Postgraduální doktorské studium biomedicíny při UK a AV ČR v Praze

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.**

PARAMETRY BIOKERAMICKÝCH VRSTEV, POVLAKOVÁNÍ IMPLANTÁTŮ HYDROXYAPATITEM MODIFIKOVANÝM ZIRKONEM A VÝHLED K OKAMŽITÉMU ZATÍŽENÍ ZUBNÍHO IMPLANTÁTU

MUDr. Zuzana Teuberová

Praha 2006

Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN Praha

Přednosta: Prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc.

Školitelka: **Prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA**

Přednostka Dětské stomatologické kliniky 2. LF UK

Fakultní nemocnice v Motole

150 06 Praha 5 – Motol, V Úvalu 84

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením školitele.

V Praze dne 4. 12. 2006

.....

podpis

Disertační práce vznikla za velmi kvalitního odborného vedení a konzultací školitelky Prof. MUDr. Taťjany Dostálové, DrSc., MBA, které si dovoluji touto cestou poděkovat. Za odborné i praktické rady a ochotnou pomoc děkuji Doc. Ing. Miroslavu Jelínkovi, DrSc. a Ing. Tomáši Kocourkovi, Ph.D. z Fyzikálního ústavu Akademie věd České republiky a také Prof. MUDr. Karlu Smetanovi, DrSc. a RNDr. Barboře Dvořánkové z Anatomického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Disertační práce vznikala v letech 2003 – 2006 za přispění grantového projektu „Využití parametrů biokeramických vrstev a buněčné terapie při integraci dentálního implantátu“ IGA MZ ČR 8512-3, 2005 – 2007.

OBSAH

1. Přehled současného stavu problematiky 4
1.1 Úvod 4
1.2 Zubní implantát a jeho historie 4
1.3 Povlakování zubních implantátů 6
1.4 Druhy materiálů k povlakování 10
1. 5 Přehled metod vhodných k povlakování 14
2. Cíle práce 19
3. Hypotéza 21
4. Materiál a metody povlakování 22
4.1 Pulsní laserová depozice 22
4.2 Metody ověřování stability 31
4.2.1 Fyzikální analýzy vlastností vrstev 31
4.2.2 Biologické testy 37
5. Výsledky 39
5.1 Depoziční podmínky 39
5.2 Experimentální údaje 45
5.3 Fyzikální analýza vzorků 1. skupiny (ZRO 1-13, ZHA 1-13) 46
5.3.1 Měření tloušťky vrstev 46
5.3.2 Analýza morfologie povrchu 47
5.3.3 Analýza krystalinity povrchu 49
5.3.4 Ca/P poměr 50
5.4 Fyzikální analýza vzorků 2. skupiny (ZRO 14-24, ZHA 21-24) 51
5.4.1 Měření tloušťky vrstev 51
5.4.2 Analýza morfologie povrchu 52
5.4.3 Analýza krystalinity povrchu 55
5.4.4 Ca/P poměr 56
5.4.5 Testy přilnavosti 57
5.4.6 Měření kontaktního úhlu 60
6. Diskuse 62
6.1 Výhody povlakování 62
6.2 Nevýhody povlakování 64
6.3 Současný pohled na povlakování implantátů 66
6.4 Biomateriály a jejich role v povlakování 67
6.5 Výhody a nevýhody dostupných metod povlakování v porovnání s PLD .. 72
7. Závěr 77
Summary 79
Literatura 80
Přehled publikací autorky a vědecká ocenění 85

1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

1.1 Úvod

V úvodní části disertační práce vymezuji téma historie a současnosti používání zubních implantátů, podávám přehled o technikách výroby povlakovaných implantátů a o materiálech, které jsou pro techniku povlakování vhodné, uvádím jejich charakteristiku včetně výhod a nevýhod. Důležitou část práce jsem věnovala metodě pulsní laserové depozice, kterou byly experimentálně vytvořeny vzorky představující makety povrchů implantátu. Těžiště vlastní práce je v kapitole 4 a 5, kde se zabývám depozicí zirkonu a hydroxyapatitu na substrát z titanové slitiny. Podrobně rozebírám technické parametry, jejichž ovlivněním se mění i struktura tenkých vrstev. V poslední kapitole hodnotím dosažené výsledky a naznačuji další možný směr rozvoje této problematiky.

1.2 Zubní implantát a jeho historie

Obor dentální implantologie se zabývá zavedením biokompatibilního materiálu do kosti horní nebo dolní čelisti. Usilujeme o jeho dlouhodobé zabudování do kostních struktur. Zubní implantát se následně stává součástí konstrukce pro definitivní fixní nebo snímatelné protetické řešení za účelem komplexní estetické a funkční rehabilitace pacienta [1].

Implantát se vhojuje do kosti v ideálním případě ankylosou, a tak nemá na rozdíl od zubu schopnost odolávat žvýkacímu tlaku pomocí pružného periodoncia. Cílem výzkumů na poli implantologie je podpora dokonalého vhojení implantátu do kostních struktur tzv. oseointegrace, a tím zajištění dlouhodobé stability

implantátu. Historie dentální implantologie sahá do dob starého Egypta, kdy lze snad jen hovořit o počátcích myšlenek na náhradu chybějícího zubu. Tehdejší stabilita zavedených trnů z drahých kovů nebyla nijak dlouhodobá. Rozvoj oboru nastal až v 18. a 19. století, kdy průkopník Magiollo a jeho následovníci začali používat zlato, slonovinu nebo porcelán jako náhradu chybějících zubů. Posun v oboru nastal v roce 1938, kdy Strock upřednostnil šroubovitý tvar implantátu, který uznáváme jako stabilní dodnes. Tyto implantáty byly z chromkobaltmolybdenové slitiny, o které nemůžeme hovořit jako o bioinertním materiálu. Na dlouhý čas se usídlila ve stomatologii myšlenka a realizace subperiostálních implantátů, které byly zaváděny mezi kost a periost, známe je pod názvem čepelkové implantáty. Do praxe se rozšířily v 60. a 70. letech 20. století. Nevýhodou byly jejich indikace na rozsáhlé bezzubé úseky a také omezená životnost. Čepelkový implantát pomohl ve své době mnoha pacientům, ale nebyl tak pevně spojen s kostními strukturami, jako je tomu u dnešních šroubovitých nitrokostních implantátů, častěji docházelo k vazivovému propojení tzv. fibrointegraci, která byla právě jednou z příčin zkrácené životnosti.

Zásadním objevem a posunem v dentální implantologii byl objev Pera Ingvara Brånemarka, který pojmenoval jev oseointegrace, tedy vhojení implantátu do kosti bez mezivrstvy vazivové tkáně viditelné v optickém mikroskopu. V roce 1977 publikoval rozsáhlou desetiletou klinickou studii, v níž prokázal dlouhodobé výsledky svých implantátů, a tím byl položen základ novodobé implantologie.

Dnes se zabýváme otázkou, jak zkvalitnit povrchy šroubovitých implantátů a zkrátit dobu vhojování. Dostupné prameny ukazují, že technologickým pokrokem docházíme od klasického Brånemarkova protokolu zavádění implantátu s dobou vhojování 3 měsíce v dolní čelisti a 6 měsíců v horní

čelisti, v indikovaných případech i k metodám časného zatížení implantátu. Pacient tak obdrží provizorní protetické řešení kotvené na zavedené implantáty v horizontu třech týdnů, nebo u okamžitého zatížení implantátu metoda umožňuje esteticky a funkčně rehabilitovat pacienta do 48 hodin [2]. Základem všech těchto zkrácených pracovních postupů je ale perfektní technologie výroby nitrokostních implantátů, kvalitní povrchová úprava fixtur, šetrné zavedení implantátu do kosti a přesnost všech následných kroků vedoucích k protetickému řešení včetně základního předpokladu, že pacient nesmí mít lokální ani systémové kontraindikace pro chirurgický zákrok [3].

1.3 Povlakování zubních implantátů

V zásadě bychom mohli rozdělit vlastnosti implantátů z hlediska vhojování na vlastnosti biologické a mechanické. Biologické vlastnosti implantátu spočívají v jeho biotoleranci a půjdu-li dále, zjišťuji, že implantát by měl být bioinertní, jako například titan, a ještě lépe bioaktivní, což znamená, že tkáně materiál aktivně přijmou. Mezi takové materiály patří například hydroxyapatit (HA) [4]. Mechanické vlastnosti implantátu odrážejí odolnost proti opotřebení, pevnost, tepelnou expanzi materiálu. Tyto charakteristiky jsou výsledkem kombinace použitých materiálů.

Při podrobnější klasifikaci materiálů popisujeme několik hledisek. Mechanicko-fyzikální vlastnosti implantátu a jeho biologická tolerance mají přesně určená specifika. Alogenní implantát může v živém organismu vyvolat kaskádu imunologických reakcí i s možnou konečnou eliminací implantátu. Na rozhraní mezi implantátem a živou tkání dochází k vzájemnému ovlivňování, materiál je rozpouštěn, podléhá korozi, může dojít k transportu mikročástic

implantátu, a tím ke vzniku metalózy, ale i k ostitidě vedoucí k resorpci kosti alveolu [1].

Klinické i experimentální zkušenosti vyústily v závěr, který shrnujeme do několika všeobecných požadavků na vlastnosti implantátu:

1. Implantát musí být pro tkáň a celý organismus neškodný – nekarcinogenní, netoxický, zbavený antigenů, neradioaktivní, neměl by korodovat, ani by neměl být chemicky ovlivňován tělními tekutinami.

2. Má být biologicky snášenlivý a stabilní. Nesmí narušovat metabolismus a způsobovat resorpci kostního lůžka, vyvolávat reakci organismu na cizí těleso nebo podléhat biodegradaci.

3. Musí minimalizovat spojení mezi vnitřním a zevním prostředím – tedy mezi subgingiválním krajinou a dutinou ústní.

4. Implantát má být dostatečně pevný a elektrochemicky stálý. Vzhledem ke kostnímu lůžku by měl být izoelastický, aby nevyvolával nadměrný tlak a napětí v čelisti.

5. Měl by se při výrobě snadno odlévat a opracovávat.

6. Musí být rentgenkontrastní a vyhovující z hlediska estetiky i ústní hygieny.

7. Opracování a sterilizace by neměly činit technické obtíže.

8. Všeobecně by neměl způsobit změny krve nebo poškodit plazmatické proteiny [1, 5].

Žádný materiál, který se do živého organismu implantuje, není absolutně inertní. Všechny tyto materiály vyvolávají nějaký stupeň imunologické odpovědi hostitelských tkání [6]. Biokompatibilitu materiálu pak definujeme jako schopnost materiálu chovat se v dané indikaci předvídatelně a uspokojivě [7].

Materiály pro dentální implantologii dělíme na tři základní skupiny – biotolerantní, bioinertní a bioaktivní. Biologická kvalita většinou nekoresponduje s pozitivními mechanicko–fyzikálními vlastnostmi, ale jejich vztah bývá často nepřímo úměrný [1]. Další možné dělení upřednostňuje charakteristiku materiálu vzhledem k okolnímu prostředí a uvažovaném účelu aplikace. Pak rozlišujeme čtyři kategorie materiálů – biologicky inaktivní a téměř inertní, porézní, bioaktivní a resorbovatelné [6].

Pro biotolerantní materiály je obecně charakteristické, že jsou okolní tkání snášeny, ale při jejich vhojování nevzniká mezi povrchem implantátu a okolní kostí novotvořená kostní tkáň, ale vazivová tkáň. Jedná se tedy o proces fibrointegrace, který není z dlouhodobého hlediska prognosticky výhodný a může dokonce vést k odloučení implantátu. Reprezentanty biotolerantních materiálů jsou některé slitiny chromu, niklu, kobaltu, molybdenu, drahokovové slitiny a slitiny obecných kovů. Výhodou této skupiny materiálů je mechanická odolnost, pevnost, která neplatí pro drahokovy, a přesnost při odlévání nejrůznějších tvarů. Nevýhodou je koroze materiálu, možné toxické nebo iritační působení na organismus, eventuálně i vznik metalóz. Implantáty této skupiny se u nás uplatňovaly zejména v sedmdesátých letech minulého století [1]. V novém dělení téměř nemají zastoupení pro svoje nevýhody.

Bioinertní materiály jsou pro tkáň biologicky akceptovatelné. Do této skupiny řadíme titan a jeho slitiny, tantal, aluminiumoxidovou keramiku, zirkoniumoxidovou keramiku a uhlíkové materiály. V současné době se nejčastěji využívá titan a jeho slitiny. Při splnění jistých předpokladů, jakými jsou tvar, forma, úprava povrchu a šetrná inserce, se vhojují oseointegrací. Vzniká tedy přímý kontakt povrchu implantátu s kostí bez jakékoliv mezivrstvy vazivové

tkáně. Podle novějšího dělení bychom tuto skupinu materiálů označovali jako biologicky inaktivní a téměř inertní, tkáně na aplikaci těchto materiálů reagují enkapsulací [5].

Téměř všechny zubní implantáty jsou v současnosti renomovanými výrobci konstruovány na bázi titanu. Specifickou vlastností titanu je jeho biokompatibilita, organismus jej obtížně identifikuje jako cizí materiál. Při vhojování dochází pravděpodobně k fyzikálně-chemickému spojení. Z hlediska dentální implantologie rozlišujeme tři skupiny bioaktivních materiálů – hydroxyapatitovou keramiku, tri- a tetrakalciovou keramiku a bioaktivní sklokeramiku [1].

Usilujeme o zvětšení povrchu a maximální biokompatibilitu implantátu, ke kterým dochází buď mechanicky – zářezy [4], chemicky – leptáním tzv. etching, pokrytím metodou plazmového naprašování, pískováním nebo kombinací dalších technik. Zdrsněný a zvětšený povrch implantátu zlepšuje oseointegraci [1].

Dentální implantologie udělala velký pokrok, ale stále ještě nejsou vyřešena některá úskalí, jakými jsou např. optimální povrchová úprava, zvláště při kombinaci materiálů. Oblast mého zájmu je zaměřena na techniku povlakování implantátů, tedy zejména na vlastnosti mechanické. Povlakované implantáty se poprvé objevily v roce 1984 díky kalifornské firmě Calcitek. Počáteční klinické testy byly povzbudivé, ale je zjevné, že samotný hydroxyapatitový povlak na titanové slitině potřebuje další výzkum k osvětlení mnoha souvislostí [4].

Možnost časnějšího zatížení implantátu je důvodem pro hledání nových technik povlakování a úprav povrchu titanových fixtur. Pro pacienta je výhodou možnost zkráceného protetického ošetření. Běžně používaným materiálem k povlakování je HA, liší se však techniky nanášení tenkého pláště. Ochrana

implantátu je tak založena na adhezi HA povlaku k titanovému podkladu [8]. Kombinace titanu a HA je slibná, protože oba materiály jsou vysoce biokompatibilní [9]. Po zavedení je implantát fixován v kosti pouze mechanicky, tento stav označujeme jako primární stabilitu implantátu [1]. Přímý kontakt s tvrdou tkání má v této době podle histologických vyšetření asi 25 – 85 % povrchu fixtury [4]. Po vhojení povlakovaných implantátů s HA se hodnoty histologických vyšetření kontaktu kosti s implantátem liší u různých autorů od 38 do 99,8 % [10]. Metoda měření se nazývá BIC (bone–implant contact) a spočívá v posouzení množství kosti, která je v přímé vazbě na povrch implantátu. Zohledňuje se i kvalita kosti v okolí, a tak BIC podává velmi objektivní informace [10].

1.4 Druhy materiálů k povlakování

V současnosti se k výrobě fixtur implantátů nejčastěji využívá titan a jeho slitiny. Titan byl objeven roku 1789. Je obsažen především v hlinitých a písčitých horninách a pro svou dříve obtížnou výrobu byl do čtyřicátých let minulého století využíván pouze laboratorně. Rozvoj jeho využití v letectví a kosmonautice podnítil další výzkum i v jiných oborech a v padesátých letech se začal uplatňovat i v medicíně.

Nejčistší titan se vyrábí z jeho jodidu, ale je velmi drahý a používá se jen v laboratořích [1]. Titan je stříbrolesklý kov s vysokou teplotou tání - 1 670 ^{o}C, jeho mechanické vlastnosti jsou závislé na přítomnosti nečistot (O, N, C) a má mnohem menší hustotu než běžně používané dentální slitiny i přes svou vysokou pevnost a mechanickou odolnost [11]. Dostupnější je technicky čistý neboli cp Ti (commercially pure titanium), který obsahuje 99 % titanu a příměsi kyslíku, dusíku a vodíku. Sám o sobě je titan velice reaktivní prvek a během jedné

milisekundy se na vzduchu pokrývá vrstvou oxidů, a tak se jeho povrch stává vysoce stabilní. Tento proces se nazývá pasivace. Kromě cp Ti se v medicíně využívá i titanová slitina Ti 6Al 4V. Vedle 90 % titanu obsahuje 6 % hliníku a 4 % vanadu, které tento materiál stabilizují, a to především ve smyslu únavové pevnosti a tepelné zpracovatelnosti [1, 11].

K povlakování titanových implantátů se užívá několika chemických látek, hydroxyapatit (HA), beta-tricalciumfosfát (TCP), tetrakalciumfosfát, biosklo [1, 4] a stále více nacházíme publikace o kombinaci se zirkonem [1, 5, 12, 13, 14, 15].

Vůbec nejčastěji citovaným materiálem k povlakování je hydroxyapatit, je to látka chemicky definována jako $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, asi z 60 % je součástí kosti, z 50 váh. % a ze 70 obj. % [5]. Využívá se také k augmentačním postupům [1]. Samostatný HA je velmi křehký a neunese protetické zatížení, proto jeho dobrých vlastností nemůžeme využít k výrobě samostatných, nosných implantátů, ale jen k jejich povlakování [16]. HA je při neutrálním pH jen těžce rozpustný, naopak v kyselém, zánětlivém prostředí jeho rozpustnost vzrůstá. HA vykazuje osteokondukční a osteoindukční vlastnosti. Osteokondukce spočívá ve schopnosti sloužit osteocytům a osteoblastům jako mřížka pro překlenutí tkáňového defektu při postupující novotvorbě kosti. Osteoindukční vlastnosti se projevují v podpoře tvorby nové kostní tkáně. Problémem se tedy stává stabilita HA povlaku v biologickém prostředí [4].

Beta-tricalciumfosfát a tetrakalciumfosfát jsou materiály s výtečnými bioaktivními účinky, ale vstřebávají se rychleji než HA a jsou méně stabilní. Jejich využití se posunuje spíše do roviny augmentačních materiálů.

Bioaktivní sklokeramika neboli biosklo patří mezi materiály s vysokou biokompatibilitou, ale nevykazuje příliš velkou pevnost při využití pro úpravu implantátů [1, 4].

Zirkon je chemicky definován jako ZrO_2, byl objeven na konci 18. století zahříváním drahých kamenů. Zirkon s nízkou kvalitou je používán jako abrasivum, vysoká tepelná vodivost předurčuje použití zirkonu v elektrolytech palivových článků a kyslíkových senzorech.

Zirkonová keramika používaná v medicíně, např. v zubní protetice, má mnoho výhodných vlastností závislých na mikrostruktuře. Zkoumalo se několik forem zirkonu různých krystalických struktur. V poslední době se vývoj zaměřuje zejména na zirkon–yttriovou keramiku charakterizovanou jemnozrnnou strukturou, známou jako Tetragonal Zirkonia Polycrystals (TZP), která je v centru zájmu implantologie a jsou s ní rozsáhlé klinické zkušenosti při implantacích v ortopedii [17].

Rozlišujeme zirkonová vlákna a částice, obojí ve formě oxidu zirkonu. Přidáním zirkonu do povlaku nastane výrazné zpevnění, a tím i vyšší odolnost vůči opotřebení [5].

Mechanické vlastnosti zirkonové keramiky typu TZP vydrží zatížení několikrát větší než je fyziologická mez. TZP forma zirkonu byla podrobena stabilizačním zkouškám v různých prostředích a teplotách. Závěr experimentů podává důkaz o dobrých mechanických vlastnostech TZP a stabilitě ve vlhkém prostředí při teplotě 37 ^{o}C po dobu očekávané životnosti implantátu, kritická je teplota 200 - 300 ^{o}C. Stabilní zástupci TZP keramiky existují i ve vlhkém prostředí [17].

Všeobecné závěry však v tuto chvíli dělat nemohu, protože chování zirkonu je příznačné pro určitou technologii přípravy materiálu. Stejně tak míra opotřebování materiálu v různých médiích není jen záležitostí laboratorních zkoumání, ale i souhry mnoha faktorů zahrnujících roztoky, jednoduché laboratorní testy a kloubní simulátory. Biologická bezpečnost se zkoumala studiemi in vivo – první byla v roce 1969 a předběhla experimentální data získaná z buněčných kultur o celých 21 let. In vitro studie byly provedeny pomocí testů chromozomových aberací a Amesova testu, později byly provedeny testy cytotoxicity, proliferace a MTT test s různými buněčnými liniemi. Tyto testy potvrzují nepřítomnost znaků cytotoxické reakce. Testy in vivo byly provedeny s různými chemickými typy zirkonu v rozličných formách, implantace zirkonu proběhly u opic, králíků, psů a krys [17]. Testy cytotoxicity a proliferace ZrO_2 na titanových terčích s povlakem HA jsme provedli i v naší laboratoři s podobnými výsledky [18]. Později jsme je doplnili i o MTT test, který neprokázal negativní ovlivnění buněčného metabolismu [19].

V zirkonu se objevují i radioaktivní nečistoty, neboť zirkon se v přírodě nevyskytuje v čistém stavu, ale jako oxid (ZrO_2) nebo silikát ($ZrSiO_4$), tyto formy se objevují s U^{235}, U^{238}, Th^{232}. Může být přítomna i vysoká hladina radioaktivních prvků, ale je možné je vyčistit. Jako purifikované formy se používají oxidy a silikáty zirkonu pro výrobu TZP keramiky. Jejich specifická aktivita je pak nižší než u lidské kosti.

Následující výsledky podporují využití zirkonu jako biomateriálu [9]:

1. Nebyly detekovány lokální ani systémové nežádoucí reakce, které by byly v souvislosti s materiálem, ani cytotoxické efekty přímo na zirkonovou keramiku nebo na její prekurzory. To vše i přes značnou šíři testovaných

materiálů a použitých metod testování (různé buněčné linie i zvířecí modely).

2. Mechanické vlastnosti jsou závislé na prekurzorech a na procesu výroby komponentů.
3. Výroba TZP keramického biomateriálu vyžaduje použití vysoce chemicky a radionuklidově čistých prekurzorů, protože jedině čistota materiálu může zaručit úroveň hydrotermální stability, která je nutná pro využití TZP ve specifických aplikacích.

Nabízí se tedy možnost využití kombinace výhodných vlastností HA a zirkonu. Vysoce čistý HA můžeme modifikovat přidáním různého podílu ZrO_2. Bod tání ZrO_2 je 2 680 °C a HA je 1 570 °C při pH_2O 500 mm Hg a Ca/P poměru 1,67 v HA. Při použití metody plazmového naprašování se přidáním ZrO_2 signifikantně zvyšuje vazebná síla mezi HA filmem a titanovou slitinou [12, 13, 15].

Studie zirkonu jako keramického biomateriálu se koncentrují na zlepšení role TZP pro použití v ortopedii [17]. Nové aplikace zirkonu nacházíme také ve stomatologii [12].

1. 5 Přehled metod vhodných k povlakování

Mezi hlavní metody povlakování zubních implantátů zařadil Lacefield následující: plazma naprašování, sol-gel a dip coating metody, tepelné izostatické stlačování, elektrolytické postupy, iontové naprašování a pulsní laserovou depozici [20], dále Mihailescu udává i magnetronové naprašování, laser cladding a biomimetickou depozici [5].

Zde uvádím stručný popis jednotlivých metod s hlavními výhodami a nevýhodami. Pulsní laserová depozice, která je předmětem našeho výzkumu, bude diskutována ještě podrobněji v kapitole 4.1.

Plazma naprašování je komerčně nejrozšířenější metodou povlakování dentálních implantátů. Principem je použití nosného ionizovaného plynu, který vytvoří plasmu a rozehřeje např. částice HA, ty se částečně rozpustí a jsou poháněny k povlakovanému substrátu. Typické jsou povlaky o tloušťce 50 - 100 μm [4, 20], Mihailescu udává až 200 μm [5]. Povrch je drsný, nepravidelný a porézní. Výhoda metody se jeví v možnosti zvýšení apozice kosti ve vzniklých makroporozitách. Dokáže deponovat povlaky na rozsáhlé plochy. Nevýhodou je slabá kohezivní a vazebná síla, velmi nepravidelná morfologie a rozsáhlý podíl amorfního povlaku [5].

Sol-gel a dip coating zpracování

Tato metoda se využívá hlavně pro vytváření tenkých povlaků a super vodivých filmů pro elektronická zařízení. Základem metody je vložení prekurzoru výsledného povlaku do roztoku, stejně tak je ponořen i povlakovaný implantát. Zahříváním se vytváří na implantátu povlak. Proces se opakuje až do dosažení požadované vrstvy [20], která se většinou pohybuje okolo 1 μm [5]. Vzniklý povlak je většinou hrubý, někdy porézní. Výhodou je možnost tvorby povlaků při relativně nízké teplotě na různé tvary substrátů. Dochází ale k porušení celistvosti povlaku a jeho mikrostruktury [5].

Tepelné izostatické stlačování

Při použití této metody se využívá jak zahřívání, tak tlaku ke zvýšení hustoty keramického prášku. Jakmile se prášek zahustí do pevné hmoty, spojí se ve stejný okamžik s implantátem. Vzniká tak solidní keramický povlak na

titanovém implantátu o tloušťce od 20 do 100 μm. Výhodou je práce za nižší teploty, pokud nedochází ke zvýšení tlaku, což dovoluje zachování mechanických vlastností implantátu. Mezi nevýhody se zařazuje potenciální kontaminace povlaku [20].

Elektrolytické postupy

Elektrolýza a elektroforéza jsou dva postupy, kterými je možné deponovat HA. Metoda je vhodná zejména pro porézní materiály, kde se vytváří elektrolyticky homogenní vrstva snáze. Principem je přenos HA z katody na implantát (anodu). Tloušťka vytvořené vrstvy dosahuje od 10 do 40 μm [20]. Struktura povrchu je hrubá. Výhodou je efektivní povlakování složitějších tvarů i s kavitami. Povlak ale nemá vysokou vazebnou sílu a dochází k jeho srážení a praskání [5].

Magnetronové naprašování

Vytváří povlaky o tloušťce do 2 μm, povrch je jednolitý, hladký. Výhodu vidím ve vysoké hustotě a adherenci povlaku. Magnetronové naprašování dokáže vytvořit kompaktní povlak téměř jakéhokoliv tvaru, ale při aplikaci HA je jeho Ca/P poměr nad 1,67.

Laser cladding

Metoda spočívá v nanášení velmi silných povlaků, řádově 300 až 400 μm v prostředí inertního plynu na podklad. Vzniká hladký povlak, který velmi dobře adheruje na titan. Nevýhodou je vznik amorfního povlaku.

Biomimetická depozice

Metoda spočívá v apozici povlaku v simulované tělní tekutině. Vzniká vrstva tloušťky několika desítek mikrometrů. Výhodou je možná variabilita ve stechiometrických poměrech aplikovaného materiálu, a tím formování povlaku

s určitým Ca/P poměrem. Nevýhodou je nízká adheze k substrátu, který se musí před úpravou modifikovat [5].

Iontové naprašování

Využívá se rutinně v elektronice, vytvářejí se tak v prostředí vakua hladké povrchy s vysokou adhezí, ale s neuspořádaným, beztvarým povrchem. Iontové naprašování je založeno na vzniku usměrněného výboje v prostředí nízkotlaké argonové atmosféry účinkem elektrického napětí. Při výboji dochází k ionizaci plynu a vzniklé ionty jsou přitahovány ke katodě, která je obkroužena prstencem z naprašovaného materiálu. Urychlené ionty z něj vyrážejí částice kovu, které se při své pouti prostorem naprašovačky rozptylují srážkami s dalšími molekulami a ionty plynu, takže vznikne prostorový mrak, který obalí povrch preparátu tenkou vrstvičkou substrátu [5].

Pulsní laserová depozice

Tato metoda využívá pro vytvoření tenké vrstvy obvykle excimerový laser KrF (generuje na vlnové délce λ=248 nm) nebo ArF (λ=193 nm). Laserové záření je centrováno na terč (HA, ZrO_2, aj.), ze kterého je emitován materiál ve formě plazmy. Odpařovaný materiál se kondenzuje na substrát v tenkém filmu [20]. Změnou depozičních podmínek (hustota energie laserového záření na terči, tlak, energie paprsku, vzdálenost HA terčíku od implantátu a složení okolního prostředí atd.) lze měnit složení a krystalickou strukturu narůstající vrstvy [21, 22]. Pracuje se v ochranné atmosféře inertního plynu a směsi vodních par. Vytvořený povlak je dle nastavení parametrů depozice hladký nebo hrubý. Výhodou je univerzálnost metody, vysoká hustota a krystalinita povlaku, přesné stechiometrické hodnoty, a tím i dobře kontrolovatelný poměr Ca/P, skvělá adheze, čistý proces depozice bez

UK v Praze - Lékařská fakulta
ÚVI
KNIHOVNA
1

příměsí a možné nastavení pokojové teploty při depozici pláště. Nevýhodou je limitovaný povrch na menší plochy a relativně malá tloušťka povlaku [5].

2. CÍLE PRÁCE

V disertační práci jsem se zaměřila na oblast aplikací laserové techniky ve vývoji nových depozičních metod tenkých vrstev pro dentální implantáty. Cíle práce jsou v oblasti experimentální, v realizaci a ověření vlastností tenkých vrstev hydroxyapatitu (HA) a oxidu zirkoničitého deponovaných na substrát ze slitiny titanu (Ti 6Al 4V). Depozice vrstev a fyzikálních testů jsem se zúčastnila na Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky pod vedením Doc. Ing. Miroslava Jelínka, DrSc.

Cíle práce jsem rozdělila do několika oblastí:

- Příprava experimentu pulsní laserovou depozicí s cílem zlepšení mechanických vlastností deponované vrstvy při zachování optimálních biokompatibilních vlastností.
- Studium depozičních parametrů zmíněné technologie pro povlakování titanového substrátu. Jedná se o zohlednění fyzikálních parametrů na vlastnosti výrobku - hustoty výkonu laserového záření nutného pro ablaci složek terče, tlak a složení okolního prostředí, ohřev podložky pro realizaci amorfních nebo krystalických struktur a kombinace jejich vlivu na požadované parametry vrstev.
- Zkoumání fyzikálních vlastností povlakovaných substrátů vyrobených z titanové slitiny, které simulují povrch nitrokostní části implantátu, tzv. fixtury. Povlak obsahuje vrstvu oxidu zirkonu a hydroxyapatitu. Popis výhod a nevýhod sendvičové struktury (HA na mezivrstvě zirkonu), stejně jako jednotlivé samostatně

vytvořené vrstvy na titanovém terči s ohledem na morfologii a poměr Ca/P v deponované vrstvě HA.

