

# Istraživanje mogućnosti za uspostavom sposobnosti in vitro ispitivanja bioaktivnosti površina materijala

---

Gojanović-Rakić, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:235:627069>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

# **DIPLOMSKI RAD**

**Matej Gojanović-Rakić**

Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

# DIPLOMSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Božidar Matijević, dipl. ing.  
Dr. sc. Ivan Kumić, dipl. ing.

Student:

Matej Gojanović-Rakić

Zagreb, 2019.

Izjavljujem da sam ovaj rad izradio samostalno koristeći znanja stečena tijekom studija i navedenu literaturu.

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Božidaru Matijeviću, dipl. ing. na danoj prilici za pisanje ovog rada. Posebne zahvale upućujem svom komentoru dr. sc. Ivanu Kumiću na velikoj pomoći pri organizaciji eksperimentalnog dijela rada, susretljivosti i stručnim savjetima. Također se uvelike zahvaljujem laborantici Rei Veseli zbog iznimne pomoći kod provedbe eksperimenta.

Za kraj upućujem zahvalu svojoj obitelji, roditeljima Ani i Šimi, i najboljoj osobi na svijetu, mome bratu Luki, na konstantnoj podršci i vjeri u mene tijekom studija, kao i mojoj baki Mariji i djedu Mati. Također bih zahvalio svim svojim prijateljima i kolegama (Toniju, Mrkiju, Brani, Dodi, Kreši, Jakovu, Nini, Lauri, Sunčici, Luciji, Filipu, Anti, Anamariji, Mariju, Breši, Duji, Robiju, Strunji, Romani, Toniju, Nikoli, Luki, Danijelu i Debori) što su olakšali i obogatili moj studentski život.

Matej Gojanović-Rakić



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE**



Središnje povjerenstvo za završne i diplomske ispite  
Povjerenstvo za diplomske radove studija strojarstva za smjerove:  
proizvodno inženjerstvo, računalno inženjerstvo, industrijsko inženjerstvo i menadžment,  
inženjerstvo materijala te mehatronika i robotika

Sveučilište u Zagrebu Fakultet strojarstva i brodogradnje	
Datum:	Prilog:
Klasa:	
Ur. broj:	

## DIPLOMSKI ZADATAK

Student: **MATEJ GOJANOVIĆ RAKIĆ** Mat. br.: 0035199276

Naslov rada na hrvatskom jeziku: **Istraživanje mogućnosti za uspostavom sposobnosti in vitro ispitivanja bioaktivnosti površina materijala**

Naslov rada na engleskom jeziku: **An exploration into possibilities for establishing the ability of in vitro bioactivity testing of materials' surfaces**

Opis zadatka:

Od materijala namijenjenih implantaciji u ljudski organizam već se odavno ne očekuje da samo budu inertni u kontaktu s tkivima već se od njihovih površina nastoje izvući maksimalno pozitivne (bioaktivne) karakteristike. Jedan od spomenutih pozitivnih bioaktivnih efekata površina materijala namijenjenih integraciji s koštanim tkivom (oseointegraciji) jest sposobnost da se površine takvih implantata u dodiru s biološkim tekućinama spontano prevuku slojem (hidroksi)apatita. U ovom diplomskom radu predviđeno je detaljnom analizom stanja u području istraživanja utvrditi principe in vitro ispitivanja površina materijala inače namijenjenih implantaciji u ljudski organizam izlaganjem djelovanju simulirane biološke tekućine. Prema rezultatima provedene analize dostupnih objavljenih istraživanja potrebno je pojasniti mehanizme (pozitivnih) reakcija i efekata na površinama materijala namijenjenih implantaciji u koštana tkiva – s naglaskom na titanovoj leguri Ti6Al4V ELI. U eksperimentalnom dijelu rada, potrebno je na uzorcima legure Ti6Al4V ELI pokušati ustanoviti utjecaj pripreme površina na više ili manje pozitivan ishod u pogledu izlučivanja (hidroksi)apatitnog sloja na njima uslijed izlaganja simuliranoj biološkoj tekućini. Analiza stanja prije i nakon izlaganja spomenutoj tekućini, a time ocjena utjecaja pojedinačnih metoda pripreme površina, biti će izvršena svim dostupnim metodama, a ponajprije svjetlosnom mikroskopijom te praćenjem promjena u parametrima hrapavosti.

U radu je potrebno navesti korištenu literaturu i eventualno dobivenu pomoć.

Zadatak zadan:  
02. svibnja 2019.

Rok predaje rada:  
04. srpnja 2019.

Predviđeni datum obrane:  
10. srpnja 2019.  
11. srpnja 2019.  
12. srpnja 2019.

Zadatak zadao:  
prof. dr. sc. Božidar Matijević

Komentor:  
dr. sc. Ivan Kumić

Predsjednica Povjerenstva:  
prof. dr. sc. Biserka Runje

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	13
1.1	Prošlost: uklanjanje tkiva .....	13
1.2	Sadašnjost: zamjena tkiva .....	14
2	SIMULIRAJUĆA TJELESNA TEKUĆINA (SBF) .....	16
2.1	KRATKA POVIJEST SBF-a .....	16
2.2	Vrste SBF-a .....	18
3	Mehanizam djelovanja .....	20
3.1	Kristalizacijska teorija .....	20
3.2	Dinamika kristalizacije .....	21
3.2.1	Nukleacija .....	21
3.2.2	Rast zrna .....	25
3.3	Kritična veličina zrna apatita u SBF-u .....	25
3.4	Kristalizacijska teorija u SBF-u .....	26
3.5	Modifikacija lokalne prezasićenosti .....	27
3.6	Utjecaj promjene lokalnih fizikalnih veličina na formaciju apatita .....	28
3.7	Proces ionske razmjene između SBF-a i bioaktivne površine .....	28
3.8	Hidroksiapatit .....	29
4	Titan i njegove legure .....	31
4.1	Fizikalna svojstva titana i njegovih legura .....	32
4.2	Kemijska svojstva titana i njegovih legura .....	33
5	Eksperimentalni dio rada .....	35
5.1	Priprema uzoraka .....	36
5.1.1	TiN prevlaka .....	36
5.1.2	Plazmatski aktivirano stanje .....	37
5.1.3	TiO <sub>2</sub> oksidni film (rutil) .....	38
5.2	Priprema SBF-a .....	40
5.3	Provedba ispitivanja bioaktivnosti .....	42
5.4	Analiza površine i mase uzoraka .....	44
5.4.1	Analiza površine primjenom svjetlosne mikroskopije .....	44
5.4.2	Analiza hrapavosti površine .....	50
5.4.3	Mjerenje mase uzoraka .....	54
6	Zaključak .....	55
7	Literatura .....	57
8	Prilozi .....	61

## POPIS SLIKA

Slika 1	Prikaz usporedbe dugovječnosti i kvalitete tkiva u 1900-oj i 2000-oj godini [1]. ....14
Slika 2	Formacija apatita na biostaklu nakon tjedan dana provedenog u SBF-u [7].....16
Slika 3	Površina staklokeramike A-W (lijevo) i presjek (desno) nakon 4 dana provedena u SBF-u [11].....17
Slika 4	Kristal apatita nastao u laboratorijskom okruženju [17]. .....20
Slika 5	Grafički prikaz ovisnosti brzine nukleacije i rasta zrna o vremenu [18]. .....21
Slika 6	Opis energetske stabilnosti sustava, gdje je 1) metastabilno stanje (slabije uravnoteženo – slabija veza), 2) nestabilno stanje i 3) stabilno stanje (uravnoteženo – jača veza) [20].....22
Slika 7	Prikaz krivulja topljivosti, zasićenosti i prezasićenosti [21]. .....23
Slika 8	Shematski prikaz konvergencije molekula i rasta kristala (crvena masa) [25]. .....25
Slika 9	Shema procesa formacije apatita na titan-oksoidnoj površini. a) Adsorpcija fosfatnih iona, b) privlačenje kalcijevih iona, c) nastanak kalcijeva fosfata i d) nastanak apatita [38].....28
Slika 10	Prikaz kristala apatita. (a) Regularna heksagonalna jedinična ćelija apatita. (b) Prikaz mogućih supstitucija i uključaka u svrhu modifikacije apatita. (c) Izometrijski prikaz heksagonalnog kristala [41].....29
Slika 11	Fleksibilni hidrogel-HA kompozit, koji se koristi kod popravka oštećenih tetiva i ligamenata [39]. .....30
Slika 12	Prikaz šipki od čistog titana [42]. .....31
Slika 13	Uzorci nakon nagrivanja i sušenja. ....39
Slika 14	Peć u kojoj je provedena toplinska obrada. ....39
Slika 15	Prikaz uzoraka nakon pripreme. S lijeva na desno: rutil, TiN, ionizirano i osnovno stanje. ....40
Slika 16	Fotografija magnetske miješalice tijekom zagrijavanja SBF otopine.....42
Slika 17	Fotografija uzoraka uronjenih u SBF u polietilenskim bočicama. ....43
Slika 18	Fotografija uzoraka postavljenih u peć. ....43
Slika 19	Fotografije uzorka osnovnog stanja dobivene svjetlosnom mikroskopijom pri povećanju od 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme površina; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a. ....45
Slika 20	Fotografije uzorka s TiN površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.....46
Slika 21	Fotografije uzorka s plazmatski aktiviranom površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.....47
Slika 22	Fotografije uzorka s rutilnom površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.....48

Slika 23	Prikaz profila hrapavosti s označenim dimenzijama pet najviših visina i dubina [53]. .....	50
Slika 24	Grafički prikaz odnosa veličina parametara hrapavosti. ....	51
Slika 25	Prikaz profila hrapavosti profila u početnom (lijevo) i konačnom (desno) stanju. Prvi red: osnovno stanje; drugi red: TiN prevlaka; treći red: Ionizirano stanje i četvrti red: Rutil.....	53



**POPIS TABLICA**

Tablica 1	Prikaz kemijskih sastava svih vrsta SBF-ova i ljudske krvne plazme [11].....	19
Tablica 2	Prikaz nekih fizikalnih svojstava komercijalno čistog titana [46]. ....	32
Tablica 3	Garantirani kemijski sastav legure Ti6Al4V ELI proizvođača AZ STEEL srl. predložen masenim udjelom konstituenata. ....	36
Tablica 4	Prikaz parametara procesa PACVD u svrhu postizanja TiN sloja. ....	37
Tablica 5	Prikaz parametara procesa plazmatske aktivacije. ....	38
Tablica 6	Prikaz količina i redoslijeda reagensa korištenih za dobivanje SBF otopine. ....	41
Tablica 7	Prikaz iznosa traženih parametara hrapavosti. ....	51
Tablica 8	Prikaz masa uzoraka u različitim koracima eksperimenta. ....	54

## POPIS OZNAKA

OZNAKA	JEDINICA	OPIS
$\Delta c$	mol/L	prezasićenost otopine
$c$	mol/L	trenutna zasićenost otopine
$c^*$	mol/L	koncentracija zasićenosti
$S$	%	omjer prezasićenosti
$B$	$s^{-1}$	broj klica nastalih u jedinici vremena
$dN$	$m^{-3}$	broj klica nastalih u jedinici volumena
$k_n$	/	konstanta specifična za parametre procesa
$n$	/	empirijski eksponent, obično iznosi između 3 i 4
$k_l$	/	konstanta specifična za parametre procesa
$M_T$	$kg/m^3$	gustoća suspenzije
$j$	/	empirijski eksponent, obično iznosi 1
$b$	/	empirijski eksponent, obično iznosi 2
$\beta_a$	/	geometrijski faktor koji se odnosi na površinu klica
$\beta_V$	/	geometrijski faktor koji se odnosi na volumen klica
$\sigma$	$J/m^3$	gustoća slobodne energije kod interakcije krutina-tekućina
$V$	$m^3/mol$	molarni volumen precipitata

<b>OZNAKA</b>	<b>JEDINICA</b>	<b>OPIS</b>
<i>T</i>	K	apsolutna temperatura
<i>R</i>	8,314 J/molK	opća plinska konstanta
<i>Ra</i>	μm	srednje aritmetičko odstupanje od profila
<i>Rp</i>	μm	maksimalna visina vrhova profila
<i>Rv</i>	μm	maksimalna dubina dolova profila

## SAŽETAK

U ovom radu istražen je utjecaj površinskog stanja titanove legure Ti6Al4V ELI na njezinu bioaktivnost u simulirajućoj tjelesnoj tekućini (SBF-u). Nakon izlaganja četiriju uzoraka različitih površinskih stanja SBF-u i analize rezultata, uspoređeno je stanje površine prije i nakon provedenog ispitivanja bioaktivnosti.

Ovaj rad podijeljen je na dva dijela; teoretski i eksperimentalni. Teoretski dio sadrži uvod u rad, opis SBF-a, njegove povijesti i vrsta, mehanizma djelovanja, kao i opis nastanka hidroksiapatita. U eksperimentalnom dijelu predložen je postupak istraživanja mogućnosti *in vitro* ispitivanja bioaktivnosti najčešće korištene titanove legure u medicinskoj primjeni. Pokus se sastojao od pripreme površina titanovih legura, pripreme SBF-a, provedbe ispitivanja bioaktivnosti u dvije iteracije SBF-a te analize stanja površina prije i poslije svakog koraka ispitivanja. Postupak pripreme površina proveden je u Laboratoriju za toplinsku obradu, dok je testiranje bioaktivnosti provedeno u Laboratoriju za analizu metala Fakulteta strojarstva i brodogradnje. Mjerenje parametara hrapavosti provedeno je u Laboratoriju za precizna mjerenja, dok je analiza površina uzoraka svjetlosnom mikroskopijom provedena u Laboratoriju za materijalografiju Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu.

Nakon provedbe eksperimenta doneseni su odgovarajući zaključci.

Ključne riječi: simulirajuća tjelesna tekućina (eng. SBF), (hidroksi)apatit, titan.

## SUMMARY

The influence of the Ti6Al4V ELI titanium alloy's surface state on its bioactivity in simulated body fluid (SBF) was studied in this paper. After the exposure of four samples of different surface modifications to the SBF and the subsequent analysis of the results, a comparison of the results was carried out.

This paper is divided into two parts, the theoretical and the experimental part. The theoretical part contains an introduction to the paper, a description of the SBF, its history, its type and the mechanism of action, as well as the description of hydroxyapatite formation. In the experimental part, a study was carried out to investigate the possibilities for *in vitro* bioactivity. The experiment consisted of the acquisition and initial preparation of titanium alloy surfaces, SBF preparation, bioactivity testing in two SBF iterations and surface condition analysis before and after each test step. The surface preparation process was performed at the Heat Treatment Laboratory, while bioactivity testing was conducted at the Laboratory for Metal Analysis of the Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture. Measurement of the roughness parameters was performed at the Laboratory for Precise Measurements, while the sample surface analysis by light microscopy was performed in the Laboratory for Materialography of the Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture of the University of Zagreb.

Following the implementation of the experiment, appropriate conclusions were made.

