinct crystalline oxide phases: T-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and rutile. No evidence was found for the presence of Ti–Nb mixed oxide phase. The surface of the alloy sample contains Nb-related sites which are difficult to identify directly due to their relatively low concentration. As their presence causes a decrease in zeta ( $\zeta$ ) potential at physiological pH, we propose that some Nb sites are related to the surface defects, i.e. to positively-charged tetrahedral coordinated Nb atoms which act as a water tolerant Lewis site. Reducing the zeta ( $\zeta$ ) potential has a positive influence on the adhesion and subsequent proliferation of osteoblast-like MG 63 cells on  $\beta$ -TiNb alloy. Piranha treatment does not further improve the cell colonization of these samples. On the Piranha-treated Ti and TiNb samples, the cell population densities (on days 3 and 7 after seeding) were even significantly lower than on the corresponding samples oxidized only by heating. This may be attributed to a decrease in the number of surface Lewis sites after oxidative Piranha treatment. Thus, thermally oxidized TiNb (600 °C, 60 min) was the most attractive sample for cell colonization.

## Acknowledgment

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant no. P108/10/1858). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

## References

- [1] X. Liu, P.K. Chu, Ch. Ding, Mater. Sci. Eng. Rep. 47 (2004) 49–121.
- [2] M. Vandrovová, L. Bačáková, Physiol. Res. 60 (2011) 403–417.
- [3] I. Milošev, M. Metikoš-Huković, H.-H. Strehlow, Biomaterials 21 (2000) 2103–2113.
- [4] T.M. Lee, E. Chang, C.Y. Yang, J. Biomed. Mater. Res. 50 (2000) 499–511.
- [5] A. Cremasco, W.R. Osório, C.M.A. Freire, A. Garcia, R. Caram, Electrochim. Acta 53 (2008) 4867–4874.
- [6] E. Eisenbarth, D. Velten, M. Mueller, R. Thull, A. Breme, Biomaterials 25 (2004) 5705–5713.
- [7] R. Goodley, D. Starosvetsky, I. Gotman, J. Mater. Sci. Mater. Med. 17 (2006) 63–67.
- [8] J. Xiong, Y. Li, P.D. Hodgson, C. Wen, Acta Biomater. 6 (2010) 1584–1590.
- [9] Y.B. Wang, Y.F. Zheng, Mater. Lett. 63 (2009) 1293–1295.
- [10] L.L. Denry, J.A. Holloway, R.J. Nakkula, J.D. Walters, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 75 (2005) 18–24.
- [11] R. Goodley, D. Starosvetsky, I. Gotman, J. Mater. Sci. Mater. Med. 15 (2004) 1073–1077.
- [12] S.G. Steinemann, Periodontology 2000 (17) (1998) 7–21.
- [13] T. Kokubo, S. Yamaguchi, Adv. Eng. Mater. 12 (2010) B579–B591.
- [14] X. Lu, Y. Wang, X. Yang, Q. Zhang, Z. Zhao, L.-T. Weng, Y. Leng, J. Biomed. Mater. Res. A 84A (2008) 523–534.
- [15] Ji-Hyun Yi, C. Bernard, F. Variola, S.F. Zalzal, J.D. Wuest, F. Rosei, A. Nanci, Surf. Sci. 600 (2006) 4613–4621.
- [16] J. Strnad, Z. Strnad, J. Šesták, J. Therm. Anal. Calorim. 88 (2007) 775–779.
- [17] G. Zorn, A. Lesman, I. Gotman, Surf. Coat. Technol. 201 (2006) 612–618.
- [18] T. Kokubo, D.K. Pattachayak, S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Kawai, M. Takemoto, S. Fujibayashi, T. Nakamura, J. R. Soc. Interface 7 (2010) S503–S513.
- [19] T. Kokubo, S. Yamaguchi, Adv. Biomaterials 12 (2010) B579–B591.
- [20] Xiaowu Fan, Lijun Lin, P.B. Messersmith, Biomacromolecules 7 (2006) 2443–2448.
- [21] A. Michiardi, G. Hélyary, C.T. Nguyen, L.J. Gamble, F. Anagnostou, D.G. Castner, V. Migonney, Acta Biomater. 6 (2010) 667–675.
- [22] G. Zorn, I. Gotman, E.Y. Gutmanas, R. Adadi, G. Salitra, C.N. Sukeinik, Chem. Mater. 17 (2005) 4218–4226.
- [23] Jianyu Xiong, Yuncang Li, P.D. Hodgson, Cu'e Wen, Acta Biomater. 6 (2010) 1584–1590.
- [24] D.L. Moffat, U.R. Katner, Metall. Trans. A 19 (1988) 2389–2397.
- [25] J. Scofield, J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 8 (1976) 129–137.
- [26] D. Briggs, M.P. Seah, Practical surface analysis, Wiley, Chichester, 1990.
- [27] R.W.M. Kwok, XPSpeak, version 4.1; Hong Kong, <http://www.phy.cuhk.edu.hk/~surface/XPSPEAK1999>.
- [28] T. Lusbacher, Desalination 199 (2006) 376–377.
- [29] J. Lusbacher, J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 81 (1996) 343–361.
- [30] H. Estrade-Szwarczkopf, Carbon 42 (2004) 1713–1721.

Please cite this article as: I. Jirka, et al., Mater. Sci. Eng., C (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.073>

- [31] V.V. Atuchin, I.E. Kalabin, V.G. Kesler, N.V. Pervukhina, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* 142 (2005) 129–134.
- [32] D. Morris, Y. Dou, J. Rebane, C.E.J. Mitchell, R.G. Edgell, D.S.L. Law, A. Vitadini, M. Casarin, *Phys. Rev. B* 61 (2000) 13445–13457.
- [33] T.K. Sham, M.S. Lazarus, *Chem. Phys. Lett.* 68 (1979) 426–432.
- [34] P.S. Porto, P.A. Fleury, T.C. Damen, *Phys. Rev.* 154 (1967) 522–526.
- [35] J.-M. Jehng, I. Wachs, *Chem. Mater.* 3 (1991) 100–107.
- [36] V. Swamy, B.C. Muddle, Q. Dai, *Appl. Phys. Lett.* 89 (2006) 163118.
- [37] L. Bačáková, E. Filová, F. Rypáček, V. Švorčík, V. Starý, *Physiol. Res.* 53 (Suppl. 1) (2004) S35–S45.
- [38] L. Bačáková, V. Švorčík, in: Daiki Kimura (Ed.), *Cell Growth Processes: New Research*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, 2008, pp. 5–36, ISBN 978-1-60456-123-6.
- [39] L. Bačáková, E. Filová, M. Pařízek, T. Ruml, V. Švorčík, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 739–767.
- [40] M. Vandrovcová, J. Hanus, M. Drabik, O. Kylian, H. Biederman, V. Lisa, L. Bačáková, *J. Biomed. Mater. Res.* 100 (2012) 1016–1032.
- [41] K. Nakajima, Y. Baba, R. Noma, M. Kitano, J.N. Kondo, S. Hayashi, M. Hara, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2010) 4224–4227.
- [42] B. Feng, J. Weng, B.C. Yang, S.X. Qu, X.D. Zhang, *Biomaterials* 24 (2003) 4663–4670.
- [43] H.P. Boehm, *Discuss. Faraday Soc.* 52 (1971) 264–289.
- [44] A.M. Ruiz, G. Dezanneau, J. Arbiol, A. Cornet, J.R. Morante, *Chem. Mater.* 16 (2004) 862–871.
- [45] P.A. de Sario, M.E. Graham, R.M. Gelfand, K.A. Gray, *Thin Solid Films* 519 (2011) 3562–3568.
- [46] P. Bai, X. Cao, Y. Zhang, Z. Yin, Q. Wei, C. Zhao, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21 (2010) 1559–1572.
- [47] Y.J. Park, H.J. Song, I. Kim, H.S. Yang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 565–575.