- Vyhodnocení krystalinity vzorků metodou rentgenové difraktometrie (XRD), která je u HA určujícím faktorem pro úspěšné vhojování implantátu procesem oseointegrace.
- Mechanickými zkouškami – vrypovou a vpichovou metodou je nutné ověřit adhezi mezivrstvy oxidu zirkoničitého k podkladu.

3. HYPOTÉZA

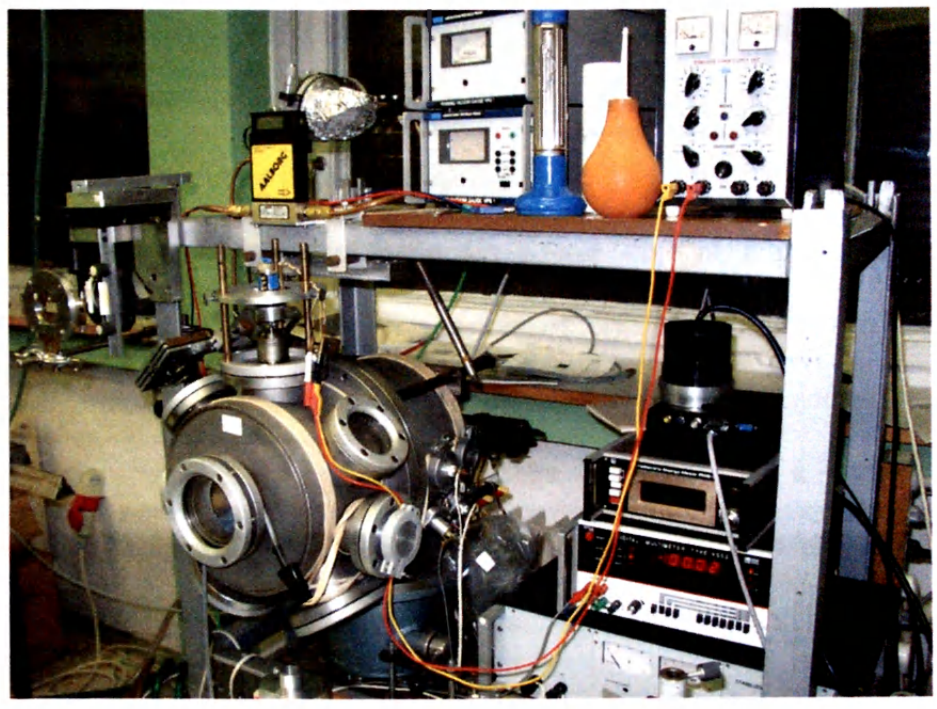
Pulsní laserovou depozicí můžeme vytvářet tenké vrstvy materiálů na titanové podložce, která simuluje povrch zubního implantátu. Soustředíme se na vytvoření sendvičových povlaků titanové slitiny s mezivrstvou oxidu zirkoničitého a vrstvou hydroxyapatitu, u kterého chceme dosáhnout krystalické struktury pro zlepšení vhojení při procesu oseointegrace.

4. MATERIÁL A METODY POVLAKOVÁNÍ

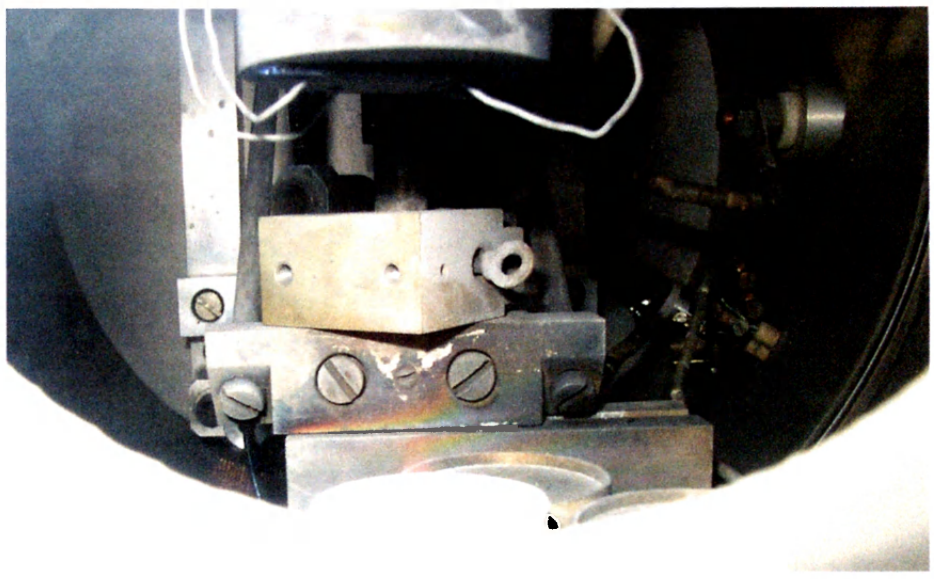
4.1 Pulsní laserová depozice

Metoda pulsní laserové depozice (PLD) se objevila v 90. letech 20. století a záhy konkurovala jiným metodám depozic tenkých vrstev pro své možnosti nanášení bioaktivních, biokompatibilních, pevně adherujících, uniformně tenkých vrstev široké škály materiálů požívaných v implantologii a chirurgii. PLD je vcelku univerzální, efektivní, bez tvorby odpadů díky použití laserového paprsku. Při vhodném geometrickém uspořádání experimentu umožňuje deponovat vrstvy i na složitější reálné tvary, tedy i na implantáty se zářezy [5]. Vlastnosti povlaku jsou přímo závislé na depozičních podmínkách, lze tedy vytvořit keramický film „na míru“ [8].

Základní experimentální uspořádání PLD tvoří vakuová depoziční komora (obr. 4.1.1), držák substrátu umožňující i jeho ohřev a přesné měření teploty, materiál terče a laser (obr. 4.1.2). Předním oknem sledujeme proces depozice za použití ochranných brýlí.



Obr. 4.1.1: Depoziční komora KrF laseru pro vytvoření tenkých povlaků metodou pulsní laserové depozice.



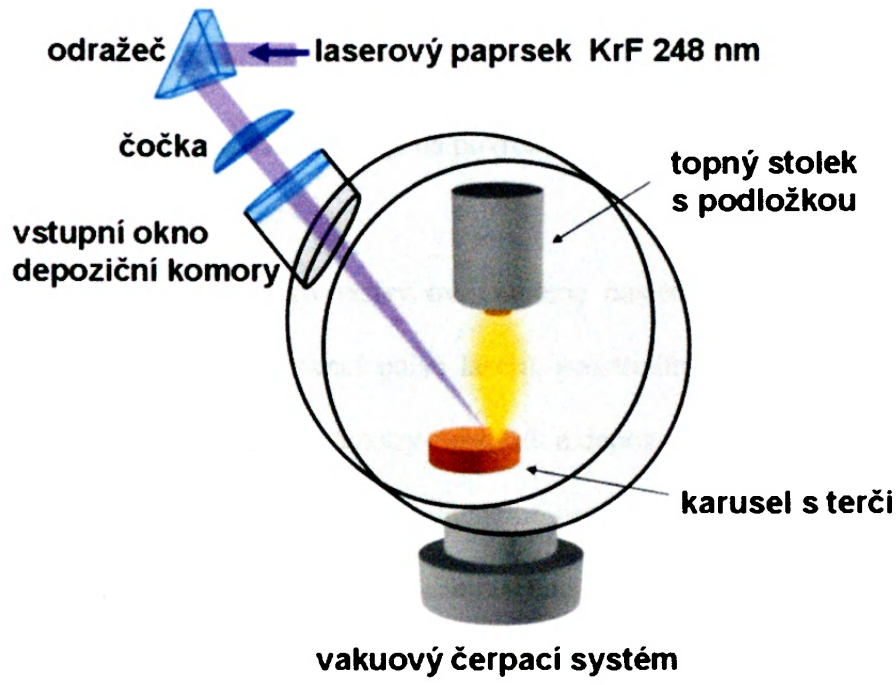
Obr. 4.1.2: Pohled do depoziční komory KrF laseru okénkem depoziční komory zobrazující držák substrátu a terč z HA.

Depoziční parametry nastavujeme experimentálně. Jedná se o teplotu a tlak v depoziční komoře před depozicí a v době nanášení tenkých vrstev, eventuálně o chemické složení ochranné atmosféry, energii laseru, frekvenci a tím

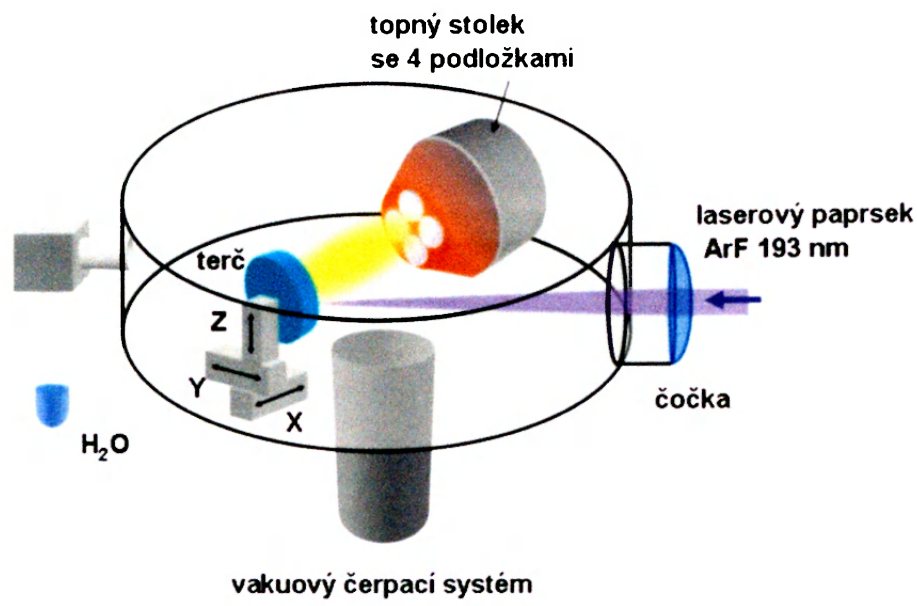
i velikost stopy na terči, počet pulsů reguluje tloušťku deponovaného filmu, dále nastavujeme hustotu energie laseru a vzdálenost podložky terče a substrátu i jeho případný ohřev na teplotu v rozmezí 20 až 800 °C.

Laser použitý pro ablaci materiálu z terče umožní kondenzaci částic vzniklého plazmatického oblaku na substrátu, který je umístěn v držáku nad terčem (obr. 4.1.2). Můžeme deponovat i na několik substrátů najednou, stejně jako lze kombinovat nanášený film z několika různých terčů, a vytvořit tak multivrstvové systémy. Tenká vrstva je v dobře volených podmínkách shodná s materiálem terče, je možné zachovat stechiometrický poměr prvků [23].

Výhodou depozice je umístění laseru mimo komoru. S rozvojem znalostí o metodě PLD byla postupně experimentální zařízení upravována a zdokonalována s ohledem na určitý druh depozic. Schéma depozice je na obr. 4.1.3.a a obr. 4.1.3.b.



Obr. 4.1.3.a Schéma pulsní laserové depozice KrF laserem.



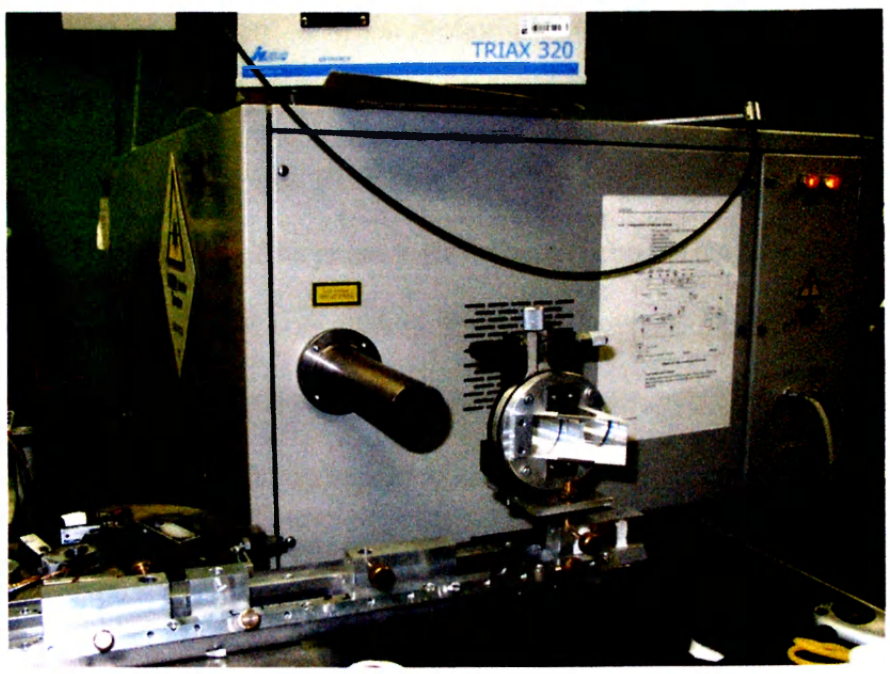
Obr. 4.1.3.b: Schéma pulsní laserové depozice ArF laserem.

Proces přípravy vrstvy můžeme stručně popsat ve třech krocích. Nejprve dochází k absorpci fotonů laserového svazku v terči a k odpařování povrchové vrstvy terče, vypařené částice jsou pak transportovány kolmo k povrchu terče směrem k podložce ve formě plazmového obláčku, který reaguje s okolním prostředím. Nakonec částice kondenzují na povrchu podložky a vrstva homogenně narůstá.

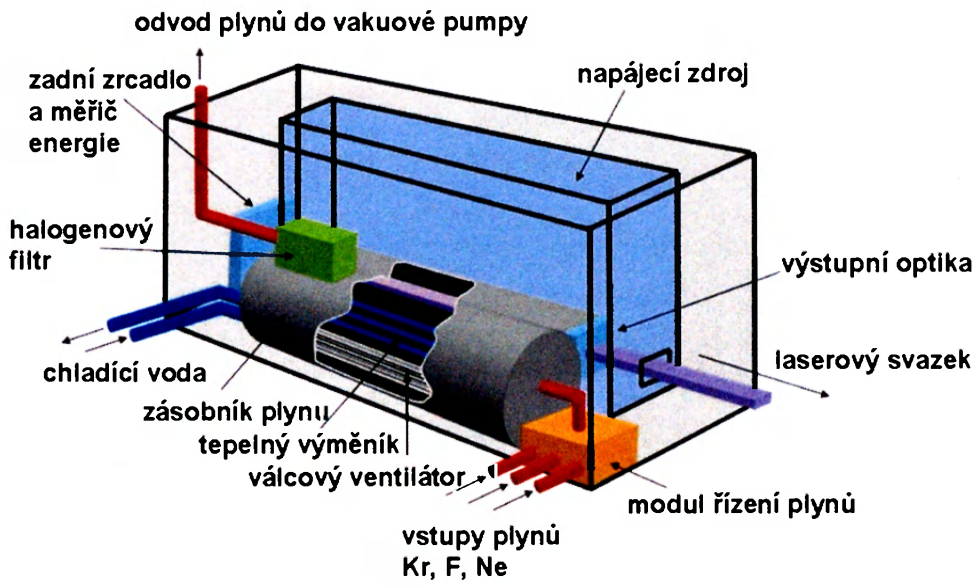
Vlastnosti deponovaných vrstev ovlivňujeme následujícími parametry – vlnovou délkou, délkou a frekvencí pulsů laseru, prostředím depoziční komory, vzdáleností substrátu od terče, parametry substrátu a depoziční rychlostí. Všechny veličiny na sebe vzájemně působí, proto hledáme optimální nastavení parametrů depozice v závislosti na požadovaných vlastnostech.

Depoziční komory i optické soustavy jsou originálním výtvorem vzniklým na základě návrhů pracovníků Fyzikálního ústavu AV ČR. Zkoumali použití různých laserů, ale nakonec byl zakoupen excimerový KrF laser (obr. 4.1.4), který je dostatečně výkonný (700mJ, 20ns v impulsu, λ=248 nm). Neustále se

zdokonaloval vakuový systém, depoziční komory i systém ohřevu substrátů. V experimentu představuji soustavu třetí generace pro PLD.



Obr. 4.1.4.a: Excimerový laser.

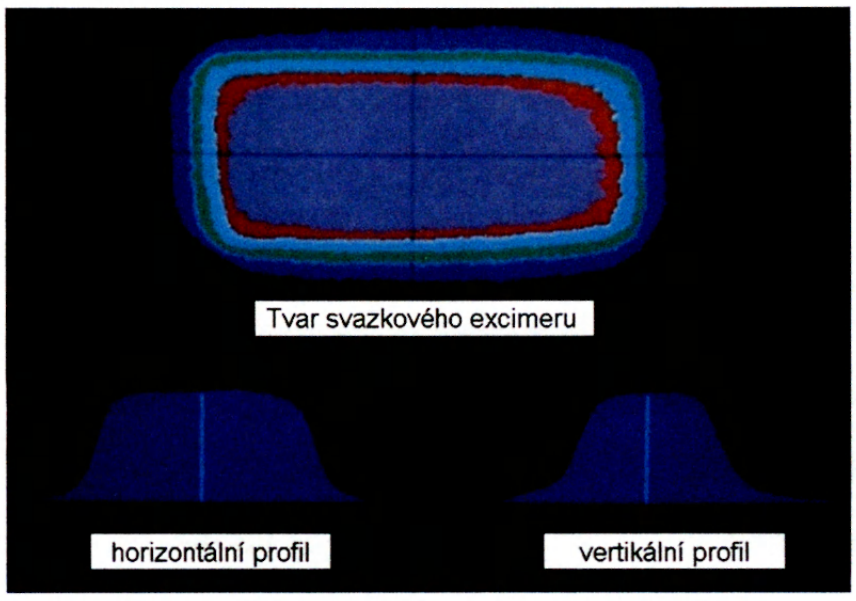


Obr. 4.1.4.b: Schéma excimerového laseru.

Excimerový KrF laser (obr. 4.1.4), který jsme využili i pro popisovaný experiment, je plynový laser a pracuje na principu zesilování optického záření v důsledku stimulovaných přechodů excimerů z vázaného stavu do stavu základního. Excimerové lasery většinou plníme plynnou směsí (např. Kr + F + He + Ne) na tlak 2 – 4 atmosféry v objemu 40 – 60 l, přičemž asi 88 – 99 % náplně tvoří buffer plyn (Ne, He). Životnost náplně je časově omezena spotřebou halogenu (nečistotami z výboje) a je asi 5.10^6 výbojů (nebo asi 1 týden provozu). Excimerové lasery jsou lasery s impulsním provozem. Bývají buzeny silnoproudým svazkem rychlých elektronů nebo elektrickým výbojem [23].

Náplň ArF laseru, který generuje záření na vlnové délce 193 nm, tvoří směs argonu, fluoru a neonu. Parametry jsou obdobné jako u výše uvedeného KrF excimerového laseru.

Kvalita výstupního laserového svazku je značně ovlivněna konfigurací výbojových elektrod a homogenním výbojem mezi elektrodami. Elektrody jsou konstruovány pro jeden typ náplně. Svazek má obdélníkovou aperturu a jeho divergence je asymetrická. Tvar svazku je na obr. 4.1.5.



Obr. 4.1.5: Tvar svazkového excimeru.

Typická divergence je pro delší osu 4,5 mrad a pro kratší osu 1,5 mrad. Apertura svazku je obvykle asi 2 x 3 cm^2.

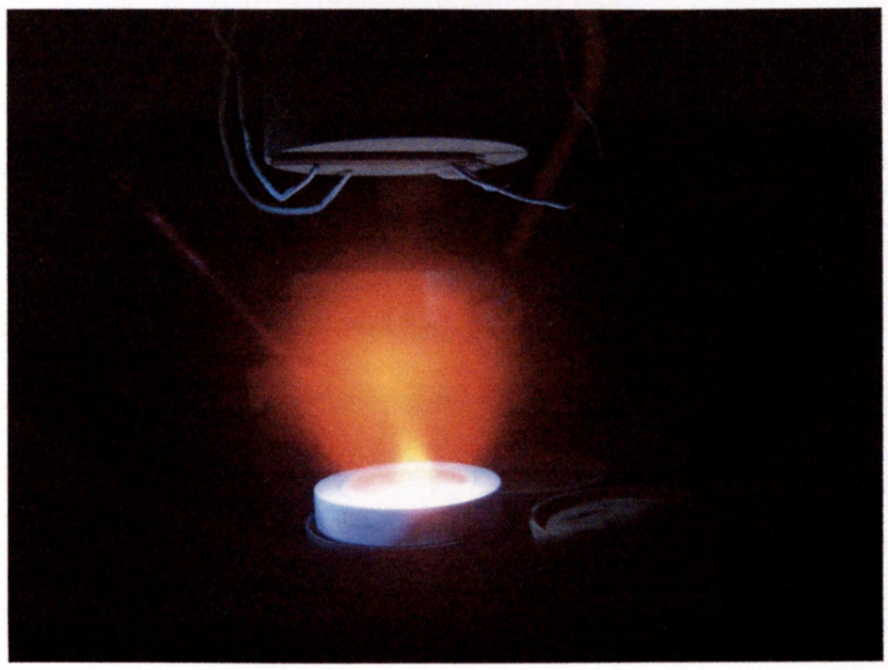
Pro depozici ZrO_2 vrstev u vzorků ZRO-1 až ZRO-24 a následnou depozici HA u ZHA-22 až ZHA-24 (tab. 1, 3, 4) jsme použili excimerový laser Lumonic PM 842 vyzařující na vlnové délce 248 nm. Délka pulsu laseru je 20 ns a jeho maximální výstupní energie 700 mJ. Opakovací frekvenci je možné volit v rozsahu 1 – 30 Hz. Apertura výstupního svazku má rozměry 12 x 25 mm^2 a jeho divergence je 1 x 3 mrad. Pro depozici HA povlaků u vzorků ZHA-1 až ZHA-13 (tab. 2) jsme použili Ar/F laser. Přehled tabulek uvádím níže v textu u konkrétních depozičních podmínek.

Před depozicí vyhříváme komoru na vysokou teplotu, abychom vypálili nečistoty uvnitř, následně čerpáme vzduch k vytvoření vakua. Čerpání vzduchu zajišťuje dvoustupňově rotační a turbomolekulární vývěva. Během depozice se na stěny usazují částice, které se rozptylují z terče, proto musíme mezi jednotlivými depozicemi čistit okno, kterým do komory prochází laserový paprsek, jinak dochází ke znatelným ztrátám energie [23].

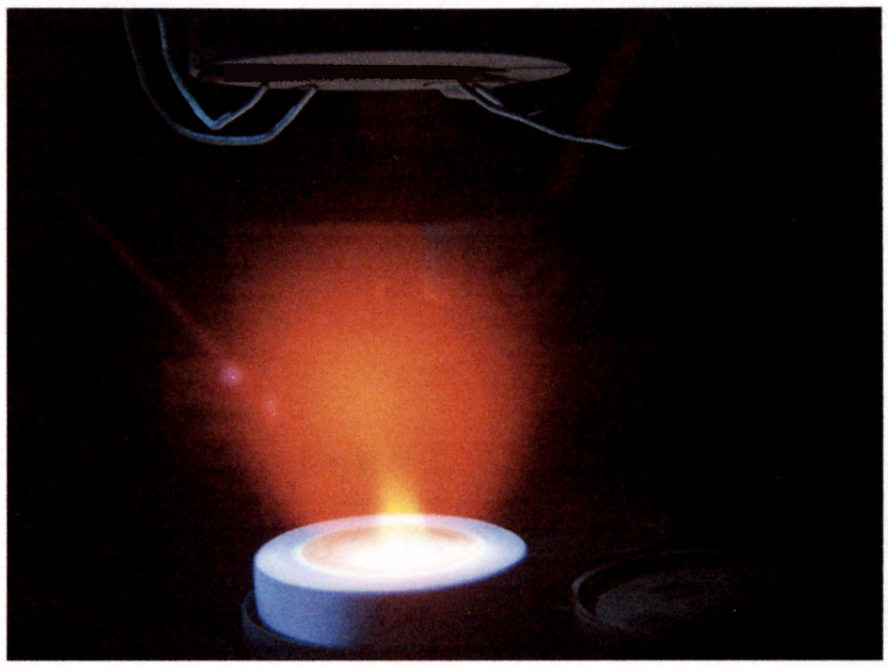
Adhezi keramického filmu nejvíce ovlivňuje teplota titanového implantátu nebo v experimentálních podmínkách teplota titanového substrátu. Se vzrůstající teplotou nosiče klesá adhezivní síla, z čehož vyplývá, že teplota nosiče by měla být co nejnižší. Dalším důležitým parametrem je složení ochranné atmosféry, která by měla obsahovat vysoký tlak vodních par se směsí argonu. Výhodná je i nízká energie laserového paprsku a malá vzdálenost mezi terčíkem a zhotovovaným vzorkem v řádu několika cm. Změny energie laserového paprsku a jejich důsledky dokumentuji na obr. 4.1.6 a obr. 4.1.7 a, b. Jedná se o změnu tvaru obláčku plazmy, který je v případě obr. 4.1.6 vytvořen při energii laserového

paprsku 150 mJ a na obr. 4.1.7 je situace při energii 50 mJ. Na obr. 4.1.7 b vidíme navíc i situaci, kdy část HA podléhá v laserovém paprsku stejnému procesu a tvoří se kolem ní obláček plazmy. Výhodnější pro depozici tenkých vrstev je uspořádání kapkovitého tvaru, kterým se materiál z terče dostává cíleněji na povrch substrátu. Tvar obláčku závisí na vlnové délce laseru, hustotě výkonu laserového záření, velikosti stopy laserového záření na terči atd. Obláček je vždy kolmý k povrchu terče [23].

Obr. 4.1.6: Obláček plazmy ve tvaru kapky vystupující z HA terče směrem na titanový substrát 150 mJ.



Obr. 4.1.7.a: Obláček plazmy ve tvaru stromu vystupující z HA terče směrem na titanový substrát 50 mJ, při nižší energii je větší rozptyl plasmy v prostoru.



Obr. 4.1.7.b: Obláček plazmy ve tvaru stromu vystupující z HA terče směrem na titanový substrát 150 mJ, drobné exploze ve směru laserového paprsku. V cestě laserového paprsku jsou drobné kousky HA, které procházejí stejným dějem a je kolem nich obláček plazmy.

Jak jsem již zmínila, některé faktory působí protichůdně. Potřebujeme nízkou teplotu nosiče, ale s rostoucí teplotou vzrůstá poměr krystalické složky

oproti amorfní, což je žádoucí. Jako vhodné depoziční podmínky se ukazují pro HA teplota v rozmezí 400 – 780° C v prostředí směsi argonu a vodních par a hustotou energie laserového paprsku 3 $J.cm^{-2}$ se vzdáleností HA od kovového nosiče 6 - 7,5 cm [21]. Tímto procesem vzniklý implantát má vyšší odolnost vůči korozi a resorpci vrstvy keramiky. Cytotoxicita a resorbovatelnost povrchu vzorku závisí na fyzikálních vlastnostech biokeramiky na titanovém nosiči [18, 19, 24].

Výzkumy ukazují, že přítomnost slabého místa ve spojení HA se slitinou je spíše v selhání vazby uvnitř povlaku než ve ztrátě připojení mezi HA a povrchem kosti [14].

4.2 Metody ověřování stability

Vhodné fyzikální a mechanické vlastnosti jsou jedním ze základních faktorů ovlivňujících délku funkčního období implantátu stejně jako je důležité chemické složení vytvořených povlaků a jejich struktura. Jednotlivé typy titanových nosičů povlakovaných biokeramickou vrstvou podrobujeme komplexu mechanických a biologických zkoušek [21].

4.2.1 Fyzikální analýzy vlastností vrstev

Nedílnou součástí optimalizace depozičního procesu je charakterizace mechanických a fyzikálních vlastností, které by měly odpovědět na otázku, jaké parametry jsou z hlediska depozičních podmínek nejdůležitější. V úvahu musíme brát teplotu kovového nosiče, prostředí depoziční komory, hustotu energie laserového paprsku a vzdálenost kovového nosiče od HA terčíku.

Metody užívané pro analýzu vlastností materiálů rozdělujeme podle různých hledisek:

- metody pro měření tloušťky vrstev (např. optický mikroskop, α – step)
- metody pro studium morfologie povrchů vrstev (např. optický mikroskop, elektronový mikroskop)
- metody pro studium stechiometrie vrstev (např. WDX – vlnově disperzní rentgenová analýza)
- metody kvantitativního i kvalitativního měření složení látky (např. XRD – rentgenová difraktometrie)
- studium mechanických vlastností (např. mikrotvrdost, test přilnavosti, mechanické pnutí)
- další (studium biochemických, chemických a elektrických vlastností, studium chemických vazeb, měření optických vlastností atd.) [5, 23, 25].

Principy jednotlivých použitých metod

Metoda rentgenové difrakce (XRD) spočívá v měření periody mřížky v krystalu, která obecně řádově odpovídá vlnové délce rtg záření, proto při průchodu rtg záření krystalickou mřížkou dochází k jeho ohybu a interferenci. Rtg záření dopadající na atomy krystalu rozkmitá elektronové obaly atomů a ty se pak stávají zdrojem rozptýleného koherentního záření o vlnové délce shodné s vlnovou délkou dopadajícího záření. Paprsky difraktované rovnoběžnými rovinami spolu za určitých podmínek interferují a vytvářejí difrakční obrazce. Vzniklý difraktogram odpovídá geometrickým rozložením difrakčních maxim a minim a přímo souvisí s prostorovým uspořádáním hmotných částic v krystalu. Každá chemická látka má své specifické uspořádání částic, a tedy i svůj

specifický difrakční záznam, což umožňuje kvalitativně rozlišovat mezi jednotlivými látkami. Difrakční záznamy látek se uchovávají v databázi, která v dnešní době čítá několik desítek tisíc záznamů jednoduchých anorganických sloučenin i krystalických bílkovin. Difrakční záznam zkoumané látky porovnáváme s již známými záznamy z databáze. Navíc jsou k dispozici softwary, které vyhledávání známých difrakčních záznamů značně ulehčují. Metodu XRD řadíme mezi objemové metody, to znamená, že měříme celý objem vrstvy. Nevýhodou je, že u velmi tenkých vrstev může dojít k „prosvítání" podkladu, kdy se na difraktogramu objeví vrcholy odpovídající materiálu podložky [26]. Ke studiu krystalové struktury deponovaných vrstev jsme použili XRD měření (300 mA, 55 kV, CuK alfa záření) [19].