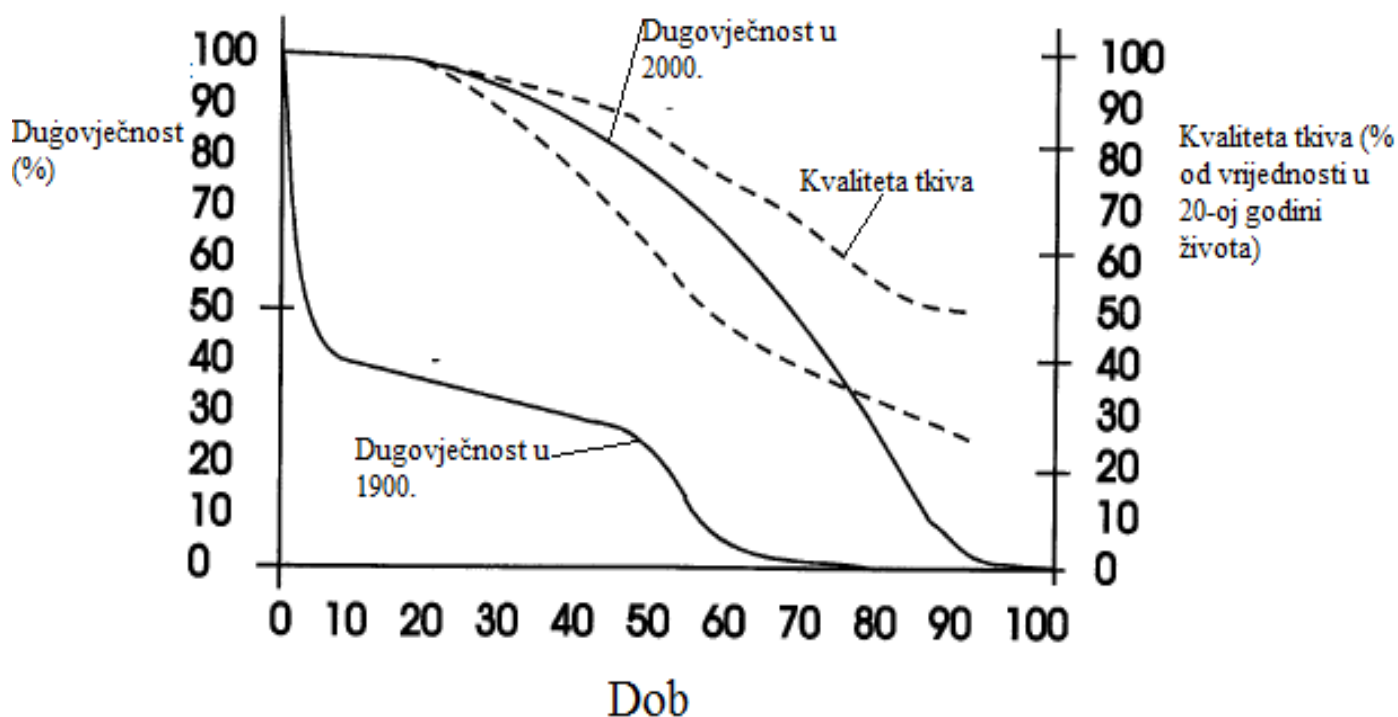
Keywords: simulated body fluid (SBF), (hydroxy)apatite, titanium.

## 1 UVOD

Kada se neki sintetski materijal usadi u koštani defekt, on biva izoliran od istog imunom reakcijom tijela (obavijanje materijala vlaknastim tkivom i izolacija od kosti). Postoji samo par vrsta materijala koji se koriste u modernoj medicini u svrhu zamjene bolesnih ili oštećenih dijelova mišićno-koštanog sustava – određene vrste keramika, metala, polimera i njihovih kompozita. Za testiranje ovakvih materijala tradicionalno su se koristila *in vivo* ispitivanja, dok se od 90-ih godina prošlog stoljeća koristi i simulirajuća tjelesna tekućina (eng. *Simulated Body Fluid* -SBF) – tekućina koja imitira ljudsku krvnu plazmu čime se omogućuju *in vitro* ispitivanja. SBF-om se ispituje tzv. *bioaktivnost* materijala, odnosno sposobnost materijala da se spontano veže za kost bez štetne tjelesne reakcije. Cilj ovog rada jest opisati SBF, njegovu povijest, vrste i mehanizam djelovanja, te provesti eksperiment bioaktivnosti površinskih modifikacija titanove legure.

### 1.1 Prošlost: uklanjanje tkiva

Stoljećima se, kada bi se neki dio ljudskog tijela zarazio ili oštetio, tkivo uklanjalo. Uklanjanje organa, zglobova, zubi ili kralježaka dovelo je do malih napredaka u kvaliteti života. Unatoč tome, očekivano trajanje ljudskog života nije bilo niti blizu današnjem, tako da bi rijetko kad bilo potrebno zamijeniti dijelove tijela. To se promijenilo u dvadesetom stoljeću s povećanjem očekivanog životnog vijeka prosječne osobe. Otkrića poput dezinfekcije, antibiotika, kemijskog tretmana vode za piće, povećanja higijene i cijepljenja su izrazito produžile ljudsku dugovječnost u razvijenijim zemljama, kao što je prikazano na slici 1 [1].



Slika 1 Prikaz usporedbe dugovječnosti i kvalitete tkiva u 1900-oj i 2000-oj godini [1].

## 1.2 Sadašnjost: zamjena tkiva

Prije 50 godina započela je revolucija u medicini s prvim uspješnim zamjenama tkiva. Srećom, ova revolucija je pratila veliko povećanje u ljudskoj dugovječnosti. Dvije alternative su postale moguće: transplantacija i implantacija. Uzimanje tkiva od donora i transplantiranje u tijelo primatelja postalo je zlatni standard za mnoge kirurške procedure. Ako su donor i primatelj ista osoba, radi se o *autotransplantaciji*, uslijed koje izostaje imunološka reakcija uz istovremeni izostanak i etičkih pitanja. Unatoč tome, autotransplantacija ima i bitna ograničenja – ograničena dostupnost, tendencija resorpciji i nekad manjak biomehaničkih svojstava. Ako su donor i primatelj različite osobe, radi se o *homotransplantaciji*. Ako su donor i primatelj različite vrste radi se o *heterotransplantaciji*. Heterotransplanti su svojim nastankom izazvali kontroverzne reakcije i postali etički upitni [1].

Drugi način zamjene tkiva bio je razvoj, odnosno modifikacija umjetnih materijala za interakciju sa živim tkivom – implantata napravljenih od biomaterijala. Značajne prednosti biomaterijala nad

transplantima su dostupnost, reproduktivnost i pouzdanost. Dobra proizvodna praksa, međunarodna suradnja i standardi te zakonske regulative osiguravaju visoku kvalitetu implantata. Međutim, gotovo svi implantati koji se koriste danas imaju neku vrstu problema, bila to stabilnost veze s tkivom primatelja, neadekvatna mehanička svojstva (lomna žilavost, čvrstoća, tvrdoća i sl.), krhotine nastale trošenjem itd. Nadalje, svi današnji implantati nemaju dvije kritične karakteristike živog tkiva – mogućnost samopopravljanja i mogućnost modifikacije strukture kao odgovor na okolne promjene. Iz tih razloga svi implantati imaju ograničen životni vijek [1].

Implantati se izrađuju od biomaterijala, koji se mogu podijeliti u tri vrste:

- bioinertni materijali,
- bioaktivni materijali i
- biorazgradivi materijali.

Bioinertni materijali su oni materijali kod kojih u kontaktu s tkivom ne dolazi do nikakve ili minimalne (prihvatljive) reakcije s tim tkivom. Bioaktivni materijali su oni materijali koji potenciraju povezivanje s tkivom domaćina bez imunološke reakcije. Biorazgradivi materijali su oni materijali koji se integriraju u okolno tkivo i razgrađuju bez imunološke reakcije. Od bioaktivnih materijala, kao podkategorije biomaterijala, se očekuje da reagiraju s tjelesnim tekućinama na poseban način, olakšavajući stvaranje slojeva apatita sličnog kostima, na njihovim površinama. Bioaktivni materijali postižu tzv. bioaktivnu fiksaciju, odnosno nakon 3-6 mjeseci provedenih implantirani u živom ljudskom tijelu postižu vezu s kosti jednake ili čak veće čvrstoće od same kosti. Na taj način, bioaktivne površine mogu ubrzati integraciju s kosti. Testiranje takvih materijala i njihovih bioloških i biokemijskih odziva se može napraviti ili *in vivo* (često neizvedivim, štetnim, etički upitnim) ili *in vitro* načinom, korištenjem simulacije tjelesne tekućine (SBF) [2].



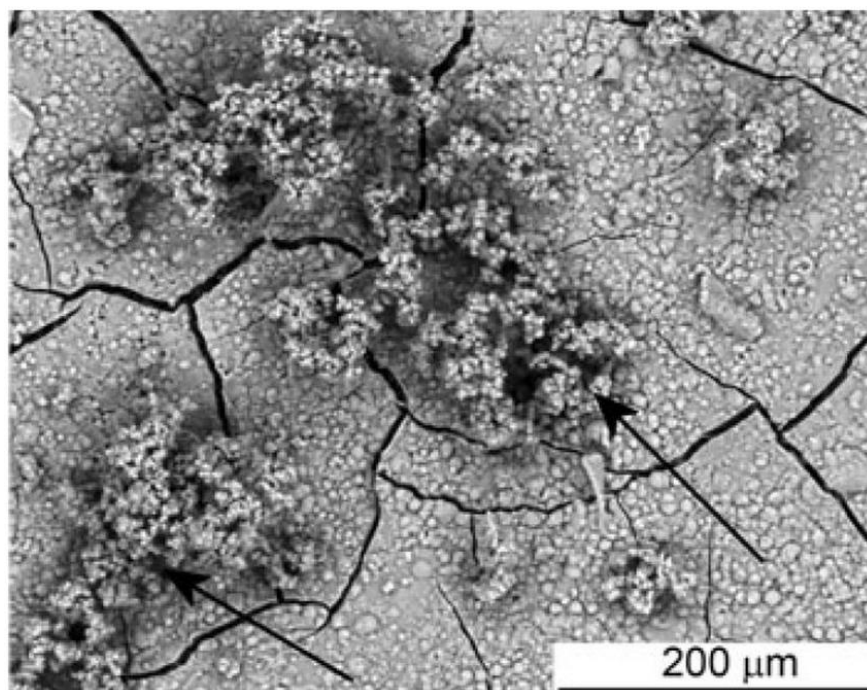
## 2 SIMULIRAJUĆA TJELESNA TEKUĆINA (SBF)

### 2.1 KRATKA POVIJEST SBF-a

1980. Hench *et al.* su pokazali da se  $\text{SiO}_2$  sloj i kalcij-fosfatni film formiraju na površini biostakla kada se ono implantira u tjelesno okruženje, što omogućuje povezivanje sa živom kosti, i da se *in vivo* formacija kalcij-fosfatnog filma može reproducirati u pufer otopini koja sadržava tris hidroksimetiloaminometan i hidroklornu kiselinu (skraćeno: tris pufer otpina) na pH 7,4 [3].

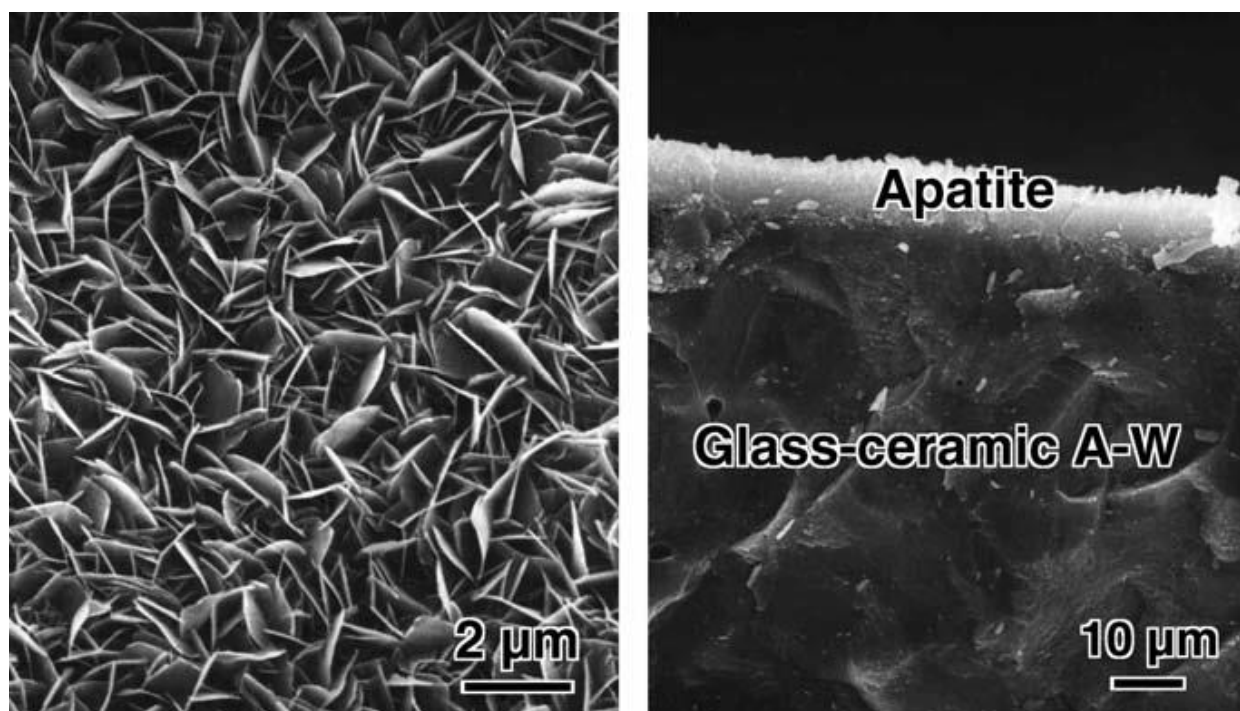
S druge strane, Kitsugi *et al.* su pokazali da se  $\text{SiO}_2$ -bogat sloj ne formira na staklokeramici A-W (apatit-wollastonit), ali da se kalcij fosfatni sloj stvara na površini iste u živom tijelu, što omogućava povezivanje sa živom kosti [4]. Nadalje, kad su Kokubo *et al.* koristili XRD, primjetili su da je to zapravo kristalni apatit a ne kalcijev fosfat, što je dovelo do novih pitanja [5].

1990. potvrđeno je da se *in vivo* formacija apatita na površini staklokeramike A-W može reproducirati *in vitro* u acelularnom SBF-u s ionskim koncentracijama sličnim kao u ljudskoj krvnoj plazmi, ali ne i u tris pufer otopini [6]. Kokubo *et al.* te Hench *et al.* također su neovisno jedni o drugima potvrdili formaciju apatita na površini Biostakla 45S5-tipa u SBF-u.



**Slika 2** Formacija apatita na biostaklu nakon tjedan dana provedenog u SBF-u [7].

Detaljna analiza površinskog apatita nastalog u SBF-u, korištenjem *X-ray* difrakcije tankog filma (TF-XRD), Fourierove infracrvene spektroskopije, skenirajuće elektronske mikroskopije i transmisivne elektronske mikroskopije pokazala je da je taj apatit jako sličan koštanom mineralu svojim kemijskim sastavom i strukturom [6, 8, 9]. Kao rezultat tih analiza, pretpostavljeno je da osteoblasti mogu podržati nastanak apatita te se razmnožiti kako bi proizveli još apatita kao i kolagena na površini materijala. Tako nastali apatit veže se za površinski apatit materijala kao i za okolno koštano tkivo. Na taj način nastaje čvrsta kemijska veza između materijala i žive kosti kroz sloj apatita. S druge strane, staklokeramika A-W koja je postavljena u staklastu matricu od  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , i koja se stoga ne veže za živu kost, nije formirala apatit na svojoj površini niti u živom tijelu niti u SBF-u [8, 10].



**Slika 3** Površina staklokeramike A-W (lijevo) i presjek (desno) nakon 4 dana provedena u SBF-u [11].

Temeljeno na prethodno spomenutim istraživanjima, 1991. godine bilo je predloženo slijedeće:

Osnovni zahtjev za povezivanje materijala sa živom kosti jest nastanak apatita na njegovoj površini u živom tkivu, te da se takva formacija apatita može pokazati i *in vitro* korištenjem SBF-a. To znači da se *in vivo* bioaktivnost materijala može predvidjeti *in vitro* ispitivanjem njegovog ponašanja u SBF-u [12].

## 2.2 Vrste SBF-a

Originalni SBF, koji se koristio do 1991. godine, nije imao  $\text{SO}_4^{2+}$  komponentu koju krvna plazma sadrži [13]. To je bilo ispravljeno u znanstvenim radovima Kokuba *et al.* 1991 [12]. Tada je nastao tzv. “korigirani SBF” (c-SBF), koji se od tada nadalje, od strane mnogih istraživača, koristi pod nazivom SBF. S obzirom na to da je SBF otopina koja je prezasićena prema apatitu, teško je pripremiti čisti SBF bez ikakve precipitacije. 1995. godine Cho *et al.* predstavili su svoj recept za lakšu pripremu korigiranog SBF-a. Sastav korigiranog SBF-a vidljiv je u tablici 1., gdje se vidi da je on i dalje bio bogatiji  $\text{Cl}^-$  i siromašniji  $\text{HCO}_3^-$  ionima nego ljudska krvna plazma. 2003. godine Oyane *et al.* pokušali su popraviti tu razliku [14] pripremom revidiranog SBF-a (r-SBF), kod kojeg su sadržaji  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  iona umanjeni odnosno povećani kako bi bolje oponašale ljudsku krvnu plazmu. No i ovaj SBF je naišao na problem, s obzirom na to da kalcijev karbonat ima snažnu tendenciju da precipira iz njega, jer je prezasićen prema ne samo apatitu, već i kalcitu [15].

