

# Recenzované vědecké články

## Výzkum a vývoj technologické aplikace mikroobloukové oxidace titanové slitiny Ti6Al4V

### Research and Development of Technological Application of Microarc Oxidation of Titanium Alloy Ti6Al4V

Ing. Roman Gabor, Ph.D.<sup>1</sup>; Ing. Karel Malaník, CSc.<sup>2</sup>; Ing. Jaroslav Marvan<sup>3</sup>; Bc. Martina Doubková<sup>4</sup>; RNDr. Martin Pařízek, Ph.D.<sup>4</sup>; doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.<sup>4</sup>; Ing. Klára Drobíková<sup>5</sup>

<sup>1</sup> VÚHŽ a.s., 739 51 Dobrá, Česká republika

<sup>2</sup> MATERIÁLOVÝ A METALURGICKÝ VÝZKUM s.r.o., Pohraniční 693/31, 706 02 Ostrava-Vítkovice, Regionální materiálově technologické centrum, detašované pracoviště VÚHŽ a.s., 739 51 Dobrá, Česká republika

<sup>3</sup> MEDIN, a.s., Vlachovická 619, 592 31 Nové Město na Moravě, Česká republika

<sup>4</sup> Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, Praha 4 – Krč, Česká republika

<sup>5</sup> Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, Centrum nanotechnologií, 17. listopadu 15/2172, 708 33 Ostrava-Poruba, Česká republika

*Vývoj keramických vrstev na slitinách titanových implantátů s žádoucí kombinací mechanických vlastností a biokompatibility může výrazně zlepšit funkčnost a aplikaci jejich povrchů ve využití ortopedických a traumatologických implantátů. Předkládaná práce popisuje možnosti využití mikroobloukové oxidace (MAO) titanové slitiny Ti6Al4V za účelem dosažení charakteristického povrchu s požadovanými vlastnostmi, žádaným chemickým složením, morfologií, smáčivostí, drsností, korozní odolností a adhezí buněk. V rámci vývoje technologie procesu MAO byly stanoveny parametry potřebné k dosažení keramické vrstvy, která má hydrofilní charakter. Takto připravené povrchy byly následně modifikovány s využitím tridecafluorooctyltriethoxysilanem (FAS) za účelem dosažení hydrofobního povrchu. Bylo zjištěno, že tyto vyvíjené povrchové modifikace slitiny Ti6Al4V procesem MAO a následně upravené pomocí FAS, podporují adhezi a růst lidských kmenových buněk v rozsahu jejich možného využití pro traumatologické a ortopedické implantáty s požadovanou osteointegrací.*

**Klíčová slova:** mikrooblouková oxidace; keramický povlak; anodická oxidace; povrchová modifikace; titanová slitina; korozní odolnost

*Development of ceramic layer on alloys of titanium implants with a desirable combination of mechanical properties and biocompatibility can significantly improve the functionality and application of their surfaces in the areas of orthopaedic and traumatological implants. The presented paper describes the possibilities of usage of microarc oxidation (MAO for titanium alloy Ti6Al4V in order to achieve the characteristic surface with the desired properties of its chemical composition, morphology, wettability, surface roughness, corrosion resistance and adhesion of the cells).*

*The results have revealed the possibility of using the MAO technique for the achievement of the porous ceramic double layer with different thickness of inner and outer layer. Within the development of technology of the MAO process conditions there were determined the parameters required for obtaining of ceramic layer that had a hydrophilic character. Thus prepared surfaces were subsequently modified with the application of tridecafluorooctyltriethoxysilane (FAS) in order to achieve hydrophobic surface. It was found that these surface modifications of Ti6Al4V alloy developed by the MAO process and subsequently modified with FAS supported the adhesion and growth of human stem cells in the range of their possible use for traumatological and orthopaedic implants with the required osteointegration. Surface treatment by MAO process has also a very positive impact on the corrosion resistance of Ti6Al4V alloy.*

**Key words:** microarc oxidation; ceramic coating; anodic oxidation; surface modification; titanium alloy; corrosion resistance

Titan a jeho slitiny mají v současné době nezastupitelnou roli ve využití stomatologických a ortopedických implantátů, a to především z důvodu jejich vysoké korozní odolnosti, biokompatibility a schopnosti osteoin-

tegrace. S cílem zvýšit jejich bioaktivitu jsou povrchy titanových implantátů modifikovány řadou technik zahrnujících chemickou, termickou a elektrochemickou úpravu [1 – 3]. Za relativně novou metodu umožňující povrchovou modifikaci titanu a jeho slitin, jakož i lehkých kovů (Al, Mg) je považována metoda mikroobloukové oxidace (MAO), někdy také nazývaná plazmatická elektrolytická oxidace (PEO) [4].

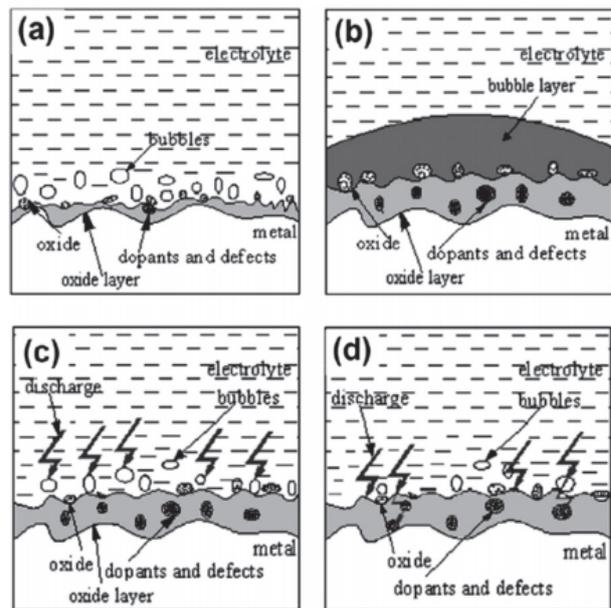
Uvedená technologie, umožňující povrchovou modifikaci titanu a lehkých kovů a jejich slitin, zahrnuje kombinaci aplikace vysokého napětí, elektrochemické oxidace a termální difuze v elektrolytu za vzniku keramického povlaku. Vlastnosti modifikovaných povrchů s využitím MAO jsou závislé na volbě experimentálních podmínek a elektrolytu. Povrchové vrstvy mohou dosahovat významně vyšší tvrdosti (např. 400 až 700 HV), odolnosti proti korozi a opotřebení [5].

V průběhu procesu MAO dochází ke změnám intenzity plazmatického výboje, ovšem detailní mechanismus procesu zatím nebyl popsán. Existuje však značná shoda, že v průběhu procesu působení střídavého proudu (AC) dochází k vývoji několika základních etap, které jsou níže popsány a uvedeny na obr. 1 [6].