Povrchovou strukturu materiálů zkoumáme pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Tato metoda je jednou z nejuniverzálnějších pro analýzu mikrostrukturálních charakteristik a je založena na principu interakce svazku primárních elektronů s hmotou vzorku. Analyzujeme emitované sekundární elektrony pro studium morfologie nebo primární odražené elektrony při zaměření na složení materiálu. Svazek primárních elektronů je změřen na určité místo, na němž dochází k přenosu energie, a jsou uvolňovány elektrony ze zkoumaného vzorku.Tyto dislokované elektrony (tzv. sekundární elektrony) jsou přitahovány ke kolektoru sekundárních elektronů, kde jsou převedeny na signál. Zachycený signál se přenáší na pozorovací obrazovku. Svazek primárních elektronů je cívkami vychylován tak, že řádek po řádku přejíždí vymezenou plochu vzorku. Čím je úhel dopadu primárního svazku vzhledem k normále pozorované plošky menší, tím je emise sekundárních elektronů silnější a ploška na obrazovce se jeví světlejší. Přístroje rastrovací elektronové mikroskopie obvykle užívají

urychlovacího napětí 10 – 50 kV, mají rozlišovací schopnost 7 – 10 nm a je možné dosáhnout zvětšení až 300 000x. Zvětšení je dáno poměrem délek stran obrazovky a rastrovacího obdélníku na vzorku [26]. Morfologie vrstev byla zjišťována skenovací elektronovou mikroskopií (JEOL JXA 733, Kanada) využívající svazek elektronů o napětí 15 kV [19].

Metodu vlnově disperzní rentgenové analýzy (WDX) využíváme k identifikaci prvkového složení vzorku nebo k určení podílového složení prvků ve vzorku. Na vzorek dopadá elektronový svazek, který vyráží elektrony z vnitřních hladin na volnou vnější hladinu, přičemž vzniklá vakance je okamžitě zaplněna elektronem z vyšší vnitřní energetické hladiny a přebytek energie se uvolní ve formě rtg záření. Rentgenová spektra vzorků bombardovaných rychlými elektrony vykazují úzká ostrá maxima při vlnových délkách charakteristických pro materiál vzorku. Rentgenové záření je rozloženo na jednotlivé vlnové délky difrakcí na monokrystalu. Intenzita spektrálních čar se měří proporcionálním detektorem převádějícím kvanta rentgenového záření na elektrické impulsy. Nejčastěji se zjišťují koncentrace těžkých atomů. Při analýze lehkých prvků proniká záření hlouběji do vrstvy a u tenkých vrstev se tak může projevit vliv podložky. Stanovovali jsme poměr Ca/P HA vrstev pomocí WDX přístrojem JEOL JXP 733 (Kanada) [19].

U deponovaných vzorků je vždy velmi důležitá dostatečná adheze vrstvy k podložce. Přilnavost povlaku k podkladu závisí na generaci smykových napětí a na mikrostruktuře povlaku v oblasti rozhraní. Na rozhraní mezi podkladem a povlakem mohou být příčinou vzniku smykových napětí rozdílné hodnoty pružnosti povlaku a podkladu, rozdílné hodnoty teplotních součinitelů délkové roztažnosti povlaku a podkladu nebo vnitřní napětí generované v povlaku během

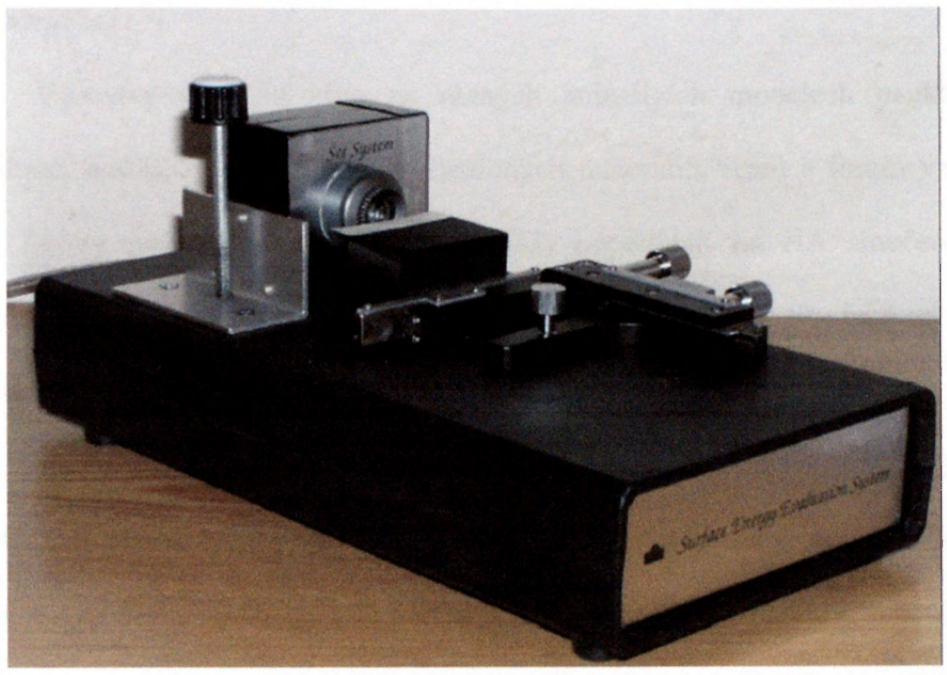
jeho růstu. Přilnavost povlaku k podložce je jedním ze základních parametrů ovlivňující životnost povlaku. V naší studii jsme vybrali zkoušku přilnavosti vpichem (indentation test) a zkoušku přilnavosti vrypem (scratch test) [26].

Při zkoušce přilnavosti vpichem se do povrchu povlaku vtlačuje rostoucí silou diamantová kulička, ocelová kalená kulička nebo diamantový indentor dle Rockwella. Pokud je zátěžová síla malá, deformuje se povlak společně s podložkou. V případě rostoucí hodnoty zátěžné síly dojde postupně k odlupování povlaku. Sílu odpovídající počátku odlupování povlaku považujeme za kritickou hodnotu přilnavosti. Provádíme kvalitativní vyhodnocení přilnavosti porovnáním s normovanou stupnicí nebo kvantitativní vyhodnocení přilnavosti měřením poloměru postranních trhlin šířících se podél rozhraní a v okolí plastické deformace při vpichu diamantového hrotu. Zkoušku jsme v našem případě provedli dle Rockwella s diamantovaným hrotem tvaru kužele s vrcholovým úhlem 120° [26].

Při zkoušce přilnavosti vrypem je diamantový indentor dle Rockwella tvaru kužele s vrcholovým úhlem 120° a vrcholovým poloměrem 0,2 mm posouván po povrchu zkoumané vrstvy definovanou rychlostí (v našem případě 10 mm/min). Přítlačná síla na diamantový indentor roste buď skokově po 5 až 10 N, nebo plynule definovanou rychlostí (100 N/min). Hodnotu přilnavosti potom chápeme jako sílu, při které je povlak proškrábnut až na podložku. Tento okamžik určujeme mikroskopickým pozorováním vrypové stopy [26].

Goniometrické měření kontaktního úhlu charakterizuje povrchovou smáčivost, která je jedním z kritérií pro sorpci proteinů umožňující buněčnou kolonizaci a adhezi. Kontaktní úhel jsme měřili kapkovou metodou s použitím speciálního přístroje vyrobeného pro tyto účely na Masarykově univerzitě

(Surface Energy Evaluation System Device, Brno, Česká republika), který pracuje s přesností ± 5°. Jako testovací tekutinu jsme použili destilovanou vodu při pokojové teplotě. Na povrch vzorku jsme kápli destilovanou vody o objemu 10 µl (automatická pipeta, BRAND, Německo) (obr. 4.2.1). Před testováním jsme titanové vzorky vyčistili acetonem a etanolem. Všechny vzorky jsme po měření vložili na 2 hodiny do H-MEM média (ÚMG ČSAV, Praha, Česká republika). Následně jsme vzorky omyli destilovanou vodou a změřili kontaktní úhel na povrchu změněném médiem [27].



Obr. 4.2.1: Přístroj na měření kontaktního úhlu.

4.2.2 Biologické testy

Jedním ze základních kritérií pro kvalitu povrchu implantátu je biotolerance a biokompatibilita biokeramiky.

Biokompatibilita zirkonu byla sledována testy in vitro a in vivo. In vitro testy byly provedeny na různých materiálech (práškových, kompaktních, různá složení s různými stupni příměsí vzorku), střídaly se typy buněk (fibroblasty, PHA stimulované lymfocyty) i prostředí. Výsledky po provedených testech cytotoxicity, proliferace a MTT testech byly vzhledem k biokompatibilitě pozitivní. Negativní výsledky se objevily jako následek degradace struktury biomateriálu [17].

Výsledky testů in vivo na různých animálních modelech neukázaly nežádoucí reakci, i když se užívalo rozdílných materiálů, tvarů a forem vzorků [17]. Buňky podobné osteoblastům (MGG3) odpovídají na HA sloučený se zirkonem (ZrO_2) do 40 obj. %, který byl modifikován příměsí CaF_2, jako na čistý HA, což sledoval Kim pomocí proliferačního testu [25].

Lemons [28] prokázal, že materiál a biomechanické vlastnosti přímo ovlivňují tkáňovou odpověď okolí. Úspěšné vhojení implantátu do kosti závisí na dostatečném množství kosti v okolí implantátu a na jeho přesném zavedení.

Histologická pozorování titanových implantátů s laserově deponovanou vrstvou HA sledovaná u vepřů Minnesota ukazují, že oseointegrace proběhla u všech implantátů a u žádného ze vzorků nebyly pozorovány osteoklasty, makrofágy nebo regresivní změny. Histologicky byla pozorována také nově tvořená kost kolem všech vzorků [8]. V další studii Himmlová uvádí výsledky testů při nezatížené oseointegraci implantátů, kdy implantát obsahoval vrstvu o tloušťce 1 μm HA. Implantáty o délce 12 mm a průměru 3,5 mm byly zavedeny

do dolní čelisti miniprasátek. Jako kontrolu autoři použili čistě titanové implantáty. Novotvorba kosti byla téměř bez přítomnosti fibrosního vaziva [29]. Byla sledována i zatížená oseointegrace titanových implantátů s HA vrstvou připravenou pomocí KrF excimerového laseru. Implantáty byly zavedeny do dolní čelisti a po 16 týdnech hojení bez zatížení byly nacementovány metalokeramické korunky a po půlročním zatížení zhodnoceny výsledky. Pozorována byla nově vytvořená kost kolem všech zavedených implantátů. U vzorků s laserově nanesenou vrstvou je vidět vrstva fibrosního vaziva pouze zřídka, u kontrolních, čistě titanových implantátů, je vrstva fibrosního vaziva častější, ale signifikantní rozdíl nebyl pozorován [29].

Biologické testy uvádím pouze v přehledu jako nutný doplněk fyzikálních a chemických analýz. V disertační práci se jimi podrobněji nezabývám.

5. VÝSLEDKY

Vytvořili jsme metodou pulsní laserové depozice dvě skupiny vzorků: 1 – 13 a 14 – 24. Blíže jsme vzorky označili dle nanesených vrstev na podložku z titanové slitiny: ZRO 1 – 13 (zirkonová vrstva), ZHA 1 – 13 (zirkonová mezivrstva s vrstvou HA), ZRO 14 – 24 (zirkonová vrstva) a ZHA 21 – 24 (zirkonová mezivrstva s vrstvou HA). Jednotlivé vzorky jsme postupně zkoumali. Depoziční podmínky udávám níže v tabulkách 1 až 4. Charakteristika vzorků, popis depozičních podmínek a výsledky prvních testů (vzorky ZRO 1 – 13, ZHA 1 – 13 v tabulce 1 a 2) byly základem pro definitivní nastavení depozičních podmínek v druhé části experimentu. Detailně jsme prozkoumali zirkonové vrstvy, které jsou nosnou plochou pro HA film, a tím pro novou sendvičovou strukturu s očekávanými dobrými mechanickými i biologickými vlastnostmi. Důraz klademe na zachování pozitivních biokompatibilních vlastností HA se zlepšenou adhezí k titanové slitině pomocí mezivrstvy zirkonu.

5.1 Depoziční podmínky

Nejprve jsme vytvořili zkušební vrstvu na křemíkové podložce o velikosti 2 x 2 cm^2, při tlaku 3.10^{-2} Pa a teplotě 20 °C. Na ní jsme ověřili, zda dosáhneme požadované tloušťky vrstvy a zda jsou vhodně nastavené základní depoziční podmínky. Tento postup je vhodné opakovat vždy před souborem nových depozic, ukazuje aktuální nastavení a případně nám pomůže vyladit jednotlivé parametry. Část křemíkové podložky jsme tedy před depozicí zakryli, abychom mohli proměřit tloušťku vrstvy po celé délce vzorku. Tloušťku vrstev jsme

proměřovali mechanickým profilometrem ALPHA STEP 500 (TENCOR Instruments, Kanada).

První ucelený soubor vzorků vznikal depozicí s ArF a KrF excimerovými lasery. Zirkonové vrstvy jsme připravili excimerovým KrF laserem (LUMONICS PM 842, Kanada) generujícím na vlnové délce 248 nm, při opakovací frekvenci 10 Hz a výstupní energii 450 mJ, jehož paprsek prochází přes optickou soustavu čoček do depoziční komory (obr. 4.1.3.a). Vzorky byly uchyceny ve vzdálenosti 4 cm od titanové slitiny tvaru ploché kruhové podložky o průměru 10 a 12 mm a tloušťce 2 mm. Depozice zirkonu probíhaly při teplotě 20 °C (tab.1). Před depozicí byly vzorky očištěny v acetonu, toluenu a etylalkoholu.

Tab.1: Depoziční podmínky při tvorbě zirkonových vrstev KrF laserem

Vzorek číslo	Terč	Podložka	Při depozici		Počet pulsů	Frekvence [Hz]	Energie laseru [mJ]	Stopa na terči [mm^2]	Vzdálenost terče a podložky [cm]
			Tlak [Pa]	Teplota [°C]					
ZrO – 1	ZrO2	SiO2	3.10^{-2}	~ 20	2000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 2	ZrO2	Ti6Al4V	7.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 3	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 4	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 5	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 6	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 7	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 8	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 9	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 10	ZrO2	Ti6Al4V	3.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 11	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 12	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4
ZrO – 13	ZrO2	Ti6Al4V	6.10^{-2}	~ 20	4000	10	450	4,2x1,8	4

V dalším kroku jsme deponovali HA vrstvy na titanovou slitinu pokrytou vrstvou oxidu zirkoničitého. HA vrstvy jsme vytvořili ArF laserem při teplotě 600 °C. Před vlastní depozicí jsme vyčerpali z komory vzduch a vytvořili jsme tak podtlak v hodnotách 10^{-3} Pa a následně jsme promísili atmosféru z vodních par a argonu, která dosahovala tlaku 50 Pa. Soubor vzorků jsme deponovali při frekvenci 50 Hz, výstupní energii 300 a 330 mJ a hustotě energie 6 Jcm^{-2}. Substrát jsme umístili ve vzdálenosti 3 cm od HA terče (tab. 2) [15].

Tab. 2: Depoziční podmínky při tvorbě HA vrstev ArF laserem

Vzorek číslo	Terč	Podložka	Při depozici		Počet pulsů	Frek-vence [Hz]	Energie laseru [mJ]	Stopa na terči [mm^2]	Vzdále-nost terče a podložky [cm]
			Tlak [Pa]	Teplo ta [°C]					
ZHA-2	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-2)	50	~ 600	300 000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-3	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-3)	50	~ 600	300 000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-4	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-4)	50	~ 600	300 000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-5	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-5)	50	~ 600	300 000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-6	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-6)	50	~ 600	365000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-7	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-7)	50	~ 600	365000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-8	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-8)	50	~ 600	365000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-9	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-9)	50	~ 600	365000	50	330	1,5x3,5	3
ZHA-10	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-10)	50	~ 600	280000	50	300	1,5x3,5	3
ZHA-11	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-11)	50	~ 600	280000	50	300	1,5x3,5	3
ZHA-12	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-12)	50	~ 600	280000	50	300	1,5x3,5	3
ZHA-13	HA	Ti 6Al 4V +ZrO2 (ZrO-13)	50	~ 600	280000	50	300	1,5x3,5	3

Depozice povlaků u dalšího souboru probíhala za nízkého tlaku (tab. 3) ve zbytkové atmosféře.

Tab. 3: Depoziční podmínky při tvorbě zirkonových vrstev KrF laserem

Vzorek číslo	Terč	Podložka	Při depozici		Počet pulsů	Frek-vence [Hz]	Energie laseru [mJ]	Stopa na terči [mm^2]	Vzdále-nost terče a substrá-tu [cm]
			Tlak [Pa]	Teplota [°C]					
ZRO-14	ZrO_2	SiO2	3.10-2	~ 20	10000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-15	ZrO_2	Ti 6Al 4V	7.10^{-3}	~ 20	10000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-16	ZrO_2	Ti 6Al 4V	7.10^{-3}	~ 20	10000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO- 17	ZrO_2	Ti 6Al 4V	7.10^{-3}	~ 20	10000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-18	ZrO_2	Ti 6Al 4V	4.10^{-3}	~ 20	15000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-19 (3 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	9.10^{-3}	400	20000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-20 (3 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	3.10^{-2}	700	20000	10	450	3,7x2,0	4
ZRO-21 (4 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	2.10^{-3}	~ 20	15000	10	300	3,2x1,2	4
ZRO-22 (4 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	3.10^{-3}	~ 20	15000	10	300	3,2x1,2	4
ZRO-23 (4 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	2.10^{-3}	~ 20	15000	10	300	3,2x1,2	4
ZRO-24 (4 ks)	ZrO_2	Ti 6Al 4V	3.10^{-3}	~ 20	15000	10	300	3,2x1,2	4

Vrstvy jsme opět nanášeli na ploché kruhové podložky ze slitiny Ti 6Al 4V a o průměru 10 nebo 12 mm a tloušťce 2 mm, které jsme před depozicí očistili v acetonu, toluenu a etylalkoholu [19].

Vzduch v depoziční komoře jsme odčerpali na tlak v řádu 10^{-3} Pa. Hustota energie cílená na terč ZrO_2 dosahovala 4 $J.cm^{-2}$. Teplota vzorků při depozici vrstev byla 20 °C, 400 °C a 700 °C (tab.4). Zirkonovou mezivrstvu jsme na titanový vzorek deponovali pouze při pokojové teplotě (tab. 3) a ve vzdálenosti terče 4 cm od substrátu. Vrstvu z HA jsme vytvořili na ZrO_2/Ti 6Al 4V vzorcích rovněž pomocí excimerového laseru, ale při nižší hustotě energie - 4 $J.cm^{-2}$ a ve vzdálenosti 6 cm mezi titanovým vzorkem a HA terčem. Depozice proběhly v pracovní atmosféře H_2O:Ar při tlaku 40 Pa (poměr 22:18) (tab. 4). Depozici vzorků o průměru 10 mm jsme prováděli po 4 kusech najednou, u vzorků o průměru 12 mm po třech kusech najednou. Přesné depoziční podmínky jsou uvedeny v souhrnu v tabulce č. 4 [19].

Tab. 4: Depoziční podmínky při tvorbě HA vrstev KrF laserem

Vzorek číslo	Terč	Podložka	Při depozici		Počet pulsů	Frek-vence [Hz]	Energie laseru [mJ]	Stopa na terči [mm^2]	Vzdále-nost terče a substrátu [cm]
			Tlak [Pa]	Teplo-ta [°C]					
ZHA-21 (4 ks)	HA	Ti 6Al 4V +ZrO_2 (ZRO-21)	40 (18 Pa Ar, 22 Pa H2O)	600	20000	10	300	3,6x1,4	6
ZHA-22 (4 ks)	HA	Ti 6Al 4V +ZrO_2 (ZRO-22)	40 (18 Pa Ar, 22 Pa H_2O)	600	20000	10	300	3,6x1,4	6
ZHA-23 (4 ks)	HA	Ti 6Al 4V +ZrO_2 (ZRO-23)	40 (18 Pa Ar, 22 Pa H_2O)	600	20000	10	300	3,6x1,4	6
ZHA-24 (4 ks)	HA	Ti 6Al 4V +ZrO_2 (ZRO-24)	40 (18 Pa Ar, 22 Pa H_2O)	600	20000	10	300	3,6x1,4	6

5.2 Experimentální údaje

V přehledu uvádím jednotlivé analýzy a měření pro dvě skupiny vzorků s ohledem na jejich odlišnou strukturu a depoziční podmínky (tab. 5).

Tab. 5: Typy provedených fyzikálních testů

Analýza	Metoda/ přístroj	Skupina vzorků	
		1 - 13	14 - 24
Měření tloušťky vrstev	Alpha Step 500	tab. 6 obr. 5.3.1.1 obr. 5.3.1.1	tab. 8 obr. 5.4.1.1
Analýza morfologie povrchu	SEM	obr. 5.3.2.1 obr. 5.3.2.2	obr. 5.4.2.1 obr. 5.4.2.2 obr. 5.4.2.3
Analýza krystalinity	XRD	obr. 5.3.3.1	obr. 5.4.3.1 obr. 5.4.3.2
Ca/P poměr	WDX	tab. 7	tab. 9
Testy přilnavosti povlaků	Vrypová metoda	neměřeno	tab. 10 obr. 5.4.5.1 obr. 5.4.5.2 obr. 5.4.5.3
	Vpichová metoda	neměřeno	obr. 5.4.5.4 obr. 5.4.5.5 obr. 5.4.5.6
Měření kontaktního úhlu	Kapková metoda	neměřeno	obr. 5.4.6.1

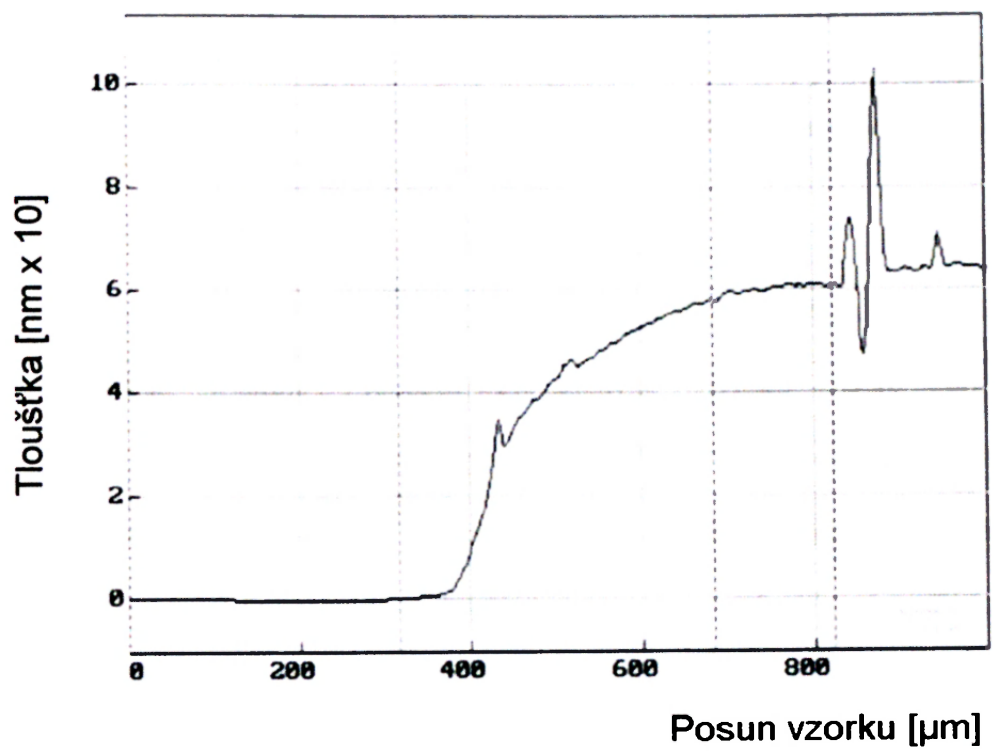
5.3 Fyzikální analýza vzorků 1. skupiny (ZRO 1-13, ZHA 1-13)

5.3.1 Měření tloušťky vrstev

Tloušťku vrstev jsme analyzovali mechanickým profilometrem Alpha Step 500. Naměřené hodnoty jsem zaznamenala v tab. 6. Výsledky měření zobrazuje i graf (obr. 5.3.1.1).

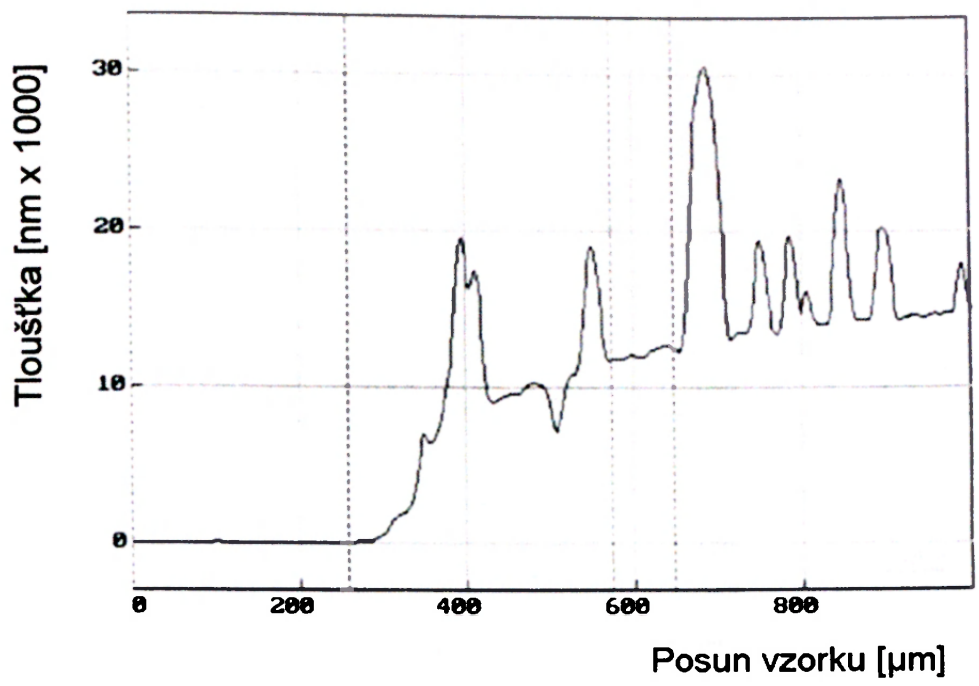
Tab. 6: Hodnoty měření tloušťky vrstev

Vzorek	Tloušťka vrstvy zirkonu [nm]
ZRO – 2	80
ZRO – 13	50



Obr. 5.3.1.1: Měření tloušťky vrstvy oxidu zirkoničitého na titanové slitině profilometrem, vzorek ZRO-2.

Měření tloušťky vrstev HA a oxidu zirkoničitého na sendvičovém vzorku ZHA-13 ukazuje graf na obr. 5.3.1.2. Vrstvy dosahují hodnot tloušťky 6 -12 µm.



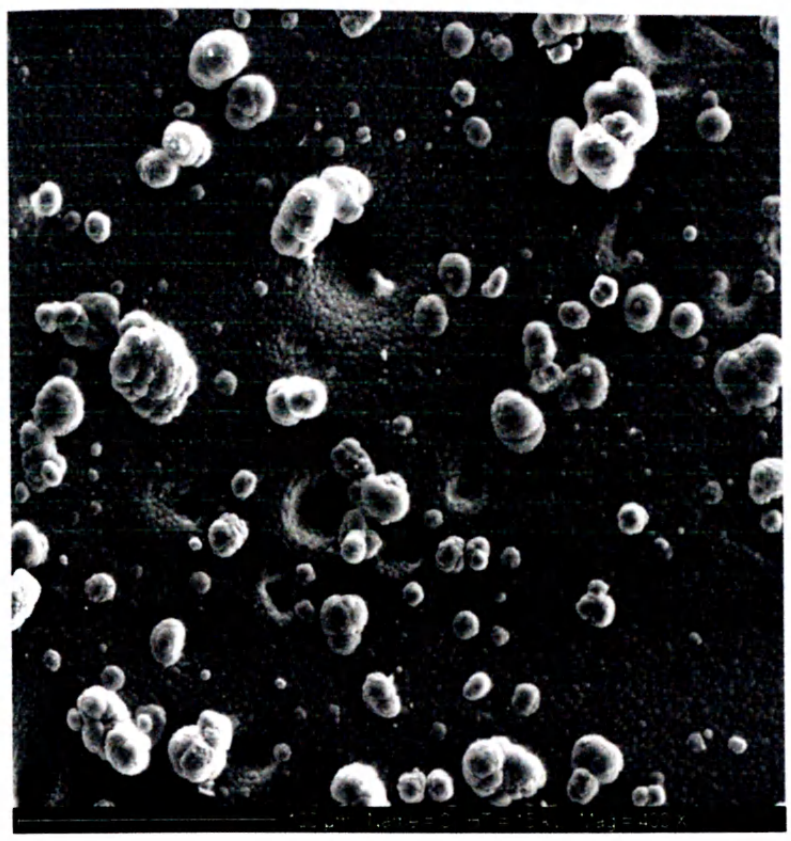
Obr. 5.3.1.2: Měření tloušťky vrstvy hydroxyapatitu na oxidu zirkoničitém a titanové slitině profilometrem, vzorek ZHA-13.

5.3.2 Analýza morfologie povrchu

První soubor vzorků ZRO 1 – 13, ZHA 1 – 13 jsme testovali s ohledem na krystalickou strukturu. Provedli jsme analýzu povrchu vzorků pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (JOEL JXA 733, Japonsko). Povrch vzorku pokrytého jen vrstvou zirkonu obsahoval jemné kapičky rozsahu 1 až 5 µm (obr. 5.3.2.1).

Obr. 5.3.2.1: SEM analýza zirkonové vrstvy ZRO-13 (zvětšení 400x).