2004. Takadama *et al.* predstavili su novi unaprijeđeni SBF (n-SBF) kod kojeg su smanjili samo koncentraciju  $\text{Cl}^-$  iona, ostavivši razinu  $\text{HCO}_3^-$  iona jednaku onoj kod korigiranog SBF-a [16]. Ovaj novi SBF bio je uspoređen s korigiranim SBF-om u njegovu stabilnosti i reproduktibilnosti formacije apatita na sintentskim tvarima. Oba SBF-a bila su podvrgnuta testiranju u deset različitih instituta. Kao rezultat, potvrđeno je da se c-SBF ne razlikuje od n-SBF-a niti u stabilnosti niti reproduktibilnosti [16]. Kroz ovo testiranje, pristup proizvodnji c-SBF-a bio je pažljivo provjeren i prerađen tako da bi se SBF mogao lakše pripremiti.

2003. godini, korigirani SBF s prerađenim receptom bio je priložen Tehničkom Odboru ISO/TC150 u sklopu Međunarodne Organizacije za Standardizaciju (ISO) kao rješenje za laboratorijsko mjerenje sposobnosti formacije apatita na materijalima korištenim za medicinske

svrhe, te je kao takav korišten do današnjeg dana. Kemijski sastavi svih dotadašnjih SBF-ova u usporedbi s krvnom plazmom prikazani su u tablici 1 [11].

**Tablica 1 Prikaz kemijskih sastava svih vrsta SBF-ova i ljudske krvne plazme [11].**

Ionska koncentracija (mM)								
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Ljudska krvna plazma</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
<b>Originalni SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0
<b>c-SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
<b>r-SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
<b>n-SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5

### 3 Mehanizam djelovanja

U svrhu opisivanja djelovanja bioaktivnog materijala u SBF-u poslužit ćemo se kristalizacijskom teorijom. Kristalizacijska teorija tvrdi da su sposobnost vezivanja za kost (bioaktivnost) i formacija apatita u SBF-u dvije različite pojave. Kako bismo objasnili ovu tvrdnju, potrebno je obratiti pozornost na osnovne principe teorije kristalizacije i povezati ih sa SBF testom bioaktivnosti.



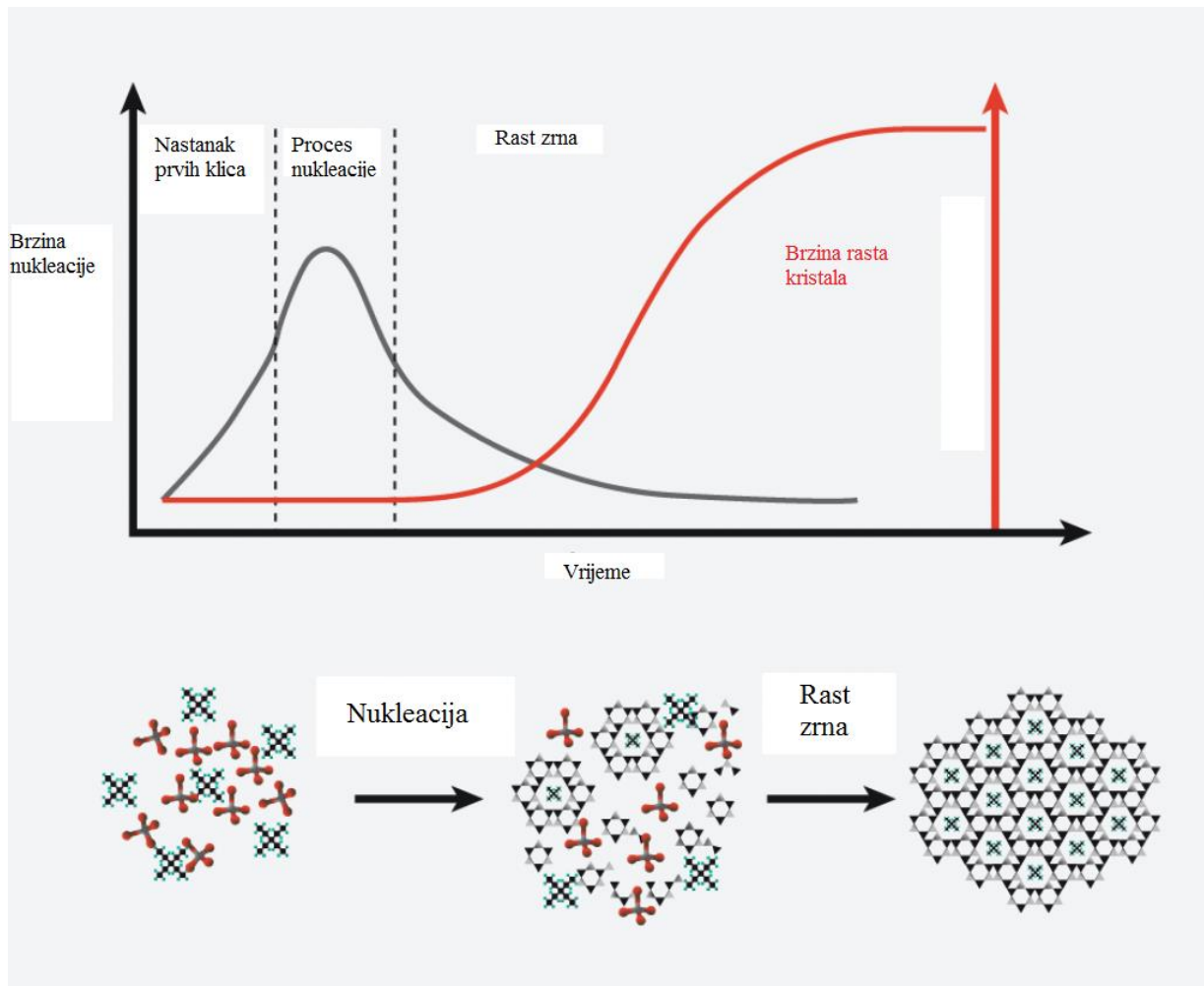
**Slika 4** Kristal apatita nastao u laboratorijskom okruženju [17].

#### 3.1 Kristalizacijska teorija

Kristalizacija je prirodni ili umjetni proces u kojem nastaju krute tvari čije su građevne jedinice (atomi ili molekule) poredane u visoko organiziranu strukturu poznatu kao kristal. Najpoznatiji načini na koje kristali nastaju su precipitacijom iz otopine, skrutnjivanjem ili, rjeđe, depozicijom iz plina. Karakteristike nastalih kristala izrazito ovise o faktorima kao što su okolna temperatura i tlak.

Kristalizacija se odvija u dva glavna koraka, a to su nukleacija i rast zrna. Nukleacija označuje pojavu kristalne faze koja nastaje ili iz ohlađene tekućine ili iz prezasićene otopine. Drugi korak,

rast zrna, jest proces u kojem se povećava veličina zrna te kod kojeg kristalna tvar poprima svoj oblik. Grafički prikaz ovisnosti brzine nukleacije i rasta zrna o vremenu nalazi se na slici 5 [18].

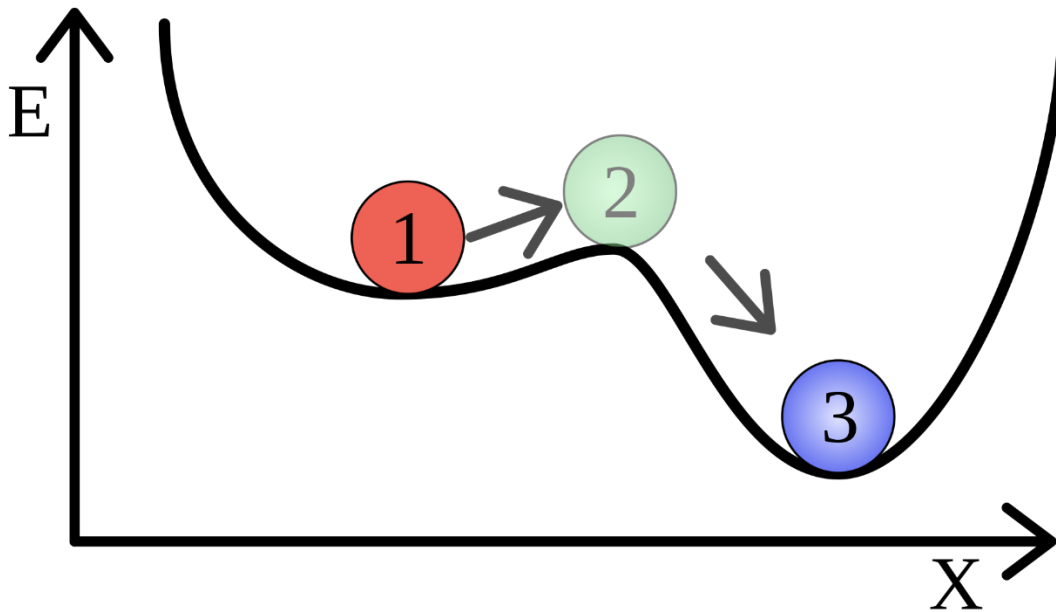


Slika 5 Grafički prikaz ovisnosti brzine nukleacije i rasta zrna o vremenu [18].

## 3.2 Dinamika kristalizacije

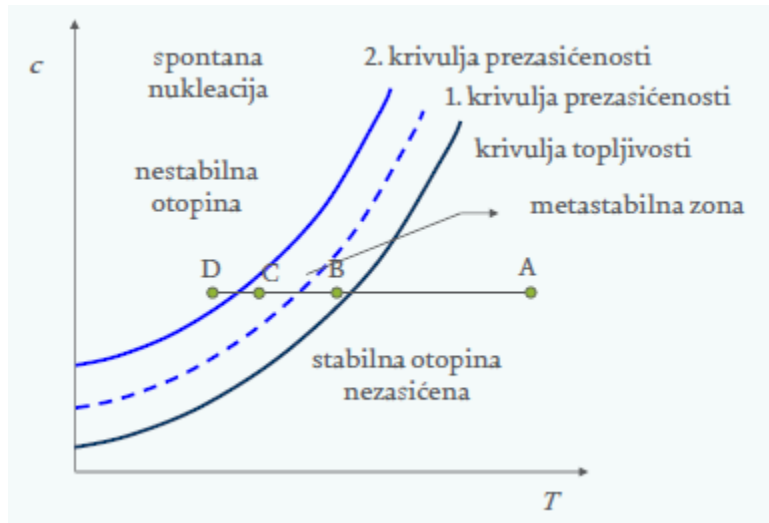
### 3.2.1 Nukleacija

Nukleacija je prvi korak u nastanku nove termodinamčke faze ili strukture samosastavljanjem ili samoorganizacijom. Ona je izrazito stohastičan (kaotičan) proces, dokazano time što će dva identična sustava pokazati drugačija vremena nukleacije u istim uvjetima [19]. Standardna teorija koja opisuje ponašanje tvari tijekom nukleacije naziva se klasična nukleacijska teorija (eng. *Classic Nucleation Theory*, CNT). CNT kvantitavno analizira brzinu nukleacije s pretpostavkom da je početno stanje metastabilno. Metastabilnost je opisana na slici 6.



**Slika 6** Opis energetske stabilnosti sustava, gdje je 1) metastabilno stanje (slabije uravnoteženo – slabija veza), 2) nestabilno stanje i 3) stabilno stanje (uravnoteženo – jača veza) [20].

Kada se neka krutina dodaje u otapalo i time gubi svoj integritet, nastaje otopina. Svaka otopina ima gornju granicu tvari koju može otopiti dok je još u stabilnom stanju (slika 6 – stanje 3), zvanu topljivost. Za većinu otopina, topljivost raste s porastom temperature. Povećanjem otopljene krute tvari iznad granice topljivosti otopina postaje zasićena – ona je u ravnoteži s krutom tvari. Krivulje topljivosti, zasićenosti i prezasićenosti za većinu poznatih otopina prikazane su na slici 7.



**Slika 7 Prikaz krivulja topljivosti, zasićenosti i prezasićenosti [21].**

Dok je količina otopljene tvari između krivulje topljivosti i prve krivulje prezasićenosti, vjerojatnosti nastanka kristala su jako male. Tek se nakon prelaska prve krivulje prezasićenosti i ulaskom u metastabilno područje (slika 6 – stanje 1) znatno povećava vjerojatnost za kristalizaciju. S dodatnim povećanjem koncentracije smanjuje se metastabilnost otopine, sve do druge krivulje prezasićenosti, nakon koje otopina ulazi u nestabilno stanje (slika 6 – stanje 2) [21]. Prezasićenost je opisana jednadžbama (1) i (2):

$$\Delta c = c - c^* \quad \text{te} \quad (1)$$

$$S = \frac{c}{c^*}, \quad (2)$$

- gdje je:
- $\Delta c$  – prezasićenost,
  - $c$  – trenutna koncentracija otopljene tvari,
  - $c^*$  - koncentracija zasićenosti i
  - $S$  – omjer prezasićenosti [21].

### 3.2.1.1 Primarna nukleacija

Primarna nukleacija odnosi se na početni nastanak klica kristalizacije tamo gdje druge klice nisu prisutne. Ova nukleacija može se odvijati na dva načina – homogeno i heterogeno. Homogena nukleacija jest ona nukleacija na koju ne utječu nikakve krutine u sustavu – uključujući stijenke posude kao i bilo koje čestice stranog podrijetla. Heterogena nukleacija se odvija kada krute čestice



stranih tijela podižu brzinu nukleacije. Homogena nukleacija se rijetko primjećuje u stvarnome svijetu, prvenstveno zbog visoke energije potrebne za početak reakcije bez ikakve prisutne krutine u svrhu katalizacije procesa. Proces primarne nukleacije opisan je jednačbom (3) [22]:

$$B = \frac{dN}{dt} = k_n(c - c^*)^n = k_n \Delta c^n, \quad (3)$$

- gdje je:
- $B$  – broj klica nastalih u jedinici vremena,
  - $dN$  – broj klica nastalih u jedinici volumena,
  - $k_n$  – konstanta specifična za parametre procesa,
  - $n$  – empirijski eksponent (najčešće iznosi između 3 i 4) i
  - $c$ ,  $c^*$  i  $\Delta c$  – iznosi zasićenosti opisani u poglavlju 3.2.1.

### 3.2.1.2 Sekundarna nukleacija

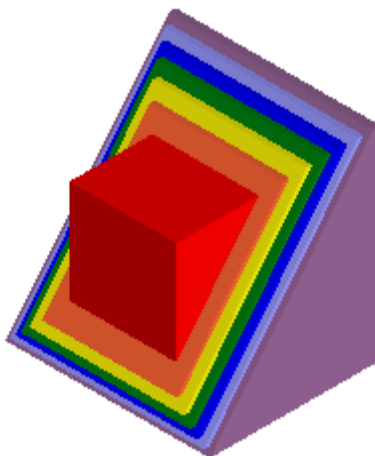
Sekundarna nukleacija odnosi se na nastanak klica pod utjecajem drugih klica, prethodno nastalih u primarnoj kristalizaciji. Nekad se naziva i kontaktna nukleacija. Proces je sličan primarnoj nukleaciji s malim razlikama, opisanim jednačbom (4) [22, 23]:

$$B = \frac{dN}{dt} = k_1 M_T^j (c - c^*)^b = k_1 M_T^j \Delta c^b, \quad (4)$$

- gdje je:
- $B$ ,  $dN$  – iznosi opisani u poglavlju 3.2.1.1,
  - $k_1$  – konstanta specifična za parametre procesa,
  - $M_T$  – gustoća suspenzije,
  - $j$  – empirijski eksponent (najčešće iznosi 1),
  - $b$  – empirijski eksponent (najčešće iznosi 2) i
  - $c$ ,  $c^*$  i  $\Delta c$  – iznosi zasićenosti opisani u poglavlju 3.2.1.

### 3.2.2 Rast zrna

Jednom kad se stvori prvi mali kristal, odnosno klica, on djeluje kao točka konvergencije za druge molekule, povećavajući tako svoje dimenzije. Geometrija rasta kristala je prikazana na slici 8 [24, 25]. Na slici svaka boja predstavlja jednaku masu konvergirajućih molekula. Kako novonastali kristal ima sve veću površinu, slojevi postaju sve tanji.