- Napětí vykazuje rychlý a lineární nárůst v čase až k tzv. průrazovému napětí. Některé malé bublinky kyslíku a vznik oxidické vrstvy lze pozorovat na povrchu vzorku, což odpovídá klasické elektrochemické anodizaci.
- Při dosažení určité hodnoty vysokého napětí (v závislosti na elektrolytu) k překročení kritické hodnoty a k tzv. dielektrickému průrazu, který je pozorovatelný vývojem „sparkového“ výboje (pozorovatelná jiskra). V této fázi se proud koncentruje pouze v určitých oblastech, což vede pouze k lokalizovanému nárůstu tloušťky povlaku. Nově vytvořený povlak může opětovně odolávat proti působícímu proudu, zatímco v jiných oblastech, kde je odpor menší, dochází k opětovnému průrazu. V této fázi dochází souběžně s pronikavým zvukem k vývoji většího počtu jisker, které jsou náhodně distribuovány a rychle se pohybují po celém povrchu anody.
- Vývin a působení plynu na povrchu anody a v elektrolytu přímo souvisí s tvorbou keramické vrstvy. K průrazu povlaku dochází vždy na místě s menším odporem rostoucí oxidické vrstvy. S nárůstem procesního času dochází k zintenzivnění výboje a jeho postupným barevným změnám od bílé až po oranžovou nebo červenou. V takovýchto oblastech se mikrooblouky transformují do silného oblouku.

Intenzivní „spark“, resp. jiskření a uvolňování plynů probíhá souběžně s vývojem velkých pórů a tepelného štěpení povrchového filmu. Spolu se zánikem jisker plynových bublin dochází k poklesu proudu, což indikuje konec procesu. Architektura povlaku vytvořeného mikroobloukovou oxidací je dvouvrstvá: jedná se o přechodovou tvrdou vrstvu a vnější porézní vrstvu s mnoha jemnými dutinami. Tloušťka povlaku v závislosti

na anodizovaném materiálu a použitím elektrolytu se pohybuje od 1 do 100  $\mu\text{m}$ .



Obr. 1 Schematická ilustrace plazmatického výboje během jednotlivých stupňů mikroobloukového procesu  
Fig. 1 Schematic illustration of plasmatic arc during particular steps of microarc process

MAO anodizace je považována za technologii vysoce ekonomicky efektivní vzhledem k nízkým provozním nákladům. Nelze také odhlédnout od skutečnosti, že je to nízkoodpadová technologie [7].

## Metody a postupy

Pro účely aplikace MAO anodizace a získání modifikovaného povrchu byly použity vzorky titanové slitiny Ti6Al4V o průměru 15 mm a tloušťce 2,6 mm a hřeby rekonstrukční. Fyzikální, chemické a buněčné testy byly provedeny na vzorcích, které byly připraveny metodou MAO v silně alkalických elektrolytech s označením El. 1 a El. 1-FAS. Po mechanické předúpravě povrchu, která byla detailně popsána v předchozím článku [8], byly povrchy vzorků anodicky modifikovány při proudové hustotě  $80 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  po dobu 30 min. Vzorky s označením El. 1-FAS byly po aplikaci MAO máčeny v roztoku etanolu s 1,0 hm. % tridecafluorooctyltriethoxysilanem (FAS) za účelem snížení povrchové energie s cílem dosáhnout hydrofobního povrchu. U vzorků byla po aplikaci procesu MAO upravena morfologie povrchů s cílem dosáhnout sjednocení povrchů s požadovanými parametry drsnosti. Na takto připravených vzorcích byly provedeny buněčné testy.

## Omílání anodicky připravených povrchů

K omletí zkušebních vzorků s anodizovanými povrchy byla použita žlabová odstředivá omílací technologie od firmy OTEC s keramickými tělísky (ZS 2/5) po dobu 20 min. (tento parametr byl korigován na základě díčích výsledků).

### Skenovací elektronový mikroskop s energiově disperzním analyzátozem (SEM/EDX)

Pro stanovení detailního rozboru topografie povrchu a jeho chemického složení byl využit rastrovací elektronový mikroskop (REM) Quanta 450 FEG (FEI Company, USA) s autoemisním zdrojem, který umožňuje generovat a snímat dostupné informace z povrchů vodivých a nevodivých materiálů. Plná integrace REM s mikroanalytickým systémem TRIDENT-APEX 4 umožňuje celý systém provozovat v jednom uživatelském rozhraní. Integrovaný systém se skládá z energiově disperzního analyzátoru (EDX), vlnově disperzního analyzátoru (WDX) a techniky difrakce zpětně odražených elektronů (EBSD) a umožňuje na povrchu studovaného vzorku provést lokální chemickou analýzu. Tloušťky povlaků byly hodnoceny na metalografického řezu pomocí softwaru SCANDIUM.

### Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Vzorky z důvodu hodnocení topografie povrchů byly hodnoceny pomocí techniky AFM na zařízení SolverNEXT v tzv. kontaktním módu (hrot je vtačován do vzorku). Povrchy byly zobrazovány v osách  $x$  a  $y$ :  $50 \times 50 \mu\text{m}$ .

### Stanovení kontaktního úhlu a povrchové energie

Kontaktní úhel byl měřen na přístroji Krüss DSA 100 (Krüss GmbH, Německo). K měření byly použity dvě kapaliny: destilovaná voda a etylenglykol. Měření bylo provedeno pomocí kapek o objemu  $3 \mu\text{l}$  na 7 různých místech na vzorku. K měření byl použit 1 vzorek pro každou kapalinu. K vyhodnocení kontaktního úhlu a stanovení volné povrchové energie byl použit software DSA4. Kontaktní úhel byl stanoven metodou tangent 1. Volná povrchová energie byla poté vypočítána z průměrných hodnot kontaktních úhlů. K vyhodnocení povrchové energie byla použita metoda Owens-Wendt-Rabel-Kaelble. Stanovení probíhalo za laboratorní teploty.

### Měření drsnosti povrchu

Měření drsnosti bylo provedeno pomocí přístroje Taylor Hobson Form Talysurf 50. Drsnosti povrchů byly hodnoceny pomocí parametrů průměrné aritmetické úchylky profilu  $R_a$  a největší výšky profilu  $R_z$ .