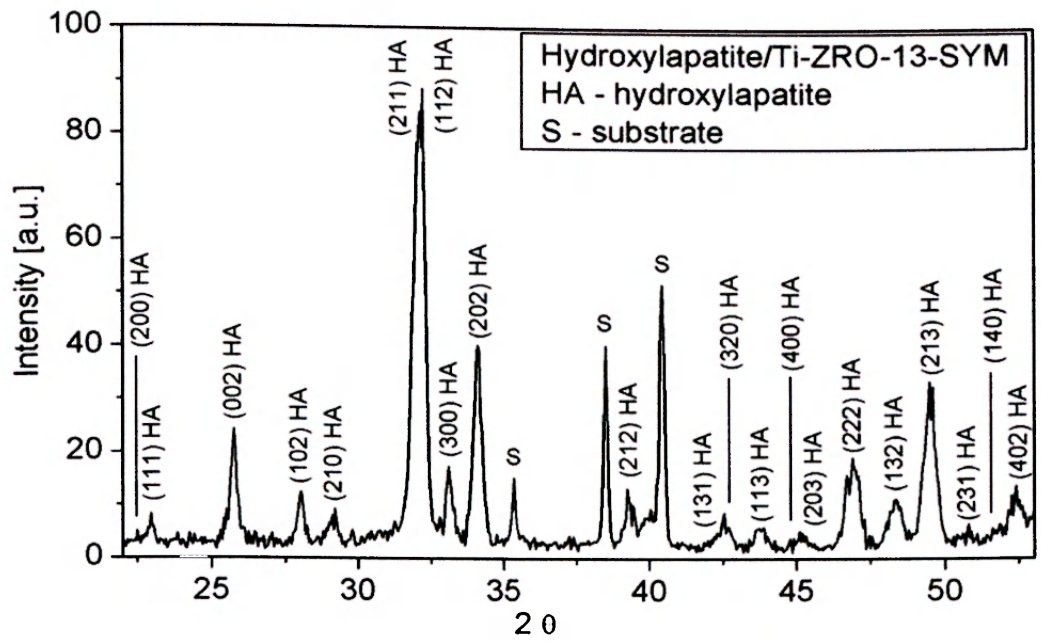
Deponovaná vrstva HA sendvičového vzorku s vrstvami zirkonu a HA byla hladká s jemnými kapkami HA velikosti 5 – 20 μm (obr. 5.3.2.2).



Obr. 5.3.2.2: SEM analýza vzorku ZHA-13 (zvětšení 400x).

5.3.3 Analýza krystalinity povrchu

XRD analýza prokázala amorfní povrch zirkonových povlaků a polykrystalickou strukturu HA filmů (obr. 5.3.3.1).



Obr. 5.3.3.1: XRD vzorku ZHA-13. Spektrum HA vrstvy na substrátu zirkonu a titanové slitiny prokazuje přítomnost HA v krystalické formě.

5.3.4 Ca/P poměr

Ca/P poměr jsme měřili na kapkách materiálu a ve vrstvě. Naměřené hodnoty poměru Ca/P dosáhly hodnot 2,53 a 2,68 (tab. 7). V přirozené formě je hodnota Ca/P u HA 1,67.

Tab. 7: Hodnoty měření Ca/P poměru u vzorku ZHA 13

vzorek	W%(P)	W%(Ca)	A%(P)	A%(Ca)	Ca/P poměr
ZHA-13 kapky	12,87	41,96	11,69	29,54	2,53
ZHA-13 vrstva	12,43	42,95	11,29	30,24	2,68

5.4 Fyzikální analýza vzorků 2. skupiny (ZRO 14-24, ZHA 21-24)

5.4.1 Měření tloušťky vrstev

Tloušťku vrstev jsme analyzovali mechanickým profilometrem Alpha Step 500. Nejprve jsme proměřili tloušťku zkušební vrstvy, podle níž byly nastaveny depoziční podmínky pro výrobu dalších vrstev ze ZrO_2.

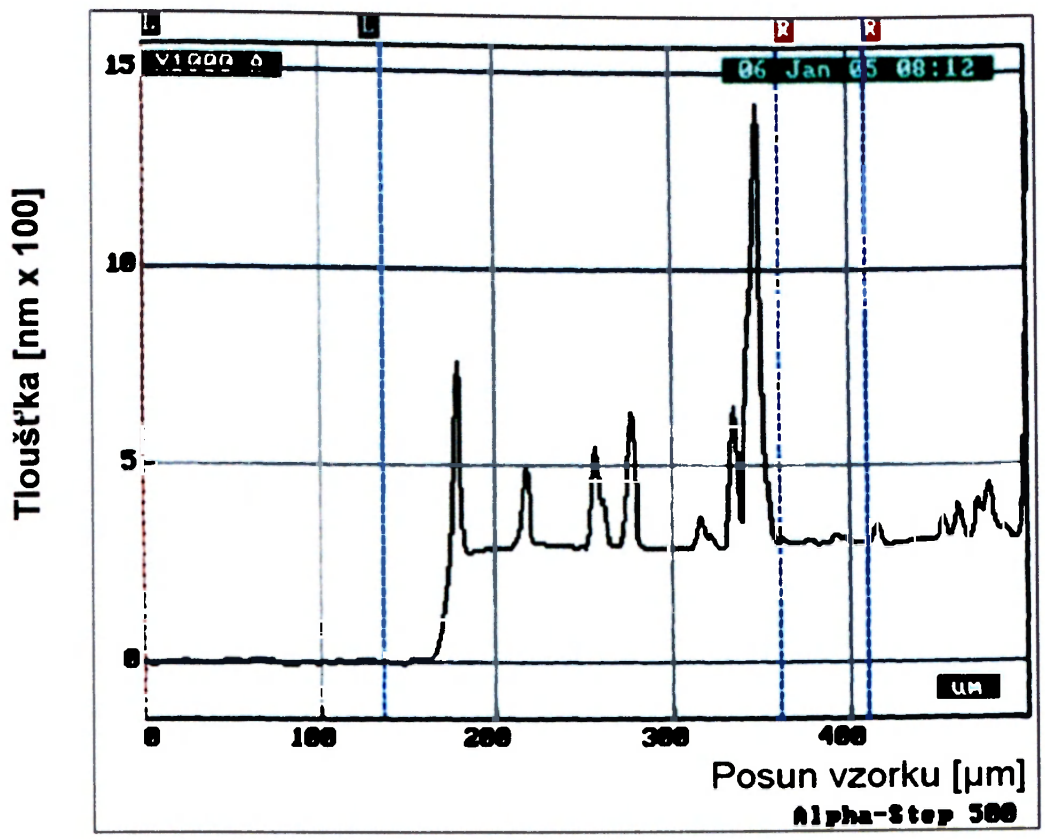
Tloušťka zkušební vrstvy dosahuje v průměru 220 nm. Rozložení po celém povrchu není ovšem homogenní. Lze tedy předpokládat, že tloušťka vzorků ZRO-15 až ZRO-17 se pohybuje okolo 250 nm a vzhledem k menší ploše jednotlivých vzorků ji můžeme považovat za relativně homogenní. Dále jsme změřili tloušťky vrstev vzorků ZRO-18b, ZRO-19b a ZRO-20b, které jsme vytvořili za jiných depozičních podmínek. Vzhledem k tomu, že dané vzorky jsme deponovali větším počtem pulsů, je podle očekávání jejich tloušťka větší než u předchozích. Přesné naměřené hodnoty uvádím v tab. 8.

Tab. 8: Měření tloušťky vrstev

Vzorek	Tloušťka vrstvy [nm]
ZRO – 14	166
ZRO – 18	272
ZRO – 19	361
ZRO – 20	332

Na obr. 5.4.1.1 je zobrazena část profilu vrstvy vzorku ZRO-18. Povrch je relativně nerovný. S rostoucí teplotou při depozici u vzorků pozorujeme hrubější povrch vrstev. Proto je většinou obtížné určit průměrnou tloušťku vrstev a naměřené hodnoty jsou spíše orientační.

UK v Praze - 1. lékařská fakulta
ÚVI KNIHOVNA 1



Obr. 5.4.1.1: Měření tloušťky zirkonové vrstvy vzorku ZRO-18.

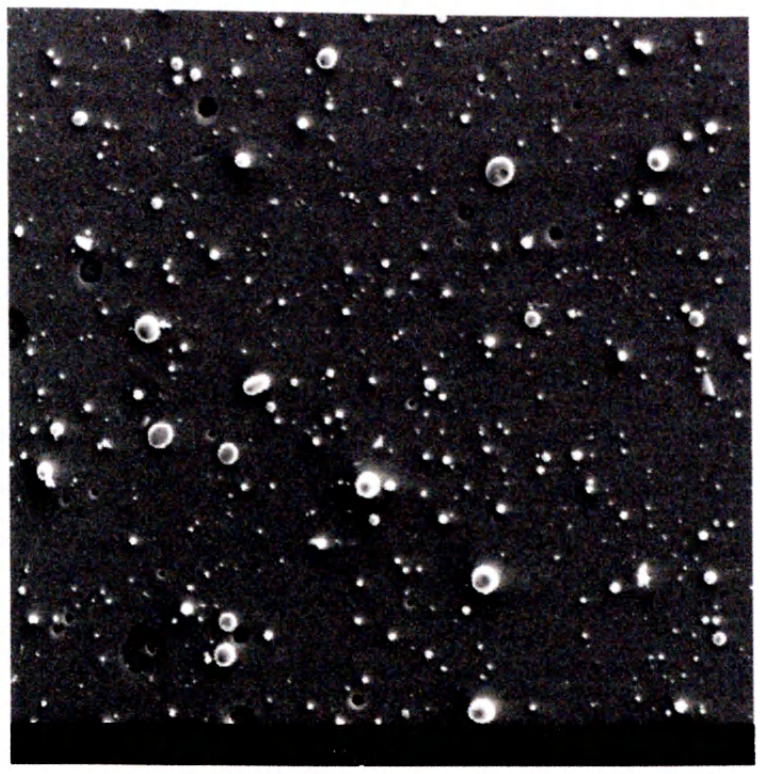
Tloušťka zirkonových vrstev, jejichž fyzikální vlastnosti jsme zkoumali, byla od 166 do 332 nm. V další skupině sendvičových vzorků měla zirkonová mezivrstva tloušťku od 50 do 100 nm a HA vrstvy vykazovaly hodnoty kolem 600 nm.

5.4.2 Analýza morfologie povrchu

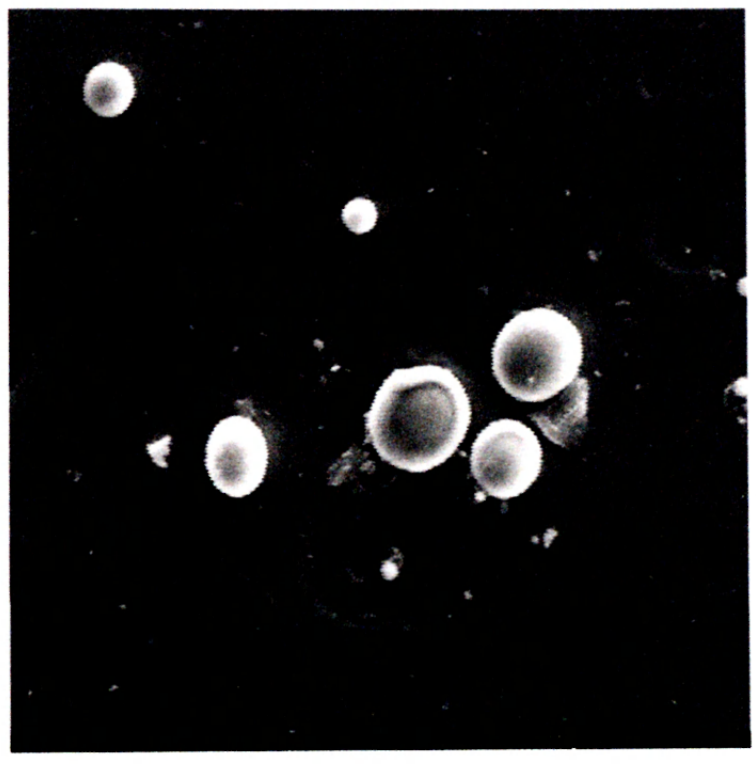
Morfologii vrstev jsme studovali rastrovacím elektronovým mikroskopem s elektronickým svazkem 15 kV při různých zvětšeních. Celkově je vrstva hladká, s kapičkami velikosti jednotek mikrometrů (obr. 5.4.2.1).

Obr. 5.4.2.1: SEM ZRO-18, detail povlaku zirkonu (zvětšení 400x).

Ve větším přiblížení (obr. 5.4.2.2) můžeme studovat tvar kapiček, které jsou většinou kruhové nebo oválné. Zřetelněji se též tvoří jamky, které pravděpodobně vznikly odpadnutím některých větších kapiček. Struktura jamky i kapek je více zřejmá z detailního pohledu (obr. 5.4.2.3).



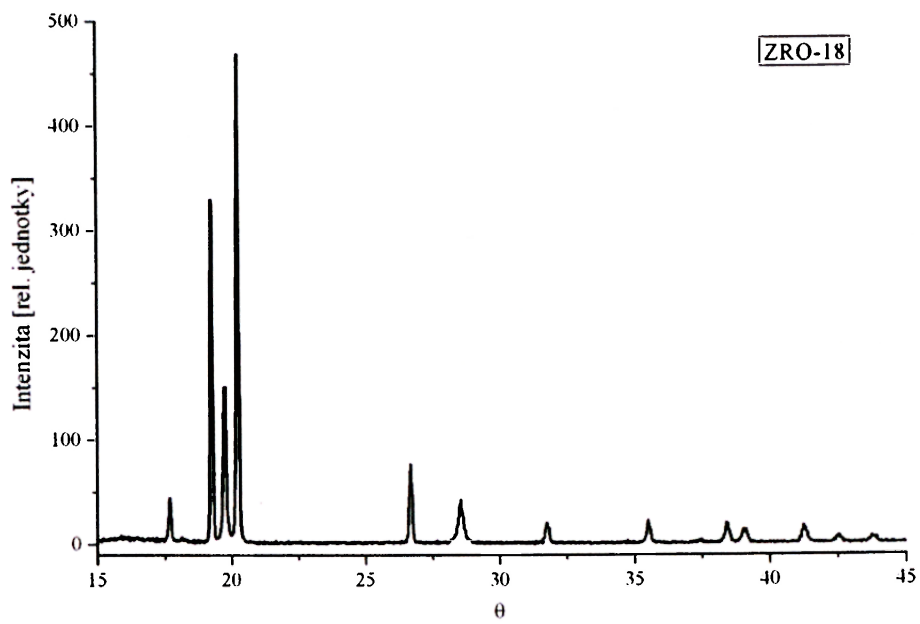
Obr. 5.4.2.2: SEM ZRO-18, detail povlaku zirkonu (zvětšení 1000x).



Obr. 5.4.2.3: SEM ZRO-15, detail povlaku zirkonu (zvětšení 4000x).

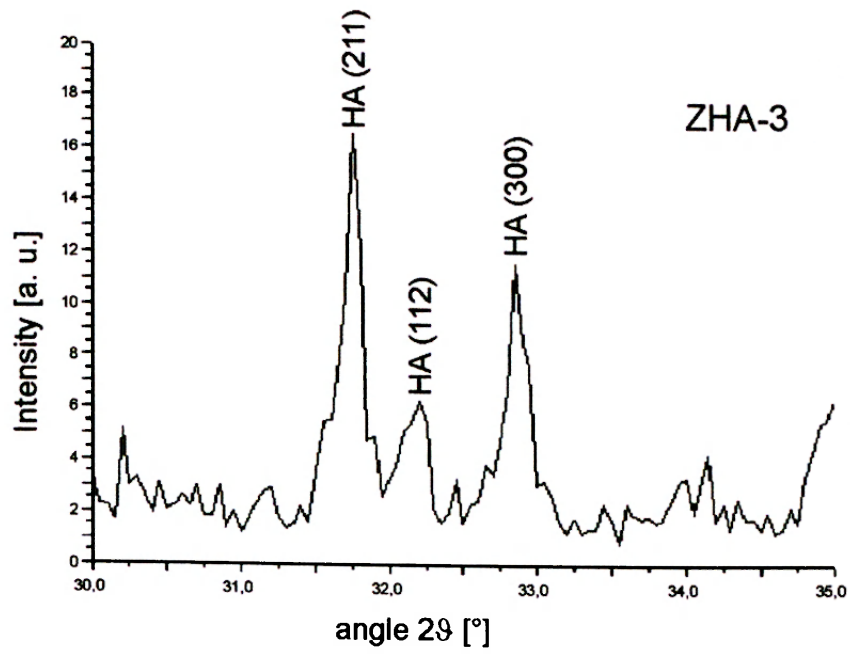
5.4.3 Analýza krystalinity povrchu

Složení vrstev jsme studovali metodou rentgenové difrakce (XRD). Výsledky neukázaly žádný výskyt krystalické struktury. U všech analyzovaných vzorků ZRO-18, ZRO-19 a ZRO-20 jsou výstupní grafy stejné (obr. 5.4.3.1) a vykazují amorfní strukturu.



Obr. 5.4.3.1: XRD spektrum podložky Ti 6Al 4V s vrstvou ZrO_2 (ZRO-18). Popis vrcholů není vyznačen, protože neodpovídá krystalickému uspořádání vzorku a je odrazem titanové podložky.

Na obr. 5.4.3.2 je znázorněno XRD spektrum HA vrstvy na mezivrstvě oxidu zirkoničitého a Ti 6Al 4V, vzorek ZHA-23. Měřením jsme potvrdili krystalickou strukturu vzorku.



Obr. 5.4.3.2 XRD spektrum HA vrstvy na mezivrstvě oxidu zirkoničitého a Ti 6Al 4V, vzorek ZHA-23.

5.4.4 Ca/P poměr

Metodou WDX jsme sledovali množství výskytu zirkonu a titanu na různých místech povrchu vrstvy. Největší obsah zirkonu byl zjištěn v kapičkách, o něco menší byl pozorován na hladké vrstvě. Naopak slabou odezvu jsme zaznamenali v místě jamky.

Hodnoty stechiometrické analýzy u vzorků se sendvičovou strukturou uvádím v tabulce 9.

Tab. 9: Hodnoty měření Ca/P poměru u vzorků ZHA 21 a 23

vzorek	W%(P)	W%(Ca)	A%(P)	A%(Ca)	Ca/P poměr
ZHA-23	18.74	40.79	13,86	23,34	1,68
ZHA-21	19.32	39.84	14,25	22,66	1,59

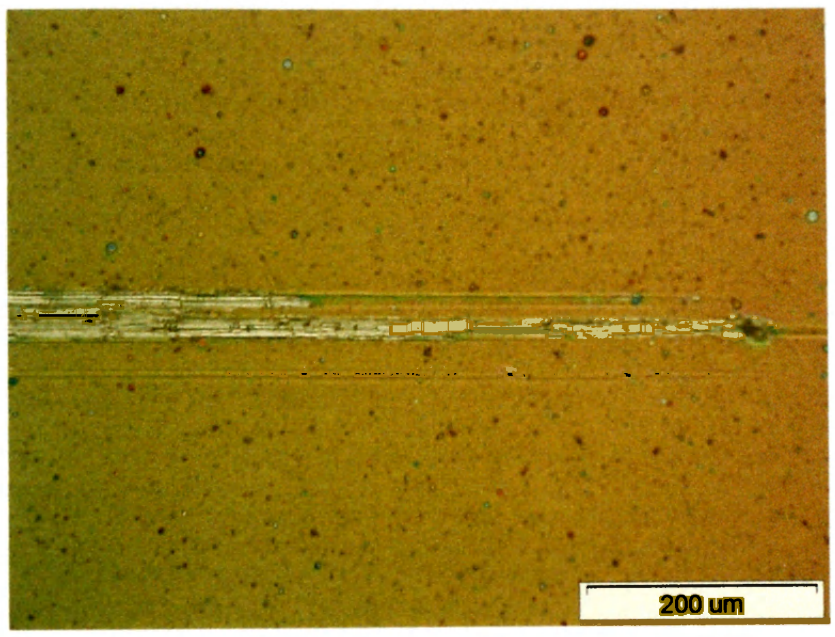
5.4.5 Testy přilnavosti

Vzorky ZRO-18, ZRO-19 a ZRO-20 jsme testovali vrypovou a vpichovou metodou. Výsledky testu jsou uvedeny v tab.10.

Tab. 10: Měření kritické síly vrypovou metodou

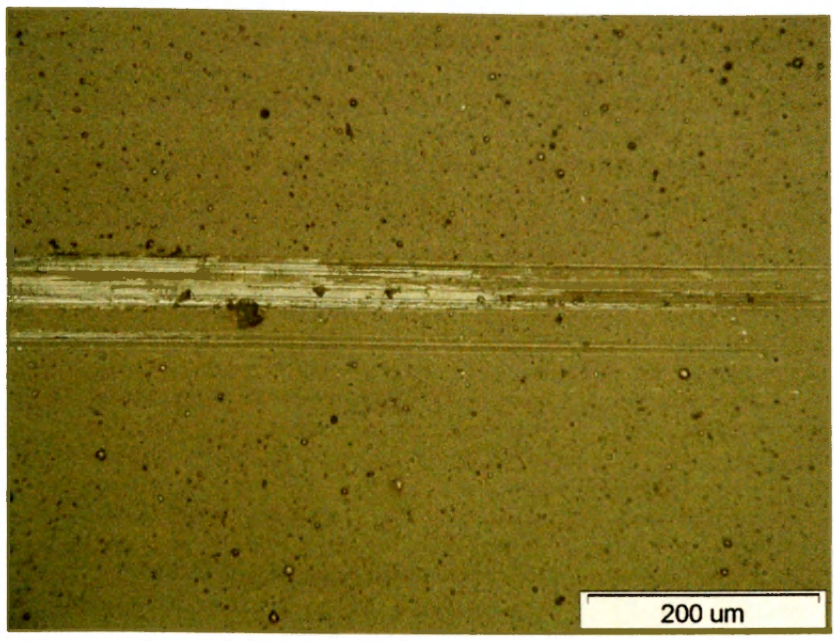
Vzorek	F_c [N]
ZRO – 18	3
ZRO – 19	9,5
ZRO – 20	7,2

Největší hodnotu kritické normálové síly 9,5 N vykazuje vzorek ZRO-19, který jsme deponovali při teplotě 400 °C (obr. 5.4.5.1).



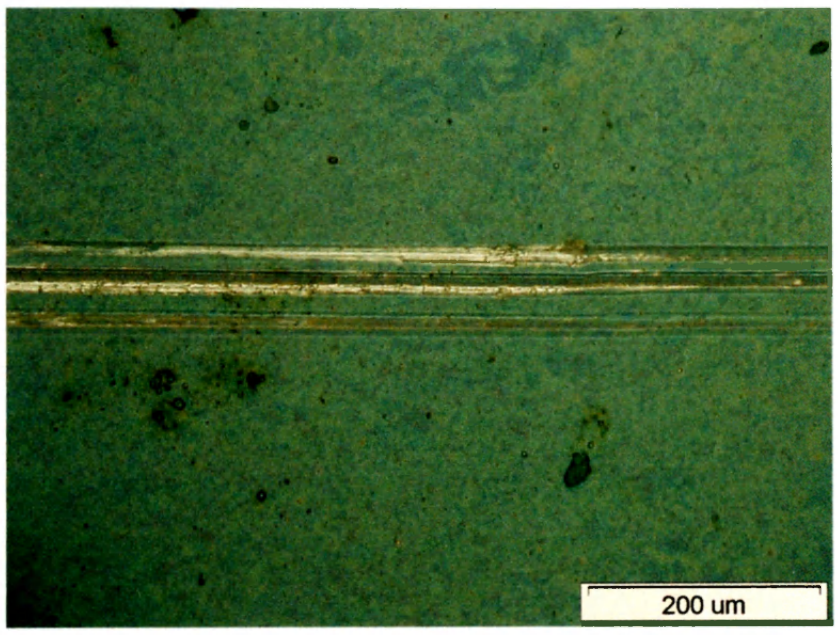
Obr. 5.4.5.1: Vrypová metoda – vzorek ZRO-19.

Na druhé straně nejmenší hodnota 3 N byla zjištěna u vzorku ZRO-18 deponovaného při pokojové teplotě (obr. 5.4.5.2).



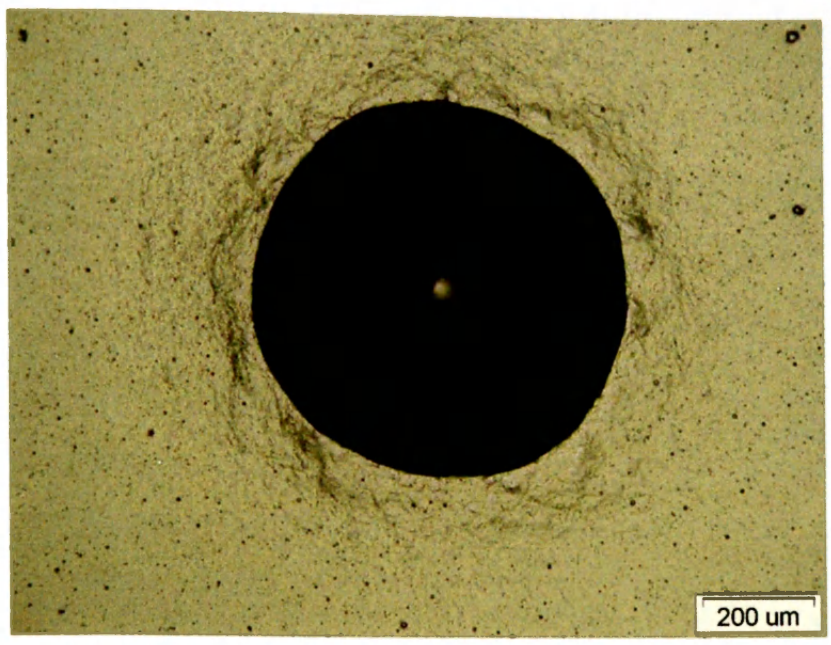
Obr. 5.4.5.2: Vrypová metoda – vzorek ZRO-18.

Vzorek ZRO-20, deponovaný při teplotě 700 °C, dosáhl kritické hodnoty 7,2 N (obr. 5.4.5.3).



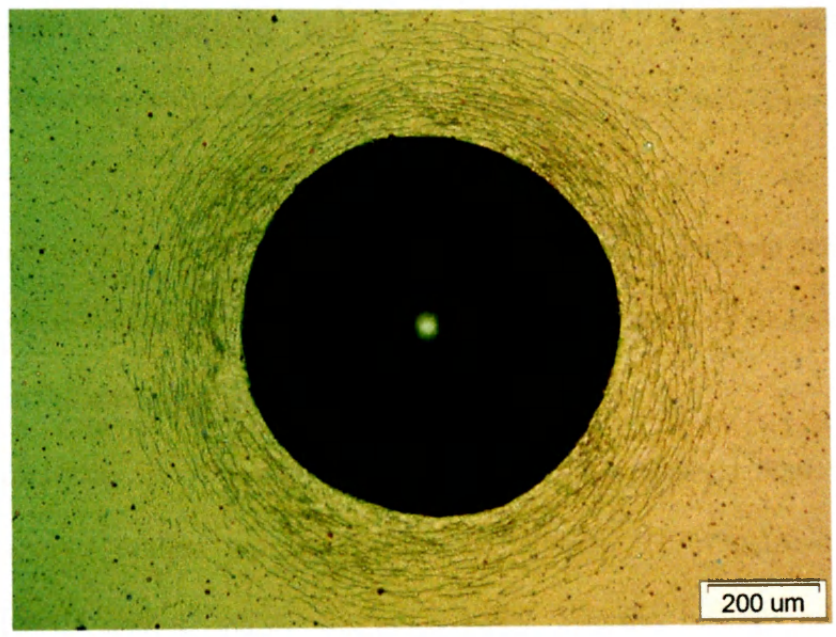
Obr. 5.4.5.3: Vrypová metoda – vzorek ZRO-20.

Vpichovou metodu kuželovým hrotem jsme provedli při zatížení 1417 N. U vzorku ZRO-18 jsme nepozorovali v okolí vpichu žádné praskliny, pouze deformace (obr. 5.4.5.4).

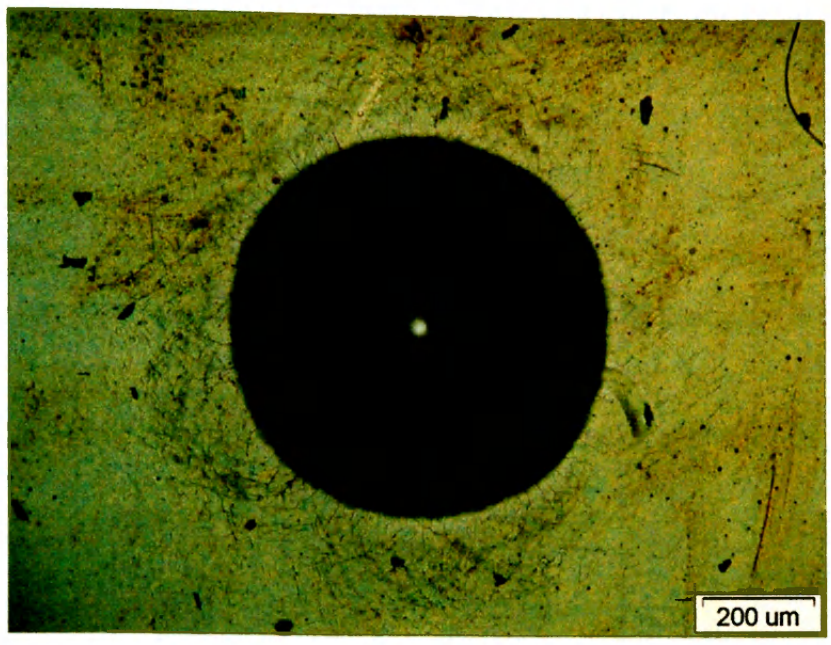


Obr. 5.4.5.4: Vpichová metoda – vzorek ZRO-18.

U vzorku ZRO-19 se objevily praskliny ve formě soustředných kružnic (obr. 5.4.5.5), u vzorku ZRO-20 vznikly praskliny v radiálním směru (obr. 5.4.5.6).



Obr. 5.4.5.5: Vpichová metoda – vzorek ZRO-19.

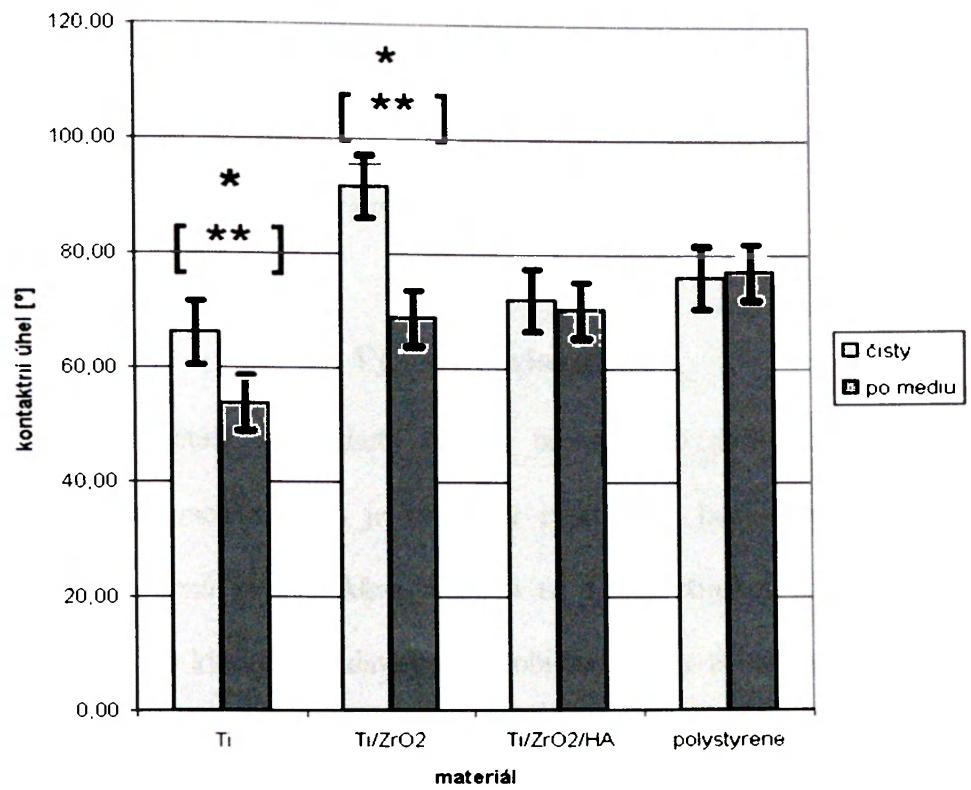


Obr. 5.4.5.6: Vpichová metoda – vzorek ZRO-20.