**Slika 8** Shematski prikaz konvergencije molekula i rasta kristala (crvena masa) [25].

Brzina rasta kristala kompleksan je proces na koji utječe nekoliko utjecajnih faktora kao što su površinska napetost, tlak, temperatura, brzina kretanja klica u otopini, Reynoldsov broj i drugi.

### 3.3 Kritična veličina zrna apatita u SBF-u

Kako bi se formirao stabilan kristal apatita, on mora prijeći tzv. energiju aktivacije za kristalizaciju. Ova energija je rezultat ravnoteže između povećanja energije zahvaljujući stvaranju nove interakcije između krutine i tekućine, i smanjenja energije zbog formiranja kristala. Stoga, kako je omjer površine prema volumenu proporcionalan  $1/r$ , gdje je  $r$  polumjer čestice, mora biti dosegnut minimalni (kritični) polumjer čestice [26]. Taj odnos veličina pobliže je opisan jednačbom (5) [26]:

$$r_c = 2\beta_a \sigma V / (3\beta_v RT \ln S), \quad (5)$$

- gdje je:
- $\beta_a$  i  $\beta_v$  – geometrijski faktori koji se odnose na površinu i volumen precipitirajućih klica,
  - $\sigma$  – slobodna energija po jedinici površine kod interakcije krutina-tekućina,
  - $V$  – molarni volumen precipitata,
  - $T$  – apsolutna temperatura,
  - $R$  – plinska konstanta i
  - $S$  – omjer zasićenosti, opisan u poglavlju 3.2.1.

Ova jednadžba vrijedi za klice koje se formiraju u otopini, i zove se homogena nukleacija. Kada klice nastaju na tvrdj površini, to se zove heterogena nukleacija, bolje opisano u poglavlju 3.2.1.1. U ovome slučaju treba biti sagledana i površinska slobodna energija između klice i krutine te je u tom smislu zanimljivo napomenuti da Kokubo i Takadama [11] preporučuju da se testovi bioaktivnosti provode u „plastičnoj posudi s glatkim površinama i bez ogrebotina (...) zato jer se nukleacija apatita može inducirati ili na površini staklene posude ili na rubu ogrebotina.“

### 3.4 Kristalizacijska teorija u SBF-u

Povezivanjem kristalizacijske teorije s testovima u SBF-u postaje jasno da je “bioaktivna” tvar materijal koji ubrzava heterogenu kristalizaciju apatita u otopini prezasićenoj prema hidroksiapatitu. Ta heterogena kristalizacija može biti postignuta primjenjujući nekoliko različitih strategija:

1. Primjenom apatitnih klica koje bi uklonile potrebu za ikakvom prvotnom nukleacijom.  
Ova strategija objašnjava zašto se hidroksiapatit, kada je uronjen samostalno u SBF, brzo prekriva novim kristalima apatita [27, 28].
2. Dodavanjem apatita površini s niskom graničnom površinskom energijom.  
Ova strategija objašnjava zašto se apatit brzo stvara na  $\beta$ -trikalcit-fosfat ( $\beta$ -TCP) površinama [28, 29]. Također može biti povezana sa savjetom Kokuba i Takadame iz

poglavlja 3.2. Smanjenjem površinske energije  $\sigma$  iz jednadžbe (5) smanjuje se kritični promjer čestice i time se potiče kristalizacija.

### 3. Modifikacijom lokalne prezasićenosti u korist precipitacije apatita.

Ova strategija objašnjava zašto se biostaklo i slični materijali brzo prekriju kristalima apatita po uranjanju u SBF. Povećanjem lokalne prezasićenosti zapravo se modificira varijabla  $S$  iz jednadžbe (5) i varijablu  $\Delta c$  iz jednadžbi (3) i (4), smanjujući kritičnu veličinu čestice i povećavajući brzinu nastanka zrna kritične veličine [29].

S obzirom na to da za treću strategiju postoji nekoliko sub-strategija, ona će biti više razmatrana nadalje.

### 3.5 Modifikacija lokalne prezasićenosti

Dodavanje krutine u SBF može promijeniti kemijski sastav otopine i stoga promijeniti varijable koje diktiraju nastanak apatita. Jedna od najbitnijih takvih varijabli jest lokalna prezasićenost  $\Delta c$ , odnosno omjer zasićenosti  $S$ , definiran u jednadžbama (1) i (2). Lokalna promjena prezasićenosti može biti ili pozitivna, olakšavajući nastanak apatita, ili negativna, otežavajući nastanak apatita. Ako uzmemo u obzir biostaklo, ono je lužnat materijal i stoga izaziva lokalno povećanje lužnatosti [30] za dvije pH jedinice, što dovodi do 10-100 puta manje topivosti hidroksiapatita [31], i stoga do velikog ubrzanja nukleacije apatita. Ta pojava je pojačana oslobađanjem kalcijevih iona iz biostakla [32, 33].

Još jedan način za lokalnu modifikaciju kemijskog sastava otopine jest korištenje materijala topivog u SBF-u koji može otpustiti velike količine kalcijevih i/ili fosfatnih iona. Ovo pravilo vrijedi za [31, 34]:

1. kalcijev sulfat hidrat (CSH, topivost blizu 100 mM Ca iona – serum: 1.6 mM),
2. kalcijev sulfat dihidrat (CSD, topivost blizu 10 mM Ca iona) i
3. dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD).

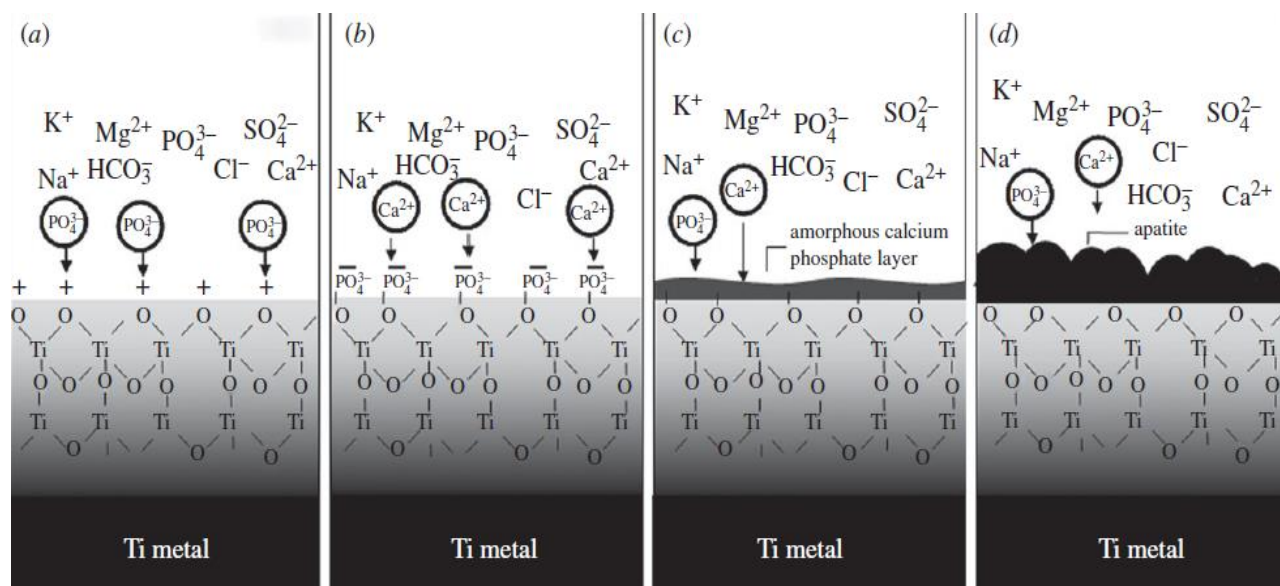
Osim pH promjene ili oslobađanja kalcijevih i/ili fosfatnih iona, materijal također može promijeniti lokalnu zasićenost oslobađajući ione ugrađene u loše topive apatite. Na primjer, oslobađanje fluoridnih iona iz materijala moglo bi povećati lokalnu zasićenost SBF-a prema fluoroapatitu. Međutim, ne postoje nikakva istraživanja povezana s takvim mehanizmom [35].

### 3.6 Utjecaj promjene lokalnih fizikalnih veličina na formaciju apatita

U prethodnom poglavlju opisano je kako promjena lokalnog kemijskog sastava SBF-a izaziva promjenu prezasićenosti koja ubrzava ili usporava precipitaciju apatita. Očito je da lokalne fizikalne veličine imaju utjecaja na kinetiku reakcije. Korištenjem dinamičke umjesto statičke inkubacijske otopine znatno se odgađa formacija apatita [32, 36]. Sličnim principom, povećanje površine materijala (npr. korištenjem granula umjesto krupnijih oblika) dovodi do brzih promjena u lokalnom SBF sastavu i tako do ranijeg nastanka apatita [37]. Također, očekuje se da bi promjena u omjeru materijal/tekućina znatno utjecala na brzinu nastanka apatita.

### 3.7 Proces ionske razmjene između SBF-a i bioaktivne površine

Iz kemijske perspektive apatit se razvija na površini bioaktivne tvari zbog niza ionskih razmjena između SBF-a i bioaktivne površine. S površinom tvari prvo reagiraju  $\text{PO}_4^{3-}$  ioni, koji se adsorbiraju na nju. Adsorpcijom fosfatnih iona površina postaje negativno nabijena, te privlači pozitivno nabijene ione iz SBF-a. Kalcijevi ioni ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se dolaskom u kontakt s fosfatnim ionima kemijski vežu za njih te nastaje amorfni sloj kalcijeva fosfata. Taj amorfni sloj služi kao baza za postepeno vezivanje preostalih iona potrebnih za nastanak apatita. Shema tog procesa kod uranjanja titanove površine s oksidnim slojem u SBF prikazana je na slici 9 [51].

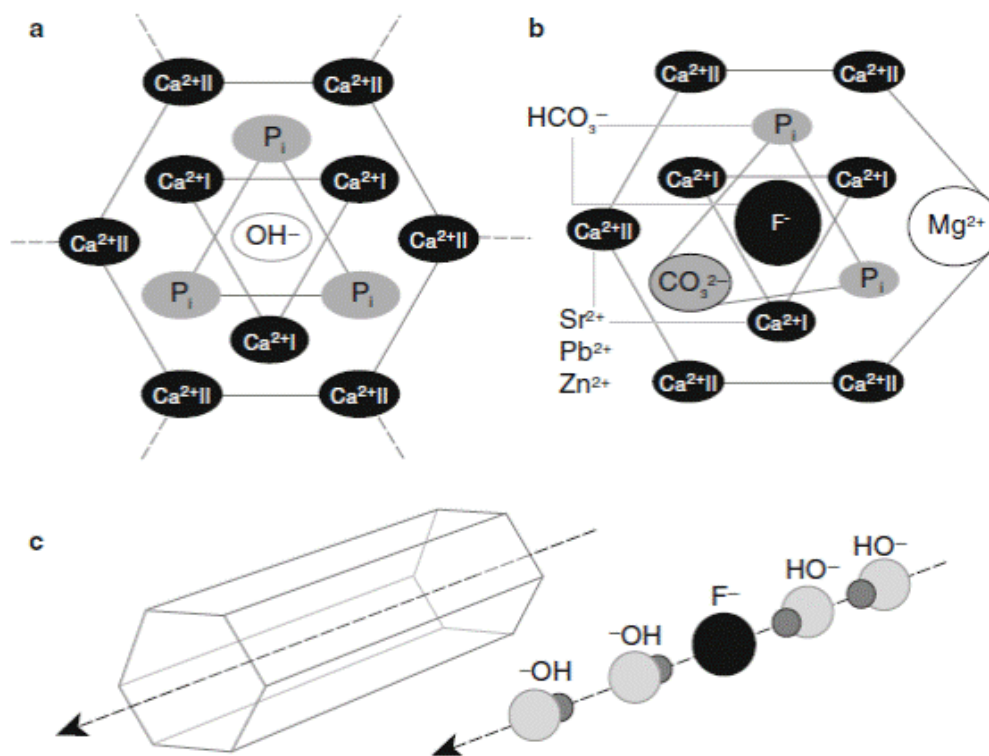


**Slika 9** Shema procesa formacije apatita na titan-oksidnoj površini. a) Adsorpcija fosfatnih iona, b) privlačenje kalcijevih iona, c) nastanak kalcijeva fosfata i d) nastanak apatita [38].

### 3.8 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit je prirodna forma kalcijevog minerala apatita s formulom  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . On je također i najčišći član kompleksne obitelji kalcijevih apatita. Zadnji član formule apatita  $\text{OH}^-$  može se zamijeniti fluoridom, kloridom ili karbonatom, stvarajući tako bliske fluoroapatite i kloroapatite. Čisti hidroksiapatit bijele je boje, no trošenje i uključci ga često diskoloriziraju. Izrazito je sličan koštanim mineralima [39].

Hidroksiapatit nastaje kristalizacijom, i kristalizira u heksagonalni kristalni sustav, prikazan na slici 9, te ima stehiometrijski omjer Ca/P 1,67. Bitna karakteristika ovog minerala jest njegova značajna stabilnost u usporedbi s drugim kalcijevim fosfatima. U termodinamičkom smislu, hidroksiapatit je najstabilnija kalcij fosfatna tvar u vidu uvjeta živog tijela, kao što su temperatura, pH i ionski sastav tjelesnih tekućina [40].



**Slika 10** Prikaz kristala apatita. (a) Regularna heksagonalna jedinična ćelija apatita. (b) Prikaz mogućih supstitucija i uključaka u svrhu modifikacije apatita. (c) Izometrijski prikaz heksagonalnog kristala [41].

S obzirom na svoja vrhunska svojstva poput biokompatibilnosti, bioaktivnosti, osteokonduktivnosti, netoksičnosti i neskolonosti izazivanju upala, hidroksiapatit se primjenjuje u raznim područjima kao što su inženjerstvo koštanog tkiva, ortopedija, stomatologija, proizvodnja implantata i slično [39].

Umjetni kompoziti na bazi hidroksiapatita se sve više koriste kao graftovi, implantati i proteze, jedna od kojih je prikazana na slici 10 [39].



**Slika 11**      **Fleksibilni hidrogel-HA kompozit, koji se koristi kod popravka oštećenih tetiva i ligamenata [39].**

## 4 Titan i njegove legure

Titan je otkrio William Gregor 1971. godine u Cornwallu u Velikoj Britaniji. Element se pojavljuje u velikom broju mineralnih nakupina, najviše kao rutil i ilmenit, široko raširenih po zemljinoj kori i litosferi, a pronađen je u gotovo svim živim bićima, vodama, stijenama i zemljama[43]. Metal se dobiva iz mineralnih ruda utilizacijom Kroll i Hunter postupaka.



**Slika 12 Prikaz šipki od čistog titana [42].**

Titan se može legirati sa željezom, aluminijem, vanadijem i molibdenom, kao i s nekim drugim elementima u svrhu proizvodnje čvrstih i laganih legura za zrakoplovnu, vojnu i automobilsku industriju, te medicinske i druge svrhe [43].

Dva glavna svojstva titana su otpornost na koroziju i visok omjer čvrstoća-gustoća, najviši od svih metalnih elemenata [44]. U svom elementarnom stanju, titan je čvrst kao neki čelici dok ima nižu gustoću. Postoje dvije alotropske modifikacije i pet prirodno prisutnih izotopa ovog elementa, od  $^{46}\text{Ti}$  do  $^{50}\text{Ti}$ , dok je najzastupljeniji  $^{48}\text{Ti}$  [45].



#### 4.1 Fizikalna svojstva titana i njegovih legura

Kao čisti metal, titan je poznat po svojem omjeru čvrstoća-gustoća (najvišem od svih metalnih elemenata [44]) i izraženoj duktilnosti. Radi se o sivkasto-bijelom metalu s relativno visokom temperaturom tališta (1650 °C). Paramagnetičan je i ima poprilično nisku i električnu i toplinsku vodljivost.

Komercijalno čisti (99,2%) titan ima vlačnu čvrstoću od oko 430 MPa, sličnu kao neke uobičajene čelične legure. U usporedbi s aluminijem, titan je 60 % gušći ali ima dvostruko veću čvrstoću. Mekši je od većine toplinski obrađenih čelika. Osnovna fizikalna svojstva titana prikazana su u tablici 2.