### Elektrochemické měření

K ověření oxidačních podmínek v modelovém fyziologickém roztoku na vzorcích s modifikovanými povrchy MAO byly měřeny samovolné korozní potenciály a sejmuty potenciodynamické křivky. Experimenty byly prováděny na laboratorně zhotoveném měřicím zařízení s korozní celou s tříelektrodovým zapojením a solným můstkem, což umožňovalo elektrochemická měření na vymezené ploše  $1 \text{ cm}^2$  při teplotě  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jako pomocná elektroda byla použita Pt síťka, jako referentní nasycená kalomelová elektroda (SCE). Hodnoty samovolného korozního potenciálu byly odečítány po 30 min,

potenciál vzorku na počátku měření potenciodynamických křivek byl volen  $100 \text{ mV}$  pod  $E_{\text{kor}}$ , rychlost polarizace činila  $1 - 2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Adheze a růst buněk

Hodnocení adheze, proliferace a diferenciací buněk probíhalo na vzorcích, které byly povrchově modifikovány pomocí elektrochemického procesu, resp. procesu MAO v různých elektrolytech.

Kovové vzorky byly umyty v 96% etanolu a v deionizované vodě, sterilizovány v autoklávu a vloženy do standardních 24jamkových polystyrenových kultivačních destiček (TPP, Trasadingen, Switzerland; průměr jamky  $15 \text{ mm}$ ). Vzorky byly osazeny lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami kostní dřeně (hMSC, 2. pasáž, ScienCell Research Laboratories, kat. č. 7500) o počáteční hustotě  $20\,000$  buněk na jamku (přibližně  $11\,300$  buněk v  $1 \text{ cm}^2$ ). Jako referenční materiály pro porovnání sledovaného chování buněk byly použity standardní kultivační polystyrenové jamky (PS) a mikroskopická krycí sklíčka (sklo).

Adheze a proliferace buněk byla hodnocena po jednodenní a po šestidenní kultivaci v termostatu (teplota  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , atmosféra: 95 % vzduch, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Buňky byly fixovány etanolem, vizualizovány fluorescenčními barvivy Texas Red  $\text{C}_2$ -maleimid ( $20 \text{ ng/ml}$ ; barví proteiny buněčné membrány a cytoplasmy) a Hoechst # 33258 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ; barví jádra buněk) a hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 51 (vybaveném digitální kamerou DP 70, Olympus Corp., Tokio, Japonsko). Pro každý vzorek byly zhotoveny digitální fotografie 10 náhodně vybraných zorných polí rovnoměrně rozložených po vzorku, na nichž byla hodnocena populační hustota, morfologie a plocha rozptřeni buněk.

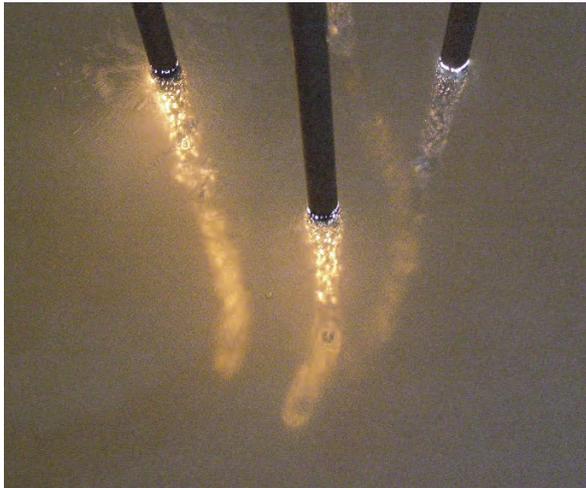
Statistická analýza kvantitativních dat byla provedena pomocí testu ANOVA, Student-Newman-Keulsovy metody. Hodnota  $p \leq 0,05$  byla považována za statisticky významnou. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of Mean, střední chyba průměru).

### Výsledky a diskuse

Povlak připravený procesem MAO má charakter dvojvrstvy s rozdílnými tloušťkami. Na obr. 2 je vidět plazmatický výboj na jednotlivých anodizovaných površích rekonstrukčních hřebů. Po dobu výboje dochází přednostně k tvorbě tzv. vnitřní vrstvy, resp. mezivrstvy s tloušťkou okolo  $1 \mu\text{m}$  (obr. 3). Vnější vrstva (obr. 4) představuje vysoce porézní keramickou vrstvu s parametry drsnosti  $R_a = 0,41 \pm 0,1 \mu\text{m}$  a  $R_z = 3,2 \pm 0,43 \mu\text{m}$  a tloušťkou pohybující se lokálně od  $1,19$  do  $2,27 \mu\text{m}$ .

Chemické složení povrchové vrstvy bylo stanoveno s využitím SEM/EDX (tab. 1). Z výsledků je patrná přítomnost oxidických fází, které narůstají v průběhu procesu MAO za vzniku plazmatického výboje, jehož intenzita se s nárůstem oxidické vrstvy snižuje. Konec

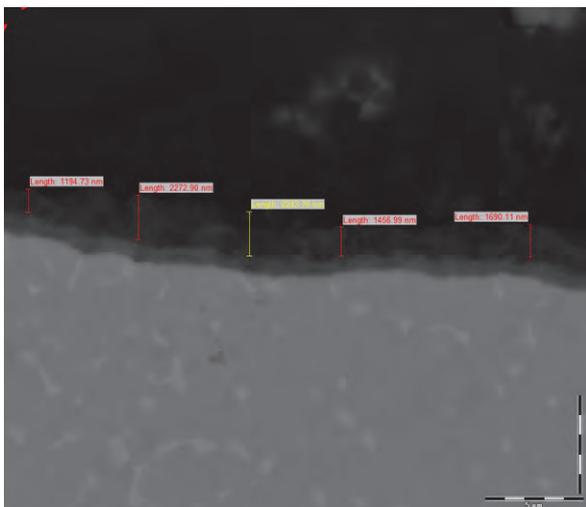
procesu je rovněž detekovatelný na základě proudových charakteristik.



Obr. 2 MAO proces  
Fig. 2 MAO process



Obr. 3 Tloušťka vnitřní vrstvy (0,90 μm; 0,99 μm; 1,08 μm; 0,99 μm)  
Fig. 3 Thickness of inner layer (0.90 μm; 0.99 μm; 1.08 μm; 0.99 μm)



Obr. 4 Tloušťka vnější vrstvy (1,19 μm; 2,27 μm; 2,24 μm; 1,46 μm; 1,69 μm)  
Fig. 4 Thickness of inner layer (1.19 μm; 2.27 μm; 2.24 μm; 1.46 μm; 1.69 μm)

Tab. 1 Chemické složení anodizovaného povrchu  
Tab. 1 Chemical composition of anodized surface