Please cite this article as: I. Jirka, et al., *Mater. Sci. Eng., C* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.073>

## Nanostructure Formation in Anodic Films Prepared on a $\beta$ Alloy Ti39Nb PVD Layer

Zdenek Tolde<sup>1, a</sup>, Vladimír Stary<sup>1</sup>, Petr Kozák<sup>1</sup>

1 – Dept. of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, CTU in Prague, Karlovo nám. 13, CZ-121 35 Prague 2, Czech Republic

a – [zdenek.tolde@fs.cvut.cz](mailto:zdenek.tolde@fs.cvut.cz)



**Keywords:** TiNb, oxide layer, Ti alloys, nanostructured surface, anodic oxidation.

**ABSTRACT.** Ti alloys are widely used for construction of bone implants. Some of them can be prepared without any toxic elements containing only Nb, Zr and Ta. At suitable composition they have the beta (BCC) structure with low modulus of elasticity and high corrosion resistance. The oxidation of their surface can increase the biocompatibility and enable the preparation of nanostructured surface morphology.

The  $\beta$ -alloy Ti39wt.%Nb alloy was melted eight times by electric discharge, annealed at 850 °C for 30 minutes and quenched to water. The substrates of the TiNb layers were prepared from bulk Ti39Nb and commercial cpTi and Ti6Al4V. They were cut using a SiC cutting wheel, ground with abrasive papers and then polished with a suspension of colloidal SiC. The TiNb layers were prepared by cathodic sputtering in a Hauser Flexicoat 850 unit. The thickness of the TiNb layer was measured by Calotest. Surface roughness was measured by a Hommel T1000 Basic roughness tester. The sample surface was observed by a JSM7600F scanning electron microscope. Samples were anodically oxidized in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5wt%NH<sub>4</sub>F electrolyte at DC voltages 10, 20 and 30 V using a stabilized voltage source.

The morphology of the nanostructured surface of a PVD layer depends particularly on the oxidation voltage and time, but also on the type of substrate. The surface morphology containing nanotubes appeared only on TiNb layer with a TiAlV substrate prepared at certain oxidation voltage and time.

The morphology of oxidized layers is heavily influenced by substrate material even though the surface roughness of PVD layer and substrate is identical for all oxidation processes.

TiNb alloy have very suitable properties for bioapplications and the study of surface properties contribute to the practical use of this material

**Introduction.** Titanium alloys have very suitable properties for bioapplications including high specific strength, high corrosion resistance and due to these properties also excellent biocompatibility. Until now the classical biomedical material – stainless steel (e.g. AISI 316L, (E ~ 210 GPa)) and pure Ti and  $\alpha$  and  $\alpha+\beta$  Ti alloys (E ~ 110-120 GPa) are usually used for the production of implants [1; 2]. Recently Ti alloys, which have a lower modulus of elasticity, are intensively studied. Since for bone implants is very useful to obtain maximum similarity of the moduli of elasticity of the material of the implant and the bone [3] and, simultaneously, the high corrosion resistance, the aim of these studies is the fabrication of a material with these properties. The moduli of  $\beta$ -Ti alloys, especially TiNb alloys ( $\beta$ -TiNb), can be about 60 GPa. Layers of these  $\beta$ -alloys with prospective properties can be prepared applying an appropriate method, particularly PVD (Physical Vapour Deposition) [4].

A relatively thin film of oxide(s) of the basic material is present on the surface of titanium and its alloys. In a TiNb alloy these are usually titanium oxide TiO<sub>2</sub> and a niobium oxide, usually Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [4; 5]. These oxides form a layer, which decreases potential corrosion in a corrosive environment. By anodic oxidation a basic thicker oxide layer is created. The properties of this layer (crystalline structure, thickness, porosity and/or nanoporosity) depend on the conditions of oxidation and can be

selected with respect to the required properties of the final application. One of the advantageous properties of the surface is its porosity, since a better adhesion of cells was observed on the surface with a porous morphology (structure). The structure with suitable pores can also be used as a reservoir of appropriate healing drugs. All these properties can improve the process of healing after implantation [5].

In our work we studied  $\beta$ -Ti39Nb, i.e., a Ti alloy with 39 wt.% Nb (further only TiNb). Both elements in the alloy are nontoxic and highly biocompatible [4; 6; 7]. At present research is concentrated on a material which could replace the until now widely used Ti alloy Ti6Al4V, which can hypothetically cause damage to the tissue due to the content of potentially toxic elements Al and V [3].

Generally, titanium alloys containing 10 - 15% of  $\beta$  stabilizers are in a metastable state and they are denoted as  $\beta$ -metastable. According to the phase diagram these alloys are formed by the unstable phase  $\beta'$  and the phase  $\omega$  or by a mixture of the unstable phase  $\beta'$  and the stable phase  $\beta$  [1]. This depends on the concentration of the  $\beta$  stabilizer. The phase  $\omega$  is created by the decomposition of the unstable phase  $\beta'$ . The mechanical properties of the alloys are influenced by the appearance of unstable and martensitic phases which depends on the concentration of  $\beta$  stabilizing elements and on the cooling rate during heat treatment. Only high concentrations of  $\beta$ -stabilizers (30% or more) create a stable form of the  $\beta$  phase in the alloy at room temperature. However, it is responsible for an increase of the density and weight of the alloy [8].

At room temperature the strength of the alloy increases with the content of the  $\beta$ -phase. The mechanical properties of  $\beta$ -alloys, e.g., strength and fatigue resistance, can be improved by heat treatment.

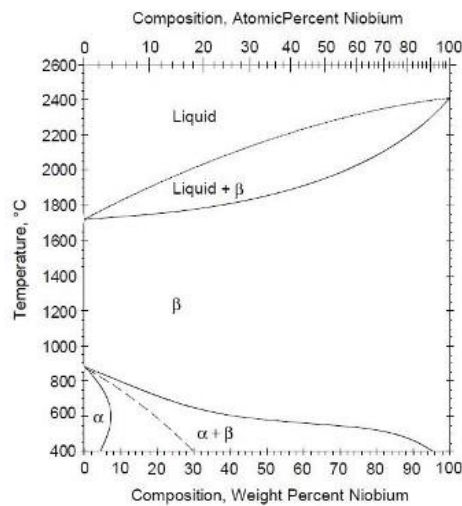
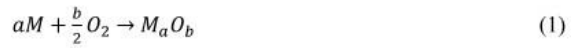


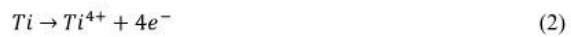
Fig. 1. Phase diagram of TiNb alloys [9].