**Tablica 2 Prikaz nekih fizikalnih svojstava komercijalno čistog titana [46].**

Fizikalno svojstvo	Iznos
Gustoća	4506 kg/m <sup>3</sup>
Vlačna čvrstoća	434 MPa
Talište	1650 °C
Modul elastičnosti	116 GPa
Modul smika	44 GPa
Poissonov omjer	0,32
Tvrdoća (Mohsova skala)	6,0
Tvrdoća (po Vickersu)	200 HV
Brzina zvuka na sobnoj temperaturi	5090 m/s
Toplinska ekspanzija	8,6 μm/m*K
Provodljivost topline	21,9 W/m*K
Provodljivost struje	420 nΩ*m

Titan se u svijetu najviše koristi u nekom od svojih legiranih stanja. Glavni razlog tome jest što legure titana posjeduju izrazitu vlačnu čvrstoću i žilavost, postojane na visokim temperaturama, uz nisku gustoću i visoku otpornost na koroziju. Iako se primjenjuje u širokom spektru industrija, visoka cijena čistog titana kao i proizvodnih procesa za dobivanje njegovih legura ograničavaju njihovu upotrebu. Najčešća legura titana jest Ti6Al4V, zbog vrhunske topljivosti aluminija i

vanadija koja jako varira s temperaturom, omogućujući tako stabilnu dvofaznu strukturu ( $\alpha+\beta$ ) [47].

S obzirom na udio faza, titanove legure dijele se na četiri vrste [47]:

- $\alpha$  legure – legure koje sadrže neutralne legirne elemente (poput kositra) i/ili  $\alpha$  stabilizatore (poput aluminijske ili kisika). Nisu toplinski obradivi. Neki primjeri su Ti5Al2Sn ELI (eng. *Extra Low Interstitial*) i Ti8Al1Mo1V.

- Djelomično  $\alpha$  legure – legure koje sadrže male količine duktilne  $\beta$ -faze. Osim  $\alpha$  stabilizatora, ove legure su legirane s 1-2 %  $\beta$  stabilizatora poput molibdena, silicija ili vanadija. Neki primjeri su Ti6Al2Sn4Zr2Mo i Ti 1100.

- $\alpha+\beta$  legure – legure koje su metastabilne i uobičajeno uključuju neku od kombinacija  $\alpha$  i  $\beta$  stabilizatora, i koje mogu biti toplinski obrađene. Neki primjeri su Ti6Al4V i Ti6Al6V2Sn.

- $\beta$  i djelomično  $\beta$  legure – legure koje su metastabilne i sadrže uglavnom  $\beta$  stabilizatore. Mogu biti tretirane u otopinama i dozrijevane za veću čvrstoću. Neki primjeri su Ti10V2Fe3Al i Ti29Nb13Ta4,6Zr.

Svi postojeći legirni sustavi razvijeni su sa specifičnim ciljevima ovisno o eksploatacijskim zahtjevima.

## 4.2 Kemijska svojstva titana i njegovih legura

Poput nekih drugih čistih metala, primjerice magnezija ili aluminijske, titan oksidira čim dođe u dodir sa zrakom, stvarajući titanov dioksid na svojoj površini. Doduše, pri sobnim temperaturama, sporo reagira s vodom ili zrakom upravo zbog sloja titanovog dioksida, koji sprječava daljnju reakciju unutar volumena tijela. Tek na temperaturi od 1260 °C u zraku ili 610 °C u čistom kisiku titan može cjelovito reagirati s kisikom [43].

Atmosferska pasivacija omogućena tankim slojem titanovog dioksida (1-2 nm debljine) daje titanu izvrsnu otpornost na koroziju – dovoljno visoku da izdrži napad sumpornih, kloridnih i organskih kiselina [43]. Termodinamički gledano, titan je poprilično reaktivan materijal koji gori u normalnoj atmosferi na temperaturama znatno nižim od njegove temperature tališta. Iz istog

razloga, čisto taljenje titana moguće je samo u inertnoj atmosferi ili vakuumu. Na temperaturi od 550 °C reagira s klorom i drugim halogenima, te apsorbira vodik [48].

Jedan je od rijetkih metala koji gore u struji čistog dušika, reagirajući tako na 800 °C da nastane titanov nitrid, koji je tvrda ali i krhka faza [49]. Svojstvo titana da reagira s dušikom, kisikom i drugim plinova ekstenzivno se koristi u svrhu detekcije istih, primjenom filamenata od čistog titana [46].

## 5 Eksperimentalni dio rada

Cilj eksperimentalnog dijela rada bio je utvrditi principe *in vitro* ispitivanja bioaktivnosti površina materijala inače namijenjenih implantaciji u ljudski organizam izlaganjem djelovanju simulirajuće tjelesne tekućine (SBF-a).

Analizom znanstvenih radova i članaka na temu bioaktivnosti i simulirajuće tjelesne tekućine postavljene su metode i ciljevi eksperimenta. Izradom plana istraživanja diplomskog rada, na temelju istraživanja provedenog u svrhu pisanja teoretskog dijela i predznanja, određen je kronološki redoslijed postupaka u svrhu postizanja željenih rezultata kako je opisano u sljedećem odlomku.

Uzorci su dobavljeni u obliku šipki titanove legure Ti6Al4V ELI. Nakon rezanja, brušenja i poliranja uzorci su pripremani na različite načine u svrhu postizanja četiri stanja:

1. Osnovno stanje (neobrađeno),
2. TiN prevlaka,
3. Ionizirano stanje (plazmatski aktivirana površina) i
4. TiO<sub>2</sub> oksidirana površina (rutil).

Nakon pripreme, uzorci su analizirani svjetlosnom mikroskopijom i mjerenjem parametara hrapavosti, a zatim su vagani. Slijedila je priprema SBF-a iteracije 1, koja je korištena u prvom ciklusu ispitivanja bioaktivnosti. Nakon prvog ispitivanja ponovno je provedena analiza (bez analize hrapavosti), te je započeta priprema SBF-a iteracije 2. Uzorci su zatim izloženi djelovanju SBF-a druge iteracije, nakon čega su ponovno bili analizirani svjetlosnom mikroskopijom, mjerenjem parametara hrapavosti i vaganjem. Slijedila je analiza prikupljenih rezultata i donošenje odgovarajućih zaključaka.

## 5.1 Priprema uzoraka

Osnovni materijal od kojeg su uzorci izrađeni jest titanova legura povišene čistoće Ti6Al4V ELI (eng. *Extra Low Interstitial*) nabavljena direktno od proizvođača AZ STEEL srl. (Italija). Sastav legure garantiran od strane proizvođača dan je u tablici 3.

**Tablica 3** Garantirani kemijski sastav legure Ti6Al4V ELI proizvođača AZ STEEL srl. predočen masenim udjelom konstituenata.

%	Al	V	N	C	H	Fe	O	Ti
Min	5,5	2,5	-	-	-	-	-	Ostatak
Max	6,5	4,5	0,05	0,08	0,0125	0,25	0,12	

Materijal za uzorke naručen je i dobavljen u predobrađenom stanju u obliku šipke promjera 16 mm. Zatim je šipka rezana na uzorke debljine 4 mm na tokarskom stroju uz hlađenje. Nakon rezanja slijedilo je brušenje uzoraka SiC brusnim papirom gradacije P 320 u trajanju od 7 minuta, te naknadno hrapavosti P 500 u trajanju od 7 minuta. Slijedilo je poliranje SiC papirom gradacije P 1200 u trajanju od 7 minuta. Nakon postupka brušenja i poliranja uzorci su bili čišćeni u ultrazvučnim kupkama, prvotno acetonom u trajanju od 10 minuta, te naknadno etilnim alkoholom, također u trajanju od 10 minuta. Slijedilo je ispiranje demineraliziranom vodom i sušenje.

Nakon zajedničke početne pripreme površina, uzorci su podijeljeni u četiri kategorije. Za svaki uzorak je slijedila posebna dodatna obrada. Za potrebe ovog eksperimenta pripremljena su četiri različita uzorka, svaki od kojih je posebno opisan u slijedećim podpoglavljima.

Prvi uzorak jest uzorak u osnovnom stanju i nije dodatno obrađen ni na kakav način.

### 5.1.1 TiN prevlaka

Prevlačenje titanove legure TiN prevlakom ostvareno je korištenjem PACVD (eng. *Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition*) postupka u svrhu postizanja tankog TiN sloja specifičnih površinskih svojstava (otpornosti na trošenje, tvrdoće i sl.). PACVD jest postupak kemijske depozicije tankih filmova tvari iz ioniziranog plina na substrat (krutinu). Kemijske reakcije potrebne za depoziciju tankih filmova događaju se nakon nastanka plazme (korištenjem radio frekvencija, frekvencija izmjenične struje ili elektrodama). Prvi korak jest ionsko čišćenje površine. Taj dio postupka poznat je pod eng. nazivom *sputtering*. U sklopu tog koraka nabijene

čestice ubrzavaju se i udaraju o površinu uzoraka te izbijaju nečistoće i inertne oksidne spojeve. uzorak se izlaže ioniziranoj smjesi plinova sastavljenoj od iona i drugih aktivnih vrsta potrebnih za nastanak željenog filma na površini substrata.

U ovom istraživanju uzorci titanove legure su prvo bili izloženi bombardiranju ionima u plazmi u postupku ionskog čišćenja. Slijedio je korak depozicije TiCN međusloja zbog postizanja bolje prionjivosti finalnog TiN sloja, koji je nanesen u posljednjem koraku. TiCN sloj omogućuje postepeni prijelaz između svojstava osnovnog materijala i svojstava završnog TiN sloja.

Parametri procesa kojim je prevučeni eksperimentalni uzorak prikazani su u tablici 5.

**Tablica 4 Prikaz parametara procesa PACVD u svrhu postizanja TiN sloja.**

Parametri procesa		1. korak – sputtering*	2. korak - TiCN	3. korak - TiN
Temperatura [°C]		500	500	500
Trajanje [h]		2	3	1,5
Protok [L/h]	H <sub>2</sub>	140	140	140
	N <sub>2</sub>	23	13	15
	Ar	10	10	10
	CH <sub>4</sub>	-	4,5	-
Tlak [mbar]		2	2	2
Snaga plazme [W]		1800	1400	1650
Napon [V]		540	490	490

\*Sputtering – ionsko čišćenje.

#### 5.1.2 Plazmatski aktivirano stanje

Plazmatska aktivacija je metoda modifikacije površine korištenjem plazme, s ciljem povećanja adhezijskih svojstava aktivirane površine. Može se koristiti kod gotovo svih materijala. U industrijskim postrojenjima se najčešće koristi za pripremu površina za lijepljenje, prevlačenje i bojanje. [50]

Svrha plazmatske aktivacije titanove legure bila je učiniti ju potencijalno podložnijom razmjeni iona, i time potencijalno poboljšati depoziciju hidroksiapatita na površini materijala u SBF-u. Uzorci su prvo bili izloženi ionskom čišćenju, opisanom u prethodnom poglavlju. Nakon ovog

koraka provedena je daljnja aktivacija površine kako je opisano u tablici 4 korakom 2. Parametri cijelog procesa kojim je aktiviran eksperimentalni uzorak prikazani su u tablici 4.

**Tablica 5 Prikaz parametara procesa plazmatske aktivacije.**

Parametri procesa		1. korak – <i>sputtering</i> *	2. korak
Temperatura [°C]		500	500
Trajanje [h]		2	6
Protok [L/h]	H <sub>2</sub>	200	180
	N <sub>2</sub>	20	20
	Ar	10	10
Tlak [mbar]		1,7	2
Snaga plazme [W]		1000	1800
Napon [V]		540	560

\**Sputtering* – ionsko čišćenje.

### 5.1.3 TiO<sub>2</sub> oksidni film (rutil)

Četvrti uzorak jest uzorak dodatno obrađen jednostavnim kemijskim i toplinskim tretmanima vodeći se primjerom istraživača Tadashija Kokuba *et al.* [51]. Nakon prvotne obrade uzorak je bio nagrizen u 5 M NaOH vodenoj otopini na temperaturi od 60 °C u trajanju od 24 h u svrhu prodiranja kisika u uzorak. Nakon nagrivanja, uzorak je ispran demineraliziranom vodom i sušen pri temperaturi od 35 °C u trajanju od 1 h. Nagrivanje i sušenje provedeni su u peći. Uzorci nakon nagrivanja i sušenja prikazani su na slici 12.



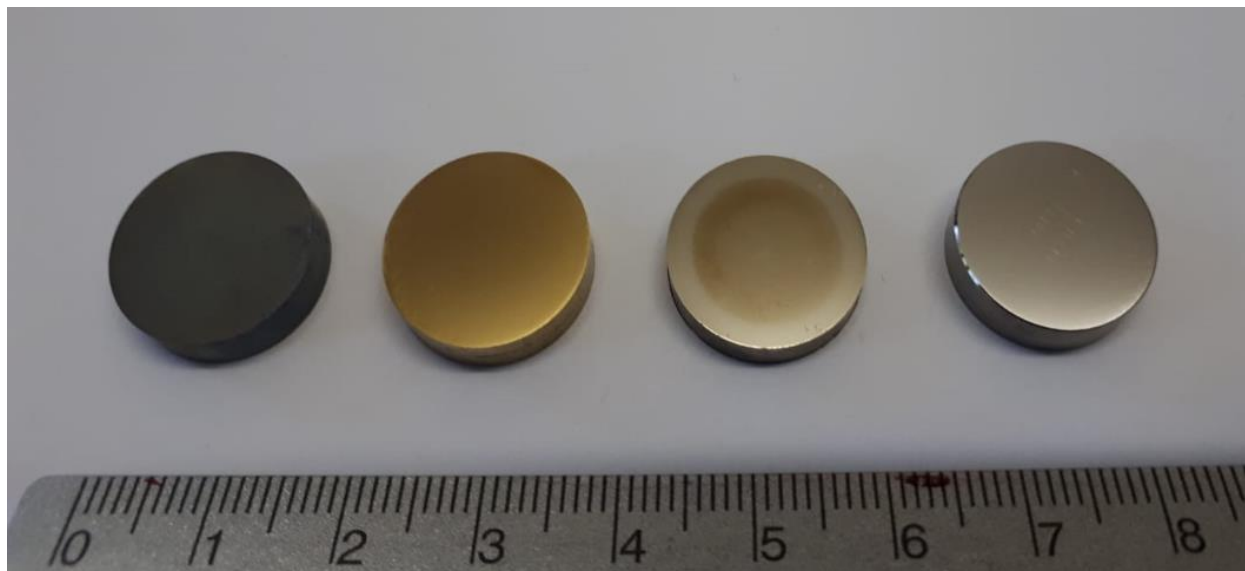
**Slika 13**      **Uzorci nakon nagrivanja i sušenja.**

Nakon nagrivanja i sušenja slijedila je toplinska obrada. Toplinska obrada bila je provedena u peći (slika 13) na temperaturi od 600 °C u trajanju od 1 h u ambijentnoj atmosferi. Brzina zagrijavanja iznosila je 5 °C/min. Nakon toplinske obrade uzorci su hlađeni prirodnim tijekom na zraku sobne temperature. Sve 4 vrste uzoraka nakon pripreme prikazane su na slici 14.



**Slika 14**      **Peć u kojoj je provedena toplinska obrada.**





**Slika 15** Prikaz uzoraka nakon pripreme. S lijeva na desno: rutil, TiN, ionizirano i osnovno stanje.

## 5.2 Priprema SBF-a

U eksperimentalnom dijelu u Laboratoriju za analizu metala Fakulteta strojarstva i brodogradnje pripremljene su dvije iteracije SBF-a: prva koja u konačnici nije imala zadovoljavajući pH [52], te druga koja je pH vrijednošću zadovoljila postavljeni zahtjev. Ispitivanja su provedena primjenom obiju iteracija tekućine, a prikupljeni rezultati analizirani su u nastavku rada.

SBF je u svojoj konačnoj inačici pripremljen po receptu institucije *Department of Material Chemistry, Graduate School Of Engineering, University of Kyoto*. SBF korišten u eksperimentu jest originalni SBF (više o tome u poglavlju 2.2). Priprema 500 mL otopine SBF-a sastojala se od četiri koraka kako slijedi:

1. Pranje sve opreme koja će biti u direktnom kontaktu s otopinom koristeći 1 M-HCl otopinu i destiliranu vodu, te sušenje iste.
2. Ulijevanje 250 mL destilirane vode u polietilensku bocu zapremnine 1 L, i pokrivanje boce satnim staklom.
3. Miješanje sadržaja boce magnetskom miješalicom. Ubacivanje i otapanje reagensa jednog po jednog redoslijedom prikazanim u tablici 6.