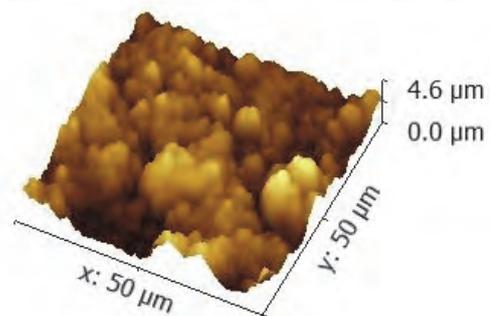
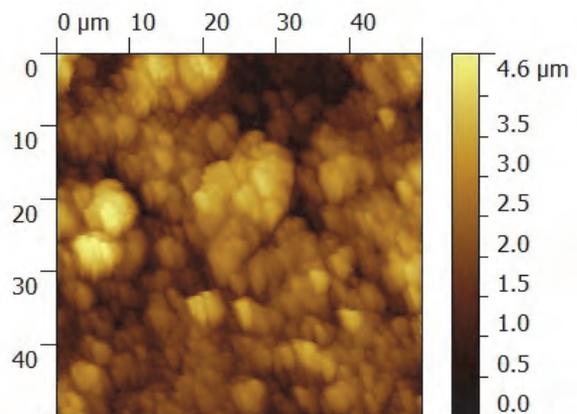
Prvek	Obsah	
	(hm. %)	(at. %)
C	5,8	11,3
O	42,4	61,9
Na	0,3	0,31
Al	3,4	2,96
Ti	46,9	22,9
V	1,2	0,55

Na obr. 5 je prezentován vzhled rekonstrukčního hřebu po aplikaci procesu MAO.

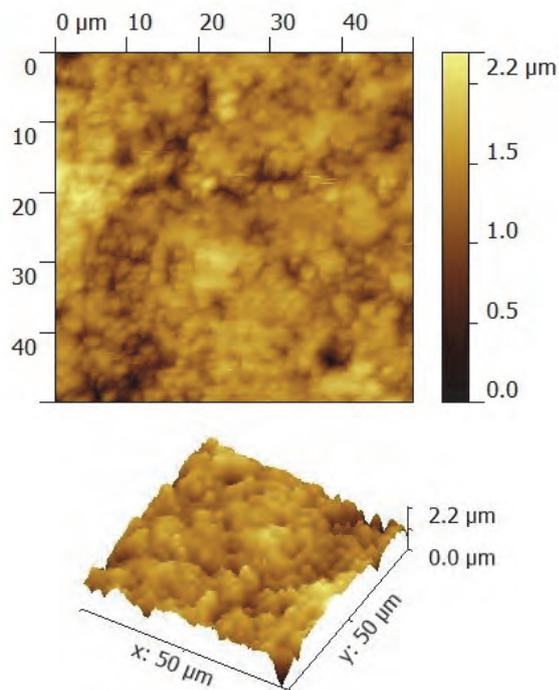


Obr. 5 Anodizovaný rekonstrukční hřeb procesem MAO  
Fig. 5 Reconstruction nail anodized by MAO process

Po aplikaci procesu MAO byly vzorky omílány s cílem dosáhnout sjednocení morfologie povrchu vnější vrstvy. Aplikací žlabové odstředivé omílací technologie bylo dosaženo snížení parametrů drsnosti povrchu na  $R_a = 0,21 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ,  $R_z = 1,79 \pm 0,24 \mu\text{m}$  při srovnání drsnosti povrchu po procesu MAO (obr. 6, 7).



Obr. 6 Anodizované povrchy vzorků před omíláním  
Fig. 6 Anodized specimen surfaces before tumbling



Obr. 7 Anodizované povrchy vzorků po omletí  
Fig. 7 Anodized specimen surfaces after tumbling

Elektrochemická měření prokázala, že povrchová úprava MAO má příznivý vliv na korozní odolnost slitiny Ti6Al4V. Svědčí o tom porovnání samovolných korozních potenciálů a proudových hustot v pasivitě u broušeného a omlétoho anodizovaného povrchu (tab. 2).

Tab. 2 Výsledky elektrochemických měření  
Tab. 2 Results of electrochemical measurements

Stav povrchu	$E_{kor}$ (mV) (SCE)	$j_p$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )
broušený	-440	2,2
anodizovaný MAO/po omletí	240	0,2
porovnání	$\Delta E_{kor} = 680$ mV	$j_{p-MAO-omletý} / j_{p-broušený} = 0,09$

Na vzorcích s modifikovanými povrchy byl nejprve stanoven statický kontaktní úhel kapalin a povrchová energie. Bylo zjištěno, že kontaktní úhel vodní kapky, tj. kapaliny tvořící základ biologických tekutin včetně kultivačních médií, byl na vzorku modifikovaném anodizací (El. 1) podstatně nižší než na kontrolním nemodifikovaném vzorku Ti6Al4V. Po následné modifikaci vzorku El. 1 pomocí FAS (El. 1 FAS) však

kontaktní úhel stoupl na hodnoty naopak vyšší než u Ti6Al4V (tab. 3). Vzorek El. 1 modifikovaný anodizací se tudíž jevil jako vysoce hydrofilní (smáčivý), kontrolní vzorky nemodifikované slitiny jako mírně hydrofilní, kdežto vzorky modifikované FAS jako poměrně vysoce hydrofobní. Z literatury a z našich předběžných pokusů je známo, že kontaktní úhel polystyrénových kultivačních misek a mikroskopických krycích skel se pohybuje kolem  $60^\circ$ , tj. že se jedná o mírně hydrofilní povrchy.

V souladu s vysokou smáčivostí měly i vzorky modifikované anodizací v elektrolytech El. 1 vysokou povrchovou energii, zejména její polární složku, zatímco tyto hodnoty byly výrazně nižší u kontrolních nemodifikovaných vzorků slitiny Ti6Al4V a zejména u vzorků modifikovaných FAS (tab. 4).