Oxidation is frequently used to improve and/or optimize the surface properties of cell adhesion. Also, the surface of the alloy samples containing Nb related sites improves cell adhesion and growth. Oxygen creates a thin film of oxides, which at room temperature can be several nanometers thick. By continuing the process the thickness of oxide layer increases up to micrometer range.

There are two basic methods of the oxidation of metals: an electrochemical (anodic) one in an appropriate electrolyte, and a thermal one, at high temperature approximately in the range of hundreds of degrees of Celsius. The chemical reaction in anodic oxidation can be described by the chemical equation (1) (M - metal ions, O - oxygen ions) [10]:



The anodic growth of an oxide layer on Ti (i.e., in electrolyte 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5 wt.% NH<sub>4</sub>F) is shown in Figs. 2 and 3. In the anodic oxidation of Ti it is necessary to add fluoride ions to obtain a nanostructured surface (i.e. a surface with a morphology with objects of nanometer size). Simultaneously with the growth of the oxide layer, Ti dissolves in the basic material of the anode according to equation (2) [11].



The cathodic reaction is described by equation (3), where H<sub>2</sub>O is decomposed into hydrogen and hydroxyl anions [11]



Firstly the interaction of Ti<sup>4+</sup>, OH<sup>-</sup> and O<sup>2-</sup> takes place on the surface in contact with the electrolyte and later also on the interface of the oxide layer and the metal and an oxide layer is created according to chemical equation (4); also titanium hydroxide can be created according to (6) [12]:

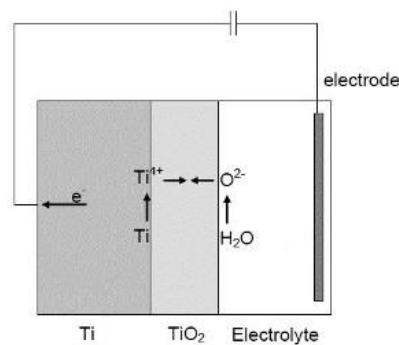
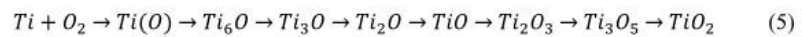


Fig. 2. Formation of an anodic layer of titanium oxide.



Titanium hydroxide is converted into an oxide according to (7) [12]:



The whole process of anodic oxidation and creation of the oxide layer is described by equation (8) [11]

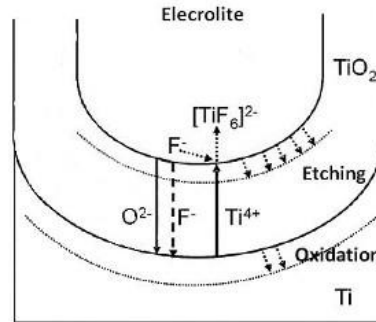
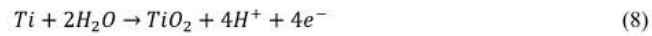
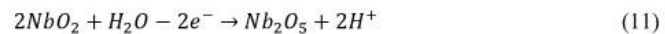
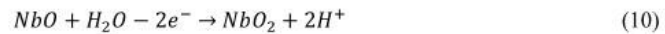


Fig. 3 Schematic view of titanium anodization (a) and dissolution of titanium inside pores.

In the case of the formation of the oxide layer, electrons and ions pass through the film, i.e. the electric current through the oxide necessary for the growth of the film is strongly limited by the thickness of the film. This electric current is influenced by a decrease of the electric field on the film and approximately follows an exponential law.

Niobium oxidation and the growth of the Nb oxide in layer are given by equations (9) – (11) [13]:



The growth rate of the oxide layer is given by the Faraday law and the rate of the dissolution of the layer. The Faraday law defines the mass of the TiO<sub>2</sub> and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oxides in the layer assuming zero production of hydrogen in the process. At simultaneous growth and dissolution the thickness of the layer practically [13] does not depend on the time and the final thickness depends on the oxidation potential  $U$

$$d = k \cdot U \quad (12)$$

where  $k$  – is the constant of the growth of the layer [14]

In the presence of fluoride ions the behaviour of the dependence of the current on the time of oxidation depends on their content. The dependence is shown in Fig. 4 [14]. In an electrolyte without fluoride ions we can observe an exponentially decreased current density up to the final equilibrium state with a certain minimum value of the current density. In an electrolyte with fluoride ions the current density after a certain minimum value begins to increase again. This is caused by the interaction of fluoride ions with the formed oxide layer. This increase also signals the creation of nanostructures on the surface of the specimen [14; 15].

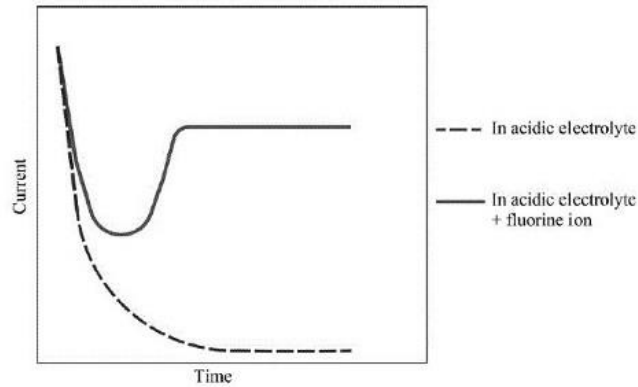


Fig. 4. Behaviour of current density in an electrolyte without fluoride ions (dashed line) and with an addition of fluoride ions (solid line curve).

If the voltage increases, the structure of the oxide changes from an amorphous into a crystalline one. During this process the conductivity changes from ionic to electronic one which retards the growth of the film. The film growth is finished by electrical breakdown of the film [16].

The thermal oxidation of a  $\beta$ -TiNb alloy sample creates on the surface two distinct crystalline oxide phases:  $T-Nb_2O_5$  and  $TiO_2$  (usually rutile) [3]. No evidence was found of the presence of the Ti-Nb mixed oxide phase even though the single-crystalline  $Ti_{1-x}Nb_xO_2$  with  $x$  as large as 0.3 and with even larger values of  $x$  for the nanocrystalline oxide have been reported in literature [16].

The purpose of our work is to compare the surface structure/morphology of TiNb films prepared on TiNb, Ti and TiAlV substrates using PACVD (cathodic sputtering).

#### Experiments. Preparation and characterization of samples.

$\beta$ -Ti39Nb alloy samples were prepared by arc-melting 61 wt.% Ti (ingot, 99.55%, Frankstahl, Austria) with 39 wt.% Nb (ingot, 99.85%, TIC, Brussels, Belgium). The melting proceeded eight times at 800–1000A/ 23V with subsequent solution annealing at 850 °C for 30 minutes and water quenching to achieve the defined homogeneity.

The substrates for the TiNb layer were ground and polished coupons of cpTi ISO 5832-2 and Ti alloy Ti6Al4V ISO 5832-3 (the basic material was supplied by Beznoska Ltd., Kladno, CR). Using a SiC cutting wheel the as-prepared ingot was sliced into coupons (diameter either 10.5 mm or 14 mm and thickness ~1.5 mm). The surfaces of the coupons were ground sequentially with abrasive papers (240, 600, 800, 1000 and 4000 grit) and then polished with a suspension of colloidal SiC (0.05  $\mu$ m, Colloidal Sillicat, Leco, CR) into a mirror-like sheen, using a Leco machine.