5.4.6 Měření kontaktního úhlu

Hodnoty kontaktního úhlu udávám na obr. 5.4.6.1 v grafu, který porovnává vzorky nejprve očištěné, poté po ovlivnění médiem. Tyto výsledky jsme statisticky zpracovali pomocí Studentova t-testu na hladině pravděpodobnosti 0,05. Signifikanci na hladině 0,05 jsme zjistili pro vzorky čisté titanové slitiny a modifikované médiem vůči kontrole i pro čistý titanový vzorek s povlakem zirkonu před i po použití média vůči kontrole.

Kontaktní úhly u kombinovaného vzorku Ti/ZrO_2/HA a titanové slitiny jsou v rozmezí optima pro sorpci proteinů. Vzorky Ti/ZrO_2/HA a Ti/ZrO_2 vykazují vyšší hodnoty než vzorky bez povlaků. Všechny hodnoty kontaktního úhlu poklesly při vložení terčíků do média H-MEM, které obsahuje proteiny. Nepozorovali jsme změny hodnot kontrolního tkáňového polystyrenu, který je všeobecně brán jako ideální povrch pro buněčnou kultivaci. Pokles kontaktního úhlu je známkou proteinové sorpce na povrchu vzorku.



Obr. 5.4.6.1: Měření kontaktního úhlu
Ti – titanová slitina Ti 6Al 4V
Ti/ZrO_2 - titanová slitina Ti 6Al 4V s povlakem zirkonu
Ti/ZrO_2/HA - titanová slitina Ti 6Al 4V s mezivrstvou zirkonu a povlakem hydroxyapatitu,
Signifikantní údaje jsou označeny hvězdičkou.

6. DISKUSE

Rychlejší vhojení povlakovaného implantátu a jeho aktivní začlenění v procesu oseointegrace dává naději na další zkrácení vhojovací fáze implantátu a potenciálně může naznačovat cestu k přímému zatížení povlakovaného implantátu, které umožňuje zkrátit terapeutický postup.

6.1 Výhody povlakování

- U implantátů s povlakem HA je biointegrace dvakrát rychlejší než oseointegrace a navíc je přítomný efekt „gap healing capacity", kdy novotvořená kost překlene mezeru až 1 mm širokou a současně tím podstatně klesají požadavky na imobilitu fixtury během vhojovací fáze. U titanových implantátů nedojde k oseointegraci již při velikosti mezery (inkongruenci) 0,3 mm. Povlakované fixtury jsou daleko tolerantnější k nepřesnostem vzniklým při preparaci kostního lože [4].

- Zhodnocení oseointegrace po zatížení u dentálních titanových implantátů s vrstvou HA deponovanou KrF laserem dospěla Himmlová k povzbudivým výsledkům. Povrchy všech nanesených vrstev byly hladké, pouze s malým množstvím kapének typických pro technologii pulsní laserové depozice. Adheze HA povlaku ke struktuře povrchu titanového podkladu je silná, a tak povrch tvoří homogenní část implantátu chránící kov před korozí. Povlak je rovnoměrný bez závislosti na tvaru implantátu [29], lze tedy s výhodou použít na šroubovitý implantát..

- Při histologickém pozorování Himmlová potvrzuje, že biokeramický povlak usnadňoval hojení v oblastech bez primárního kontaktu mezi implantátem a kostí, proto bylo vazivo mezi implantátem a kostí častěji přítomno u nepovlakovaných kontrolních vzorků [30].

- Po simulacích v laboratoři Chou popisuje nález nižšího stupeň degradace ve vazebné síle HA s 10 hm. % zirkonového pláště než pouze u povlakování HA [13, 17]. Někteří autoři pozorovali in vivo přímý kontakt kosti s keramikou. Nicméně v počátečních stádiích byly pojivové tkáně připojeny vazivovou tkání. Původ tkáně, která hraje hlavní roli v distribuci v raných stádiích zátěže kosti, vychází ze vztahu mezi materiálem a tkání (biokeramikou a kostí). Ovlivnění může nastat větší měrou na straně implantátu, protože osteogenická aktivita medulární kavity je velmi nízká v porovnání s periostem a endostem [17].

- Tvorbu koagula na titanových implantátech pokrytých a nepokrytých vrstvou HA sledoval Steinberg a zjistil, že na mikrofotografiích je téměř celý povrch naneseného HA na implantátu pokryt fibrinem, popřípadě plazmovým proteinem, kdežto povrch titanových implantátů prosvítá [31].

- Oseointegrace nezávisí přímo na samotném tvaru implantátu, ale na shodě odpovídajících povrchů implantátu a vypreparovaného lůžka. Pevnost

implantátu i jeho mechanická odolnost závisí na velikosti plochy oseointegrace, proto je snaha zajistit co největší povrch implantátu [32].

V polovině 90. let zesílily námitky proti povlakování implantátů a došlo k odmítnutí povlakování. V současné době je implantologická odborná veřejnost ovlivňována často protichůdnými názory na tuto problematiku [4].

6.2 Nevýhody povlakování

I přes podstatné výhody povlakovaných implantátů je jejich dlouhodobá úspěšnost zpochybňována. Nelze vyloučit, že negativní hodnocení povlakovaných implantátů má i výrazný komerční podtext [4]. Nejradikálnější odpůrci povlakování namítají, že HA je v biologickém prostředí trvale nestabilní a že neustále probíhá výměna iontů mezi povlakem a kostí.

- Mezi příčiny selhání implantátů řadíme i špatný výběr materiálu k povlakování implantátu nebo nedokonalou adhezi okolních tkání na vlastní implantát, způsobenou např. rozsáhlejším preparačním traumatem [29].

- Resorbovatelnost materiálu úzce souvisí s cytotoxicitou. Změna kvality povrchu po provedení testu cytotoxicity byla měřítkem hodnocení resorbovatelnosti materiálu [12], stejně jako degradační produkty nevhodně použitého materiálu [17].

- Proces vhojování probíhá u povlakovaných implantátů prvních 6 měsíců rychleji a dosahuje většího kontaktu s kostí než u čistě titanových fixtur. Na druhé straně pokud u titanových implantátů nedojde po dvouleté zátěži ke ztrátě kosti, je pravděpodobné, že budou i v dalších letech stabilní. V případě zkoumání povlakovaných implantátů toto pravidlo ale neplatí a proces se projevuje typickou kontinuální ztrátou kosti [4]. Výše citovaný názor ale vyvrací Blind a osvětluje tato negativní tvrzení argumentem, že autoři ve svých kritikách nezohlednili amorfní strukturu HA pláště, která mohla být vysvětlující příčinou dlouhodobého neúspěchu. Dlouhodobé studie byly často provedeny s povlakovanými implantáty zhotovenými metodou plazma naprašování, u které je amorfní struktura jako jednou z hlavních nevýhod, stejně jako nízká mechanická odolnost povlaku [9].

- Častým problém je zpochybňování zejména biologické stability implantátu. Povlak není tvořen vždy jen krystalickým HA, který je vysoce odolný vůči desintegraci, ale je přítomna část amorfních nestabilních složek. Alternativním vysvětlením poklesu buněčné aktivity amorfní fáze HA je uvolnění Ca a P, dochází tak k zániku buněk [22]. Přesný postup biodegradace není znám, udává se, že ke ztenčení povlaku dochází během 3 měsíců až 8 let [4]. Jisté ztenčení povrchu však může naopak znamenat aktivní integraci implantátu do organismu, přestavění kosti a zároveň i povrchu povlaku implantátu. Námitkám se snaží neúspěšně čelit metoda plazma naprašování, kdy vysoká teplota plazmového hořáku narušuje mikrostrukturu HA, vzniká tak vnitřní napětí a případný vznik trhlin uvnitř materiálu, v extrémním případě dochází k oddělení povlaku od jádra. Při

posuzování kolonizace povrchu implantátu je důležitý poznatek, že bakterie vnikají hrubým povrchem do mikrostruktury a je tudíž touto cestou možné vysvětlení pro vznik periimplantitidy [4].

- Degradace materiálu se zirkonem může být způsobena na základě reakce, kdy vznikají Zr-OH a Y-OH vazby na povrchu TZP-Y po chemické adsorbci vody. Tato reakce je jasnou degradací materiálu. Dalším údajem o probíhající materiálové degradace je vznik ytriových iontů pozorovaných v testech in vitro, ale nedetekovaných in vivo [17].

6.3 Současný pohled na povlakování implantátů

V posledních letech téměř jednoznačně preferujeme šroubovité tvary implantátů, které se zavádějí pomocí předvrtávačů do kosti, kdy velikost implantátu souhlasí s velikostí kostních frézek. Po zavedení měříme primární stabilitu implantátu periotestem [1], nověji resonanční frekvenční analýzou (RFA). Principem metody RFA je hodnocení vibrací na rozhraní implantátu s kostí a dle výsledků můžeme posoudit, jestli je možné a vhodné implantát zatížit [33]. Výborná primární stabilita je jednou z nezbytných podmínek úspěšného vhojení implantátu.

Studie za pomoci periotestu prokázaly, že povlakování HA má lepší vlastnosti při vhojování a titanové implantáty prokazují větší dlouhodobou stabilitu [34]. V literatuře se objevuje i tvrzení, že implantáty s povlakem HA se rychleji vhojují, ale snáze desintegrují, po delší době mají horší biologickou stabilitu a nastává resorpce. Budoucnost povlakování implantátů je naznačena v

nových způsobech nanášení HA v tenkých vrstvách a v redukovaném pokrytí fixtury [8, 23, 29].

Stále nevyřešenou otázkou je rychlost desintegrace HA vrstvy. Nové techniky se snaží tento problém vyřešit a zabránit mu zvýšenou odolností povlaku a také vyšší adhezí HA k titanovému implantátu. Nicméně Trisi ve své práci uvádí, že povlakované implantáty mají při porovnání objektivních parametrů, jejichž souhrnem je index BIC, výrazně dobré klinické zkušenosti podložené i histologickým vyšetřením mandibuly s implantátem povlakovaným HA po 10 letech funkce [10].

Histologické nálezy prokázaly vynikající vhojení titanu do kostní tkáně a jeho schopnost těsného kontaktu s okolní kostí. Elektronovým mikroskopem se podařilo odhalit pouze několik nanometrů silnou amorfní mezivrstvu. Pravou chemickou vazbu kosti s implantátem popisují někteří autoři pouze u HA povlakovaného implantátu. Vazba je výsledkem tzv. biointegrace, procesu charakteristického pro bioaktivní materiály, které dávají předpoklad k osteokondukčním procesům aktivní stimulací kosti [1].

6.4 Biomateriály a jejich role v povlakování

Hydroxyapatit byl podroben detailnímu výzkumu a následně se začalo vzhledem k jeho křehkosti uvažovat o zvýšení odolnosti přidáním dalších látek, mezi nimi je mimo jiné i zirkon. Výsledky jsou v literatuře bohatě dokumentovány u metody plazma naprašování [12, 13] a v poslední době i u metody pulsní laserové depozice [5, 9, 15, 21, 35]. Měření ukazují, že vazebná síla pro sendvičové uspořádání povrchu se zirkonem a HA je nejvyšší a hned

za ním následuje povrch s kombinací HA a zirkonu ve směsi, nejslabší vazbu vykazuje povrch z čistého HA [12].

Krystalická struktura je jedním z předpokladů úspěchu povlakovaného implantátu [36] a při metodě PLD je v přímé návaznosti na teplotu vzorku [9]. Krystalinita byla optimální u HA vzorků deponovaných PLD při teplotě 600°C (tab. 2, 4), jak je patrno z grafů XRD (obr. 5.2.7.3, 5.2.3.1). Tato skutečnost koresponduje s výsledky, které ve své studii uvádí Cotell. Poukazuje na konverzi amorfního HA na krystalický při teplotě 575°C. Významnou úlohu v celém procesu hraje tenze vodních par [37].

Výsledky našich experimentů dokládám skenovací elektronovou mikroskopii (SEM). Typický hladký povrch s drobnými kapičkami jsme zjistili u HA i u zirkonových vrstev. Průměr kapiček byl u vrstev se zirkonem přibližně stejný v rozsahu 1 – 5 μm a u sendvičových povlaků 5 – 20 μm. Hustota kapek byla nižší na povrchu zirkonových vrstev. Kapičky pevně adherují k podkladu tvořeném homogenním filmem. Rychlost, se kterou dopadají na povrch, je natolik vysoká, že nehrozí odloučení kapiček od povrchu. Naopak by jistá drsnost mohla napomoci vhojování svým zvětšeným povrchem.

Další podnětem k výzkumu je i povrch vytvořené vrstvy. Hladký rovnoměrný povrch má menší tendenci k praskání než vrstva nestejnoměrné síly. K drsnějšímu povrchu lépe adherují kostní buňky, k hladkému povrchu spíše nasedají fibroblasty [21]. Povrch vytvořený metodou pulsní laserové depozice se svými nerovnostmi, které v podobě drobných kapiček velikosti několika mikrometrů nasedají na homogenní vrstvu implantátu, by neměl činit klinické obtíže, dovoluji si tvrdit, že vzhledem k výše uvedeným argumentům by naopak měl být pro osteoblasty atraktivní.

Testovali jsme přilnavost zirkonové vrstvy vzorků u ZRO 18 - 20. Určovali jsme kritickou normálovou sílu, což je síla, při které dochází k delaminaci vrstvy od podložky. Testy přilnavosti ukázaly, že pro ZRO-18 je kritická normálová síla 3,0 N a pro ZRO-20 je 7,2 N. Maximální normálová síla 9,5 N byla naměřena u vzorku ZRO-19, který byl deponován při teplotě 400 °C. Při vrypové zkoušce jsme nepozorovali žádné trhliny na zirkonových vrstvách vytvořených za pokojové teploty. Vrstvy vytvořené při 700 °C vykazovaly paprskovité trhliny a vzorky ze 400 °C ukazovaly soustředné kruhy kolem vtlačení. Souhrnem lze tedy říci, že pokojová teplota se jeví z pohledu zkoušek přilnavosti pro depozici zirkonu jako optimální. Zkouškami přilnavosti povlaků jsme se snažili zjistit vzájemnou vazebnou sílu povlaků. Tyto vazebné síly mohou být charakteru van der Waalsových sil, elektrostatických sil a nebo chemických vazebných sil, které působí v oblasti existujícího rozhraní. Přilnavost povlaku k podložce je jedním ze základních parametrů ovlivňujících životnost povlaku a je silně ovlivněna charakterem deponovaného materiálu, morfologií, mikrostrukturou a zbytkovým napětím vytvořeným při jeho nanášení. Měření a interpretace výsledků jsou ale značně problematické. Nemůžeme dobře srovnávat jednotlivé výsledky testů u různých měření, protože kritická síla naměřená u vrypových a vpichových zkoušek může kolísat i ve stejné vrstvě [5]. Podobné poznatky uvádí ve své studii i Blind [9]. Jednotlivé výsledky tedy hodnotím jako relativní a bude je třeba pro další posuzování porovnat s výsledky vzorků vytvořenými stejným postupem. Publikované studie toto srovnání nenahradí [5].

Poměr Ca/P jsme měřili pomocí WDX. Průměrný poměr Ca/P u vytvořených HA vrstev u vzorků ZHA 21 – 24 byl 1,65. Tato hodnota se pomalu blíží hodnotě stechiometrického poměru Ca/P přírodního HA, která je

1,67. Přiblížení k optimálnímu poměru Ca/P HA vrstev jsme získali při teplotě podložky 600°C a při pracovní atmosféře obsahující vodní páry a argon (tab.2). Vzrůstající stupeň krystalinity zlepšuje stabilitu a buněčnou aktivitu [8]. Z experimentů vyplývá, že dochází k difúzi oxidů vápníku v zirkonu během splynutí HA/zirkonových komponent [9]. Krystalové defekty, jako jsou nečistoty, mezery nebo rozrušení, mají vliv na difúzní jevy ovlivňující míru rozpustnosti [38], ale metoda PLD zabraňuje během povlakování titanu vnikání nečistot do povlaku prací ve vakuu nebo v ochranné atmosféře [23]. Vše nasvědčuje skutečnosti, že snížení rozpustnosti vede ke zvýšení krystalového růstu [14].

Kontaktní úhly kombinovaného vzorku Ti/ZrO_2/HA a titanové slitiny jsou v rozmezí optima pro sorpci proteinů [15]. Vzorky Ti/ZrO_2/HA a Ti/ZrO_2 ukazují vyšší hodnoty kontaktního úhlu než vzorky bez povlaků. Všechny hodnoty kontaktního úhlu poklesly při vložení terčíků do média H-MEM, které obsahuje proteiny. Nepozorovali jsme změny hodnot kontrolního tkáňového polystyrenu, který obecně považujeme za ideální povrch pro buněčnou kultivaci. Pokles kontaktního úhlu je známkou proteinové sorpce na povrchu vzorku.

Jedním z velmi diskutovaných témat je u povlakovaných implantátů možnost resorpce HA povrchu. Vysoce krystalické povrchy vytvořené pomocí PLD nejsou jednoduše resorbovatelné a některé studie dokonce dokazují, že HA krystaly na povrchu implantátu mohou i stimulovat kostní apozici [26]. Nyní se řeší problém krystalinity tenkých vrstev.

Příměsi a krystalinita v HA jsou zodpovědné rozhodující měrou za rozpouštění materiálu [4]. Ovlivnění této vazby HA k podkladu závisí na poměru mezi krystalickým a amorfním HA, krystalická struktura je daleko odolnější [9]. To má vliv jak na biologické vlastnosti povlaku, tak na chemickou rozpustnost,

která je závislá jednak na poměru Ca/P [19] a na typu použité metody nanášení. Vlastnosti HA lze tedy modifikovat přidáním chemických sloučenin, různými pracovními postupy, jedná se například o použití zirkonu, F, CaF_2 [25]. Cílem modifikace HA je zvýšení spolehlivosti povlaku [5]. Relevantní hledisko stability materiálu v biologickém prostředí je obsah skelné fáze zastoupené SiO_2, Al_2O_3, TiO_2 a CaO přítomných v nečistotách vázaných v zrnech. Tyto nečistoty mohou pocházet z chemických prekurzorů, z frézovacích přístrojů a mohou být přidány do prášku při sintrování. Jejich přítomnost vede ke ztrátě stability. Mechanické vlastnosti nezávisejí pouze na mikrostruktuře, ale také na celém pracovním postupu a použité metodě povlakování.

Povlakováním také implantát chráníme proti korozi, která je v intraoseálním prostředí minimální, ale byla prokázána in vitro, stejně jako signifikantní snížení koroze po adsorpci povlaku HA plazmovým naprašováním [38]. Rezistence ke korozi je popisována vždy pro konkrétní materiál v určitém prostředí. Titan dokáže korodovat buď extrémně rychle, nebo velmi pomalu v závislosti na prostředí [26]. Ochranný povlak z HA fixturu trvale izoluje od kostních struktur. V titanové slitině jsou i prvky Al a V, které jsou sice spojovány s možnými neurologickými obtížemi, ale právě jejich přítomnost má pozitivní vliv na mechanické vlastnosti [21].

Povrch titanu i titanové slitiny může být při inserci implantátu nebo později částečně poškozen. Tato skutečnost způsobuje i drobnou destrukci ochranného filmu z oxidu titanu a samotné jádro je náchylnější k elektrochemickým procesům iv vivo [26]. Na druhé straně Fischer uvádí, že čistý titan je jedním z nejvíce korozi rezistentním a biokompatibilním materiálem [39]. Důvodem je rychlý vznik pasivačního oxidu titanu na jeho povrchu, udává

se, že vzniká vrstva asi 4 nm v časovém úseku několika milisekund [26]. Oxid titanu se rychle obnovuje při lokální destrukci například mechanickým působením. Všeobecně řečeno můžeme nahlížet na tenké povlaky implantátu jako na materiál, který příznivě komunikuje s biologickým prostředím a chrání implantát za předpokladu vysoké adheze k substrátu. Potenciálně existuje totiž i riziko vzniku prasklin na přechodu jednotlivých materiálů. Povlak musí také odolávat zátěži a nesmí poškozovat implantát. Pro titan to znamená např. šetrné zahřívání při některých technikách depozice vrstev, důsledné dodržování čistoty prostředí proti vniknutí nečistot, které by mohly změnit vlastnosti povrchu. [26]. Základní materiál - jádro implantátu - tedy musí vydržet zátěž a povrch by měl napomoci integraci implantátu do hostitelského organismu.

Titan je úspěšný biomateriál. Další vývoj ale nastiňuje modifikaci jeho povrchu a tím cílené ovlivnění procesu vhojování. Pokud poznáme biologické reakce na určitý druh povlakování, můžeme předpokládat kaskádu biologických reakcí spíše než jen čekat na adsorpci proteinů při oseointegraci [26].

6.5 Výhody a nevýhody dostupných metod povlakování v porovnání s PLD

Žádná z dostupných metod neprodukuje automaticky HA povlaky s vysokou krystalinitou a přilnavostí. Krystalinita se zvyšuje modifikací parametrů jednotlivých technických metod, v popředí je téměř u všech, kromě plazma naprašování, zahřívání titanového implantátu [20].

Garcia-Sanz ve své srovnávací studii mezi PLD a plazma naprašováním potvrdil rozdíly v morfologii HA povlaku v přímé souvislosti s depozičními podmínkami [40]. Plazma naprašování negativně ovlivňuje krystalické uspořádání

vzorku a navíc je vrstva často amorfní [16, 22]. Při studiích povrchů vytvořených právě technikou plazma naprašování Chou zjistil, že pokud se na titanovou slitinu vrství směs oxidu zirkonu s HA, dochází pak během depozice k difúzi Ca iontů z HA povlaku do zirkonové vrstvy, což by mohlo znamenat zesílení povlaku [14]. HA keramiku však můžeme deponovat na vrstvu zirkonu v sendvičovém uspořádání. Jsou popsány experimenty, kdy během sintrování HA a zirkonu probíhá difúze CaO do ZrO_2, což způsobuje přechod z tetragonální do stabilní kubické fáze. I malý přídavek ZrO_2 (např. 2 mol. %) může výrazně zlepšit mechanické vlastnosti [17]. Tento názor podporuje i Chou, který ale zkoumal vliv zirkonu jako mezivrstvy mezi titanem a HA a porovnával tento stav s plazmovým naprašováním směsi HA a zirkonu. Pozitivnější výsledky přineslo vrstvení [12]. Nedají se sice srovnávat výsledky různých metod, ale výše uvedené poznatky ukazují na možnou cestu. Povlak HA by byl odolnější vůči degradaci při vhojování, protože by s menší pravděpodobností nastala situace odtržení naneseného pláště od povrchu titanové fixtury [18, 19].

Od plazma naprašování se pomalu upouští, kromě amorfního povlaku je dalším negativním rysem i nižší adheze pláště k povrchu implantátu [9, 20]. Pro dostatečnou primární stabilitu implantátu požadujeme šroubovitý tvar, který ale vylučuje povlakování metodou plazma naprašování, protože v zářezech není HA film kvalitní, touto metodou se povlakují především válcové implantáty [4].

U povlakování implantátů závisí na metodě nanesení pláště a na jednotlivých technických faktorech, které často působí protichůdně [21]. Nejprve se zkoumalo chování HA a následně byly vzaty do výzkumu i látky, které by mohly vlastnosti HA zlepšit. Mezi nimi je i zirkon. Kohezivní a adhezivní síly

HA povrchu vytvořeného plazma naprašováním byly potencovány přidáním ZrO_2 částic[12].

Svou pozornost jsem zaměřila na možnost povlakování implantátů HA zirkonem. Na titanové slitině můžeme vytvořit samostatnou vrstvu HA, nebo v kombinaci s mezivrstvou ze zirkonu eventuálně vytvořit povlak ze směsi HA a zirkonu. Výhodou je, že přidáním zirkonu se zlepší mechanické vlastnosti a povlak je pevnější [17]. Tuto skutečnost dokazují i naše experimenty [18, 19].

Existuje i metoda rekrystalizace amorfního HA. Probíhá mezi teplotami 500 – 700 °C a toto rozmezí je také závislé na obsahu hydroxylových iontů v povlaku a vlhkosti během žíhání. Suchá atmosféra zvyšuje rekrystalizaci nad 600 °C [22], proto je výhodné využít ochrannou atmosféru při depozici povlaku doplněnou o vodní páry [5]. Rekrystalizované vzorky mají vyšší aktivitu než nepřežíhané vzorky. Na těchto površích mají buňky lépe organizovaný cytoskelet [22].

Naším cílem proto bylo vytvoření tenkých, dobře adherujících krystalických vrstev. V prvním uceleném souboru u vzorků ZHA 1 – 13 byla vrstva HA mnohem silnější než u druhého souboru ZHA 21 – 24. Vyšší vrstva obsahuje pro metodu PLD větší nahromadění HA kapiček a povrch je tudíž více nerovný. Praktický důsledek jsme při kultivaci buněk na těchto površích nezaznamenali [18, 19]. Zirkon a titan se ale velmi málo uvolňují do tělesných tekutin, daleko méně než zlato [41].

Pokud podrobněji nahlédneme do problematiky PLD, můžeme osvětlit její objektivní výhody a nevýhody. Základní předností aplikace laseru je možnost modifikace materiálu bez mechanického kontaktu s výrobkem, opracování těžko

dostupných míst, v našem případě aplikace povlaku i v zářezech implantátu. Výhody laserové depozice můžeme shrnout do následujících bodů:

- docílení stechiometrického poměru přenosu materiálu z terče na podložku, a to i pro případ vícesložkových materiálů
- vysoká rychlost růstu vrstvy
- jednoduchost a vysoká univerzálnost metody
- lze deponovat za velmi nízkého i velmi vysokého tlaku okolí
- depoziční proces je velmi čistý (terč je ohříván laserovým svazkem pouze bodově), velmi malá spotřeba materiálu terče, ostře definovaná oblast emise materiálu z terče, snadná příprava terče, terč malých rozměrů (průměr ~ 1 cm)
- do vrstvy lze z terče přenést i stopové prvky
- lze deponovat v reaktivním okolním plynném prostředí
- deponované vrstvy mají vysokou hustotu materiálu, dobrou morfologii a často preferenční krystalovou orientaci
- zařízení s laserem mimo depoziční komoru je relativně jednoduché a finančně přijatelné

Hlavní nevýhody laserové depozice jsou následující:

- na povrchu se vytvářejí kapičky
- plocha deponované vrstvy je poměrně malá, obvykle 1 – 2 cm^2

Jedním z problémů depozice tenkých vrstev je tedy nerovnost povrchu vrstvy. V závislosti na depozičních podmínkách nacházíme na povrchu vrstvy nebo ve vrstvě různé nehomogenity, které mají nejčastěji tvar kuliček, kapiček, jehliček, fragmentů atd. Mechanismus tvorby kuliček zcela neznáme, ale experimentálně se podařilo snížit jejich hustotu použitím leštěných povrchů terčů, vysokou hustotou

terčů, volbou vhodné vlnové délky laseru, depozicí tenkých vrstev 100 až 200 nm, větším rozměrem stopy na terči, depozicí ve směsi argonu a vodních par pro HA a dalšími podmínkami [23].

Kritická místa povlakovaných implantátů jsou na rozmezí HA a kosti, uvnitř plochy povlakované vrstvy a na rozmezí HA a titanové slitiny [12, 14]. Cílem celého procesu hledání a experimentálního ověřování nových metod je urychlení vhojování implantátu se stabilním povrchem [23].

7. ZÁVĚR

Cílem výzkumu bylo vytvořit nový technologický postup pro zhotovení biokeramické vrstvy pevně adherující ke kovovému podkladu slitiny titanu s krystalickým, neresorbovatelným povlakem v tenké vrstvě. Z fyzikálních analýz vzorků vyplývá, že sendvičový povrch z oxidu zirkoničitého a hydroxyapatitu vytvořený pulsní laserovou depozicí na titanové slitině tyto podmínky splňuje. Z mechanického hlediska je samostatný hydroxyapatit velmi křehký a nemůžeme ho použít jako nosnou část implantátu. Zirkon má bezpochyby lepší mechanické vlastnosti než ostatní biomateriály (jako Ti 6Al 4V, CoCr slitina) a jeho biokompatibilita je také zřejmá. Při použití implantátů pokrytých HA byla pozorována rychlejší a kvalitnější oseointegrace implantátu. Celistvá HA vrstva na titanovém implantátu zvyšuje stabilitu implantátu a biointegraci do kostní tkáně.

Našimi studiemi jsme prokázali u sendvičových i u zirkonových vrstev typický povrch s drobnými kapičkami. Průměr kapiček byl u povlaků se zirkonem přibližně stejný v rozsahu 1 – 5 μm a u sendvičových povlaků se zirkonem a HA byla velikost kapek 5 – 20 μm. Relativní nerovnost povrchu vzorků je v přímé souvislosti s technikou pulsní laserové depozice. Tato skutečnost by mohla mít pozitivní vliv na vhojování povlakovaného implantátu.

Všechny zirkonové povlaky jsme shledali při různých depozičních podmínkách jako amorfní. Vrstvy HA vytvořené ArF laserem jsme popisujeme jako krystalické, zatímco vrstvy vytvořené KrF byly amorfní nebo jen částečně krystalické. Důvodem není pouze jiná vlnová délka použitého laseru, ale i hustota energie a atmosféra v depoziční komoře.

Testem přilnavosti povlaků jsme prokázali kritické hodnoty v rozmezí 3,0 - 9,5 N. Za depoziční teploty 20 °C nebyly přítomné žádné praskliny v zirkonové vrstvě. Tyto hodnoty napovídají, že další depozice zirkonové vrstvy k vytvoření sendvičového povlaku bychom měli provádět při pokojové teplotě.

Průměrný poměr Ca/P u vytvořených HA vrstev byl u vzorků ZHA 21-24 1,65. Tato hodnota se blíží hodnotě stechiometrického poměru Ca/P přírodního HA, která je 1,67. Optimální poměr Ca/P HA vrstev lze získat při teplotě podložky 600 °C a při pracovní atmosféře obsahující vodní páry a argon.