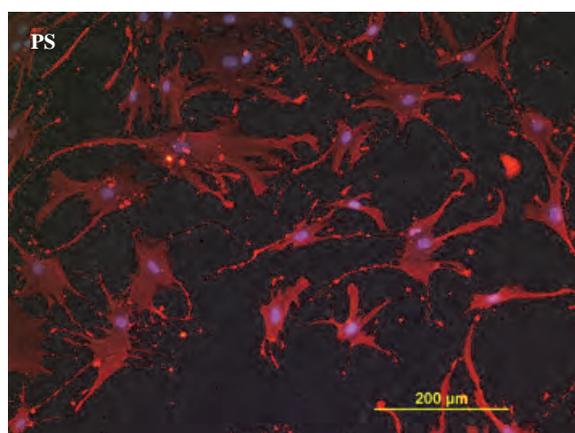
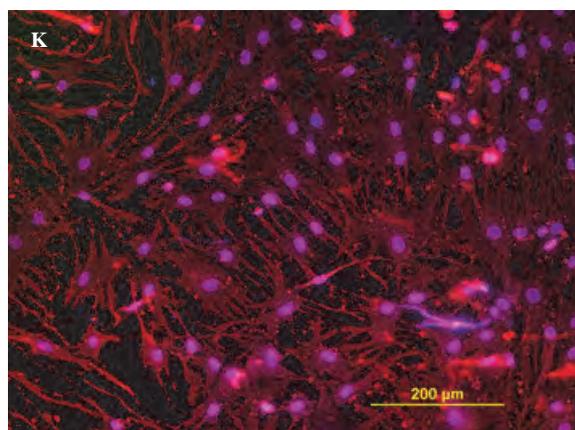
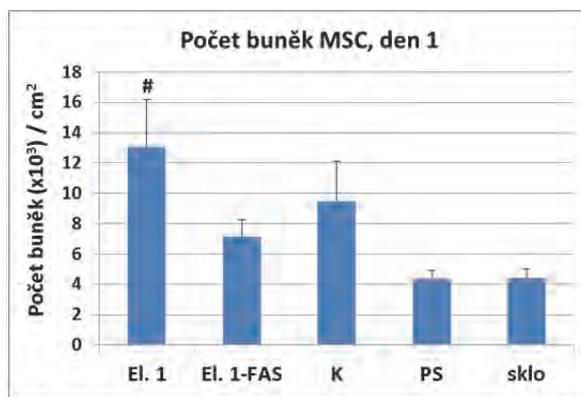
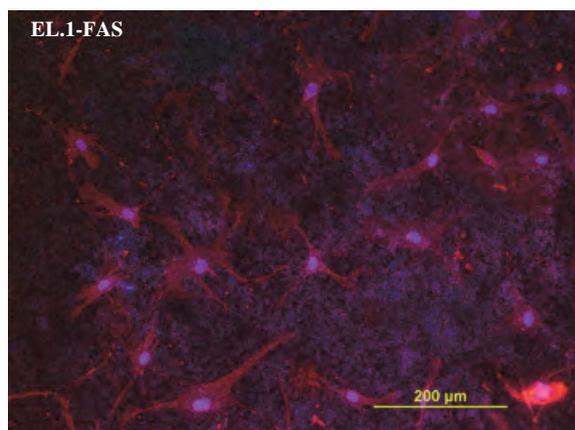
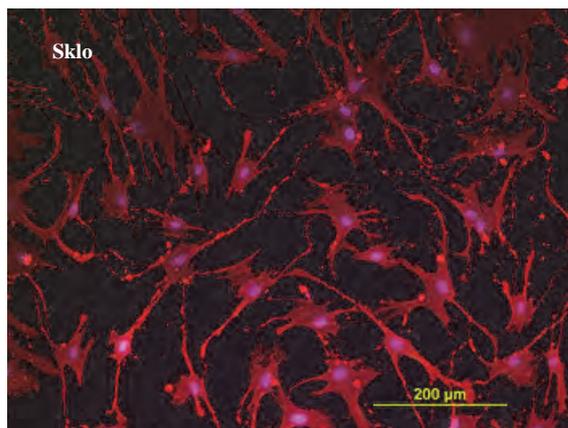
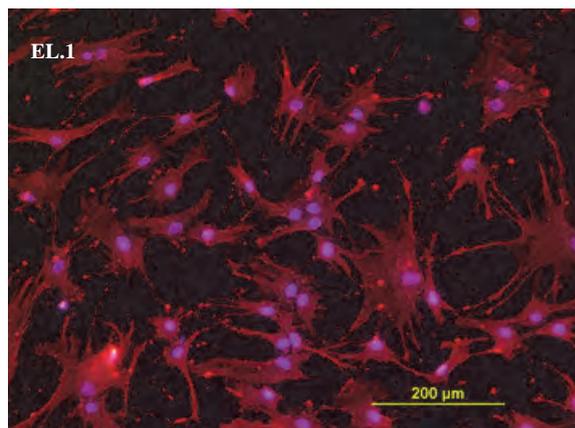
Tab. 3 Statický kontaktní úhel vodní a glycerolové kapky  
Tab. 3 Static water and glycerol drop contact angle

Vzorek	Kontaktní úhel, voda	Kontaktní úhel, glycerol
	( $^\circ$ )	
K	$71,8 \pm 5,8$	$63,3 \pm 3,7$
El. 1	$14,7 \pm 0$	$15,5 \pm 0,4$
El. 1 + FAS	$112,6 \pm 4,8$	$118,9 \pm 2,3$

Tab. 4 Povrchová energie kontrolních nemodifikovaných a modifikovaných vzorků  
Tab. 4 Surface energy of control unmodified and modified samples

Vzorek	Povrchová energie	Disperzní část povrchové energie	Polární část povrchové energie
	(mN·m $^{-1}$ )		
K	$33,4 \pm 18,84$	$18,1 \pm 9,67$	$15,3 \pm 9,17$
El. 1	$71,0 \pm 0,38$	$15,5 \pm 0,17$	$55,5 \pm 0,21$
El. 1 + FAS	$9,5 \pm 5,8$	$0,0 \pm 0,16$	$9,5 \pm 5,64$