The TiNb layer was prepared by cathodic sputtering (PVD) in a Hauser Flexicoat 850 unit (Hauser, Netherlands). The time of deposition was 2.5 hrs, the temperature of the substrate 250°C, rotation of

the substrate 2 rpm, and the working pressure  $2 \cdot 10^{-3}$  mbar (2 Pa). The thickness of the TiNb layer was measured by Calotest (CSM, Switzerland).

Surface roughness was measured by a Hommel T1000 Basic roughness tester (Jenaoptic, Germany).

For a general evaluation the surface morphology all samples were observed by a JSM7600F scanning electron microscope (JEOL Ltd, Japan) at several magnifications (usually between 1000 and 50 000x), using SEI detectors and LEI detectors. The SEI detector shows a general overview of the surface, while the LEI detector shows the irregularities with higher sensitivity.

The samples were oxidized by anodic oxidation in 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0,5 \text{ wt}\% \text{ NH}_4 \text{ F}$ , the resultant pH was 4.7. The potentiostatic process was carried out at constant voltages (DC) 10, 20 and 30 V using a stabilized voltage source SZ 20 110/400 – 19 I2 KZ C230 (NES Nová Dubnica, SR). From the beginning of oxidation, the potential was increased to the final value approximately at a rate of 100 mV/s. The time dependence of the oxidizing current was measured and recorded by a UT 804 (TIPA Ltd, CR) digital multimeter and the current density was calculated for all samples.

**Results and discussion.** The parameters of substrates is in table 1.

Table 1. List of substrates.

Substrate material	Phases in substrate	Composition	Substrate roughness $R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	Modulus of elasticity $E_r$ [MPa]	Substrate hardness (GPa)
TiNb	Ti – beta	Ti + 39wt.%Nb	0.058+/-0.006	95+/-2.5	3.1+/-0.09
Ti	Ti – alpha	Ti	0.047+/-0.005	135+/-2.1	2.3+/-0.1
TiAlV	Ti – alpha+beta	Ti + 6wt% Al, 4wt.%V,	0.035+/-0.003	143+/-1.3	4.0+/-0.11

The PVD coating was 1.45  $\mu\text{m}$  thick.

After depositing the TiNb layer on a Ti no grain boundaries were observed on surface of TiNb/Ti while on the layer of TiNb on a TiAlV substrate both alpha and beta phases and the grain boundaries of the substrate could be observed on electron microscope images.

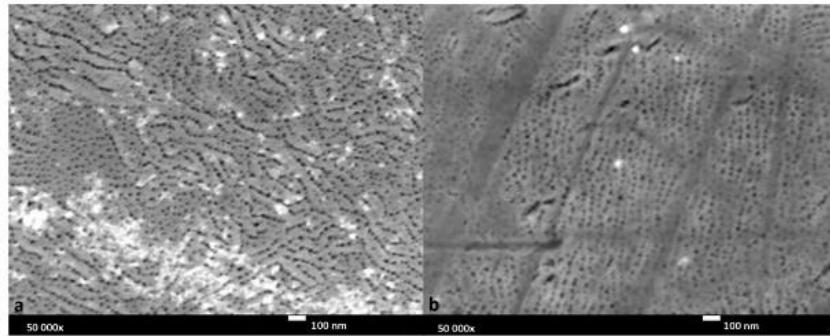
Next we compared the electron microscope images of the structure and surface morphology of the oxide film on a bulk Ti39Nb alloy and of an oxidic film on the TiNb layer which was sputtered by means of the PVD process on different Ti substrates (TiNb/Ti) and Ti6Al4V (TiNb/TiAlV).

Table 2. Values of several parameters of TiNb layers on different substrates.

Substrate	Modulus of elasticity $E_r$ [MPa]	Film hardness [GPa]	Substrate grain size [ $\mu\text{m}$ ]	Film grain size [ $\mu\text{m}$ ]	Film roughness by $R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]
TiNb/TiNb	100+/-2.5	3.8+/- 0.14	600	600	0.093+/-0.047
TiNb/Ti	116+/-3.37	4.1+/-0.22	10	6 – 7	0.13+/-0.008
TiNb/TiAlV	115+/-3.15	4.1+/-0.19	3	3 – 5	0.10+/-0.005

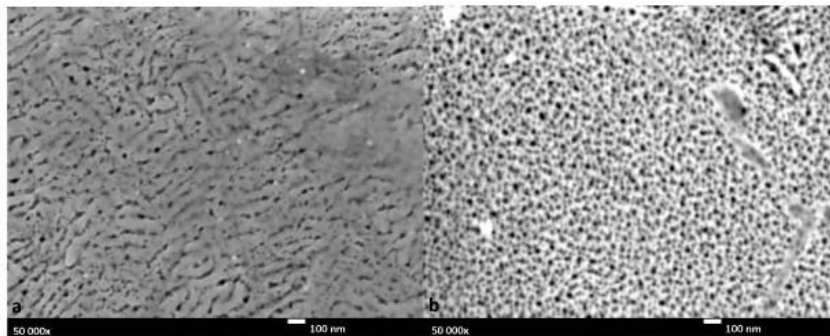
The anodic voltage and time of oxidation was monitored. Different details of the surface morphology are apparent on images at various magnifications.

At an anodic voltage of 10 V individual pores with a 10 nm size are clearly apparent (Fig. 5a) in the oxide film on a TiNb/Ti layer. This is due to the presence of fluoride ions in the electrolyte. The oxide film on TiNb/TiAlV has a similar structure with pores of comparable size (Fig. 5b).



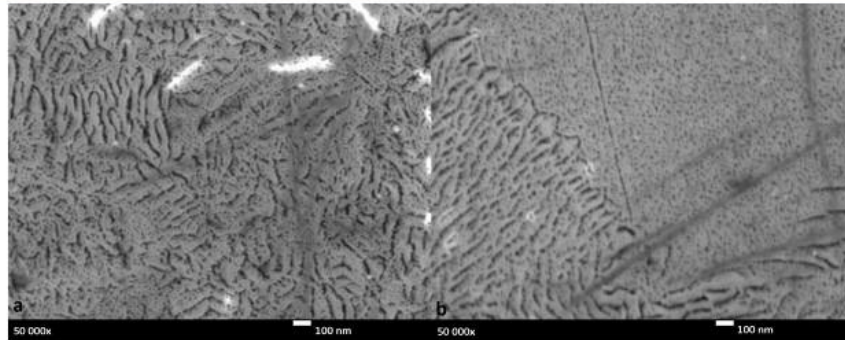
*Fig. 5. SEM images of oxide films prepared at anodic voltage 10 V, magn. 50 000x, time 1 hr, a) TiNb/Ti, b) TiNb/TiAlV.*

During anodic oxidation at a constant 20V voltage a porous layer of titanium and niobium oxides [3,13] which has a similar surface structure as in the previous experiment at a 10V voltage (Fig. 5,6a) is apparent on the coating deposited on the Ti substrate. A more clearly apparent porous nanostructure can be seen on the Ti6Al4V substrate (Fig. 5,6b).