Kontaktní úhly u sendvičového vzorku a titanové slitiny jsou v rozmezí optima pro sorpci proteinů. Všechny hodnoty kontaktního úhlu poklesly při vložení terčíků do média H-MEM, které obsahuje proteiny. Nepozorovali jsme změny hodnot kontrolního tkáňového polystyrenu, který je všeobecně brán jako ideální povrch pro buněčnou kultivaci. Pokles kontaktního úhlu je známkou proteinové sorpce na povrchu vzorku.

Závěrem můžeme konstatovat fakt, že zirkonová vrstva dostatečně silně adheruje k titanové slitině a umožňuje depozici krystalického HA, a tak zajišťuje vhodné materiálové podmínky pro možnou oseointegraci implantátu, protože krystalická struktura hydroxyapatitu je odolnější a neměla by podléhat desintegraci. Zirkonovou mezivrstvu je vhodné deponovat za pokojové teploty, hydroxyapatit za zvýšené teploty 600 °C. Nastavení kombinace depozičních podmínek uvedených v tabulkách se jeví výhodné.

Předpokládáme, že využití titanových implantátů s hydroxyapatitovou vrstvou povede k rychlejšímu funkčnímu a estetickému ošetření pacientů v důsledku zkrácení doby od zavedení implantátu až do celkové protetické rekonstrukce.

SUMMARY

PHYSICAL PROPERTIES OF BIOCERAMIC LAYERS, ZIRCONIA/HYDROXYAPATITE IMPLANT COATING AND ITS CONSEQUENSES TO THE DIRECT IMPLANT LOADING

Dental implantology is a branch, which has started a rapid evolution over the last years. All of the experts dealing with implantation are focused on extending indications for the application of the used materials to reduce the time period of therapy. Coating of the implants is a possible way how to treat patients in a shorter time period with the similar results as following the classical Brånemark protocol.

Hydroxyapatite is one of the most attractive materials for human hard tissue implants because of its close resemblance to the bone and the teeth. Its positive influence on the healing process called osseointegration is obvious. Hydroxyapatite is of a brittle nature and limits the applications as the main solid material for the dental implants. Zirconia ceramics have several advantages such as the high strength and it is frequently used to reinforce other ceramics. The concept of adding zirconia as the second phase to hydroxyapatite significantly increased the bonding strenght.

In the dissertation pulsed laser deposition is shown as one of the coating method. The bioceramic zirconia samples were characterized by methods for thin solid film analysis such as X-ray diffraction, morfology investigation by electrone microscope and measurement of the film thickness. Afterwards we examined the mechanical properties of titanium alloy samples with the buffer layer from zirconia and the coating from hydroxyapatite. We measured crystallinity, morphology characteristics, wettability and Ca/P ratio of the hydroxyapatite layer. The methods used for physical evaluation were electron microscopy, X-ray diffraction, goniometric measurement of contact angle and wavelength dispersive X-ray analysis.

The physical tests summarized good mechanical properties and a satisfactory adhesion to a titanium core modified with zirconia and hydroxyapatite. Pulsed laser deposition was found to be a promising method of applying thin films to a metal core for dental implants.

LITERATURA

1. Šimůnek A. a spol.: Dentální implantologie (monografie). Nucleus, Hradec Králové, 2001.

2. Seydlová M., Havlová Z., Dostálová T., Nathanský Z., Šimůnek P.: Přímé zatížení implantátu (souborný referát), Prakt. Zub. Lék 2004, vol. 52, č. 2, s. 54-63.

3. Teuberová Z., Dostálová T., Holakovský J.: Okamžité a časné zatížení implantátů u zdravotně rizikových pacientů. Progresdent, 2005, č. 2, s. 32-37.

4. Kopecká D., Šimůnek A.: Současné názory na povlakování dentálních implantátů hydroxyapatitem, souborný referát, Česká stomatologie, 2000, č.1, s. 29-35.

5. Mihailescu I. N., Jelínek M., Nelea V.: Pulsed laser deposition of thin films. Applications – Led Growth of Functional Materials, Chapter 18, John Wiley and Sons, Inc, 2006, s. 421-459, v tisku.

6. Cao W., Hench L. L.: Bioactive Materials, Ceram. Int., 1996, 22, s. 493-507.

7. van Loon J., Mars. P: Biocompatibility: The Latest Developments, Medical Device Technology, 1997, vol. 8, č.10, s. 20-24.

8. Himmlová L., Dostálová T., Jelínek M., Grivas Ch.: Hojení titanových implantátů s laserově deponovanou vrstvou hydroxyapatitu, první část: Nezatížená osteointegrace, Česká stomatologie, 1999, č. 3, s. 107-114.

9. Blind O., Klein L. H., Dailey B., Jordan L.: Characterization of hydroxyapatite films obtained by pulsed-laser deposition on Ti and Ti-6AL-4V substrates, Dent Mater., 2005, Nov, 21(11), s. 1017-1024.

10. Trisi P., Keith D. J., Rocco S.: Human histologic and histomorphometric analyses of hydroxyapatite-coated implants after 10 years of function: a case report, Int J Oral Maxillofac Implants, 2005, Jan-Feb, 20(1), s.124-130.

11. van Noort R.: Introduction to dental materials, Mosby 2002, s. 228-229.

12. Chou B. Y., Chang E.: Plasma-sprayed hydroxyapatite coating on titanium alloy with ZrO_2 second phase and ZrO_2 intermediate layer, Surface and Coatings Technology, 2002, 153, s. 84-92.

13. Chou B. Y., Chang E.: Microstructural characterization of plasma-sprayed hydroxyapatite – 10wt% ZrO_2 composite coating on titanium, Biomaterials, 1999, 20, s.1823 – 1832.

14. Chou B. Y., Chang E.: Interface investigation of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on titanium alloy with ZrO_2 intermediate layer as bond coat, Scripta Materialia, 2001, 45, s. 487-493.

15. Jelinek M., Dostalova T., Teuberova Z., Seydlova M., Masinova P., Kocourek T., Mroz W., Prokopiuk A., Smetana K.: Study of laser created ZRO_2 and hydroxyapatite/ ZRO_2 films for implantology., Biomol Eng., 2006, Jun 6, s. 1-4.

16. Arias J. L., Mayor M. B., Pou J., Leon B., Peréz-Amor M.: Stochiometric transfer in pulsed laser position of hydroxylapatite, Applied Surface Science, 2000, 154 – 155, s. 434-438.

17. Piconi C., Maccauro G.: Zirconia as a ceramic biomaterial. Review, Biomaterials, 1999, 20, s. 1-25.

18. Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser: In vitro study. Journal of applied physic, 2006, 99, s. 014905-1-014905-6.

19. Teuberova Z., Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Jr., Jelinek M., Masinova P., Kocourek T., Kolarova K., Wilson J.: Biological and physical properties of pulsed laser deposited zirconia/hydroxyapatite on titanium – in vitro study, Laser physics, 2007, No. 4, vol. 17, s.1-5, v tisku.

20. Lacefield W. R.: Current status of ceramic coatings for dental implants. Review, Implant Dent., 1998, 7(4), s. 315-22.

21. Himmlová L., Dostálová T., Jelínek M.: Soubor optimálních mechanických vlastností biokeramických povlaků implantátů a jejich parametry pro techniku pulsní laserové depozice, Lékař a technika, 1999, č.6, s.126-134.

22. Ball M. D., Downes S., Scotchford C. A., Antonov E. N.: Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation, Biomaterials., 2001 Feb, 22(4), s. 337-347.

23. Jelínek M.: Pulsní laserová depozice tenkých vrstev v elektronice, Fyzikální ústav AV ČR, Praha, 1999.

24. Dostálová T., Himmlová L., Jelínek M., Dvořák V., Bártová J.: Spojení titanových implantátů a biokeramiky na bázi hydroxyapatitu - hodnocení in vitro, Česká stomatologie, 1995, č.3, s. 89-96.

25. Kim H. W., Noh Y. J., Koh Y. H., Kim H. E., Kim H. M.: Effect of CaF_2 on densification and properties of hydroxyapatite – zirconia composites for biomedical applications, Biomaterials, 2002, 23, s. 4113-4121.

26. Brunette D. M., Tengvall P., Textor M., Thomsen P.: Titanium in Medicine, Material Science, Surface Science, Engeneering, Biological Responses and Medical Applications (monografie), Springer, Germany, 2001.

27. Manuál k měření kontaktního úhlu pomocí Surface Energy Evaluation System Device, Masarykova Universita, Brno.

28. Lemons J.E. :Dental implant retrieval analyses. Review J Dent Educ, 1988, Dec, 52(12), s. 748-56.

29. Himmlová L., Dostálová T., Jelínek M., Grivas Ch.: Hojení titanových implantátů s laserově deponovanou vrstvou hydroxyapatitu, druhá část: Zatížená osteointegrace, Česká stomatologie, 1999, č. 6, s. 224-229.

30. Himmlová L., Dorazilová V., Dostálová T.: Zatížený titanový implantát s laserově deponovanou vrstvou hydroxyapatitu – histologická pozorování, Česká stomatologie, 2003, č. 3, s. 95-101.

31. Steinberg A. D., Willey R, Drummond J. L.: In-vivo comparisons of clot formation on titanium and hydroxyapatite-coated titanium., J Periodontol., 1992, Dec, 63(12), s. 990-994.

32. Himmlová L., Dostálová T., Jelínek M.: Osteointegrace implantátu, souborný referát, Česká stomatologie, 1996, č. 3, s. 73-80.

33. Brunski, J., Nanci A., Helms J.: Implant Stability and the Bone Implant Interface. An Editorial for Applied Osseointegration Research, 2001, vol. 2, no 1., s. 3-5.

34. Šimůnek A., Vokurková J., Kopecká D.: Evaluation of stability of titanium and hydroxyapatite-coated osseointegrated dental implants: a pilot study, Clin. Oral Implants Res., 2002, roč. 13, č.1, s. 75-79.

35. Himmlová L., Dostálová T., Jelínek M., Pešáková V., Adam M.: Fyzikální a biologické vlastnosti hydroxyapatitového povrchu nanášeného na titanový implantát metodou laserové ablace, Česká stomatologie, 1999, č.4, s.146-157.

36. Ong J. L., Chan D. C.: Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants. Review, Crit Rev Biomed Eng., 2000, 28(5-6), s. 667-707.

37. Cotell C. M.: Pulsed laser deposition and processing of biocompatible hydroxylapatite thin films, Appl Surface Sci, 1993, 69, s. 140-148.

38. Fathi M. H., Salehi M., Saatchi A., Mortazavi V., Moosavi S.B.: In vitro corrosion behavior of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants, Dent Mater., 2003, May, 19(3), s. 188-198.

39. Fischer G. R., Bardhan P., Geiger J. E.: The lattice thermal expansion of hydroxyapatite, J Mater Sci Lett 2, 1983, s. 577-578.

40. Garcia-Sanz F. J., Mayor M. B., Arias J. L., Pou J., Leon B., Perez-Amor M.: Hydroxyapatite coatings: a comparative study between plasma-spray and pulsed laser deposition techniques, J Mater Sci Mater Med., 1997, Dec, 8(12), s. 861-865.

41. Steinemann S. G.: Titanium – the material of choice?, Periodontology 2000, 1998, 17, s. 7-21.

PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY A VĚDECKÁ OCENĚNÍ

Výsledky uvedené v disertační práci byly vloženy do následujících publikací:

Teuberova Z., Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Jr., Jelinek M., Masinova P., Kocourek T., Kolarova K., Wilson J.: Biological and physical properties of pulsed laser deposited zirconia/hydroxyapatite on titanium – in vitro study, Laser physics, 2007, no. 4, vol. 17, s. 1-5, v tisku, **IF: 0,684**

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Kocourek T.: Metabolic activity of LEP in the presence of KrF laser coated titanium implants, Lasers in medical science (20th Int. Congress Laser Medicine, abstrakt book, 10.-12.11.2005, Florencie.), 2005, vol. 20, s. S 37, **IF: 1,90**

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser: In vitro study. Journal of applied physic, 2006, 99, s. 014905-1-014905-6, **IF: 1,642**

Jelinek M., Dostalova T., Teuberova Z., Seydlova M., Masinova P., Kocourek T., Mroz W., Prokopiuk A., Smetana K. Jr.: Study of laser created ZRO_2 and hydroxyapatite/ ZRO_2 films for implantology. Biomol Eng., 2006, Jun 6, s. 1-4, **IF: 1,62**

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Kocourek T.: KrF laser coated titanium implants do not decrease cell proliferation. Lasers in medical science (20th Int. Congress Laser Medicine, abstrakt book, 10.-12.11.2005, Florencie.), 2005, vol. 20, s. S 34, S 37, **IF: 1,90**

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological and mechanical properties of titanium implant covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser. Protetyka stomatologiczna, Wroclaw, 2005, vol. 50, No. 5, Supl. LV, s. 89.

Havlová (Teuberová) Z., Seydlová M., La Serna P., Dostálová Z., Jelínek M.: Povlakování implantátů hydroxyapatitem modifikovaným zirkonem. Čes Stomat., 2004, vol. 104, no. 4, s. 149 – 159.

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Jelínek M., Dvořánková B.: Titanový terčík modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem nevykazuje známky cytotoxicity. Prakt. Zub. Lék., 2005, vol. 53, no. 1, s. 7-11.

Seydlová M., Havlová (Teuberová) Z., Dostálová Z., Šimůnek P.: Přímé zatížení implantátu (souborný referát). Prakt. Zub. Lék., 2004, vol. 52, no. 2, s. 54-63.

Seydlová M., Havlová (Teuberová) Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M.: Titanový terčík modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem - hodnocení povrchu in vitro. Prakt. Zub. Lék., 2004, vol. 52, no. 6, s. 159-164.

Dostálová T., Seydlová M., Bartoňová M., Teuberová Z., Radina P.: Klasifikace defektů chrupu. Progresdent, 2005, vol. 11, no. 1, s. 46-49.

Teuberová Zuzana, Dostálová Taťjana, Holakovský Jiří: Okamžité a časné zatížení implantátů u zdravotně rizikových pacientů. Progresdent, 2005, no. 2, s. 32-37

Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Jr.: Mice and human fibroblasts colonize the surface of titanium samples. Abstract book, 28th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, Izmir, Turkey, 16. - 18. 9. 2004, s. 132.

Teuberova Z., Dostalova T., Jelínek M., Dvorankova B.: Titanium samples modified with hydrohyapatite and zirkonia are not toxic. Abstract book, 28th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, Izmir, Turkey, 16. - 18. 9. 2004, s. 133.

Seydlová M., Havlová (Teuberová) Z., Dostálová Z., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M.: Biologické vlastnosti titanové slitiny - přímý test cytotoxicity. Pražské dentální dny. 13-16.10. 2004, s. 30.

Teuberova Z., Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B. Jelínek M.: Titanový terčík modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem nevykazuje známky cytotoxicity. 5. studentská vědecká konference 1. LF UK, Praha 24.5.2004, abstraktová kniha, s. 37.

Seydlova M., Teuberova Z., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Jr., Jelínek M.: Titanový terčík modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem – hodnocení povrchu in vitro. 5. studentská vědecká conference 1. LF UK, Praha 24.5.2004, abstraktová kniha, s. 39.

Vědecká ocenění:

Quintessence poster prize za rok 2005 za poster na 29th Annual Conference of the European Prosthodontic Association Poznaň, 1.-3. 9. 2005: Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological and mechanical properties of titanium implant covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser deposition

Cena Josefa Hlávky za rok 2006 – Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových

ISSN 1054-660X, Laser Physics, 2007, Vol. 17, No. 1, pp. 1–5.
© MAIK "Nauka/Interperiodica" (Russia), 2007.
Original Text © Astro, Ltd., 2007.

Biological and Physical Properties of Pulsed-Laser-Deposited Zirconia/Hydroxyapatite on Titanium: in Vitro Study

Z. Teuberova[a], M. Seydlova[a], T. Dostalova[a], B. Dvorankova[b], K. Jr. Smetana[b], M. Jelinek[c], P. Masinova[c], T. Kocourek[c], K. Kolarova[d], and J. Wilson[f]

[a] *Department of Prosthodontics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Katerinska 32, 121 08, Prague, Czech Republic*

[b] *Institute of Anatomy, 1st Faculty of Medicine, Charles University, U Nemocnice 3, 121 08, Prague, Czech Republic*

[c] *Institute of Physics ASCR, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic*

[d] *Institute of Chemical Technology, Technicka 5, 166 28, Prague, Czech Republic*

[f] *Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University, Trojanova 13, 120 00, Prague, Czech Republic*

e-mail: zuzana.teuberova@seznam.cz

Received July 24, 2006

Abstract—Coating dental implants with hydroxyapatite (HA) may give certain advantages such as active encouragement of new bone growth, a lower rejection rate, and an improved long-term prosthesis fixation. This study examined the mechanical and biological properties of titanium alloy implant cores with an interlayer of zirconia and a coating of HA created using pulsed layer deposition (PLD). The thickness of the zirconia layer was 50–100 nm, and that of the HA layer was ~600 nm. The crystallinity, morphology, wettability, and Ca/P ratio of the HA layer were investigated by electron microscopy, X-ray diffraction, goniometric measurement of contact angle, and wavelength dispersive X-ray analysis. The physical tests indicated adequate mechanical properties and a satisfactory adhesion to a titanium core modified with zirconia and HA. Cell proliferation and metabolic activity of human embryonal lung fibroblasts were determined using counting of harvested cells and providing an MTT assay. It was demonstrated that none of the samples were cytotoxic and their surfaces promoted cell colonization. PLD was found to be a promising method of applying coatings to a metal core for dental implants, and the in vitro biological tests suggest that the crystalline HA coating can improve the biological properties of titanium covered with zirconia.

PACS numbers:

DOI: 10.1134/S1054660X0701@@@@

INTRODUCTION

A promising method to produce implants with suitable mechanical, physical, and biological properties is to cover metal or metal-alloy substrates with a thin film of biocompatible material [1]. The preferred coating for a substrate is hydroxyapatite (HA), [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] as one of the best known bioceramics [1]. Although HA has good biocompatibility, its mechanical strength is inferior to that of metal [2]. The brittle nature of HA requires it to be coated onto more resistant substrates such as titanium or titanium alloy [Ti_6Al_4V] [3]. Modifying the surface of a dental implant gives many advantages: improved osseointegration, enlargement of its surface area, better retention, and the permanent isolation of the metal core, protecting it from corrosion. Implants can be modified chemically by etching [4] or mechanically by cutting [5]; however, the most advanced way is to modify the surface of the implant with a thin layer of biocompatible material. Obtaining the required film thickness depends on the chosen deposition method, because there are some limitations with regard to the layer thickness and deposition time [1]. Depositing a thin film of a ceramic material onto metal is done routinely in the electronics industry [6]. There are several methods of coating implants: plasma spraying, magnetron sputtering, pulsed laser deposition (PLD), etc. The advantage of PLD is that it gives a finer control over layer thickness, crystallinity, and composition. The research into PLD is directed toward the creation of crystalline apatite films at a low substrate temperature [3]. This usually requires heat treatment in a controlled atmosphere to attain a high crystallinity [6]. The vacuum deposition technique creates high-quality coatings with effective bonding to either smooth or rough titanium surfaces [7]. The bonding at the HA/titanium interface can be improved by an intermediate layer such as zirconia (ZrO_2) between the HA coating and the titanium substrate [8, 9].

The aim of the study was to demonstrate the mechanical and biological qualities of PLD-created HA/zirconia coatings for use in implantology. We compared three types of samples: titanium alloy, titanium alloy coated with zirconia, and titanium alloy with an interlayer of zirconia and a coating of HA. All the lay-

Deposition conditions

Sample	Target	Substrate	Pressure, Pa	Temperature, °C	Number of pulses	Laser energy, mJ	Energy density, J cm^{-2}	Target–Substrate Distance, cm
ZRO—15, 16, 17	ZrO_2	Ti	7×10^{-3}	~20	10000	450	4	4
ZRO—18	ZrO_2	Ti	4×10^{-3}	~20	15000	450	4	4
ZRO—19	ZrO_2	Ti	9×10^{-3}	400	20000	450	4	4
ZRO—20	ZrO_2	Ti	2×10^{-2}	700	20000	450	4	4
ZHA—1, 2, 3, 4	ZrO_2	Ti	3×10^{-3}	~20	15000	300	4	4
ZHA—1, 2, 3, 4	HA	ZrO_2/Ti	40	600	20000	300	3	3

ers were created by PLD. We characterized the surfaces of different substrates for their biological qualities. We tested colonization, subsequent proliferation, and metabolic activity of human embryonal lung fibroblasts on the substrates. We had previously confirmed that these samples are not cytotoxic [10].

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Zirconia oxide films were created using KrF excimer laser (LUMONICS PM 842) of a wavelength of 248 nm, a frequency of 10 Hz, and output energy of 450 mJ. Disks made of titanium alloy [Ti_6Al_4V] of diameter 10 mm or 12 mm were used as substrates. Laser energy density on the target was 4 J cm^{-2}. Layers were fabricated at three different substrate temperatures (T_s) of 20°C, 400°C, and 700°C (table). The zirconia films acting as buffer layers between the HA coating and the titanium alloy were only deposited at room temperature (20°C) (table). HA thin films were created on ZrO_2/Ti_6Al_4V substrates using a KrF excimer laser (LUMONICS PM 842) of wavelength 248 nm, repetition rate 10 Hz, and output energy 300 mJ. The deposition took place in an H_2O and Ar (ratio 22:18) atmosphere at a pressure of 40 Pa (table). Laser energy density on the target was 3 J cm^{-2}.

Physical Properties

Film thickness was measured by a mechanical profilometer Alpha Step 500 Surface Profilometer (TENCOR Instruments). Film morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JXA 733) using a 15-kV electron beam. The crystalline structure of the deposited films was characterized by X-ray diffraction (XRD). Parallel beam optics geometry with a Huber two-circle diffractometer powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, CuK alpha radiation) was used. The Ca/P ratio of HA films was analyzed by wavelength dispersive X-ray analysis (WDX) by JEOL JXA 733.

Goniometric Measurement

Contact angle characterizes the surface wettability is one of the criteria for the protein sorption which promotes cell colonization and adhesion. The contact angle was measured using a surface energy evaluation system device (Masaryk University, Brno, Czech Republic) to an accuracy of ±5 degrees. Distilled water at room temperature was used as a test liquid. Drop volume was 10 μl (dosed by an automatic pipette, BRAND, Germany). Titanium samples were cleaned using acetone and ethanol prior to measurement. All samples were left in an H-MEM medium for two hours after measurement. After this procedure, they were washed with distilled water and measured again.

Biological Evaluation

A cell line of human embryonal lung fibroblasts was used for the biological testing (LEP_{19}) (Sevapharma, Czech Republic). Cell proliferation on the surface of the samples was evaluated by cell counting and by a MTT assay. The sterile samples were placed into 24-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark). Fibroblasts at a density of 22000 cells/cm^2 were seeded into each well in 1 ml of culture medium (EPL—Sevapharma, Prague, Czech Republic). Each sample had its own control—tissue-culture-grade polystyrene without any sample present. Cultivation proceeded for 120 hours at 37°C, 5% CO_2, and 100% humidity. After 48 hours, the medium was changed. On the fifth day, the cells were harvested from the sample's surface by 0.15% trypsin (SIGMA, Prague, Czech Republic). The fibroblasts were counted in the Burker chamber in the optical microscope (Nikon, Japan). The metabolic activity of the cells growing in the cultures was shown by MTT assay [11]. The culture medium was removed, and to each well we added 1 ml of 2 mM solution of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide – SIGMA, Prague, Czech Republic) in serum-free H-MEM medium. The cells were cultured for two hours at 37°C and 5% CO_2. The samples were transferred to new wells and the blue precipitate on their surface was diluted with 1.2 ml of isopropylalcohol. In the wells used as controls, the

solution of MTT was removed and the same volume of isopropylalcohol was added. The absorbance of the formed blue solution was measured using an EL 800 Universal Microplate Reader (Bio-tek Instruments, Highland Park, United States) at 570 nm. The results were statistically evaluated using Student's t-test at a probability level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

In the PLD method, the temperature of the substrate is an important factor [2]. It has been well documented that plasma-sprayed coatings suffer from low adhesion between coating and substrate, as well as low cohesion within the coatings [2]. On the other hand, vacuum deposition techniques produce high-quality coatings with good bonding to either smooth or rough titanium surfaces but usually require a heat treatment in a controlled atmosphere to attain high crystallinity [6]. XRD analysis shows that the crystalline HA is present in the samples created at a temperature of 600°C (Fig. 1).

The film thickness of the zirconia layers used for studying its physical properties ranged from 200 nm to 400 nm. Buffer layers of zirconia ranged from 50 nm to 100 nm. The thickness of the HA layers was approximately 600 nm.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to study film morphology. A smooth surface covered with small droplets was observed for both HA and zirconia layers. The diameters of the droplets were similar for both HA and zirconia films (Fig. 2) and ranged in size from 1 μm to 5 μm. The density of the droplets was lower on the zirconia films.

Single zirconia films were tested for adhesion. Scratch and indentation tests were made. The critical normal force, which is the force when the coating is scratched down to the substrate, was measured. Adhesion tests showed that the critical normal forces were 3.0 N for the sample ZRO-18 and 7.2 N for the sample ZRO-20 (see table). A maximum normal force of 9.5 N was measured for the sample ZRO-19 deposited at 400°C. Indentation tests were made at 1470 N using a Rockwell cone indenter. No cracks in the zirconia layer were observed for the films created at 20°C. The films deposited at 700°C exhibited radial cracks, and those created at 400°C showed concentric circles around the indentation.

There are several reasons for coating implants with HA. From a mechanical point of view, HA is very brittle, like most ceramics, and cannot be used as an implant in a load-bearing application. There is no doubt that zirconia ceramics have mechanical properties superior to other biomaterials such as Ti_6Al_4V, CoCr alloy, or alumina [12]. The use of HA-coated implants has been reported to stimulate bone healing, resulting in an improvement in the rate and strength of initial implant integration [5]. Hence, the dense HA layer on the top of a titanium substrate is mainly for biointegration to bone tissue and enhanced implant stability. Thus, it is believed that the use of HA coatings on metallic implants can speed the rehabilitation of patients by decreasing the time from implant insertion to final reconstruction [13].

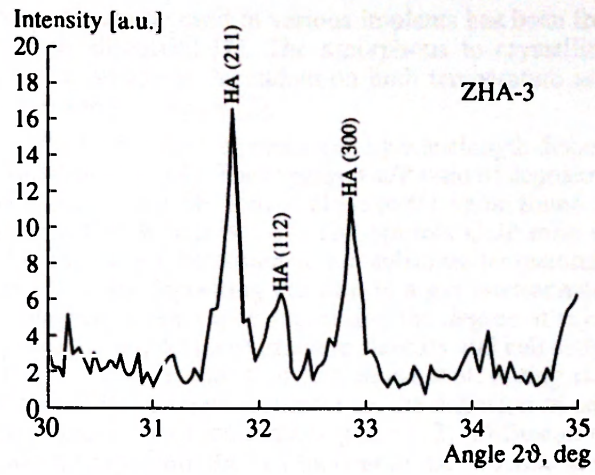


Fig. 1. XRD analysis show crystalline structure of HA layer of the sample ZHA-3.

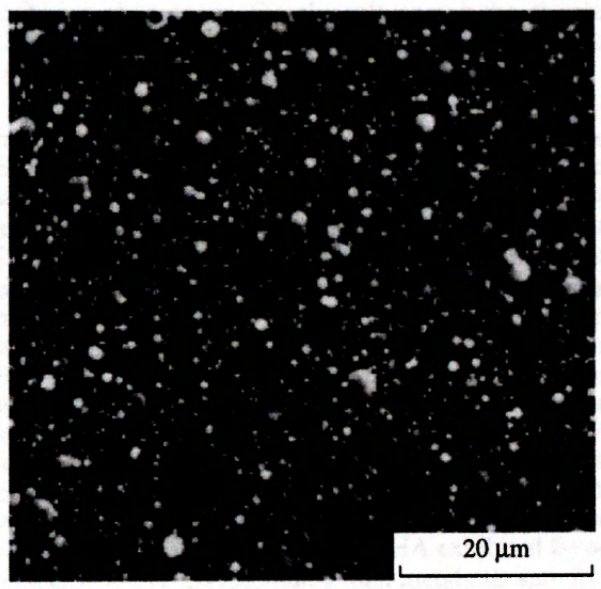


Fig. 2. Film morphology of the sample ZHA-2 (magn. ×2000). The diameters of the droplets were similar for both HA and zirconia films and ranged in size from 1 μm to 5 μm.

The crystalline structure of the deposited films was studied by X-ray diffraction. Parallel beam optics geometry with a Huber two circle diffractometer powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, CuK alpha radiation) was used. The

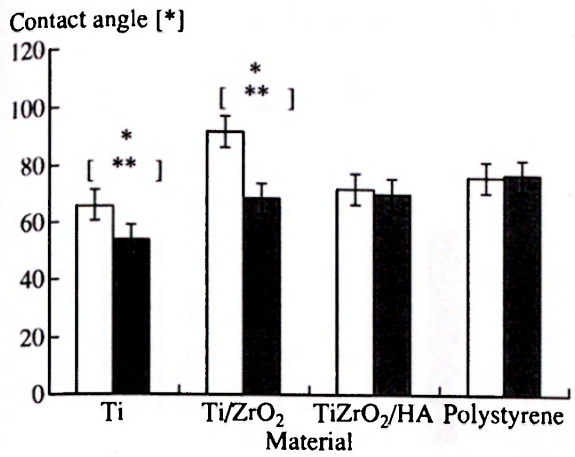


Fig. 3. Contact angle measurement, Ti—titanium alloy, Ti/ZrO_2—titanium alloy with zirconia layer, $Ti/ZrO_2/HA$—titanium alloy with the interlayer of zirconia and hydroxyapatite coating. White columns indicate clean samples, black ones after two hours in medium containing serum proteins (*—significantly higher comparing clean samples and samples after two hours in serum containing medium, **—significantly higher than control polystyrene). Columns without any symbol above were neither significantly higher nor lower.