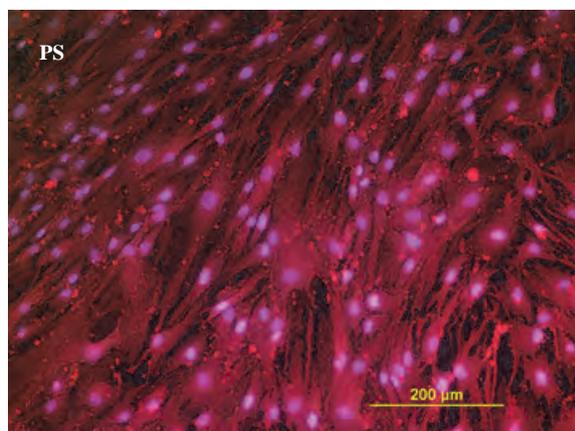
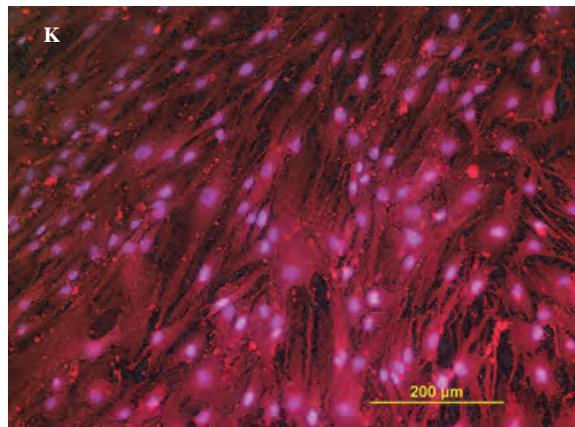
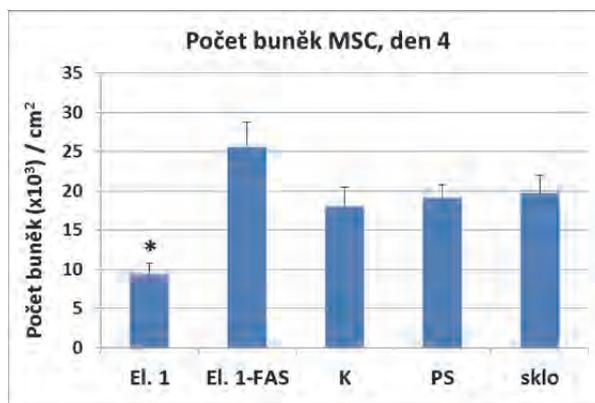
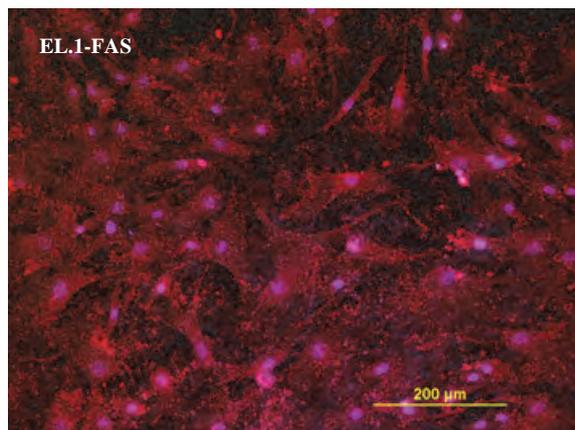
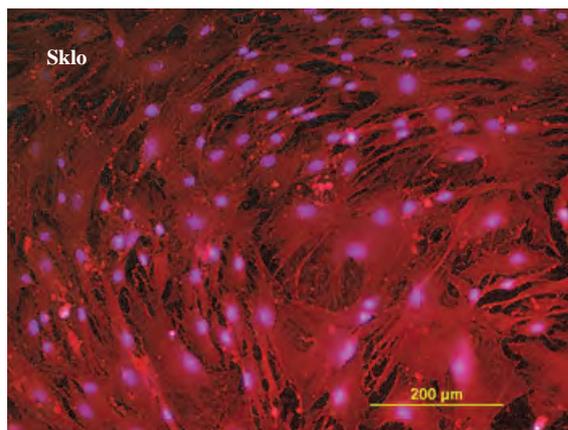
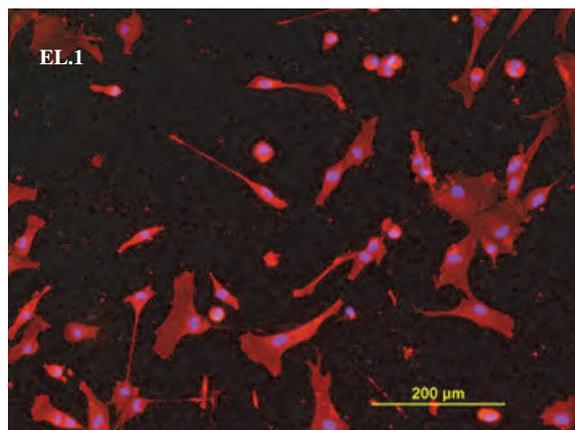
Za 1 den po nasazení adherovaly buňky MSC na všechny typy vzorků, přičemž byly dobře rozprostřeny a zaujímaly polygonální či hvězdicovitý tvar s mnoha výběžky (obr. 8). Na vzorek Ti6Al4V anodizovaný v elektrolytu El. 1 adherovaly buňky v počtu statisticky významně vyšším než na standardní kultivační polystyrénové misky (PS) a mikroskopická krycí skla (sklo), zatímco počty buněk na vzorcích modifikovaných FAS se významně nelišily od hodnot dosažených na PS a skle.



Obr. 8 Morfologie a počty lidských mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně (MSC) za 1 den po nasazení na vzorky slitiny Ti6Al4V anodizované v elektrolytech EL. 1 a EL. 1-FAS a na referenční nemodifikované vzorky Ti6Al4V (K), standardní kultivační polystyrénové jamky (PS) a mikroskopická krycí skla (sklo). Počty buněk jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření (provedených na 2 vzorcích, à 10 měření) pro každou experimentální skupinu. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: #  $p \leq 0,05$  ve srovnání se vzorky PS a sklo.

Fig. 8 Morphology and numbers of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on day 1 after application on the samples of Ti6Al4V alloy anodized in the EL. 1 electrolyte and subsequently exposed to FAS (E.1 FAS), on control unmodified Ti6Al4V samples (K), on standard cell culture polystyrene pits (PS) and on microscopic glass coverslips. Cell numbers are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error) from 20 measurements (performed on 2 samples, 10 measurements per sample) for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. Statistical significance: #  $p \leq 0.05$  in comparison with PS and glass samples.