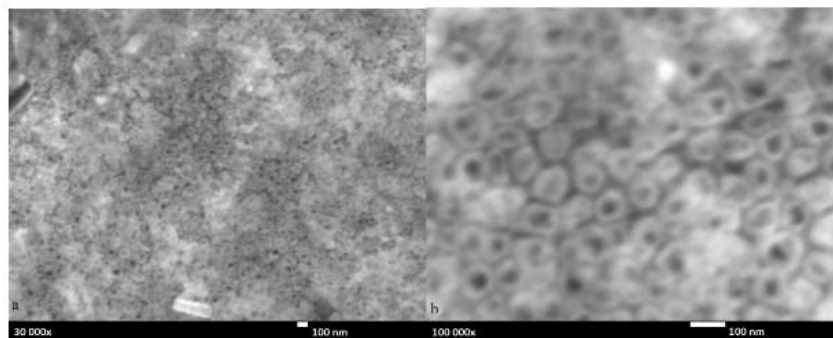
*Fig. 6. SEM images of oxide films prepared at an anodic voltage of 20 V, magn. 50 000x, time 1hr, a) TiNb/Ti, b) TiNb/TiAlV.*

In the TiNb/Ti sample at an anodic voltage of 30 V (Fig. 7a) the arrangement and topography of the oxide layer is different from previous results. The pores are accumulated into characteristic corrugations which cover the entire surface of the sample. Also the microscope images of the TiNb/TiAlV samples (Fig. 7b) clearly show the grain boundaries of alpha and beta phases of the substrate which remained in the layer after deposition.



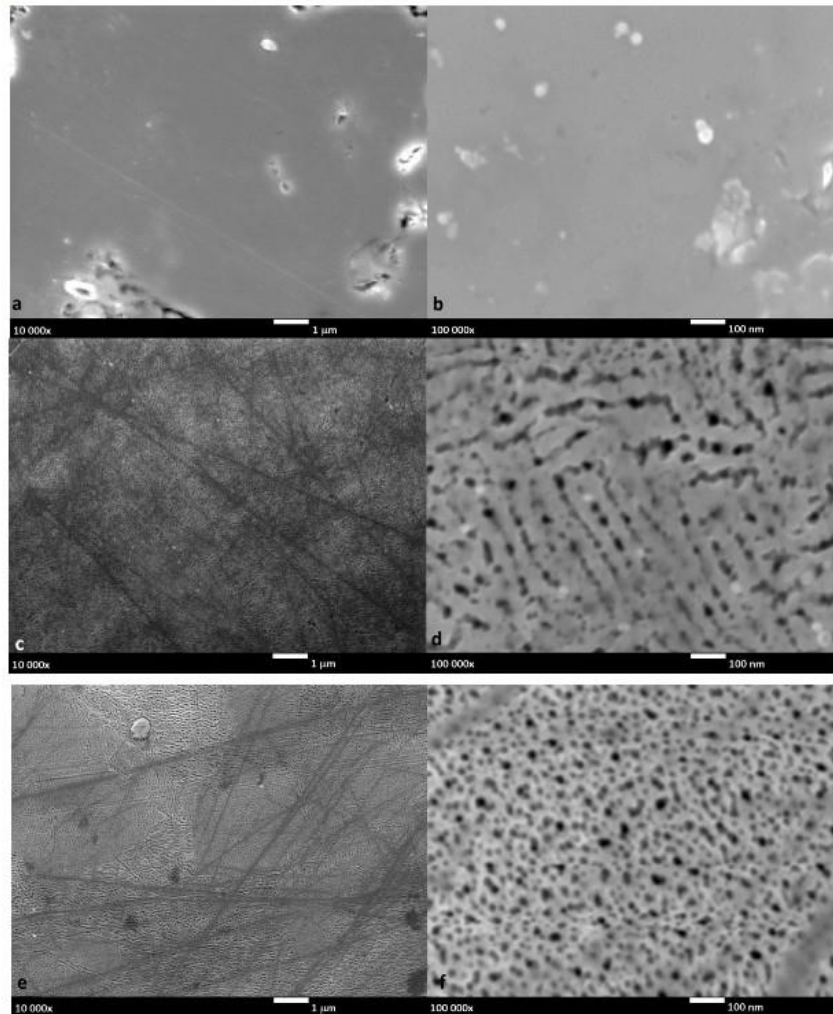
*Fig. 7. SEM images of oxide films prepared at anodic voltage 30 V, magn. 50 000x, time 1 hr, a) TiNb/Ti, b) TiNb/TiAlV.*

Since maximum pore density and their best regularity were observed at an anodic voltage of 20 V, the time of oxidation was increased to 2 hrs in the next set of experiments. On TiNb/Ti pores were present but their density was relatively low. We observed localized growth of nanotubes (Fig. 8a). On TiNb/TiAlV the oxide layer is formed by a nanoporous selforganized system of oxide nanotubes (Fig. 8b,c). The diameter of the nanotubes is within the range 50 – 100 nm and they are distributed uniformly over the sample surface.



*Fig. 8. SEM images of oxide films prepared at anodic voltage 20 V, time 2 hrs, a) TiNb/TiAlV, magn. 30 000x, b) TiNb/TiAlV, magn. 100 000x.*

We also can compare the electron microscope images of an anodic layer of TiNb/TiNb, oxidized at an anodic voltage of 20 V for 1 hr, taken at different magnifications. The results are in Figs. 9a-f. It can be seen that on the TiNb layer on bulk TiNb a porous anodic film was not formed and the surface of sample remained practically unchanged. This could be explained by the mechanical treatment of the surface layer during grinding and polishing of the surface of the sample before oxidation, which limited the growth of the porous oxide film.



*Fig. 9. SEM images of oxide films prepared at anodic voltage 20 V, time 1 hr, a) bulk TiNb, magn.10 000x, b) bulk TiNb, magn.100 000x, c) TiNb/Ti, magn. 10 000x, d) TiNb/Ti, magn. 100 000x, e) TiNb/TiAlV, magn. 10 000x, f) TiNb/TiAlV, magn. 100 000x.*

Besides the surface structure also the dependence was studied of the oxidation current on the anodic voltage and on the time. The dependences of the current density on time during the oxidation of the TiNb layer (both on Ti and TiAlV) at anodic voltages 10, 20 and 30 V in the studied electrolyte are in Figs. 10a,b. The rate of the voltage increase was  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . We found that the critical passivation current density  $i_{kp}$  on TiNb/Ti and TiNb/TiAlV is  $11.9 - 12.2 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  and  $10.2 - 10.4 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively. It can be observed that the magnitude of the anodic voltage has no influence on the critical passivation current density  $i_{kp}$  at the given parameters of the process.

The magnitude of the anodic voltage obviously affects the rate of the decrease of the current densi-

ty; at higher voltages the decrease is slower. Also at higher anodic voltages the value of the density of the passivation current increases (Fig. 10a,b). From the diagram of the dependence of the current density on the time, the value of the critical passivation current density  $i_{kp}$  lies within the time intervals 65 – 75 s and 75 – 85 s for TiNb/Ti and TiNb/TiAlV respectively. Using these values and the rate of growth of the anodic voltage we can calculate the passivation voltages  $6.5 \div 7.5$  V and  $7.5 \div 8.5$  V for TiNb/Ti and TiNb/TiAlV respectively.