4. Postavljanje temperature otopine na 36,5 °C, i namještanje pH vrijednosti na 7,40 dodavanjem potrebne količine 1 M-HCl otopine.

**Tablica 6 Prikaz količina i redosljeda reagensa korištenih za dobivanje SBF otopine.**

Redosljed	Reagens	Količina za 500 mL SBF-a	
		Iteracija 1	Iteracija 2
1.	NaCl	5 g	3,998 g
2.	NaHCO <sub>3</sub>	0,175 g	0,175 g
3.	KCl	0,112 g	0,112 g
4.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,114 g	0,114 g
5.	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,1525 g	0,1525 g
6.	1 M-HCl	20 mL	20 mL
7.	CaCl <sub>2</sub>	0,139 g	0,139 g
8.	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0355 g	0,0355 g

Kao što se vidi u tablici, iteracija 1 ima znatno veću količinu NaCl reagensa. To je iz razloga što je, nakon pripreme prve iteracije SBF-a, otopina imala pH vrijednost od 7,26 (što je niže od predviđenih 7,40), tako da se pH vrijednost nije mogla namjestiti na ciljanu vrijednost dodavanjem kiseline. Pretpostavljeno je da je pH vrijednost bila niža od predviđene zbog toga što u prvoj iteraciji reagensi nisu bili potpuno osušeni, već direktno ubačeni u otopinu nakon doziranja i vaganja. U drugoj iteraciji, nakon sušenja reagensa, dobivena pH vrijednost iznosila je točnih 7,40.

Dodavanjem reagensa iz tablice 6 rasla je zasićenost otopine, povećavajući tako faktor ( $c-c^*$ ), odnosno  $\Delta c$  iz jednadžbi (3) i (4) opisanih u poglavlju 3.2. To povećanje zasićenosti na kraju rezultira povećanjem broja klica kristala apatita nastalih u jedinici vremena, odnosno faktora  $B$ . Ovaj postupak također indicira da je odabrana *strategija* nastanka apatita treća od navedenih u poglavlju 3.4, odnosno modifikacija lokalne prezasićenosti u korist nastanka apatita.

Na slici 15 prikazana je Biosan Intelli-Stirrer MSH-300i magnetska miješalica korištena u procesu zadnjeg koraka pripreme SBF-a.



**Slika 16**      **Fotografija magnetske miješalice tijekom zagrijavanja SBF otopine.**

### **5.3 Provedba ispitivanja bioaktivnosti**

Nakon pripreme četiriju različitih, iznad spomenuta uzorka, i pripreme SBF-a, uzorci su položeni u polietilenske bočice i potpuno uronjeni u po 100 mL SBF-a iteracije 1, prikazano na slici 16. Razlog korištenja polietilenskih bočica umjesto staklenih jest taj što staklo posjeduje određenu bioaktivnost koja bi mogla negativno djelovati na eksperiment i preuzeti izlučivanje apatita na vlastitoj površini. Ovaj efekt bio bi izraženiji kada bi bočica imala ogrebotine s unutarnje strane (detaljnije opisano u poglavlju 3.3).



**Slika 17** Fotografija uzoraka uronjenih u SBF u polietilenskim bočicama.

Nakon uranjanja uzoraka u SBF, bočice su postavljene u peć na temperaturu od 37 °C u svrhu simulacije uvjeta unutar ljudskog tijela. Uzorci su tako ostavljeni u peći na 24 h. Peć s uzorcima prikazana je na slici 17.



**Slika 18** Fotografija uzoraka postavljenih u peć.

Nakon 24 h provedenih u peći uzorci su bili izvađeni iz bočica, a SBF uklonjen. Slijedilo je pranje uzoraka demineraliziranom vodom i sušenje na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Nedugo nakon toga započeta je priprema SBF-a iteracije 2, opisanog u prethodnom poglavlju.

Nakon proizvodnje SBF-a iteracije 2, ponovljeno je ispitivanje bioaktivnosti po istom principu. Nakon 24 h uzorci su bili izvađeni, oprani demineraliziranom vodom i osušeni na zraku.

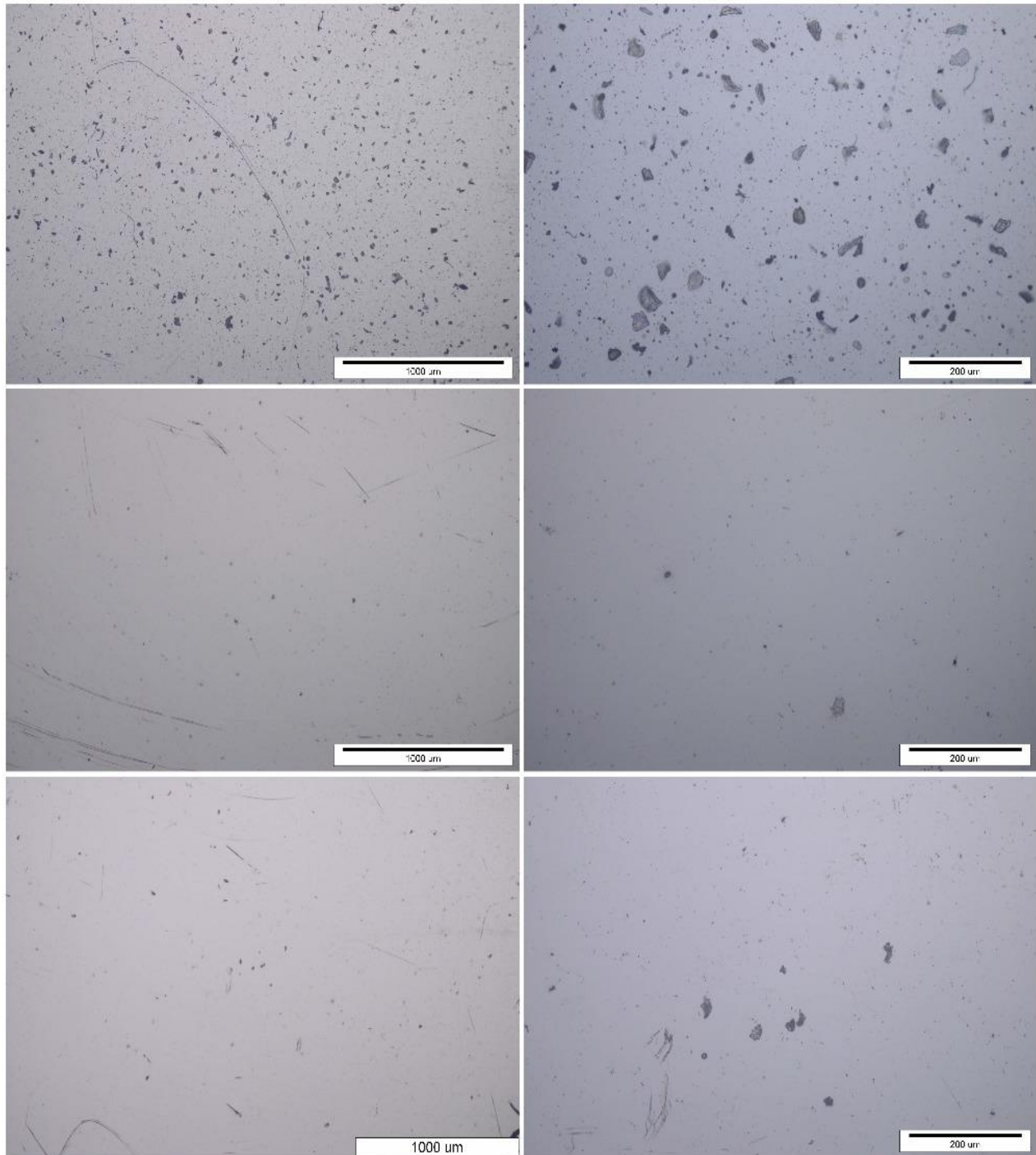
Nakon svega provedenog, pristupilo se analizi rezultata.

#### **5.4 Analiza površine i mase uzoraka**

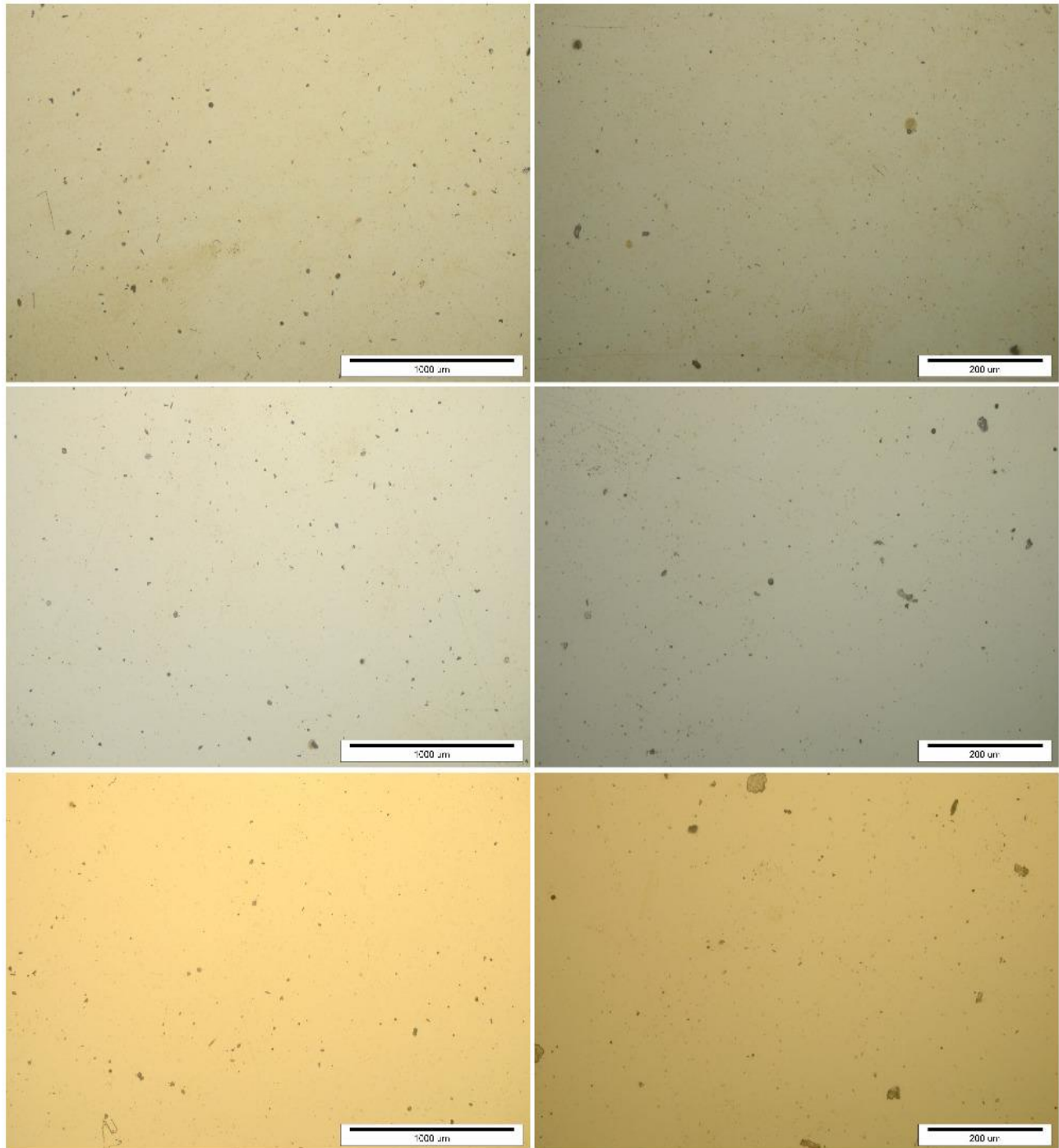
Nakon kemijskih i toplinskih obrada, te nakon izlaganja djelovanju simulirajuće tjelesne tekućine, slijedila je analiza površinskih karakteristika uzoraka primjenom svjetlosne mikroskopije i mjerenjem parametara hrapavosti, kao i mjerenjem mase uzoraka.

##### **5.4.1 Analiza površine primjenom svjetlosne mikroskopije**

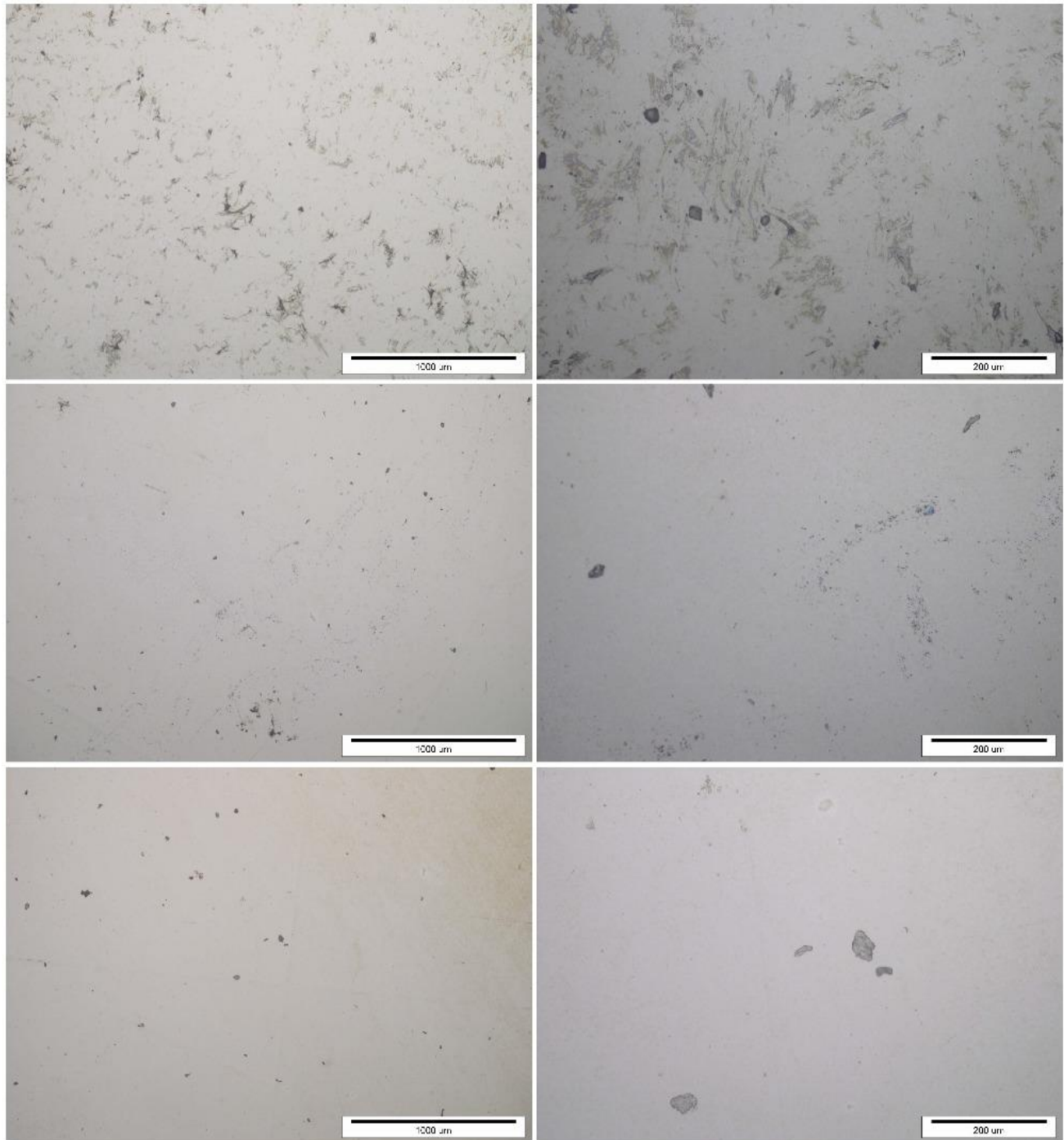
Svjetlosni mikroskop korišten za promatranje površina uzoraka bio je Olympus GX 51. Uzorci su promatrani nakon pripreme, te nakon prve i druge iteracije ispitivanja bioaktivnosti zasebno. Povećanja korištena za promatranje iznosila su 50x i 200x. Na slikama 18-21 prikazane su snimke površina svih uzoraka u sve tri faze ispitivanja (u početnom stanju te po izlaganju objema iteracijama SBF-a). Cjelovita analiza snimki površina uzoraka dana je nakon slike 21.