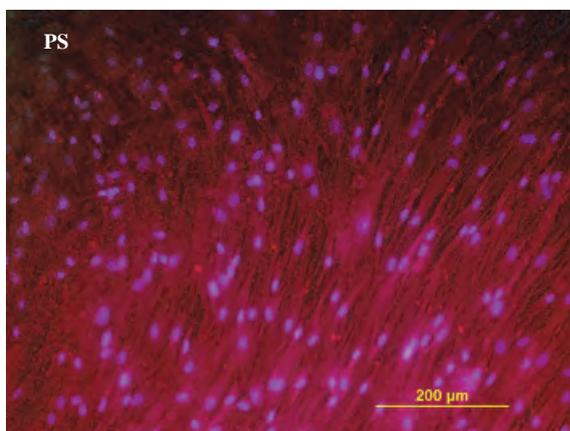
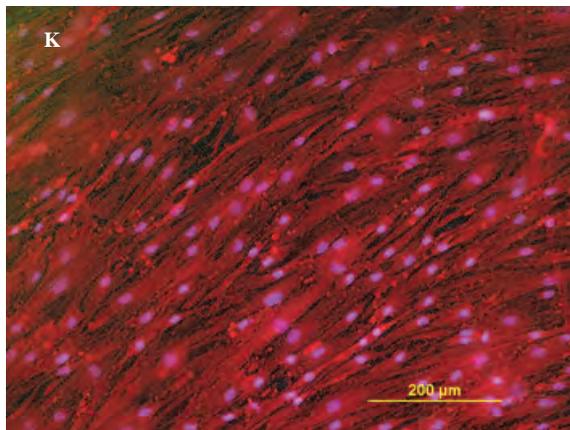
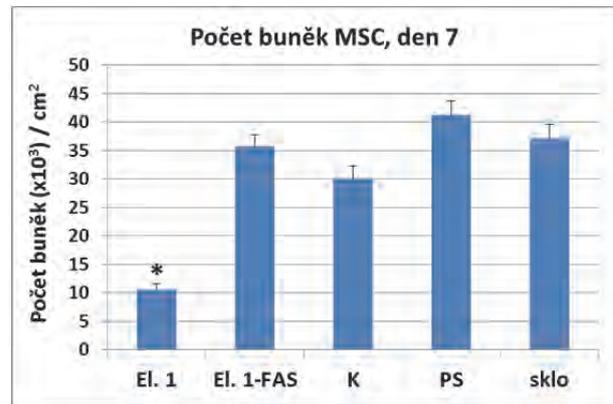
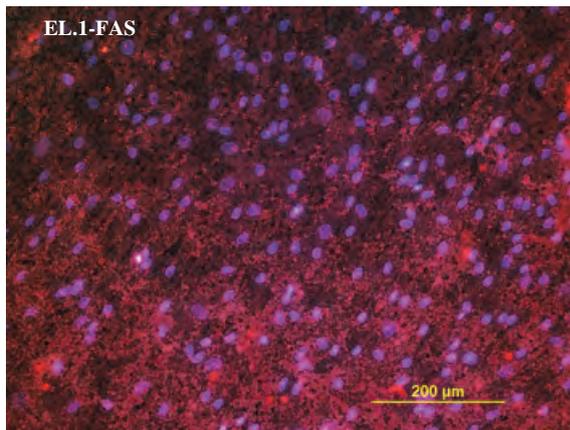
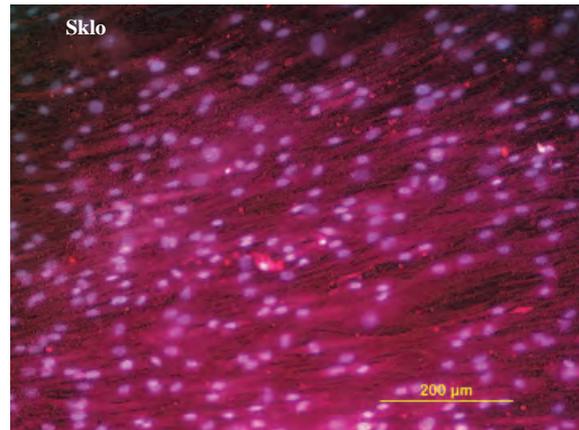
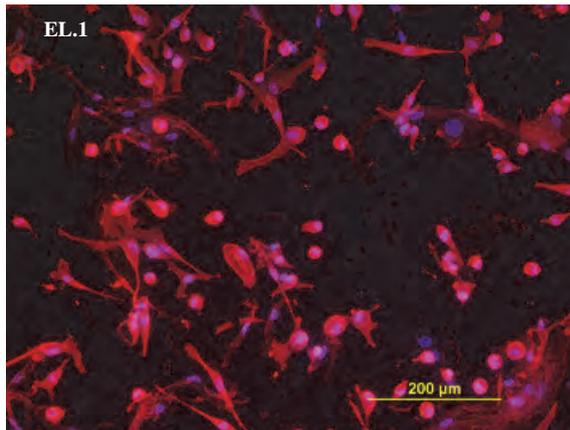
Za 4 dny po nasazení se však projevilo, že vzorky anodizované v elektrolytu EL. 1 podporují růst buněk MSC v menší míře, než vzorky modifikované FAS a vzorky referenční (K, PS a sklo). Buňky na anodizovaných vzorcích byly distribuovány poměrně řídce, podobně jako 1. den, a byly dokonce rozprostřeny po menší ploše než 1. den po nasazení, zatímco buňky na vzorcích exponovaných FAS a vzorcích referenčních prakticky dosáhly konfluence, tj. tvořily souvislou vrstvu. Počty buněk na vzorcích anodizovaných v elektrolytu EL. 1 byly statisticky významně nižší než na vzorcích modifikovaných FAS a dokonce významně nižší než na všech referenčních vzorcích (obr. 9).



Obr. 9 Morfologie a počty lidských mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně (MSC) za 4 dny po nasazení na vzorky slitiny Ti6Al4V anodizované v elektrolytech EL. 1 a EL. 1-FAS a na referenční nemodifikované vzorky Ti6Al4V (K), standardní kultivační polystyrénové jamky (PS) a mikroskopická krycí skla (sklo). Počty buněk jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření (provedených na 2 vzorcích, à 10 měření) pro každou experimentální skupinu. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: \*  $p \leq 0,05$  ve srovnání se všemi ostatními vzorky.

Fig. 9 Morphology and numbers of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on day 4 after application on the samples Ti6Al4V alloy anodized in the EL. 1 electrolyte and subsequently exposed to FAS (E.1 FAS), on control unmodified Ti6Al4V samples (K), on standard cell culture polystyrene pits (PS) and on microscopic glass coverslips. Cell numbers are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error) from 20 measurements (performed on 2 samples, 10 measurements per sample) for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. Statistical significance: \*  $p \leq 0.05$  in comparison with all other samples.

Uvedený trend pak pokračoval až do konce pokusu, tj. do 7. dne po nasazení. Počty buněk na anodizovaném vzorku EL. 1 nepřesáhly hodnoty naměřené za 1 den po nasazení, což naznačuje, že buňky MSC během týdenní kultivace na tomto vzorku nebyly schopny proliferace. Tyto buňky byly i nadále rozprostřeny po malé ploše, menší než za 1 den po nasazení, prakticky ztratily svůj polygonální či hvězdicovitý tvar a byly mnohdy zakulacené, což svědčí o nízkém stupni adheze buňka-materiál. Jejich počty byly statisticky významně nižší, než na vzorcích modifikovaných FAS a na všech referenčních vzorcích (K, PS a sklo), kde byly za 7 dnů buňky již plně konfluentní (obr. 10).



Obr. 10. Morfologie a počty lidských mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně (MSC) za 7 dnů po nasazení na vzorky slitiny Ti-6Al-4V anodizované v elektrolytech EL. 1 a EL. 1-FAS a na referenční nemodifikované vzorky Ti6Al4V (K), standardní kultivační polystyrénové jamky (PS) a mikroskopická krycí skla (sklo). Počty buněk jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření (provedených na 2 vzorcích, à 10 měření) pro každou experimentální skupinu. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: \*  $p \leq 0,05$  ve srovnání se všemi ostatními vzorky.

Fig. 10 Morphology and numbers of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on day 7 after application on the samples of Ti-6Al-4V alloy anodized in the EL. 1 electrolyte and subsequently exposed to FAS (E.1 FAS), on control unmodified Ti6Al4V samples (K), on standard cell culture polystyrene pits (PS) and on microscopic glass coverslips. Cell numbers are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error) from 20 measurements (performed on 2 samples, 10 measurements per sample) for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. Statistical significance: \*  $p \leq 0.05$  in comparison with all other samples.