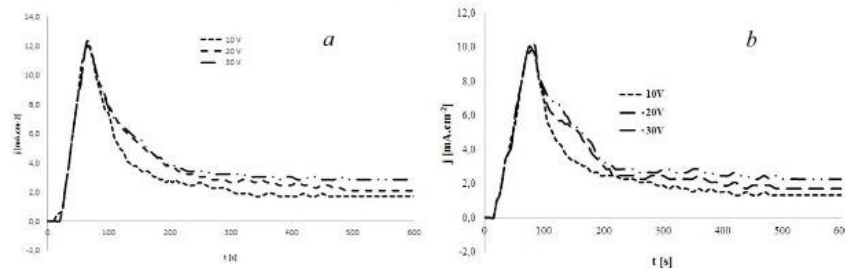


Fig. 10. The dependence of current density on time during oxidation of a) TiNb/Ti, b) TiNb/TiAlV.

**Summary.** On anodic oxide films prepared on layers of TiNb on various substrates we found a porous oxide layer. After 1 hour of growth at anodic voltages of 10, 20 and 30 V the layers were porous without apparent nanotubes with a various degree of porosity and different directions of the growth of the coating. In TiNb/Ti the porous structure is homogeneous over the entire surface of the substrate. In the oxide layer on TiNb/TiAlV the phase boundaries in the substrate are visible.

After 2 hours of growth at an anodic voltage of 20 V, the oxide film on TiNb/Ti has a relatively low density of pores. In spite of this in TiNb/TiAlV a nanostructured surface morphology with a regular set of nanotubes with diameters in the range 50 – 100 nm was observed. The boundaries of phase grains disappeared.

No nanostructural features were found on TiNb/TiNb samples.

Finally, we can state that the sputtered TiNb layer is not influenced by the mechanical treatment of the substrate and by the potential impurities due to this treatment. Moreover a nanostructured oxide layer (without or with nanotubes) can grow at suitable conditions of growth on a deposited layer of TiNb.

#### Acknowledgment

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant no. 15-01558S) and by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, Program NPU1, project No. LO1207. We are grateful to Mr Ivan Šiman for the English language review.

#### References

- [1] Lutjering G. A. J. Williams Titanium. 2nd ed. New York: Springer, 2007. ISBN 978-354-0713-975.
- [2] Ozaki Tomomichi, Hiroaki Matsumoto, Sadao Watanabe a Shuji Hanada. Beta Ti Alloys with Low Young's Modulus. MATERIALS TRANSACTIONS. 2004, 45(8), 2776-2779. DOI: 10.2320
- [3] Oshida, Yoshiki. Bioscience and bioengineering of titanium materials. 2nd ed. Waltham, MA: Elsevier, 2013. Elsevier insights. ISBN 04-446-2625-5.
- [4] Jirka Ivan, Marta Vandrovcová, Otakar Frank, Zdeněk Tolde, Jan PLŠEK, Thomas Luxbacher, Lucie Bačáková a Vladimír Starý. On the role of Nb-related sites of an oxidized  $\beta$ -TiNb alloy

- surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. 2013, 33(3), 1636-1645. DOI: 10.1016/j.msec.2012.12.073. ISSN 09284931.
- [5] Liu X., P. Chu, C. Ding. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2004, 47(3-4), 49-121. DOI: 10.1016/j.mser.2004.11.001. ISSN 0927796x
- [6] Mani A, L Vaidhyanathan, Y Hariharan, M Janawadkar, T Radhakrishnan. Structural and superconducting properties of Nb-Ti alloy thin films. *Bulletin of Materials Science*. 1997, 20(4), 503-507. DOI: 10.1007/BF02744763. ISSN 0250-4707.
- [7] Vlcek P, F Cerny, Z Weiss, S Danis, J Sepitka, Z Tolde, V Jech. The Effect of Nitrogen Ion Implantation on the Surface Properties of Ti6Al4V Alloy Coated by a Carbon Nanolayer. *Journal of Nanomaterials*. 2013, 2013, 1-8. DOI: 10.1155/2013/475758. ISSN 1687-4110
- [8] Bönisch Matthias, Mariana Calin, Thomas Waitz, Ajit Panigrahi, Michael Zehetbauer, Annett Gebert, Werner Skrotzki a Jürgen Eckert. Thermal stability and phase transformations of martensitic Ti–Nb alloys. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2016, 14(5), 055004-. DOI: 10.1088/1468-6996/14/5/055004. ISSN 1468-6996.
- [9] Murray Joanne L. The Nb–Ti (Niobium-Titanium) system. *Bulletin of Alloy Phase Diagrams*. 1981, 2(1), 55-61. DOI: 10.1007/BF02873704. ISSN 0197-0216.
- [10] Izman S., M Rafiq, M Anwar, E.M. Nazim, R. Rosliza, A. Shah, M.A. Hass. Surface Modification Techniques for Biomedical Grade of Titanium Alloys: Oxidation, Carburization and Ion Implantation Processes. *Titanium Alloys - Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/36318. ISBN 978-953-51-0354-7.
- [11] Macák, J. Growth of Anodic Self-Organized Titanium Dioxide Nanotube Layers. *Der Technischen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg zur Erlangung des Grades*, 2008.
- [12] Liu Guohua, Kaiying WANG, Nils HOIVIK, Henrik JAKOBSEN. Progress on free-standing and flow-through TiO<sub>2</sub> nanotube membranes. *Solar Energy Materials and Solar Cells*. 2012, 98, 24-38. DOI: 10.1016/j.solmat.2011.11.004. ISSN 09270248.
- [13] Krasicka-Cydzik, E. Anodic Layer Formation on Titanium and Its Alloys for Biomedical Applications. *Titanium Alloys - Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/34395. ISBN 978-953-51-0354-7.
- [14] Macak J.M., H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2007, 11(1-2), 3-18. DOI: 10.1016/j.cossms.2007.08.004. ISSN 13590286.
- [15] Minagar S, Ch. Berndt, J Wang, E Ivanova, C Wen. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8(8), 2875-2888. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.04.005. ISSN 17427061.
- [16] Zorn, G., A. Lesman a I. Gotman Oxide formation on low modulus Ti45Nb alloy by anodic versus thermal oxidation. *Surface and Coatings Technology*. 2006, 201(3-4), 612-618. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2005.12.009. ISSN 02578972.