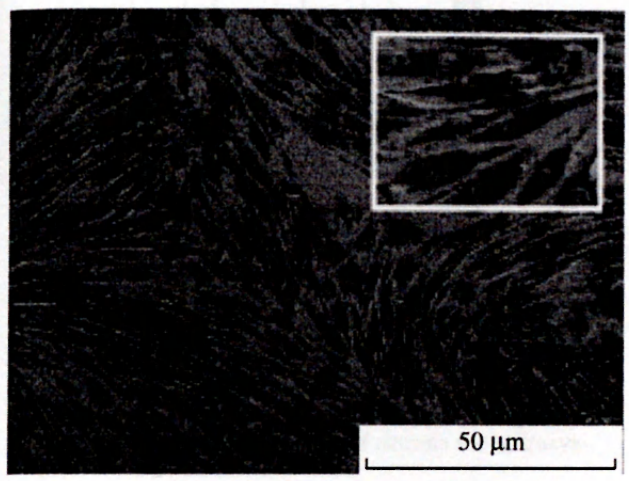


Fig. 4. Example of formazane crystal formation in fibroblasts cultured on polystyrene before the dilution and measurements in course of MTT test. Bar equates 250 μm.

crystalline structure of the HA films was confirmed (Fig. 2). XRD showed no crystallinity on the zirconia films for temperatures from 20 to 700°C.

HA dissolves in body fluid when its crystallinity is low. This means that amorphous HA has poor biocompatibility [14]. The influence of the ratio between crystalline and amorphous HA phases in the layer on the biological properties of the coating and on the coating properties to be used in various implants has been frequently discussed [1]. The amorphous to crystalline HA conversion is dependent on both temperature and water vapor pressure [3].

The Ca/P ratio was measured by wavelength dispersive X-ray (WDX). The average Ca/P ratio of deposited HA films was 1.68. This is close to the value found in natural HA, which is 1.67. The optimal Ca/P ratio of HA films could be obtained at a substrate temperature of 575°C by depositing the film in a gas environment containing water vapor. Increasing the degree of crystallinity is important to improve stability and cell activity [3]. Experimental evidence shows that, during sintering of HA/zirconia composites, the diffusion of calcium oxide in zirconia takes place [12]. Diffusion of calcium ions from the HA topcoat to the zirconia bond coat occurred during the depositon of the plasma-sprayed HA coating on the zirconia surface. The diffusion should enhance the bonding at the HA/ZrO_2 interface [8]. It has been shown that crystal defects such as impurities, vacancies, or dislocations have an effect on diffusion phenomena, thereby influencing the dissolution rate. It has been suggested that a decrease in solubility occurs with increasing crystal growth [13].

The contact angle values for the samples are shown in Fig. 3. The results were statistically evaluated using Student's t-test at a probability level of 0.05. The contact angles of titanium/ZrO_2/HA and titanium alloy samples are in the optimal range for protein sorption [15]. The titanium/ZrO_2/HA and titanium/ZrO_2 samples showed higher values for the contact angle than the uncoated titanium alloy samples. All the measured contact angles decreased after the samples had been immersed in the H-MEM media containing serum proteins. No decrease was measured for the control of tissue-grade polystyrene. This decrease in the contact angle is an indication that protein sorption is taking place on the surface of the samples. Both polystyrene with a surface optimized for cell adhesion and proliferation and the tested titanium/ZrO_2/HA exhibited favorable growth of cells (including their metabolic activity). Both of these samples showed no and very low decreases of contact angles after the preincubation with media containing serum proteins. This observation can indicate similarities of both surfaces from the standpoint of surface properties.

The cells were able to grow in the presence of the tested targets (direct test of cytotoxicity). The morphology and proliferation rate of the cells were comparable with the control polystyren (Fig. 4). None of the tested materials were found to be cytotoxic and they all allowed the growth of cells. The cells adhered to the samples' surfaces, proliferated, and formed uniform growth. The number of the cells growing on spot samples taken from the materials under test was statistically higher than on spot samples taken from tissue grade polystyrene (Fig. 5A). On the other hand, the metabolic activity of cells was highest on tissue-grade polystyrene

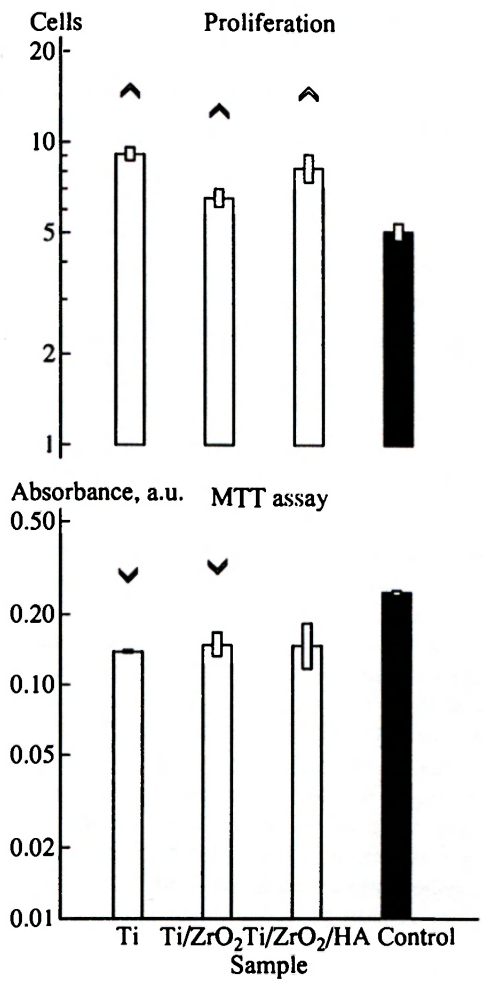


Fig. 5. A—Proliferation test by counting after statistical evaluation, *y* axis shows cell count per square cm. Image ˆ means that these results are significantly higher than control samples. B—MTT assay after statistical evaluation, *y* axis shows light absorbance in arbitrary units. Image ˇ means that the first two samples are significantly lower than control samples; columns without any symbol above were neither significantly higher nor lower. Ti—titanium alloy, Ti/ZrO_2—titanium alloy with zirconia layer, $Ti/ZrO_2/HA$—titanium alloy with the interlayer of zirconia and hydroxyapatite coating.

control, which is an optimal material for cell cultures (Fig. 5B). However, the highest metabolic activity of cells on samples was reached on the Ti alloy–ZrO_2-HA sandwich, even though the absolute number of cells was less (Fig. 5).

CONCLUSIONS

We found that a titanium alloy substrate with an interlayer of zirconia and a top coating of HA promotes the growth of fibroblast cells and is a suitable material for further development of dental implants. This material was found to be non-cytotoxic and supported the oxidative metabolism of studied cells. The HA coating with a buffer layer of zirconia has adequate physical and biological properties. The sandwich material could be used in further studies in order to prove that HA coating on a metal nucleus covered with a zirconia bond coat promotes the healing process and opens the possibility for the earlier rehabilitation of the patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Studnicka for XRD, K. Jurek for SEM and WDX, J. Kadlec for adhesion measurement, and L. Mrklas for statistical evaluation.

This research has been supported by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, no. 8512–3.

REFERENCES

1. T. Dostalova, M. Jelinek, L. Himmlova, et al., Cell. Mater. **6**, 117 (1996).
2. T. Nakayama, M. Kuwaa, and T. Matsutani, Chin. J. Lasers B **10**, 1 (2001).
3. O. Blind, L. H. Klein, B. Dailez, and L. Jordan, Dent. Mater., 1 (2005).
4. L. Jonasova and J. Strnad, Chem. Listy **9**, 775 (2000).
5. D. Kopecka and A. Simunek, Ceska Stomatolog. **1**, 29 (2000).
6. W. R. Lacefield, Implant Dent. **7**, 315 (1998).
7. F. J. Garcia-Sanz, M. B. Mayor, J. L. Arias, et al., J. Mater. Sci.: Mater. Med. **8**, 861 (1997).
8. B. Y. Chou and E. Chang, Scr. Mater. **45**, 487 (2001).
9. B. Y. Chou and E. Chang, Surf. Coat. Technol. **153**, 84 (2002).
10. M. Seydlova, Z. Teuberova, T. Dostalova, et al., J. Appl. Phys. **99**, 014905 (2006).
11. C. J. Kirkpatrick and A. Dekker, *Biomaterials—Tissue Interfaces* (Elsevier, Amsterdam, 1992).
12. C. Piconi and G. Maccauro, Biomaterials **20**, 1 (1999).
13. J. L. Ong and D. C. N. Chan, Crit. Rev. Biomed. Eng. **28**, 667 (1999).
14. T. Nakayama, T. Tanaka, Y. Tsumoto, et al., Appl. Phys. A **79**, 833 (2004).
15. M. Sato, E. B. Slamovich, and T. J. Webster, Biomaterials **26**, 1349 (2005).

SPELL: OK

JOURNAL OF APPLIED PHYSICS 99, 014905 (2006)

Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layers by pulsed laser: *In vitro* study

Michaela Seydlova,[a] Zuzana Teuberova, and Tatjana Dostalova
1st Faculty of Medicine, Department of Prosthodontics, Charles University, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Barbora Dvorankova and Karel Smetana, Jr.
1st Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Charles University, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Miroslav Jelinek and Tomas Kocourek
Institute of Physics, ASCR, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

Waldemar Mroz
Institute of Optoelectronics, MUT, Kaliskiego 2, 01-489 Warsaw, Poland

(Received 2 March 2005; accepted 18 November 2005; published online 12 January 2006)

The biological and physical properties of dental implants coated by the sandwich technique with a thin layer of hydroxyapatite and an interlayer of zirconia were evaluated. The implant samples were covered by pulsed laser deposition. The aim of our study is to evaluate the cytotoxicity and the surface characteristics of the titanium targets modified with zirconia and hydroxyapatite. The titanium substrates were analyzed physically by x-ray diffraction and scanning electron microscopy. We used a direct test of cytotoxicity to compare the prepared samples with other reference materials. No changes in the morphology or the proliferation rate of the cells used were found in the presence of the modified titanium targets. The adhesion, proliferation, and fibronectin expressions of human fibroblasts were also evaluated on the surface of the modified titanium targets. The results show that the modified titanium samples are at least as attractive as the tissue grade polystyrene in promoting fibroblasts' adhesion and proliferation. The results show adhesion and cell proliferation, which in turn implies that the studied material is not cytotoxic and is suitable for cell colonization. Titanium modified with zirconia and hydroxyapatite can be beneficially employed in oral bone surgery.
© *2006 American Institute of Physics*. [DOI: 10.1063/1.2158140]

I. INTRODUCTION

A successful implantation is the result of a suitable combination of various parameters related to the implant such as the properties of the material that it is made of as well as its shape and size. The combination of these factors can influence the healing of the implant into the bone.[1–3] The nonload healing period is the generally accepted condition for osseointegration. Previously it was suggested that specific biological responses of early loaded implants (fibrous repair or osseointegration) were directly related to a specific combination of the bone-implant interface, implant design, and type of the prosthetic reconstruction.[3]

There are many reasons to modify the surface of the dental implant, such as to achieve enlargement of its surface, quicker osseointegration, better retention as well as protection of the metal nucleus against corrosion, and in turn permanent isolation. Implants can be modified chemically by etching[4] or mechanically by cutting,[5] however, the most advanced view is to modify the surface of the implant by a thin layer of biocompatible material. A necessary demand on the implant and its loading is its perfect and quick osseointegration. That is why materials that could facilitate a direct structural and functional junction between the bone structure and the implant are being developed.[5] The biocompatibility and bioactivity are the main requirements for a coating material.

Several methods have been employed for the fabrication of a coating on implants such as plasma spraying, vacuum-deposition techniques including ion-beam sputtering and pulsed layer deposition (PLD), sol-gel and dip coating methods, hot isostatic pressing, and electrolytic processes such as electrophoresis and electrolytic codeposition.[6]

At present, the preferred method of coating implants is a thin crystalline layer of hydroxyapatite (HA), chemically defined as $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, which is an inorganic compound of bone in the range from 60% to 67%.[7] Hydroxyapatite crystallized with hexagonal phase and its unit cell contains six $(PO_4)^{3-}$ tetrahedral groups.[8] Plasma spraying enables the fabrication of a relatively thick coating (50–200 μm) with an amorphous structure quite widely spread.[9] The disadvantage of plasma spraying is its negative effect on the HA crystallinity and thus on the healing process of the implant. The optimal composition of HA is high film stoichiometry, porosity crystallinity, efficient attachment to the substrate, and low level of decomposition.[8] Since its introduction in 1992 PLD has been routinely used as a fabrication technique due to its capability to provide high-quality HA coatings.[10]

[a]FAX: +420 2 24916573; electronic mail: michaela.seydlova@seznam.cz

 © 2006 American Institute of Physics

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

We assume that the material under study is not cytotoxic and does not change the behavior and morphological structure of cells in surrounding tissue.This was tested by culturing fibroblat cells with the treated samples.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Sample preparation

The substrate made of titanium alloy (Ti_6Al_4V) with a diameter of 10 mm and thickness of 2 mm was used as a substrate for the deposition. These substrates were successfully coated by ZrO_2 interlayers with a thickness ranging from 50 to 100 nm and 6- to 12-μm-thick HA coatings using PLD.

B. Pulsed laser deposition

PLD of HA layers is usually performed with KrF or ArF excimer lasers. PLD is a vacuum-deposition technique capable of producing such coatings with a thickness of the order of a few micrometers and good bonding to either smooth or rough titanium surfaces. However, to attain high-crystallinity heat treatment in a controlled atmosphere is usually required.

The quality of the coatings obtained by PLD is directly dependent on the deposition conditions such as laser power density, target substrate distance, environment in the interaction chamber, film growth rate, film thickness, substrate material, the deposition regime, etc.[11] It is possible to vary, via the deposition conditions, the Ca/P ratio or calcium phosphate phases. This may be significant for implantation applications. The degree of bioresorbability of calcium phosphate ceramics reportedly depends on the Ca/P ratio. Higher Ca/P ratio leads to lower rates of bioresorbability.[11]

The depositions of HA and ZrO_2 films were carried out in two different deposition setups where KrF and ArF excimer lasers were used. First ZrO_2 films were produced by a KrF excimer laser (LUMONICS PM842) emitting at 248 nm with a repetition rate of 10 KHz and an output energy of 450 mJ.

The substrate was fixed at a distance of 4 cm from the ZrO_2 target. The trace of the laser beam on the target was 7.6 mm^2. The energy density of the laser beam on the target was 4 J cm^{-2}. During the deposition, the oxygen pressure of 6×10^{-3} Pa was kept and the substrate temperature of 20 °C was maintained. ZrO_2 films with a thickness of 50–100 nm were grown. An HA film was fabricated on the titanium substrates coated with the ZrO_2 layers. The ArF excimer laser emitting at 193 nm with a repetition rate of 50 Hz and an output energy of 330 mJ was used for the deposition. The trace of the laser beam was 5.3 mm^2. The deposition was proceeded in H_2O atmosphere at the pressure of 50 Pa. The target was fixed at distance of 3 cm from the HA substrate and heated up to 600 °C. The growth rate of the HA films was ~0.03 nm/pulse.

C. Physical tests

1. Analysis of the sample surface

The film morphology was observed using a scanning electron microscope (SEM) (JEOL JXA 733, Japan) using a 15 kV electron beam and ×400 magnification. On completion of all the biological tests the surface of the coated titanium target was reassessed with the scanning electron microscope [JSM 5500 LV (Joel, Japan)].

2. X-ray-diffraction and wavelength dispersive x-ray (WDX) analyses

The films were structurally characterized by x-ray diffraction (XRD). A parallel beam optic geometry with a Huber two circle diffractometer, powered by a rotating anode generator x-ray source (300 mA and 55 kV), RIGAKU Rotaflex RU 300 was used. Film thickness was measured with Alpha Step 500. The ratio of calcium to phosphorus (Ca/P) in the film was studied by an electron microscope using WDX.

D. Biological tests

1. Test of cytotoxicity

The coated samples were compared with positive and negative controls in a direct test of cytotoxicity. The positive reference was a ceramics target—Noritake (Noritake, Arlington Heights, USA); the two negative controls a target of artificial red rubber (Vegum, Gumarne Dolne Vestenice, Slovakia) and a target of dental resin Superpont C+B (Dental a.s. Prague, Czech Republic) made with an excess of monomer: 5 ml of monomer and 3 g of polymer. The usual ratio for the preparation of Superpont C+B is 1:1.

Two types of cell were used for the biological testing: 3T3 murine line fibroblasts and human dermal fibroblasts. The cells were seeded into six-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) at 2500 cells/cm^2 and 3 ml of H-MEMd medium (ÚMG ČSAV, Prague, Czech Republic) was added into each well. The H-MEMd medium with 0.3 mg/ml of glutamine (Sevafarma, Prague, Czech Republic) and 10% bovine serum (ZVOS, Hustopeče, Czech Republic) was supplied with antibiotics—gentamycin [(10 μg/ml) and penicillin (200 U/ml)].

The cells were cultured in the incubator at 37 °C, 3.3% CO_2, and 100% humidity. After 24 h the titanium targets, with HA and zirconia coatings, and the control reference targets of ceramic, rubber, and dental resins were inserted into the wells. An equal number of wells without targets but seeded with cells and supplied with nutrient was cultured as additional controls. On the third and fourth day of cultivation, 1.5 ml of medium was added to each dish. The morphology of adherent cells was monitored using phase contrast microscope (Olympus, Prague, Czech Republic). The cells were cultured for 5 days in the incubator. The samples were removed and the cells were harvested using a mixture composed of equal amounts of 0.25% trypsin and 0.02% EDTA (SIGMA, Prague, Czech Republic). The same procedure was used to remove the cells in the reference control

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

six-well plates. To ensure a perfect release of the cells from the six-well plates they were placed in an incubator at 37 °C for 10 min.

The fibroblasts from the control wells and from wells containing samples were counted in a Bürker chamber in using an optical microscope (Olympus, Prague, Czech Republic). The results were evaluated using a Student's *t*-test for statistical significance.

2. Test of adhesion

After sterilization, the studied samples were placed into 24-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) with a dish diameter of 16 mm. Each 24-well plate was seeded with 100 000 (eighth subculture) human dermal fibroblast cells suspended in 1 ml of culture medium. An equal number of well plates not containing a sample were seeded with cells and medium and paired with a well plate containing a sample as a control.

The cells were cultured in the incubator for 24 h under the condition described above. The samples were then transferred into new wells and rinsed with phosphate buffer saline (PBS). The cells were harvested from the target's surface by a mixture of 0.25% trypsin and 0.02% EDTA (SIGMA, Prague, Czech Republic) in the mixing ratio of 1:1. The cells from the bottom of the control wells were subjected to the same procedure for their detachment. For a perfect release of the cells, the 24-well plates were put into the incubator for 10 min at 37 °C. The fibroblasts were counted in the Bürker chamber using the optical microscope. The cells obtained from the target and from the corresponding control well were counted separately.

3. Test of proliferation

The samples were prepared in the same way as for cell adhesion: 20 000 human fibroblast cells were added to 1 ml of culture medium in 24-well plates. Each sample had a control well plate paired with it.

Cultivation proceeded for 96 h at 37 °C, 3.3% CO_2, and 100% humidity. At 48 h and at 72 h, the H-MEMd medium was completely changed. Two samples were dried and deep frozen for storage and later immunohistochemical study. After 96 h the remaining cells were evaluated in the same way as in the test of attachment described above.

4. Fibronectin expression

The fibronectin was detected by a monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) diluted as recommended by the supplier. FITC-labeled porcine antimouse serum (SwAM-FITC, AlSeVa, Prague, Czech Republic) was used as the second step antibody. The control of the specificity of the reaction was proved by the presence of isotype antibody against cytokeratins normally not occurring in fibroblast. This type of control is essential to exclude the nonspecific binding of the first step antibody via Fc receptors. The samples were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The fluorescence microscope Optiphot-2 (Nikon, Prague, Czech Republic) equipped with a charge-coupled device (CDD) camera (Cohu) and computer-assisted image analyzer LUCIA (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) were used for detection of the signal and data storage.

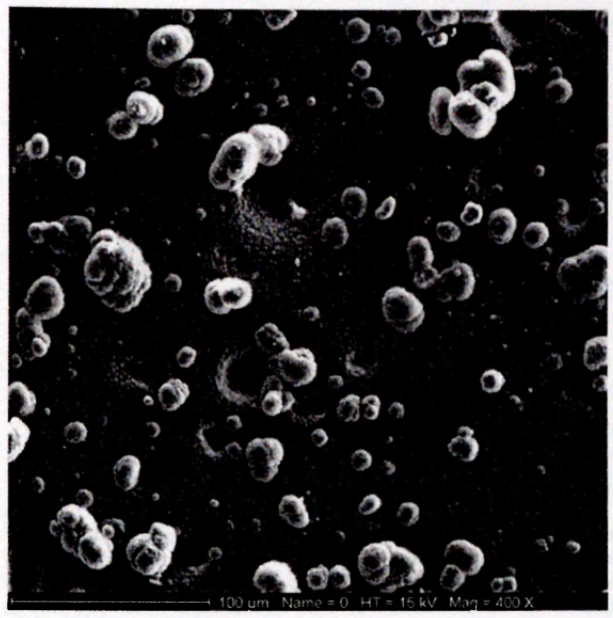


FIG. 1. Film morphology of ZrO_2 sample (SEM) (magnification of ×400). The structure of a created film is similar to the original hydroxyapatite.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Physical analysis

The SEM analysis showed that the HA film surface was covered with droplets with diameters ranging from 5 to 20 μm (see Fig. 1).

The deposited HA layer was smooth (Fig. 2). The XRD analyses confirmed amorphous layers of ZrO_2 and the polycrystalline structure of the HA films (Fig. 3). The Ca/P ratio of natural HA is 1.67. The Ca/P ratio in one of the samples was measured both in one of the droplets and in the flatter surface and was found to be in the range of 2.2–2.4.

There are several reasons to use HA as a coating material. The HA crystals are very fragile so HA cannot be used as a raw material for a self-contained implant.[4] One of its important qualities is its biocompatibility because HA is an integral part of bone tissue. The HA coating on the metal nucleus is known to facilitate the healing processes and to allow the patient to use the prosthetic rehabilitation earlier.[7,12] The presence of Ca and P ions was verified as essential for bone apposition in immediate surroundings of the implant.[6] Hydroxyapatite and tricalcium phosphate are usually considered as bone bioactive ceramics, because they generally bond to the surrounding osseous tissue and enhance bone tissue formation.[13]

One of the much debated topics is resorption of the HA layer. The resorption of the HA layer may cause a new interface to develop with the implant isolated and separated from the surrounding bone tissue. The highly crystalline surfaces produced by PLD are not so easily resorbable. Some studies

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

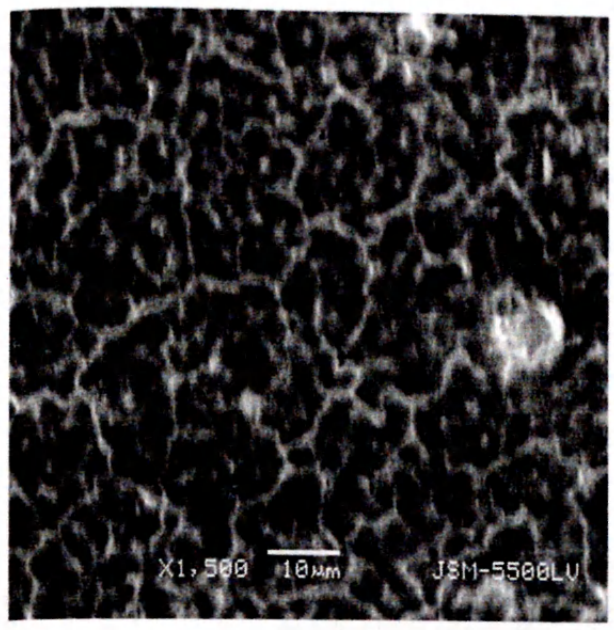


FIG. 2. SEM of the hydroxyapatite surface created by pulsed laser deposition on the interlayer of zirconia on the titanium target confirmed crystalline structure (magnification of ×1500). The images shows that the HA coating is smooth and covered with droplets of diametres between 5 and 20 μm. The surface of the HA upper layer is homogeneous.

show that HA crystals stimulate bone apposition.[14] The investigation of a mixture of HA and zirconia in one film made by plasma spraying shows positive results.[15]

The problem in focus is to improve the technique for thin layer coating with HA.[8,16] There is detectable evidence of a positive relation of the laser ablation technique to the thin layer of HA and zirconia. One of the most serious disadvantages of plasma spraying is their more or less amorphous structure.[6] Hydroxyapatite is a porous material improving the osseointegration[6] but reducing the quality of the coating and its attachment to the metal core of the implant. At present, most of the commercially produced implants are made by plasma spraying which produces a fast coverage,

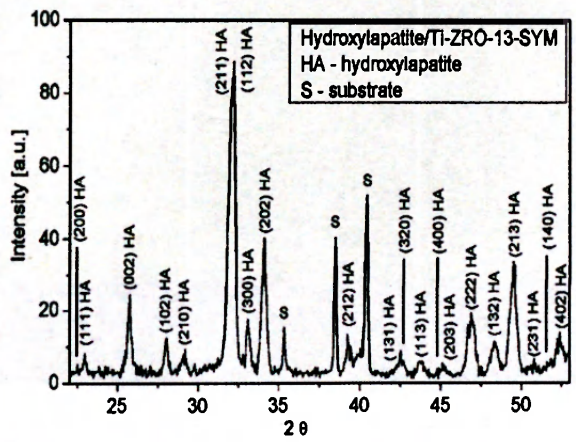


FIG. 3. XRD spectrum of HA layers (ZrO_2, 13 sample). It describes several planes of crystal lattice. Calibrating was compared with standards. The analyses of the target surface by the above-mentioned technique verified that HA on the surface is crystalline.

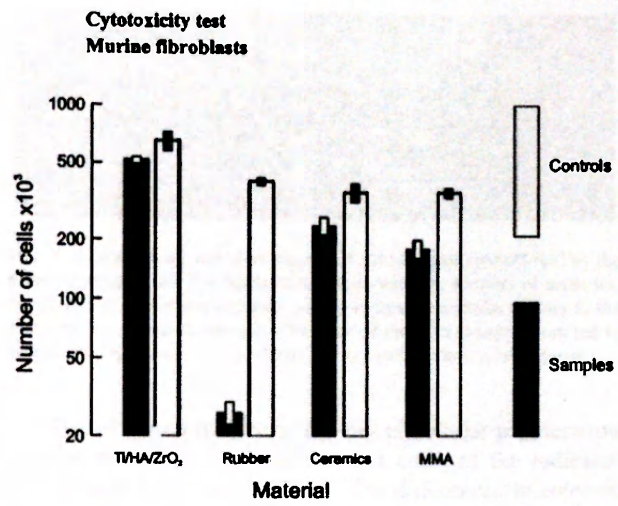


FIG. 4. Cytotoxicity test—murine fibroblasts. The growth of the murine fibroblasts with (black columns) and without (white columns) tested materials was compared. Statistical significant differences between evaluated samples and their controls are marked with asterisk. The best results were obtained for the modified titanium samples with zirconia and hydroxyapatite ($Ti/HA/ZrO_2$); MMA is the abbreviation for the methylmetacrylate sample.

high film thickness (100–300 μm), high film porosity, and high substrate attachment. The coating created by plasma spraying is very granular but with low intergrain attachment. The high film porosity improves the osseointegration but reduces the intergrain and metal-ceramic attachments. The pulsed laser deposition has certain advantages. It creates a crystalline layer with strong intergrain attachment. Hydroxyapatite bonds well to the metal surface and the coating is evenly spread. However, the deposition of larger grains has not been achieved. Nevertheless, it is necessary to develop a high porosity coating for attachment to the bone.[8]

B. Cytotoxicity of the studied material

We have confirmed that the studied material with the crystalline HA coating and the interlayer from zirconia is not cytotoxic. The number of cells that were growing in the presence of the tested material was compared with the number of cells in the control wells without the materials. For both types of tested cells the best results were obtained with titanium samples coated with HA and zirconia (Figs. 4 and 5). As calcium hydroxyapatite is the most stable calcium phosphate in contact with the body, laser deposition research is directed towards the creation of crystalline HA.[11] Zirconia ceramic has a better mechanical quality than other types of ceramics used for medical needs. The mechanical characteristics depend on raw materials and on the procedures used in component processing. Biological tests made *in vitro* show that zirconia powder or ceramics are not cytotoxic. None of the cytotoxic or general reactions were observed in relation to this material,[17] which support our outcomes.

Fibroblasts are known to quickly adhere to the bottom of the culture well, so after 24 h of cultivation the targets could be added to the cells. When the coated titanium and ceramic targets were inserted, the morphology of the cells did not change [Figs. 6(a) and 6(b)] in their surroundings. Fibro-

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

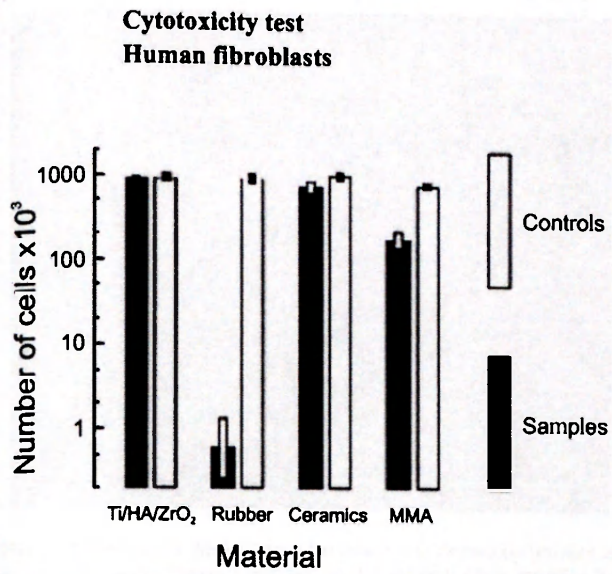


FIG. 5. Cytotoxicity test—human fibroblasts. The growth of the human fibroblasts with (black columns) and without (white columns) tested materials was compared. Statistical significant differences between evaluated samples and their controls are marked with asterisk. The best results were obtained from modified titanium samples with zirconia and hydroxyapatite ($Ti/HA/ZrO_2$) and were comparable with ceramic samples. MMA is the abbreviation for the methylmetacrylate sample.

blasts rapidly proliferated, resulting in subconfluent or almost confluent growth. In the surroundings of the rubber samples not only did the cells fail to divide but also changed their morphology and died and became detached from the bottom [Fig. 6(c)]. Red rubber is absolutely cytotoxic and the monomer released from the dental resin stunts the growth of the cells.

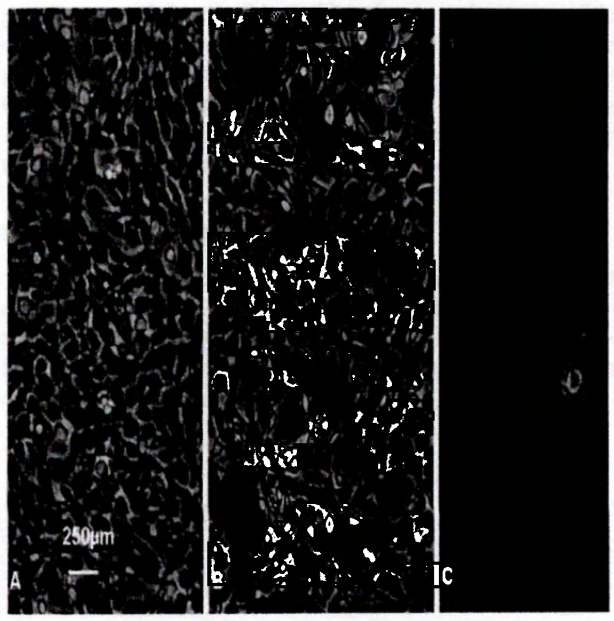


FIG. 6. The human fibroblasts in the surroundings of the titanium sample (a) coated by zirconia and hydroxyapatite grew confluently without any change of morphology as well as fibroblasts in the surroundings of ceramic target (b). Inactive human fibroblasts in the well with the red rubber sample (c), not only the cells fail divide, but also they changed their morphology and died, detaching from the bottom.