**Slika 19** Fotografije uzorka osnovnog stanja dobivene svjetlosnom mikroskopijom pri povećanju od 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme površina; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.

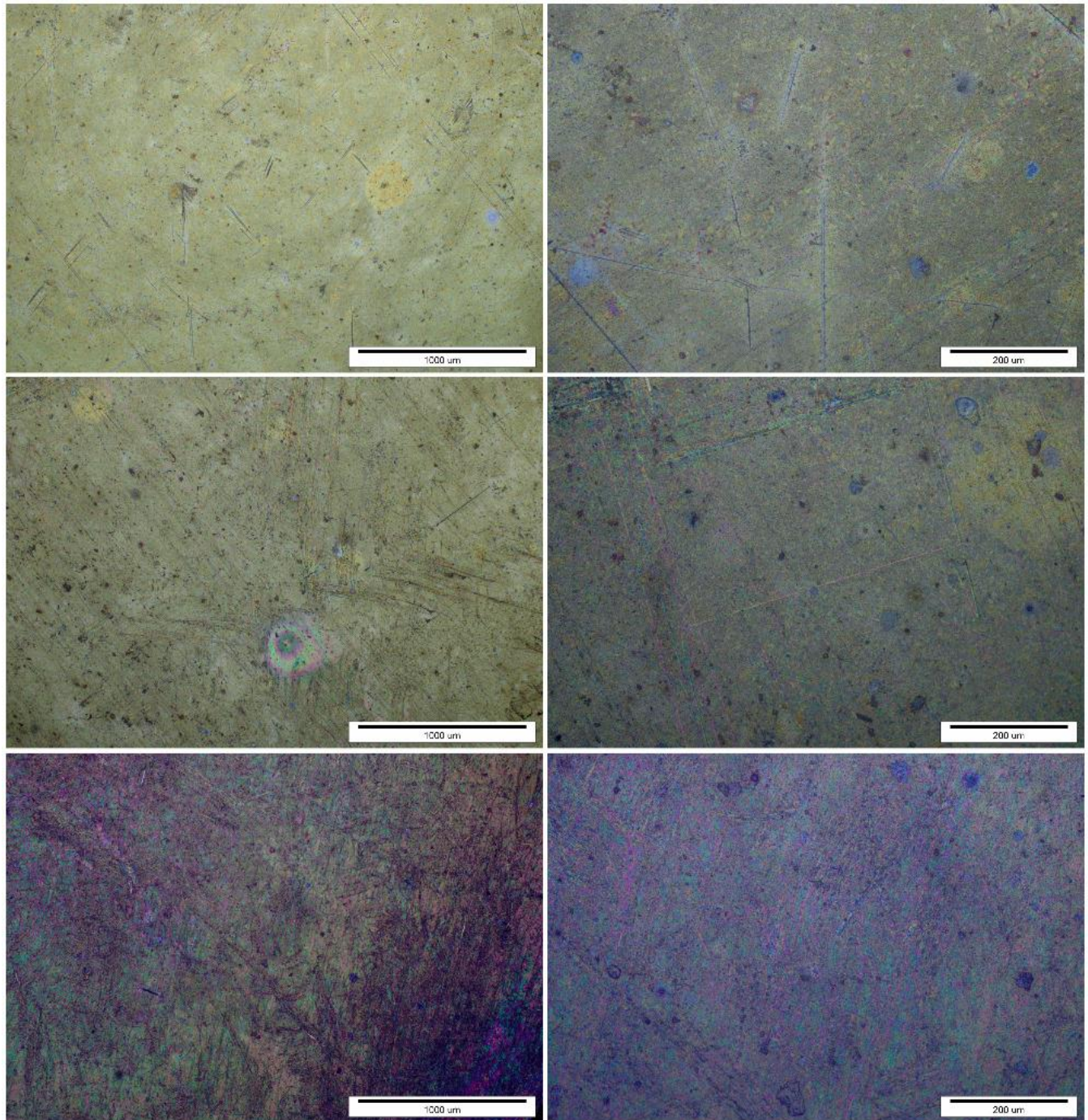


**Slika 20** Fotografije uzorka s TiN površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.



**Slika 21** Fotografije uzorka s plazmatski aktiviranom površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.





**Slika 22** Fotografije uzorka s rutilnom površinom dobivene svjetlosnom mikroskopijom s povećanjem 50x (lijevo) i 200x (desno). Gornji red – nakon pripreme; srednji red – nakon izlaganja prvoj iteraciji SBF-a; donji red – nakon izlaganja drugoj iteraciji SBF-a.

Kod uzorka u osnovnom stanju, prikazanog na slici 18, jasno je vidljiv porozitet površine. Taj porozitet je vjerojatno rezultat pripreme površine opisane u poglavlju 5.1. U drugom i trećem redu slike 18 vidljivo je kako porozitet nestaje, što bi moglo ukazivati na hvatanje hidroksiapatita na površinskim nepravilnostima, kao što je napomenuto u poglavlju 3.3.

Kod uzorka s TiN prevlakom, prikazanog na slici 19, nije uočena nikakva promjena, što je i djelomično očekivano s obzirom na visoku kemijsku otpornost (inertnost) TiN prevlaka. Prisutna razlika u boji površina rezultat je softverskih detalja programa koji interpretira snimke s mikroskopa.

Za uzorak s ioniziranom (plazmatski aktiviranom) površinom, prikazan na slici 20, primjetno je da su na snimkama njegove površine u početnom stanju prisutne raznovrsne nepravilnosti kao posljedica djelovanja plazme, ponajprije u koraku *sputteringa*. Pojavnost spomenutih nepravilnosti značajno se smanjila nakon izlaganja uzorka prvoj iteraciji SBF-a, dok su iste nepravilnosti gotovo u potpunosti nestale nakon izlaganja uzorka drugoj iteraciji SBF-a. Sve navedeno također govori u prilog ranije spomenutim teorijama iz poglavlja 3.

Kod uzorka s rutilnom površinom, prikazanog na slici 21, primjetno je da sa svakom iteracijom eksperimenta površina izgleda sve tamnije. Pretpostavljeno je da se prilikom izlaganja objema iteracijama SBF-a na površini izlučio neki spoj (vjerojatno apatit) koji intenzivnije raspršuje svjetlost u odnosu na površinu početnog stanja.

#### 5.4.2 Analiza hrapavosti površine

Hrapavost uzoraka mjerena je na uređaju Mahr Perthen Perthometer S8P 4.5 u Laboratoriju za precizna mjerenja Fakulteta strojarstva i brodogradnje na sva četiri uzorka nakon pripreme te nakon testiranja bioaktivnosti drugom iteracijom SBF-a. Parametri hrapavosti stavljeni u fokus u ovom istraživanju su parametri  $Ra$ ,  $Rz$  i  $Rv$ .

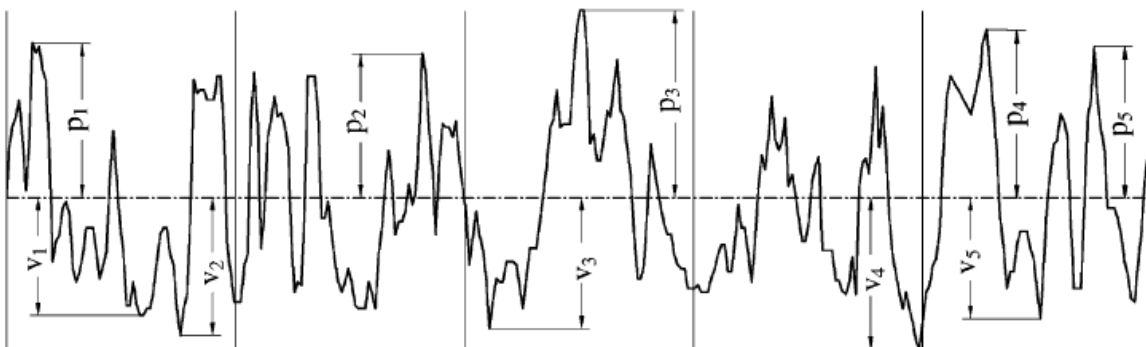
Prvi traženi parametar, parametar srednjeg aritmetičkog odstupanja od profila, poznat kao  $Ra$ , jest univerzalno korišteni parametar za opću kontrolu kvalitete površine. Definiran je kao srednja apsolutna devijacija nepravilnosti u profilu hrapavosti. Ovaj parametar je lagano definirati i mjeriti, te daje dobru opću sliku o varijacijama visine profila. Unatoč tome, promatranjem samog  $Ra$  ne može se doći do zaključka o tome je li se hrapavost mijenjala na temelju rasta vrhova ili pada dolova. Matematički izraz korišten za računanje parametra  $Ra$  dan je u jednadžbi (6) [43]:

$$Ra = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx, \quad (6)$$

gdje je:

- $l$  – duljina mjerenog segmenta i
- $y(x)$  – funkcija profila hrapavosti.

Iako je  $Ra$  često korišten kao parametar za ocjenu kvalitete, u inženjerstvu površina veću težinu imaju parametri  $Rp$  i  $Rv$ . Drugi traženi parametar, parametar maksimalne visine vrhova  $Rp$ , odnosi se na najvišu visinu profila iznad središnje linije, dok se treći traženi parametar, parametar maksimalne dubine dolova  $Rv$ , odnosi na maksimalnu dubinu profila ispod središnje linije. Na slici 22 dimenzija  $p_3$  predstavlja  $Rp$  parametar, dok dimenzija  $v_4$  predstavlja  $Rv$  parametar.

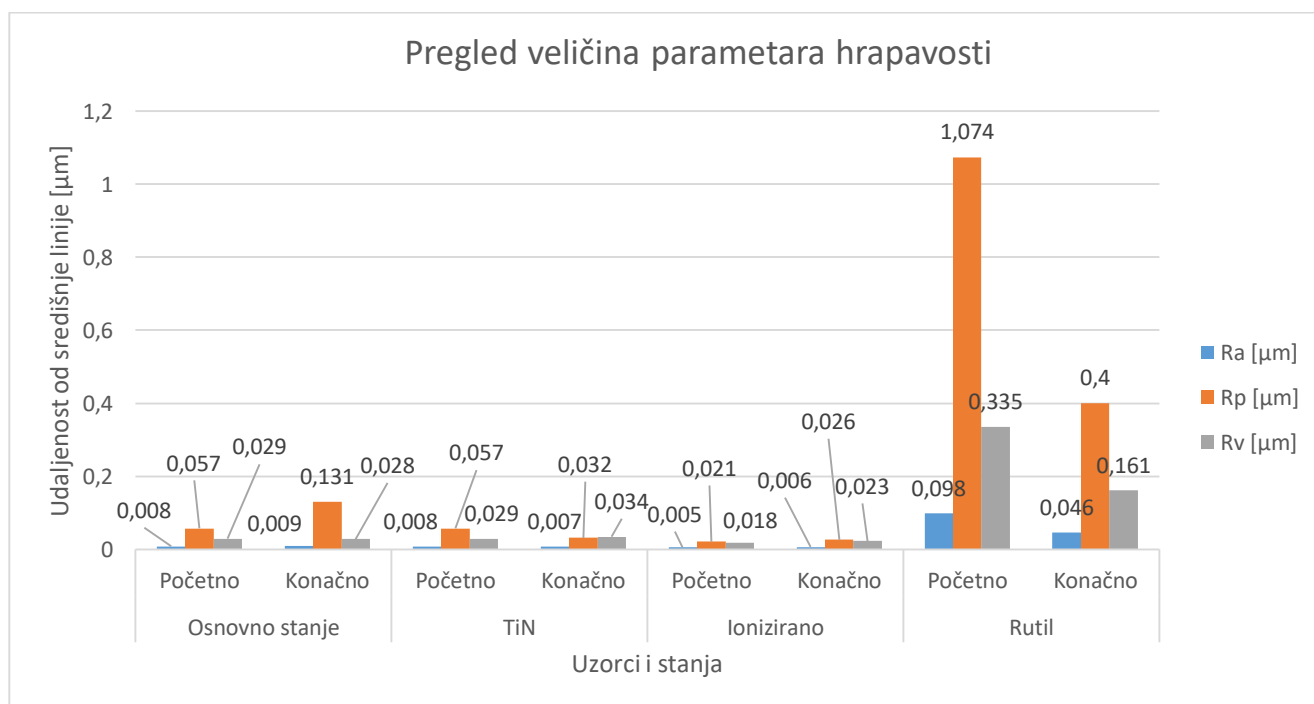


**Slika 23** Prikaz profila hrapavosti s označenim dimenzijama pet najviših visina i dubina [53].

U tablici 7 prikazani su iznosi traženih parametara hrapavosti za četiri uzorka u početnom stanju (nakon pripreme uzoraka) i u konačnom stanju (nakon provedbe ispitivanja bioaktivnosti u SBF-u iteracije 2). Na slici 23 grafički je prikazan odnos veličina parametara hrapavosti, dok su na slici 24 prikazani profili hrapavosti uzoraka u početnom i konačnom stanju.

**Tablica 7 Prikaz iznosa traženih parametara hrapavosti.**

Parametri hrapavosti	Osnovno stanje		TiN		Ionizirano		Rutil	
	Početno	Konačno	Početno	Konačno	Početno	Konačno	Početno	Konačno
$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	0,008	0,009	0,008	0,007	0,005	0,006	0,098	0,046
$R_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	0,057	0,131	0,057	0,032	0,021	0,026	1,074	0,400
$R_v$ [ $\mu\text{m}$ ]	0,029	0,028	0,029	0,034	0,018	0,023	0,335	0,161



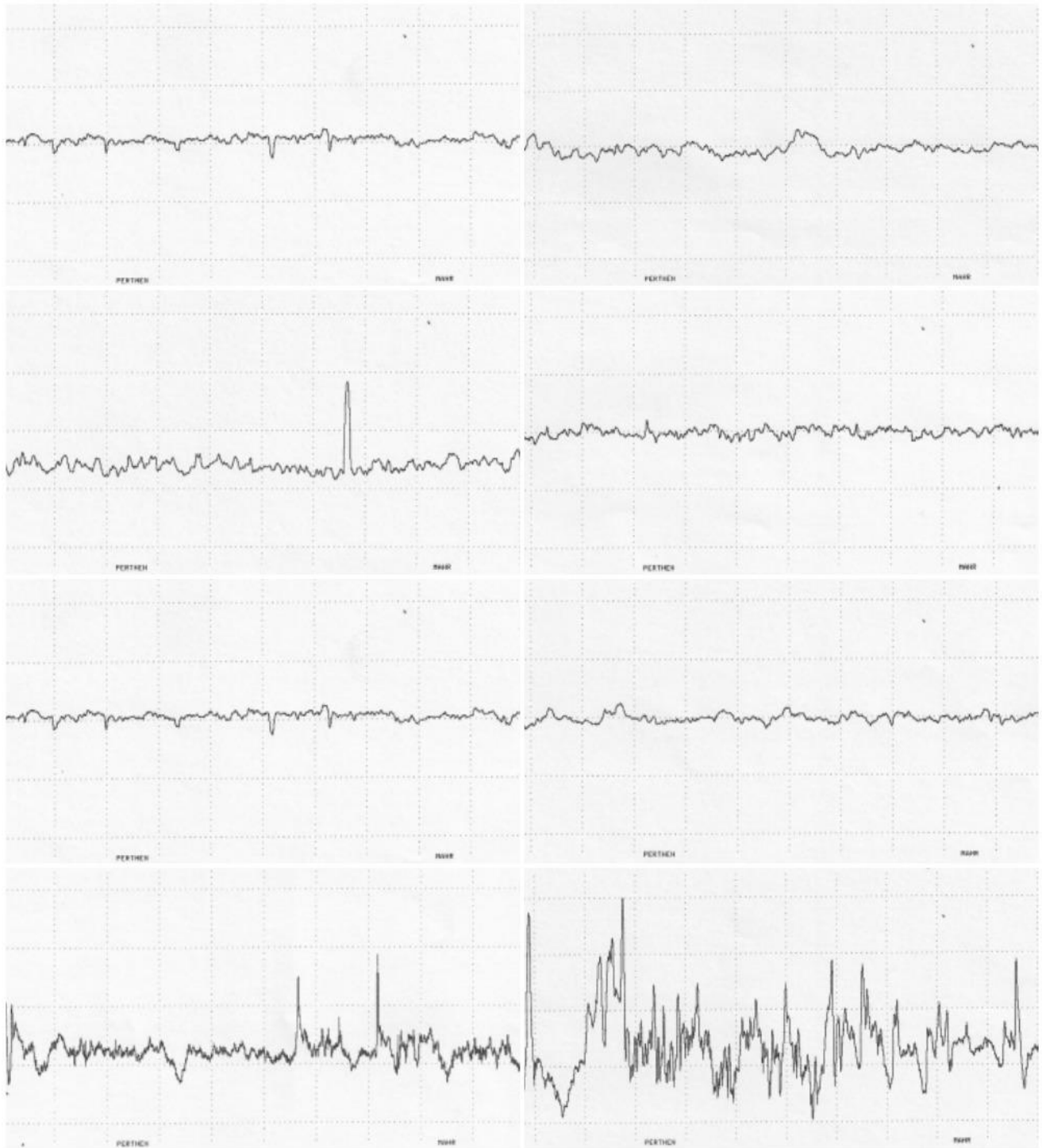
**Slika 24 Grafički prikaz odnosa veličina parametara hrapavosti.**

Kod uzorka u osnovnom stanju vrijednost parametra  $Ra$  nema skoro pa nikakvu promjenu, ali sagledavajući druge parametre vidljiv je značajan rast vrijednosti  $Rp$  uz zanemariv pad vrijednosti  $Rv$  što sugerira potencijalno taloženje neke tvari na vrhovima profila.