## Souhrnné vyhodnocení

Relativně vysokou iniciální adhezi kostních buněk MSC na slitinu Ti6Al4V anodizovanou procesem MAO, ale i jejich nízkou či chybějící proliferační aktivitu v následujících kultivačních intervalech lze vysvětlit vysokou polaritou a hydrofilií uvedených povrchů. Adheze buněk je zprostředkována proteiny extracelulární matrix, jako je fibronektin a vitronektin, které se v podmínkách buněčných kultur spontánně adsorbují

k povrchu materiálu ze séra, používaného jako doplněk standardních kultivačních médií. Na hydrofilních površích jsou tyto proteiny adsorbovány ve výhodné geometrické konformaci, která se blíží konformaci fyziologické a umožňuje snadnou vazbu adhezních receptorů na buněčné membráně. Na vysoce hydrofilních površích, mezi které spadají i povrchy vzorků anodizovaných v El. 1, jsou však proteiny uchyceny slabě a nestabilně, a proto jsou buňky náchylné k odloučení v pozdějších kultivačních intervalech [9]. Svědčí o tom fakt, že počet buněk MSC se na anodizovaných površích prakticky nezvyšoval v průběhu týdenní kultivace, a buňky dokonce zmenšovaly svou plochu adheze a zakulacovaly se. Je známo, že adheze a růst buněk je optimální na mírně hydrofilních površích, na něž se proteiny zprostředkující adhezi buněk adsorbují ve flexibilní konformaci výhodné pro vazbu adhezních receptorů buněk, přičemž uchycení proteinů na povrchu materiálu je relativně pevné a stabilní. Adheze a růst buněk však byly vysoké i na vzorcích modifikovaných FAS (El. 1-FAS), které byly vysoce hydrofobní. Podle odborné literatury se na vysoce hydrofobní vzorky (kontaktní úhel vodní kapky vyšší než  $100^\circ$ ) adsorbují proteiny zprostředkující adhezi buněk v rigidní a denaturované konformaci, která je nevýhodná pro vazbu adhezních receptorů buněk. Silikonové substráty pokryté fluoroalkylsilanem (kontaktní úhel  $112,2 \pm 2,6^\circ$ ) výrazně redukovaly růst astrocytů [10] a rovněž redukovaly adhezi a růst bakterií, jako je *Staphylococcus epidermidis* či *Escherichia coli*. Příčiny zvýšeného růstu kostních buněk na površích s FAS v naší studii je tudíž třeba dále zkoumat z hlediska dalších fyzikálně-chemických vlastností tohoto povrchu, jako je např. i jeho drsnost a morfologie.

## Závěr

Vývoj aplikace procesu přípravy keramické vrstvy s využitím techniky MAO ukázal na možnosti jejího využití pro modifikaci povrchu implantátů vyrobených ze slitiny Ti6Al4V. U výsledných porézních povrchů po procesu MAO, které byly následně upraveny procesem omílání, byla potvrzena jejich zvýšená korozní odolnost ve srovnání se vzorky bez povrchové úpravy.

Z výsledků adheze a růstu lidských kmenových buněk je patrné, že slitinu Ti6Al4V anodizovanou v elektrolytu procesem MAO lze využít pro konstrukci dočasných ortopedických implantátů, kde není osteointegrace žádoucí. Naopak slitinu Ti6Al4V anodizovanou v alkalickém elektrolytu El. 1 a následně modifikovanou pomocí FAS (elektrolyt El. 1-FAS), je vhodné použít pro konstrukci dlouhodobých implantátů, kde je vyžadována osteointegrace a sekundární stabilita implantátu.

## Poděkování

*Tato práce vznikla při řešení projektu č. LO1203 "Regionální materiálově technologické výzkumné centrum - program udržitelnosti" financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.*

*Práce byla dále podporována Technologickou agenturou České Republiky (grant č. TA04011214).*

## Literatura

- [1] XIAO, F., TSURU, K., HAYAKAWA, S., OSAKA, A. In vitro apatite deposition on titania film derived from chemical treatment of Ti substrates with an oxysulfate solution containing hydrogen peroxide at low temperature. *Thin Solid Films*, 441 (2003), 271–276, ISSN 0040-6090.
- [2] WEI, D., ZHOU, Y., JIA, D., WAN, Y. Chemical treatment of TiO<sub>2</sub>-based coatings formed by plasma electrolytic oxidation in electrolyte containing nano-HA, calcium salts and phosphates for biomedical applications. *Applied Surface Science*, 254 (2008), 1775–1782, ISSN 0169-4332.
- [3] WEI, D., ZHOU, Y., JIA, D., WANG, Y. Effect of heat treatment on the structure and in vitro bioactivity of microarc-oxidized (MAO) titania coatings containing Ca and P ions. *Surface and Coatings Technology*, 201 (2007), 8723–8729, ISSN 0257-8972.
- [4] YEROKHIN, L. A., LJUBIMOV, V. V., ASHITKOV, V. R. Phase formation in ceramic coatings during plasma electrolytic oxidation of aluminium alloys. *Ceramics International*, 24 (1998), 1–6, ISSN 0272-8842.
- [5] XUE, W., WANG, CH., CHEN, R., DENG, Z. Structure and properties characterization of ceramic coatings produced on Ti-6Al-4V alloy by microarc oxidation in aluminate solution. *Materials Letters*, 52 (2002), 435–441, ISSN 0272-8842. ISSN 0167-577X.
- [6] ZHANG, X., YAO, Z., JIANG, Z., ZHANG, Y., LIU, X. Investigation of the plasma electrolytic oxidation of Ti6Al4V under single-pulse power supply. *Corrosion Science*, 53 (2011), 2253–2262.
- [7] WANG, Y.M., JIA, D.C., GUO, L.X., LEI, T.Q., JIANG, B.L. Effect of discharge pulsating on microarc oxidation coatings formed on Ti6Al4V alloy. *Materials Chemistry and Physics*, 90 (2005), 128–133, ISSN 0254-0584.
- [8] GABOR, R., VLČKOVÁ, I., MALANÍK, K., MICHENKA, V., MARVAN, J., DOUBKOVÁ, M., PAŘÍZEK, M., BAČÁKOVÁ, L. Výzkum a vývoj přípravy a hodnocení anodické vrstvy na titanové slitině Ti6Al4V. *Hutnické listy*, 68 (2015) 6, 84–92, ISSN 0018-8069.
- [9] BACAKOVÁ, L., FILOVÁ, E., PARIZEK, M., RUMML, T., SVORCIK, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 29 (2015), 739–767, ISSN 0734-9750.
- [10] PATEL, R., K., TANG, H.; GREVER, E. W. et al. Evaluation of polymer and self-assembled monolayer-coated silicone surfaces to reduce neural cell growth. *Biomaterials*, 27 (2006), 1519–1526, ISSN 0142-9612.