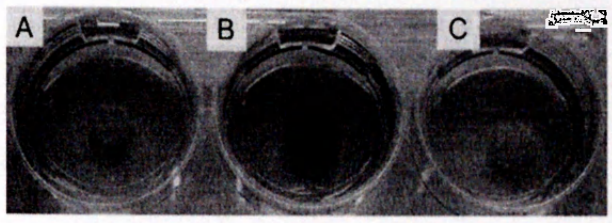


FIG. 7. (Color online) The color change of *p*H indicator (phenol red) by the metabolization of the fibroblasts in the wells with the samples of ceramics, resin, and red rubber and controls. Severe reduced metabolic activity in the dish with the red rubber sample. The color of medium changed from red to yellow [(a) ceramics, (b) red rubber, and (c) methylmetacrylate sample].

The increased metabolic activity of cellular proliferation reduced the *p*H of the medium and changed the indicator (phenol red) from red to yellow. The differences in color of the culture medium in the dishes with the ceramics, resin, and red rubber samples are shown in Fig. 7. A severely reduced metabolic activity in the dish with the red rubber sample is obvious (Fig. 7).

Statistical significant differences occur in both murine and human fibroblasts in the samples from methylmetacrylate(MMA) and red rubber when compared with the controls. The results obtained from the ceramic samples show no toxic effects on the human fibroblasts which correspond well with the use of ceramics in human medicine (Fig. 5). In contrast to human fibroblasts the proliferation activity of the murine fibroblasts decreases in the presence of ceramic targets (Fig. 5). Student's *t*-test at probability level of 0.05 was used to evaluate the differences of the component materials. In the case of murine fibroblasts statistically significant differences were found among all tested materials. On the other hand, using human fibroblasts no statistically significant differences appeared between titanium and ceramic targets. These outcomes show that any tested materials need to undergo an assessment with cells of the species the material is intended to be used in. The reaction of the cells to external material is species specific. Therefore the surface quality tests were provided only with the human fibroblasts.

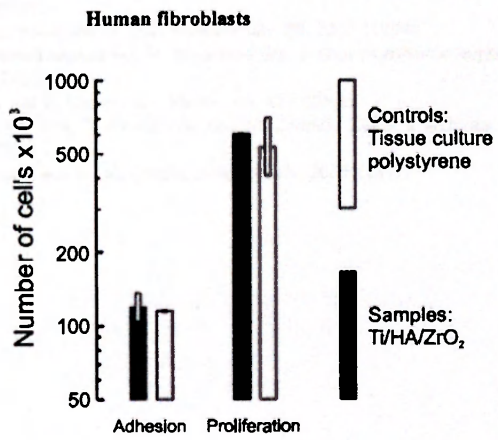


FIG. 8. Adhesion and proliferation of human fibroblasts on the surface of modified titanium target (black columns). The results are compare well with the growth of cells on tissue grade polystyrene (white columns). $Ti/HA/ZrO_2$ marks titanium modified with zirconia and hydroxyapatite

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

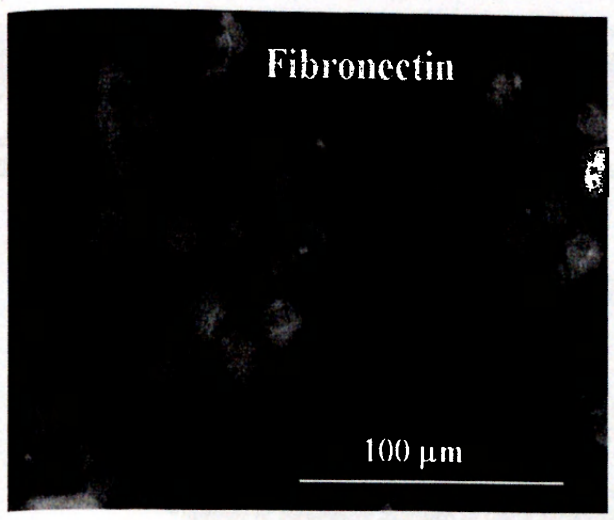


FIG. 9. (Color online) We confirmed the presence of fibronectin (marked in green color) in the human fibroblasts on the titanium target modified by zirconia and hydroxyapatit after 48 h cultivation (fluorescence microscope). In the photo the blue color marks the DAPI staining of the fibroblast nuclei.

C. Surface quality tests: Test of adhesion and proliferation

To test the characteristics of the titanium target's surface for cells we inoculated 50 000 human fibroblasts/cm^2 for adhesion and 10 000 human fibroblasts/cm^2 for proliferation. The quantity of cells harvested from the titanium target was compared with the quantity obtained from the same area of tissue grade polystyrene. Student's *t*-test was used at a probability level of 0.05. The test results show (Fig. 8) that the titanium target modified with HA and zirconia is at least as effective as the tissue grade polystyrene for adhesion and proliferation of the fibroblasts. This fact promises a possible way toward other research in dental implantology because perfect adhesion and proliferation of the cells are necessary for successful implantation. Our findings are in agreement with data published by Dion and Li, who used SEM to study the attachment and spreading of the murine fibroblasts.[17]

D. Fibronectin expression

The targets were impermeable to light so the growth and morphology of the cells could not be monitored with an optical microscope while being cultured. Using immunohistochemical staining enabled us to visualize the cells' growth on the surface of the targets.

Fibroblasts cultured for 72 h were spread well and created subconfluent growth. They expressed fibronectin in cytoplasm, which was stained a green color (Fig. 9). At that time no extracellular deposition of fibronectin was observed.

IV. CONCLUSION

Our main finding is that the surface quality test has proven that the samples of an implant with HA and the interlayer of zirconia produced by the pulsed laser deposition are readily colonized by murine and human fibroblasts. No cytotoxic effects have been found during our direct test of cytotoxicity.

The samples with various modifications could be used for other researches as well as open the possibility of its implantation into the bone. The pulsed laser deposition seems to be a promising method of coating the thin layers of zirconia and HA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Studnicka and K. Jurek for XRD, SEM, and WDX measurements, Dr. L. Mrklas for statistic evaluation, and M. Capová, E. Vancova, and P. Masinova for technical assistance. This research has been supported by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. 8512-3.

[1] I. Ericsson, K. Randow, and K. Nilner, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 2, 70 (2000).
[2] S. Szmukler-Moncler, A. Piatelli, G. A. Favero, and J. H. Dubrille, Clin. Oral Implants Res. **11**, 12 (2000).
[3] S. Szmukler-Moncler, H. Salama, Y. Reingerwirtz, and J. H. Dubruille, J. Biomed. Mater. Res. **43**, 192 (1998).
[4] L. Jonášová and J. Strnad, Chem. Listy **94**, 775 (2000).
[5] D. Kopecká and A. Šimůnek, Cesk Stomatol. **1**, 29 (2000).
[6] W. R. Lacefield, Implant Dent. **7**, 315 (1998).
[7] J. L. Ong and D. C. N. Chan, Crit. Rev. Biomed. Eng. **28**, 667 (1999).
[8] L. Torrisi, S. Trusso, G. Di Marco, and P. Parisi, Phys. Medica **10**, 227 (2001).
[9] L. Himmlová, T. Dostálová, M. Jelínek, and C. Grimas, Cesk Stomatol. **6**, 224 (1999).
[10] M. Katto, M. Nakamura, T. Tanaka, and T. Nakayama, Appl. Surf. Sci. **197**, 768 (2002).
[11] M. Jelínek *et al.*, Thin Solid Films **257**, 125 (1995).
[12] A. Šimůnek, J. Vokurková, and D. Kopecká, Clin. Oral Implants Res. **13**, 75 (2002).
[13] P. Ducheyne and Q. Qiu, Biomaterials **20**, 2287 (1999).
[14] N. Lumbikanonda and R. Sammons, Int. J. Oral Maxillofac Implants **16**, 627 (2001).
[15] Chou and E. Chany, Scr. Mater. **45**, 487 (2001).
[16] L. Himmlová, T. Dostálová, and M. Jelínek, Lékař a technika. 6. 126 (1999).
[17] C. Piconi and G. Maccauro, Biomaterials **20**, 1 (1999).

Downloaded 31 Jan 2006 to 147.231.27.22. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jap.aip.org/jap/copyright.jsp

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT

ELSEVIER

Biomolecular Engineering xxx (2006) xxx–xxx

Biomolecular Engineering

www.elsevier.com/locate/geneanabioeng

Study of laser created ZRO_2 and hydroxyapatite/ZrO_2 films for implantology

M. Jelínek [a,b,*], T. Dostálová [c], Z. Teuberová [c], M. Seydlová [c], P. Mašínová [a], T. Kocourek [a], W. Mróz [d], A. Prokopiuk [d], K. Smetana [e]

[a] Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic
[b] Institute of Biomedical Research of Czech Technical University, Nám. Sítná 3105, 27201 Kladno, Czech Republic
[c] Department of Stomatology, 1st Medical Faculty, Charles University, Kateřinská 32, Prague 2, Czech Republic
[d] Institute of Optoelectronics, MIT, 2 Kaliski Str., 01-489 Warsaw 49, Poland
[e] Institute of Anatomy, 1st Medical Faculty, Charles University, U nemocnice 3, 128 00 Prague 2, Czech Republic

Abstract

Thin films of ZrO_2 and hydroxyapatite/ZrO_2 were created by excimer laser ablation on Ti6Al4V substrates. ZrO_2 layers were fabricated in vacuum by KrF laser at various substrate temperatures and hydroxyapatite (HA) layers were fabricated in water vapor ambient by ArF laser and in water vapor/argon ambient by KrF excimer laser. Film properties were evaluated by XRD, SEM and WDX methods. The test of mechanical adhesion was proceeded on ZrO_2 films. XRD analysis proved the presence of amorphous or crystalline HA in the deposited films. SEM method demonstrated smooth surface covered by droplets for both HA and ZrO_2 films. Ca/P ratio of the HA films is higher than that of the natural HA and is within the range of 2.8–3.0. The HA/ZrO_2 and ZrO_2 samples were tested in vitro for cytotoxicity. The best results were received by the HA/ZrO_2 samples in the test of cytotoxicity. Fibroblasts cultivating with HA/ZrO_2 samples exhibited subconfluent and confluent growth and showed fibronectin homogenously.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Hydroxyapatite; Pulsed laser deposition; X-ray diffraction analysis

1. Introduction

Hydroxyapatite [HA; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] ceramics have been recognized as substitute materials for teeth in dentistry for long time. The method of pulsed laser deposition (PLD) was successfully used to create HA coatings and these were studied in vitro and in vivo (Jelínek et al., 1995, 1996; Dostálová et al., 2001). HA-coated implants have shown good fixation to the host bones and increased bone ingrowth into the implants. However, there are still many concerns about the application of HA coatings due to their poor mechanical stability. Some previous studies have shown that mechanical properties of HA coatings can be improved by adding ZrO_2. One of the approaches is to create HA/ZrO_2 composite coatings. HA coating reinforced by zirconia shows better dissolution behavior while tested in vitro than HA coating (Chang et al., 1997). Alternatively, HA/ZrO_2 coatings are fabricated with the ZrO_2 layer as a bond coat (Chou and Chang, 1999, 2002).

Zirconia (ZrO_2) is used to strengthen the brittle materials due to its good mechanical properties, especially strength, toughness and high Young's modulus. Zirconia at various forms has been studied of biocompatibility by many authors. Several reports evaluating zirconia in vitro were published (Piconi and Maccauro, 1999). Calcium partially stabilized zirconia (CaYPSZ) was studied by SEM in presence of 3T3 fibroblasts (Tateishi et al., 1994). Adhesion and spreading of cells was observed and a cell monolayer was created. By test of cell viability and MTT assay, biocompatibility of zirconia and yttrium partially stabilized zirconia (YPSZ) was examined (Davidson et al., 1992; Li et al., 1993). In both cases no cytotoxic effect was analyzed. No toxic effects on cell cultures of 3T3 fibroblasts were also shown while testing YPSZ in the indirect contact, cell viability and MTT assay (Dion et al., 1994). While cultivating YPSZ with human oral fibroblasts, ion release was observed and toxicity was related to the release (Bukat et al., 1990). In vivo, different zirconia materials in many various physical forms such as pellets, bars or cylinders

* Corresponding author. Tel.: +420 2 6605 2733; fax: +420 2 8689 0527.
E-mail address: jelinek@fzu.cz (M. Jelínek).

1389-0344/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biocng.2006.05.019

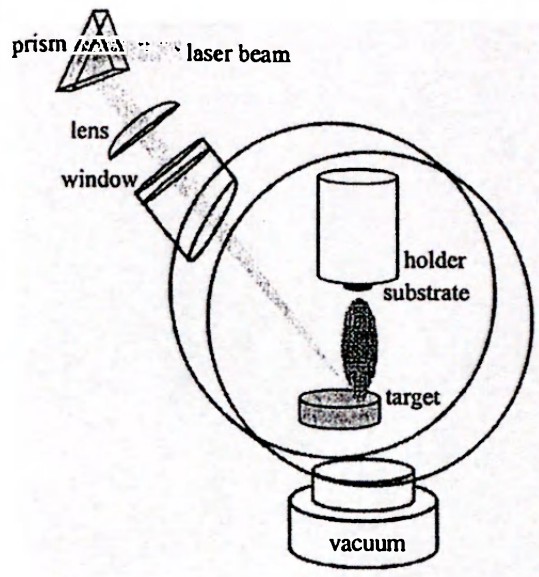


Fig. 1. Experimental set-up of ZrO_2 film deposition.

were implanted in bone or soft tissues (Piconi and Maccauro, 1999). In general, no adverse responses were analyzed. In the early postoperative phase, connective tissue between bone and ceramic was usually observed.

This contribution is oriented to study thin ZrO_2 and HA layers created by PLD. Results of physical, mechanical and biomedical in vitro tests in connection with deposition conditions are presented.

2. Experimental details

For layer deposition ArF and KrF excimer lasers were used. Zirconia oxide films were fabricated by KrF laser deposition (LUMONICS PM 842, repetition rate of 10 Hz, output energy of 450 mJ). Target was fixed in the distance of 4 cm from the substrate (Fig. 1). Laser energy density on the target was 4 J cm^{-2}. Layers were fabricated onto titanium alloy Ti6Al4V substrates (diameter of 10 or 12 mm and thickness of 2 mm) at three substrate temperatures: 20, 400 and 700 °C. Before the deposition the substrates were cleaned in acetone, toluene and in ethylacohol. The ZrO_2 films, which were supposed to be buffer layers for HA/ZrO_2 coatings, were fabricated only at room temperature. Thickness of buffer layers was 100 nm (4000 laser pulses).

Two sets of HA layers were fabricated on ZrO_2/Ti6Al4V substrates – one set of layers was created by ArF (193 nm output wavelength) and the second by KrF (248 nm) laser deposition. The first set was created at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm^{-2} – see set-up in Fig. 2. The deposition was proceeded in the H_2O atmosphere at the pressure of 50 Pa. The target was fixed in the distance of 3 cm from the HA substrate and heated up to 600 °C (Fig. 2). The second set of HA layers was fabricated by KrF deposition again on ZrO_2/Ti6Al4V substrates at 600 °C of substrate temperature. Energy density was 3 J cm^{-2}, target-substrate distance of 6 cm, and argon + water pressure of 40 Pa (Ar/water = 0.8).

Film thickness was measured by mechanical profilometer Alpha Step 500. Crystalline structure of the deposited HA/ZrO_2 films was characterized by X-ray diffraction analysis (XRD). Parallel beam optics geometry with a Huber two circle diffractometer, powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, Cu Kα radiation) was used. Film morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JXA 733) using 15 kV electron beam and 400× magnification. The Ca/P ratio was studied using an electron microprobe and wavelength dispersive X-ray analysis (WDX). Single ZrO_2 films were tested of adhesion by scratch and indentation tests. In the scratch test the load was increasing from 0 to 50 N. The indentation test was carried out by a Rockwell cone indenter at load of 1470 N.

3. Results and discussion

3.1. Physical and mechanical analysis

All ZrO_2 layers fabricated at three various substrate temperatures were amorphous. Film surface was smooth covered with small droplets (see Fig. 3). Adhesion, exhibited as critical normal force, was in the range 3.0–9.5 N. Maximum force was for samples deposited at 400 °C. Example of abrasion trace is in Fig. 4. No cracks in ZrO_2 layers were observed for films created at 20 °C. The film deposited at 700 °C exhibited radial cracks and the indentation in films created at 400 °C formed concentric circles around the puncture (Fig. 5).

The HA layers created by ArF excimer laser were crystalline (see Fig. 6), and layers created by KrF laser were amorphous and only partly crystalline. The reason can be not only in laser deposition wavelength, but also in energy density and ambient atmosphere. Example of HA film morphology is in Fig. 7. The Ca/P ratio of the films was ~3.0. Content of calcium in droplets was lower (Ca/P: ~2.8).

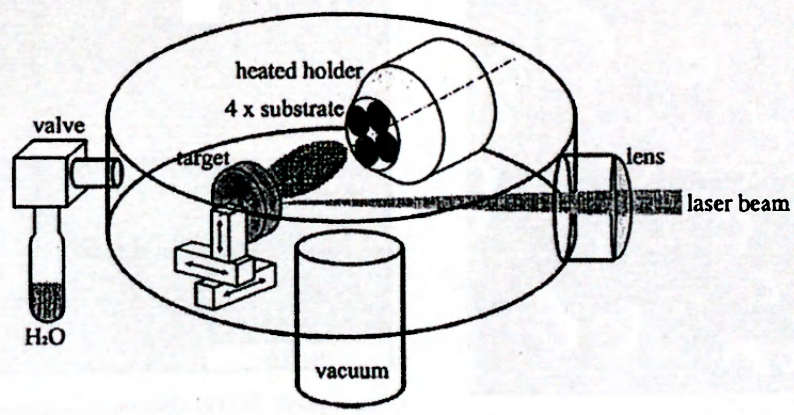
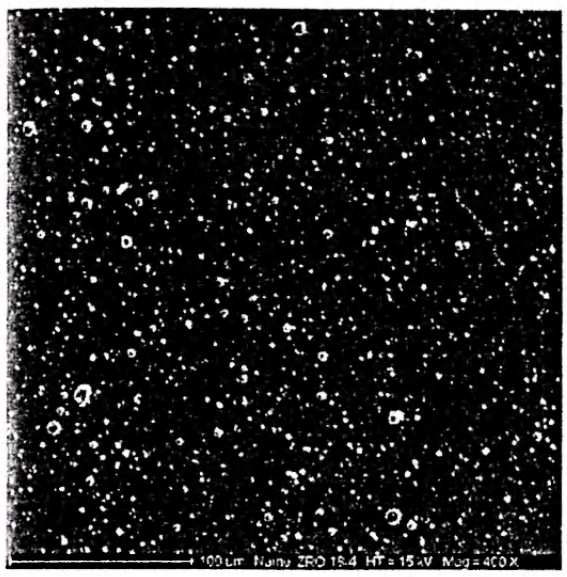


Fig. 2. Experimental set-up of HA film deposition.

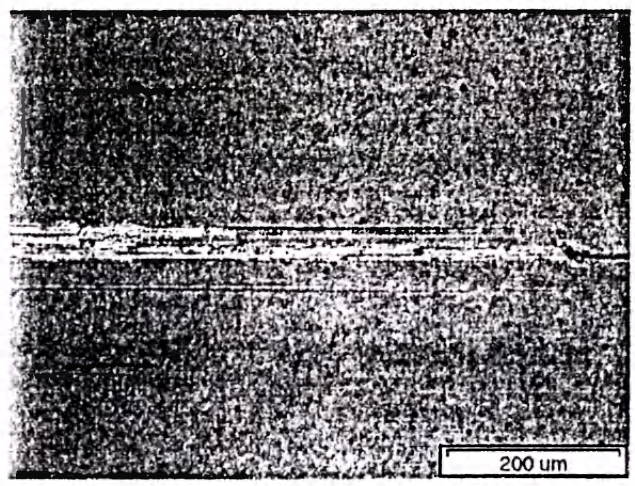


ig. 3. Film morphology by SEM of ZrO_2 coating (magnification 400×)—ample ZRO-18 (ZRO-18 deposited by KrF laser at the repetition rate of 10 Hz, he output energy of 450 mJ, the energy density of 4 J cm^{-2} and the substrate emperature of 20 °C).

.2. *Biological tests of HA/ZrO_2 coatings*

Direct test of cytotoxicity was used to evaluate the iocompatibility of HA/ZrO_2 samples. Mice line and human ibroblasts were cultivated in the presence of different materials ncluding the studied samples. The Noritake ceramics was used s a positive control and two materials as a negative control—a ample of red artificial rubber and a sample of dental resin uperpont C + B. The best results were reached for the HA/ rO$_2$ samples. (Table 1) No morphology changes were bserved during cultivation. The cytotoxicity of the HA/ rO$_2$ samples was not proved.

In the test of attachment, amounts of attached fibroblasts nto the surface of the sample and onto the bottom of the dish



ig. 4. Scratch test of ZrO_2 coating—sample ZRO-19 (ZRO 19 deposited by rF laser at the repetition rate of 10 Hz, the output energy of 450 mJ, the ergy density of 4 J cm^{-2} and the substrate temperature of 400 °C).

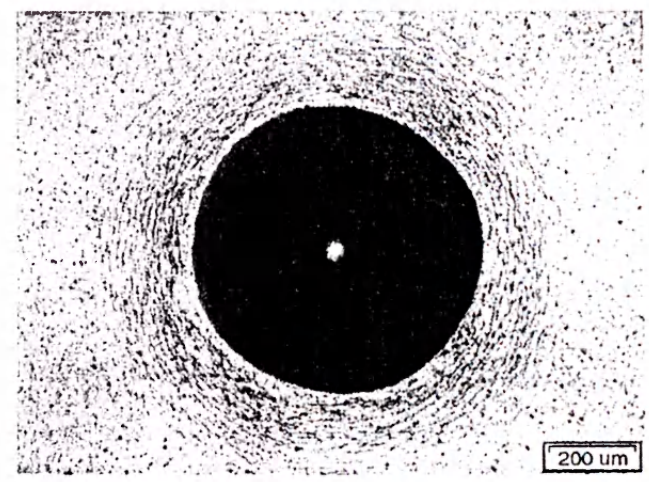


Fig. 5. Indentation test of ZrO_2 coating—sample ZRO-19.

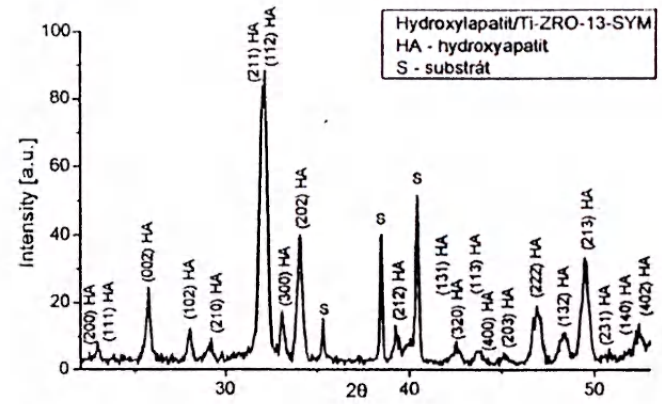


Fig. 6. XRD spectrum of HA/ZrO_2 coating—sample ZRO-13 (ZRO-13 deposited by ArF laser at the repetition rate of 50 Hz, the output energy of 330 mJ and the energy density of 6 J cm^{-2}).

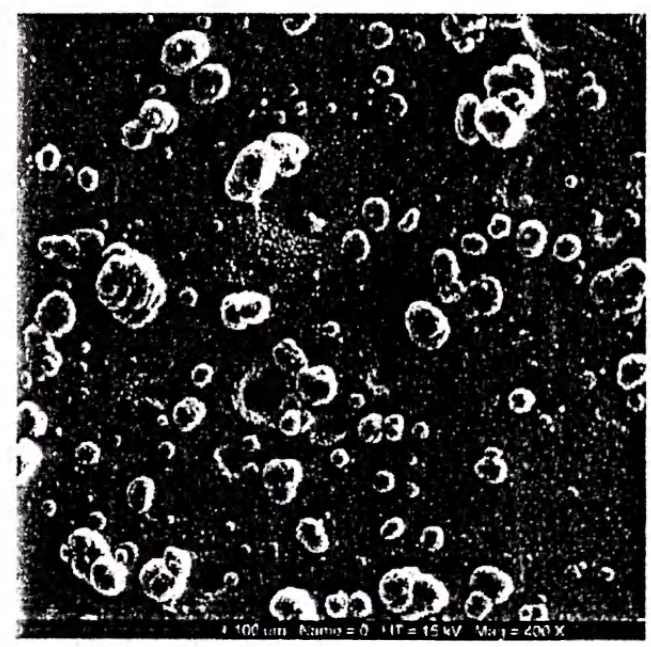


Fig. 7. Film morphology of HA/ZrO_2 coating by SEM (magnification 400×)—sample ZRO-13.

Table 1
Test of cytotoxicity of HA/ZrO_2 coatings (samples 1–3 deposited by ArF laser at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm^{-2})

Material	Proportional number of cells (%)							
	Mice fibroblasts				Human fibroblasts			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average value	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average value
HA/ZrO_2	81	71	81	78	98	89	95	94
Red rubber	9	9	6	8	0	0	0	0
Ceramics	50	82	63	65	58	74	89	74
Resin	47	28	54	43	30	25	21	25

Table 2
Tests of attachment and spreading of HA/ZrO_2 coatings (sample deposited by ArF laser at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm^{-2})

Test	Count of cells (1000×)		
	Sample surface	Sample surroundings	Control cultivation
Attachment	58.5	51.5	130.0
Spreading	333.0	378.0	713.0

were numbered in the Burker counting cella in an optical microscope. Human fibroblasts were plated at a density of 1×10^5 cells per ml into the plates containing the HA/ZrO_2 samples. The cells were cultivated in an incubator at the temperature of 37 °C, at 3.3% pressure of CO_2 and at 100% humidity in H-MEMd medium. Dishes without samples were used as control. After 24 h of cultivation, there were 53% of cells attached onto the surface of the sample and 47% of cells attached onto the bottom of the dish. Total amount of the attached cells fits well with that of control cultivation (Table 2).

In the test of spreading, the human fibroblasts were cultivated for 96 h. The fibroblasts were plated at the density of 20,000 cells/ml in 1 ml volume of cultivating medium to the HA/ZrO_2 samples. Cultivation proceeded for 96 h, at the temperature of 37 °C, at 3.3% pressure of CO_2 and at 100% humidity. Each test has its own control with no samples. There was 47% growth of the cells on the surface of the sample and 53% growth of the cells in the surroundings (Table 2). The sum of the cells on the sample and in its surroundings is well comparable with the number of cells in the control cultivation.

Two of the HA/ZrO_2 samples were separated after 72 h of the cultivation processed in the test of spreading to study the immuno-histochemical reaction. The fibroblasts created subconfluent and confluent growth.

4. Conclusions

Thin films of HA were grown by pulsed laser deposition on the titanium alloy Ti6Al4V with intermediate ZrO_2 buffer layers. For HA deposition ArF and KrF excimer lasers were used. Films were crystalline or amorphous depending on deposition conditions. Scanning electron microscopy demonstrated smooth surface covered by droplets with the diameters of 5–20 μm in case of HA/ZrO_2 films and of 1 or 2 μm in case of single ZrO_2 films. The Ca/P ratio of crystalline HA films was higher than that of natural HA and it differed within the range of 2.8–3.0. Single ZrO_2 films were tested of adhesion. In the scratch test, maximum value of critical normal force was measured for ZrO_2 film deposited at 400 °C. The indentation test showed different reaction of the ZrO_2 samples. For ZrO_2 film deposited at 20 °C no cracks were observed while for films deposited at higher temperature the cracks were observed. Biocompatibility of the HA/ZrO_2 films was the best of all tested samples. After 24 h the test of attachment showed that 53% of cells have attached on the surface of the sample and 47% of cells have attached in the surroundings. The test of spreading showed the 47% growth of the cells on the surface of the sample and the 53% growth of the cells in the surroundings. The fibroblasts created subconfluent and confluent growth and showed fibronectin homogenously.

Acknowledgements

This project was supported by the GA ASCR, Project No. A1010110 and IGA No. 8512-3. Our thanks should be also expressed to CTU Research Project No. 6640770030 and No. 88/1.

References

Bukat, A., Fassina, P., Greco, F., Piantelli, S., Piconi, C., Zaghini, N., 1990. In: Hulbert, J.E., Hulbert, S.F. (Eds.), Bioceramics, vol. 3. Terre Haute, pp. 355.
Chang, E., Chang, W.J., Wang, B.C., Yang, C.Y., 1997. J. Mater. Sci. Mater. Med. 8, 201.
Chou, B.Y., Chang, E., 1999. Biomaterials 20, 1823.
Chou, B.Y., Chang, E., 2002. Surf. Coat. Technol. 153, 84.
Davidson, J.A., Mishra, A.K., Poggie, R.A., Wert, J.J., 1992. In: Proceedings of the Transaction of 38th ORS. p. 404.
Dion, I., Bordenave, L., Lefebvre, F., 1994. J. Mater. Sci. Mater. Med. 5, 18.
Dostálová, T., Himmlová, L., Jelínek, M., Grivas, C., 2001. J. Biomed. Opt. 6 (2) 239.
Jelínek, M., Olšan, V., Jatrabík, L., Studnička, V., Hnatowicz, V., Kvítek, J., Havránek, V., Dostálová, T., Zergioti, I., Petrakis, A., Hontzopoulos, E., Fotakis, C., 1995. Thin Solid Films 257, 125.
Jelínek, M., Dostálová, T., Fotakis, C., Studnička, V., Jatrabík, L., Havránek, V., Grivas, C., Hnatowicz, V., Kadlec, J., Patentalaki, A., Peřina, V., Pospíchal, M., 1996. Laser Phys. 6 (1) 144.
Li, J., Liu, Y., Hermansson, L., 1993. Clin. Mater. 12, 197.
Piconi, C., Maccauro, G., 1999. Biomaterials 20, 1.
Tateishi, T., Hyodo, K., Kondo, K., Miura, K., 1994. Mater. Sci. Eng. C1, 121.