Kod uzorka s TiN prevlakom zabilježen je pad vrijednosti  $Rp$  uz rast vrijednosti  $Rv$ , što znači da se smanjila visina vrhova i porasla dubina dolova, te takva kombinacija promjene parametara sugerira moguće blago korozivno djelovanje SBF-a na spomenutu površinu. Iako je TiN izrazito stabilan spoj dobre korozivne postojanosti, u ovom slučaju, za ovakvo ponašanje površine, mogla bi biti odgovorna izražena ionska aktivnost (priroda) SBF-a. Valja napomenuti da je, obzirom na izraženu kemijsku postojanost TiN prevlake, mogući i izgledniji razlog za tu pojavu pomak u lokaciji ispitivanja hrapavosti na samoj površini uzorka.

Kod uzorka s ioniziranom (plazmatski aktiviranom) površinom, iako su promjene jedva primjetne, promjena parametara hrapavosti sugerira blagi rast vrhova profila i blago produbljivanje dolova profila. To može ukazati na dvofaznu prirodu te površine pri čemu jedna faza otpušta ione u SBF, dok druga faza na sebe taloži spojeve iz SBF-a.

Uzorak s rutilnom površinom jedini je uzorak kod kojeg sam parametar  $Ra$  sugerira značajnu promjenu, dok se vrijednosti  $Rp$  i  $Rv$  smanjuju. To smanjenje parametara ukazuje na moguću prisutnost korozivnog djelovanja SBF-a na vrhove. Potencijalno izlučivanje hidoksiapatita ili nekog sličnog spoja iz SBF-a zapunjavalo je dolove profila, na taj način smanjujući njihovu dubinu i uzrokujući znatno pomicanje središnje linije profila hrapavosti prema gore. Time je ujedno uvjetovano i rezultirajuće smanjenje parametra  $Rp$ . Opisani mehanizam može poslužiti i kao objašnjenje zbivanja kod uzorka s ioniziranom površinom ali u suprotnom smjeru.



**Slika 25** Prikaz profila hrapavosti profila u početnom (lijevo) i konačnom (desno) stanju. Prvi red: osnovno stanje; drugi red: TiN prevlaka; treći red: Ionizirano stanje i četvrti red: Rutil.

### 5.4.3 Mjerenje mase uzoraka

Masa uzoraka mjerena je nakon pripreme uzoraka, te nakon prve i druge iteracije ispitivanja – bioaktivnosti. Iznosi masa uzoraka prikazane su u tablici 8.

**Tablica 8 Prikaz masa uzoraka u različitim koracima eksperimenta.**

Masa [g]	Osnovno stanje	TiN	Ionizirano stanje	Rutil
Nakon pripreme	4,57	4,62	3,58	4,43
Nakon prve iteracije SBF-a	4,57	4,62	3,57	4,43
Nakon druge iteracije SBF-a	4,57	4,63	3,58	4,44

Kao što je vidljivo u tablici 8, razlike mase nisu značajne.

Kod uzorka u osnovnom stanju ne vidi se nikakva razlika.

Uzorak s TiN prevlakom pokazao je lagani porast u masi tek nakon druge iteracije SBF-a, što može i ne mora biti rezultat izlučivanja hidroksiapatita.

Kod uzorka s plazmatski aktiviranom površinom je moguće da je veća prisutnost NaCl iona u prvoj iteraciji SBF-a dovela do ionske razmjene negativne bilance, dok je ta razmjena u drugoj iteraciji bila pozitivna po sam uzorak, dovodeći lako do ponovnog porasta mase.

Za uzorak s rutilnom površinom nije bilo porasta mase nakon testiranja bioaktivnosti u prvoj iteraciji SBF-a, što je vjerojatno rezultat nezadovoljavajuće pH vrijednosti prve iteracije SBF-a. Tek nakon testiranja u drugoj iteraciji SBF-a uočen je porast mase od 0,01 g, što može i ne mora ukazivati na izlučivanje hidroksiapatita na površini.

## 6 Zaključak

U svrhu utvrđivanja sposobnosti *in vitro* ispitivanja bioaktivnosti površine materijala, uzorci titanove legure Ti6Al4V ELI površinski su modificirani u svrhu postizanja četiriju različitih površinskih stanja: osnovnog stanja, rutilne, TiN i ionizirane površine. Tako pripremljeni uzorci podvrgnuti su ispitivanju bioaktivnosti primjenom čak dviju iteracija SBF-a. Na uzorcima su, prije i poslije testa bioaktivnosti, provedena sljedeća ispitivanja: analize površine primjenom svjetlosne mikroskopije, ispitivanje hrapavosti te mjerenje mase. Iz rezultata provedenih ispitivanja može se zaključiti sljedeće:

- Analizom snimki dobivenih svjetlosnom mikroskopijom vidljive su određene mikrostrukturne promjene koje su vjerojatno produkt blagog korozijskog djelovanja i taloženja tvari iz SBF-a. Indikacije taloženja tvari kod uzoraka s osnovnom, ioniziranom i rutilnom površinom mogu i ne moraju ukazivati na taloženje hidroksiapatita.
- Analiza promjene parametara hrapavosti uzoraka, u pojedinim slučajevima, ukazuje na kombinaciju otapanja i taloženja tvari iz SBF-a. Razlike parametara  $R_a$ ,  $R_p$  i  $R_v$  kod uzoraka s osnovnom, ioniziranom i rutilnom površinom daju određene indikacije na taloženje tvari iz SBF-a koja može i ne mora biti hidroksiapatit.
- Analizom promjene mase uzoraka uočavaju se promjene kod uzoraka s TiN, ioniziranom i rutilnom površinom. Te promjene mogu i ne moraju ukazivati na prisutnu ionsku razmjenu koja je prema analiziranim izvorima prekursor izlučivanju hidroksiapatita.
- Od svih uzoraka, samo oni s ioniziranom i rutilnom površinom kroz sva provedena ispitivanja konzistentno pokazuju rezultate koji idu u korist hipotezi da je na njima započelo izlučivanje nekog spoja – moguće hidroksiapatita.

Očekivani izraženiji indikatori nastanka sloja hidroksiapatita na površinama uzoraka (posebice onog s rutilnom površinom) su izostali. Provedeni eksperiment i analize daju određene ohrabrujuće indicije u korist ostvarenom izlučivanju hidroksiapatita na površinama uzoraka, iako ne konkluzivno. Postoji mogućnost da bi definitivna izostala potvrda izlučivanju hidroksiapatita bila jasno vidljiva uvođenjem drugih instrumenata i vrsta ispitivanja (SEM, TEM ili XRD) koji, prilikom provedbe ovog eksperimenta, nisu bili dostupni.



Još jedan od mogućih razloga jest moguće nedovoljno precizna priprema SBF-a, kao posljedica čega potencijalno proizlazi nesigurnosti u sastav SBF-a (prvenstveno količina vlage u reagensima), koja se donekle sanirala korištenjem potpuno osušenih reagensa u drugoj iteraciji otopine. Nadalje, poznato je kako duljina držanja uzoraka u SBF-u direktno utječe na količinu nastalog apatita. Iako je držanje od ukupno 48 h u dvije iteracije SBF-a i više nego dovoljno za nastanak apatita, kod nekoliko znanstvenih radova iz priložene literature spominje se i značajno dulje držanje, ponekad čak i do par tjedana. Također valja napomenuti da su ispitivanja bioaktivnosti iz stranih znanstvenih radova, koji su poslužili kao inspiracija za ovaj rad, provedena na čistom titanu, a ne titanovoj leguri. Iako se u ovom radu ispitivala bioaktivnost modificiranih površina titanove legure, razlika u kemijskom sastavu mogla bi odigrati bitnu ulogu u procesu, posebice glede udjela aluminijskog i vanadijskog.

Unatoč nekonkluzivnim rezultatima provedenih eksperimenata, uz male izmjene i uvođenje drugih tehnika u analizi, na Zavodu za materijale nije se pokazao niti jedan razlog iz kojega ovakvo ispitivanje ne bi moglo biti provedeno uz unaprjeđenje istoga.

## 7 Literatura

- [1] Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998;19:1419-1423.
- [2] Meyers MA., Chen PY., Lin AYM., Seki, Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science* 2008;53:1–206.
- [3] Ogino M, Ohuchi F, Hench LL. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *J Biomed Mater Res* 1980;14:55–64.
- [4] Kitsugi T, Nakamura T, Yamamuro T, Kokubo T, Shibuya T, Takagi M. SEM-EPMA observation of three types of apatite containing glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1255–71.
- [5] Kokubo T, Ohtsuki C, Kotani S, Kitsugi T, Yamamuro T. Surface structure of bioactive glass-ceramic A–W implanted into sheep and human vertebra. In: Heimke G, editor. *Bioceramics*, vol. 2. Cologne: German Ceramic Society; 1990:113–21.
- [6] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A–W. *J Biomed Mater Res* 1990;24:721–34.
- [7] [https://www.researchgate.net/figure/Apatite-formation-on-Bioglass-surface-after-immersion-in-SBF-for-1-week-109\\_fig43\\_316412130](https://www.researchgate.net/figure/Apatite-formation-on-Bioglass-surface-after-immersion-in-SBF-for-1-week-109_fig43_316412130) (29.6.2019.)
- [8] Kokubo T, Ito S, Huang T, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, et al. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A–W. *J Biomed Mater Res* 1990;24:331–43.
- [9] Ohtsuki C, Aoki Y, Kokubo T, Bando Y, Neo M, Nakamura T. Transmission electron microscopic observation of glass-ceramic A–W and apatite layer formed on its surface in a simulated body fluid. *J Ceram Soc Japan* 1995;103:449–54.
- [10] Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. The bonding of glass ceramics to bone. *Int Orthop* 1989;13:199–206.
- [11] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006), 2907-2915.

- [12] Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 1991;12:155–63.
- [13] Gamble JE. *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1967. p. 1–17.
- [14] Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res* 2003;65A:188–95.
- [15] Oyane A, Onuma K, Ito A, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:339–48.
- [16] Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, Kokubo T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phos Res Bull* 2004;17:119–25.
- [17] <https://auction.catawiki.com/kavels/17128973-large-blue-apatite-crystals-laboratory-grown-16-5-x-13-0-x-8-0-cm-652-gm> (29.6.2019)
- [18] <https://syrris.com/applications/what-is-crystallization-and-what-are-the-methods-of-crystallization/> (29.6.2019.)
- [19] Sear RP. Quantitative Studies of Crystal Nucleation at Constant Supersaturation: Experimental Data and Models. *CrystEngComm*. 2014;16(29): 6506–6522.
- [20] Georg Wiora. <https://en.wikipedia.org/wiki/Metastability#/media/File:Meta-stability.svg> (29.6.2019.)
- [21] Prof. dr. sc. Aleksandra Sander. KRISTALIZACIJA. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.  
<https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/kristalizacija.pdf> (29.6.2019.)
- [22] Tavare NS. *Industrial Crystallization*. 1995 Plenum Press, New York.
- [23] McCabe & Smith. *Unit Operations of Chemical Engineering*. 2000 McGraw-Hill, New York.
- [24] Burton WK, Cabrera N. Crystal growth and surface structure. Part I. *Discussions of the Faraday Society*. 1949; 5: 33.

- [25] <https://en.wikipedia.org/wiki/Crystallization> (29.6.2019.)
- [26] Ring TA. Fundamentals of ceramic powder processing and synthesis. San Diego: Academic Press Limited; 1995.
- [27] Kim HM, Himeno T, Kawashita M, Kokubo T, Nakamura T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *J Royal Soc Interface* 2004;1:17–22.
- [28] Juhasz JA, Best SM, Auffret AD, Bonfield W. Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:1823–9.
- [29] Driessens FCM, Verbeeck RM, editors. Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1988.
- [30] Zhang D, Hupa M, Hupa L. In situ pH within particle beds of bioactive glasses. *Acta Biomater* 2008;4:1498–505.
- [31] Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 2005;26:1097–108.
- [32] Ramila A, Vallet-Regi M. Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity. *Biomaterials* 2001;22:2301–6.
- [33] Jones JR, Sepulveda P, Hench LL. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;58:720–6.
- [34] Lindsay WL. Chemical equilibria in soils. Wiley; 1979.
- [35] Bohner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*, Elsevier 2009.
- [36] Izquierdo-Barba I, Salinas AJ, Vallet-Regi IM. Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO–SiO<sub>2</sub> sol–gel glass. *J Biomed Mater Res* 2000;51:191–9.
- [37] Cerruti MG, Greenspan D, Powers K. An analytical model for the dissolution of different particle size samples of bioglass in TRIS-buffered solution. *Biomaterials* 2005;26:4903–11.

- [38] Kokubo T, Pattanayak DK, Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, Kawai T, Takemoto M, Fujibayashi S, Nakamura T. Positively charged bioactive Ti metal prepared by simple chemical and heat treatments. *J. R. Soc. Interface* 2010; 7:503-513.
- [39] <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxyapatite>
- [40] Kalita SJ, Bhardwaj A, Bhatt HA. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3), 441 (2007).
- [41] [https://ebrary.net/27130/health/dental\\_caries](https://ebrary.net/27130/health/dental_caries) (29.6.2019.)
- [42] <http://www.fuji-ta.com/advantages-titanium-bicycle.html> (29.6.2019.)
- [43] "[Titanium](#)". Encyclopædia Britannica. 2006.
- [44] [https://books.google.hr/books?id=Ct9RAAAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.hr/books?id=Ct9RAAAAMAAJ&redir_esc=y) (29.6.2019.)
- [45] Barbalace, Kenneth L. (2006). "[Periodic Table of Elements: Ti – Titanium](#)". Retrieved 26 December 2006.
- [46] <https://en.wikipedia.org/wiki/Titanium> (29.6.2019.)
- [47] <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=2591> (29.6.2019.)
- [48] Krebs, Robert E. [The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide](#) (2nd ed.). Westport, CT: 2006.
- [49] Forrest AL. "[Effects of Metal Chemistry on Behavior of Titanium in Industrial Applications](#)". *Industrial Applications of Titanium and Zirconium* 1981: 112.
- [50] [https://en.wikipedia.org/wiki/Plasma\\_activation](https://en.wikipedia.org/wiki/Plasma_activation) (29.6.2018.)
- [51] Kokubo T, Yamaguchi S. Biomineralization of metals using chemical and heat treatments. Chubu University, Kasugai, Japan 2016.
- [52] <http://www.life.kyutech.ac.jp/~tmiya/SBF-e.html> (29.6.2019.)
- [53] Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness Parameters. Mansoura University, Egypt. *Journal of materials processing technology* 2002; 123: 133-145.

## **8 Prilozi**

1. CD-R DISC