## Characterization of TiNb Films on Ti Alloys for Hard Tissue Replacement

Vladimír Starý<sup>1</sup>, Ladislav Cvrček<sup>1</sup>, Stanislav Daniš<sup>2</sup>, Jan Krčil<sup>1</sup>, Jaroslav Málek<sup>1</sup>, Zdeněk Tolde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Materials Engn., Fac. of Mechanical Engn., CTU in Prague, Karlovo nám. 13, Prague

<sup>2</sup>Dept. of Cond. Matter Physics, Fac. of Math. and Phys., Charles Univ. in Prague, Ke Karlovu 5, Prague

<sup>a</sup>stary@fsik.cvut.cz, <sup>b</sup>danis@mag.mff.cuni.cz

**Keywords:** binary Ti alloys, thin films, structure, mechanical properties, nanoindentation

**Abstract.** We present here a study of coatings prepared from  $\beta$ -Ti binary alloy Ti-39wt%Nb, a promising metallic material. TiNb is a highly corrosion-resistant and non-toxic material that is potentially applicable as a biomaterial. TiNb coatings can be prepared on substrates of widely-used materials, and promise not only improved properties but also a less high price of potential TiNb implants. A TiNb film can also be used as a barrier for limiting the potential diffusion of some allergens and toxic elements from the substrate to the surface, which can be influenced by layer properties. We deposited thin layers of TiNb by magnetron sputtering, which provides excellent layer properties in applications. These layers were prepared on substrates made from Ti, Ti alloys (Ti39Nb and Ti6Al4V) and stainless steel AISI316. The aim of our work was to characterize the structure and the mechanical properties of the layers, in dependence on the type of substrate, for application as coatings for medical implants.

### Introduction

Low-modulus  $\beta$ -TiNb alloys (the TiNb binary system with a BCC structure) with excellent corrosion resistance are currently under consideration as a surgical implant material [1,2]. The elastic modulus of bulk TiNb decreases to  $\sim 60$  GPa at about 40 wt.% Nb [3]. The low modulus improves the connection of the material surface with living tissue, and prevents the appearance of “stress shielding”. The advantage of using of a binary alloy is that it is simpler to preserve the composition than in the case of ternary and quaternary alloys, which induce obviously non-homogeneous segregation of elements [4]. We made a study of coatings prepared by the PVD method from a TiNb target with the same composition as the required films. Until now, the structure of the layers has been studied by X-ray diffraction and TEM [5,6]. In order to define the mechanical properties of TiNb thin films, both the hardness and the modulus of elasticity of the films were measured using nanoindentation [5,7].

### Experiment and methods

Four types of identically prepared substrates made of different materials were used for the TiNb layers. The basic material of the Ti39wt%Nb substrates was prepared by UJP Ltd., Prague, CR, and the material for the other substrates was supplied by Beznoska Ltd., Kladno, CR. The substrates were ground and polished coupons of bulk TiNb, cpTi, Ti6Al4V and austenitic stainless steel AISI316, denoted as TiNb, Ti, TiAlV and Fe, respectively. The substrates were ground sequentially with abrasive papers (from 240 up to 4000 grid), and were then polished with a suspension of colloidal silica.

The TiNb layers were prepared by magnetron sputtering in a Hauser Flexicoat 850 unit (Hauser, Netherlands) from a single target Ti39wt%Nb (Safina, Vestec, CR). The time of deposition was 2.5 hrs, the substrate temperature was 250°C, and the working pressure was 2 Pa. The samples rotate at a rate of 2 rpm. Before sputtering, ion etching in Ar was performed for approximately 15 min. The thickness of the layer was measured by Calotest (CSM, Switzerland) and the value was  $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ .

X-ray diffraction (parallel beam (PB) and Bragg-Brentano (BB) geometry) was used for crystallographic observations of the layer structure. The analysis was performed on Seifert XRD7 (Germany)

and PANanalytical X'Pert MPD Pro (Netherlands) powder diffractometers, both PB and BB geometry, using CuK $\alpha$  radiation. PB was set to an angle of incidence of 1.0 deg.

The hardness of the substrates and of the evaporated layers were measured using the Nanotest system (Micro Materials Ltd., UK) with a Berkovich indenter. The nanohardness measurements also give the values of the modulus of elasticity. The hardness and the reduced modulus of elasticity were given by the software of the device. For the measurements of the substrates near to the surface, we applied a load of 200 mN; the maximal depth for this load was between 1.5 and 2.0  $\mu\text{m}$ .

**Results and discussion**

**Structure.** The measured parameters of the TiNb layers on four types of substrates are presented in Table 1. The BB arrangement of the X-ray measurement shows preferentially the crystallographic planes parallel to the substrate. The BB diffractograms show the BCC structure and the strong (110) texture on all the films. This is usual for TiNb layers and for other similar layers [5,6]. The PB geometry utilized a constant angle of incidence of the primary beam, and only a detector scan (2theta scans) was made. This allows a constant penetration depth of the X-ray beam into the sample to be held. In PB geometry, mainly the lines of the  $\beta$ -phase of the TiNb layers appeared in the diffractograms (Fig. 1a), and the same texture appeared for the BB configuration. The size of the coherently diffracted area (CDO) and the mean stress values in the layers were also obtained in this arrangement. Moreover, the (002) and (112) lines of the  $\omega$  phase of Ti appeared for all the films measured using PB geometry (Fig. 1b).

Table 1 Values of several parameters of TiNb layers on different substrates

Substrate	Stress [MPa]	Film hardness [GPa]	Substrat grain size [ $\mu\text{m}$ ]	Film grain size [ $\mu\text{m}$ ]	Substrate roughness Ra [ $\mu\text{m}$ ]	Film roughness Ra [ $\mu\text{m}$ ]
TiNb	710 $\pm$ 220	3.80 $\pm$ 0.14	600	600	0.058 $\pm$ 0.006	0.093 $\pm$ 0.047
Ti	1700 $\pm$ 200	4.10 $\pm$ 0.22	10	6 – 7	0.047 $\pm$ 0.005	0.13 $\pm$ 0.008
TiAlV	1250 $\pm$ 230	4.10 $\pm$ 0.19	3	3 – 5	0.035 $\pm$ 0.003	0.10 $\pm$ 0.005
Fe	1500 $\pm$ 730	4.38 $\pm$ 0.28	5	---	0.013 $\pm$ 0.005	0.08 $\pm$ 0.012

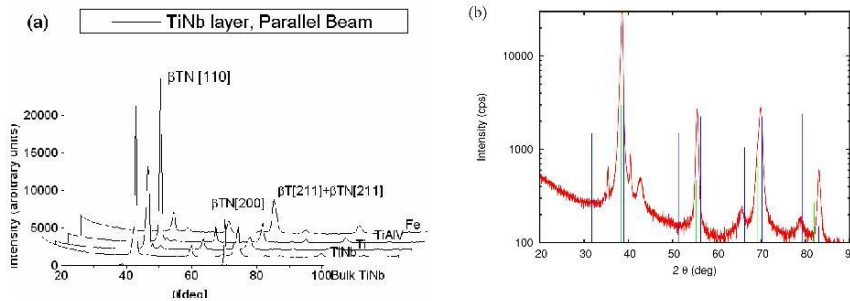


Fig. 1 A comparison of X-ray diffractograms of TiNb films measured by the PB arrangement a) on several substrates (T=Ti, TN=TiNb), and b) on a TiAlV substrate (green  $\beta$ -phase, blue  $\omega$ -phase).

**Modulus of elasticity and hardness.** The so-called reduced modulus of elasticity  $E'$  is given as

$$E_i' = \frac{E_i}{1 - \nu^2}, \tag{1}$$

$E$  being the modulus of elasticity, index  $i$  being  $f$  or  $s$  for the film and for the substrate, respectively.

Three strategies for measuring the hardness and the elasticity modulus of the layers were compared: first, we measured the hardness and the modulus of the films 25 times at a low load of 10 mN. In low load mode, the indentation depth was about 1/10 of the layer thickness. This depth is recommended for practical measurements of real layer hardness [9]. The second method uses an increase of the load from 5mN to about 250mN to obtain the depth dependence of the hardness; the hardness and the modulus of the film can be read from the regression equation. The third strategy is based on linearization of this dependence according to [8].

Table 2 presents the values of the supposed and measured moduli of elasticity of a layer on several substrates. The measured hardness of the bulk TiNb substrate was  $3.18 \pm 0.18$  GPa, and the supposed value of the modulus of bulk  $\beta$ -Ti39wt%Nb, as-quenched, is quoted in the literature to be about 60 GPa [3]. Using a Poisson ratio of 0.31-0.37, the reduced film modulus according to (1) should be about 66–70 GPa. However, the measured values of thin film moduli in low load mode are not only somewhat different from the supposed value but they also depend on the type of substrate.

Table 2 Values of the educed modulus of elasticity of TiNb layers on different substrates.

Substrate	Substrate modulus of elasticity $E_s$ [GPa]	Supposed modulus of elasticity $E_r$ [GPa] [3]	Measured modulus of elasticity $E_r$ – low load mode [GPa]	Modulus of elasticity according to (4) $E_r$ [GPa]
TiNb	$95 \pm 2.5$	66 ÷ 70	$100 \pm 2.5$	89.2
Ti	$135 \pm 2.1$		$116 \pm 3.4$	114.2
TiAlV	$143 \pm 1.3$		$115 \pm 3.2$	106.2
Fe	$216 \pm 2.6$		$127 \pm 3.9$	59.2

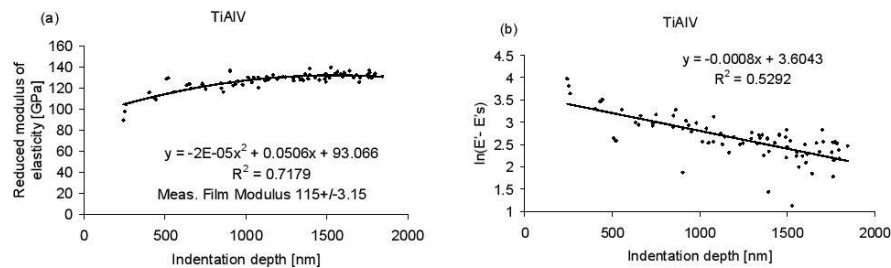


Fig. 2 The dependence of (a) modulus of elasticity, (b) quantity  $\ln(E' - E'_s)$ , on depth of indentation.

Fig.2a shows an example of the dependence of the measured reduced modulus of the TiNb film on TiAlV on the depth of indentation. This dependence makes it possible to calculate the value of the modulus of the layer from the regression equation, included in the figure, at a selected depth.

In [8], the supposed depth dependence was given by the empirical function (2)

$$E' = E'_s + (E'_f - E'_s) \exp(-cx), \quad (2)$$

$c$  being a constant. Subtracting  $E'_s$  and taking logarithms we obtain the equation for a straight line,

$$y = \beta + \gamma x \quad (3)$$

with  $y = \ln(E' - E'_s)$  and constants  $\beta = \ln(E'_f - E'_s)$  and  $\gamma = -c$ . The independent variable  $x$  can be taken as the contact depth. This method often gave reasonable results in fitting the experimental data

which were obtained with non-indentation measurements. The regression constants were determined using the least squares method, and the film modulus was calculated as

$$E'_f = E'_s + \exp(\beta) \quad (4)$$

The exponential function (2) has several advantages. The linearized equation (3) enables one to use standard statistical procedures, and to determine the confidence interval for  $\beta$  and (via Eq. (4) for  $E'_f$ ). The proposed dependences have been checked in Fig. 2b, and the calculated values of  $E'_f$  are given in the last column of Table 2. There is reasonable agreement between the measured values of the modulus for the TiNb layer on Ti and TiAlV substrates and the modulus for the low load measurement near the film surface. Unfortunately, the calculation of the modulus of elasticity of the film gives a fully incorrect value for TiNb on Fe.

The measured modulus of elasticity is substantially higher than the proposed modulus of the as-quenched material [3]. Due to [3,4], this can be caused by the presence of  $\omega$  phases in the structure during and after preparation of the layer. The temperature of the substrates during layer growth is about 520-570K, and the sputtering and cooling of the films continues for about 3 hours. At this temperature, the  $\omega$  phase can nucleate and the  $\omega$  precipitates considerably increase the modulus of the film. Although the mechanical working could reduce the modulus, no such process took place during or after sputtering. The presence of  $\omega$  phases is also connected with an increase in layer hardness (the hardness of the layer increases from 3.18 GPa for bulk to 3.80 to 4.38 GPa for thin films on various substrates). Also the modulus of the film on our substrates was higher than the film modulus of the TiNb film of the same composition on a glass substrate (about 80 GPa) [5]. This indicates that the modulus also has a strong influence on the mechanical and thermal properties of the substrate.

### Conclusion

The aim of our work was to prepare a suitable substrate for coatings of implants and to characterize its mechanical properties for a subsequent study of biocompatibility. It was found that the mechanical properties of the layer depend on the type of substrate. The reason for this lies in the thermal and mechanical influencing of layer growth, mainly due to the different modulus of elasticity of the substrates, and also the coefficient of thermal conductivity. The relatively high modulus of elasticity of the films probably appeared due to the formation of the  $\omega$  phase in growing films. The SEM and EBSD results will be presented elsewhere, and the dependence of biocompatibility on surface characteristics will be studied with the use of biological tests.

### Acknowledgements

This work was supported by project LO1207, Program NPU1, of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by Czech Science Foundation project No. 15-01558S. Mr. P. Sachr is acknowledged for nanoindentation measurements and Mr. Robin Healey is gratefully acknowledged for his language revision of the paper.

### References

- [1] E. Eisenbarth, D. Velten, M. Muller, R. Thull, J. Breime: *Biomaterials* Vol. 25 (2004), p. 5705
- [2] L. Bačáková, E. Filová, F. Rypáček et al.: *Physiol. Research, Suppl. 1*, Vol. 53 (2004), p. 35
- [3] S. Hanada, H. Matsumoto, S. Watanabe: *International Congress Series*. Vol. 1284 (2005), p. 239
- [4] S. Guo, J. Zhang, X. Cheng, X. Zhao: *Journal of Alloys and Compounds* Vol. 644 (2015), p. 411
- [5] S. Achache, S. Lamri et al.: *Surface & Coatings Technol.* Vol. 275 (2015), p. 283
- [6] E. D. Gonzalez, T. C. Niemeyer et al.: *J. Vac. Science & Technol. A* Vol. 34, 021511 (2016)
- [7] D.A. Tallarico, A.L. Gobi et al.: *Mater. Sci. & Engin. C* Vol. 43 (2014) p. 45
- [8] J. Menčík: *Mechanics of Components with Treated and Coated Surfaces* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1996).
- [9] R. Saha, W. D. Nix: *Acta Materialia* Vol. 50 (2002), p. 23