

# Kompoziti na temelju titana i hidroksiapatita u medicinskim primjenama

---

**Horvat, Dominik**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:164198>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dominik Horvat

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dominik Horvat

KOMPOZITI NA TEMELJU TITANA I HIDROKSIAPATITA U MEDICINSKIM  
PRIMJENAMA

ZAVRŠNI RAD

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Dr. sc. Anamarija Rogina

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, rujan 2018.

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na predloženoj temi i vremenu koje mi je posvetila tijekom ovog rada. Također veliko hvala dr. sc. Anamariji Rogini na korisnim savjetima, posvećenom vremenu te pomoći i vođenju prilikom izrade rada. Hvala svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi rada.*

*Hvala roditeljima i bratu, na njihovoj podršci kroz cijelo vrijeme studiranja.*

*Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na dobrom društvu zbog kojeg je studiranje bilo lakše i zabavnije*

## Kompoziti na temelju titana i hidroksiapatita u medicinskim primjenama

### Sažetak

Rast svjetske populacije vodi prema povećanoj potražnji za medicinskim implantatima pomoću kojih je moguća zamjena kostiju oštećenih bolešću (poput artritisa ili raka) ili ozljedama. Prirodno tkivo, poput koštanog tkiva, posjeduje jedinstvenu strukturu i mehanička svojstva zbog čega popravak ili izmjena takvog tkiva predstavlja veliki izazov. Biokeramike su prvi puta predstavljene kao novi materijal za medicinske implantate u šezdesetim godinama dvadesetog stoljeća i od tada se učestalo primjenjuju u medicini. To su prije svega metalni materijali poput legura titana, nehrđajućeg čelika te legura kobalta i kroma. U počecima razvoja jedini kriteriji koje je implantat morao zadovoljiti bili su prikladna fizikalna svojstva i netoksičnost materijala. U današnje vrijeme zahtjevi uključuju razna fizikalna svojstva materijala, te sposobnost da materijal potiče rast tjelesnog tkiva.

Metalni implantati posjeduju viši Youngov modul od kostiju što uzrokuje „zasjenjenje naprezanja“ (engl. stress shielding). Također mana je i loša biokompatibilnost koja je nužan uvjet za poticanje rasta prirodnog tkiva. No prednost metalnih implantata je ta što se odlikuju dobrim mehaničkim svojstvima poput čvrstoće i otpornosti na koroziju. Hidroksiapatit (HAp) je biokeramički materijal sa slabim mehaničkim svojstvima, pogotovo u smislu nosivosti. Pozitivna strana HAp-a je u sličnosti sastava s onim od kosti što potiče stvaranje novog tkiva. Kombinacijom titanijevih legura s HAp-om nastaje novi biomaterijal s odličnim mehaničkim i biološkim svojstvima.

Ovaj rad usmjeren je na literaturni pregled biomaterijala na temelju titanijevih legura i HAp-a kao kompozita za medicinske implantate. Razmatrat će se i neke učestale metode kombiniranja HAp-a i titanija, njihova biokompatibilnost te ponašanje *in vitro* i *in vivo*.

*Ključne riječi:* medicinski implantati, titanij, hidroksiapatit, biomaterijali, biokompatibilnost.

## **Titanium/hydroxyapatite composites in medical applications**

### **Abstract**

The expansion of the global population is leading to an increased demand for medical implants for bone defects caused by diseases (such as arthritis and cancer) or trauma. Due to the unique structure and mechanical properties of natural bone tissue, the repair is challenging. The bioceramics were first introduced as the medical implants in the 1960s and since then they have been extensively utilized in medical applications. These materials are primarily metal implants such as titanium alloy, stainless steel, and cobalt-chromium alloys. In the early period of medical implant development, the only criteria for implant material suitability were appropriate physical properties and non-toxicity. Today, the criteria include the physical properties of the bone implant material and its ability to promote the tissue growth.

Metal-based implants have a higher Young's modulus than bones, which leads to stress shielding. Metal implants also have poor biocompatibility, which is necessary to promote the growth of natural tissue. However, metal-based implants have the beneficial mechanical properties in terms of strength and corrosion resistance. Hydroxyapatite (HAp) is a bioceramic material with poor mechanical properties, especially for load-bearing applications. However, HAp has a similar composition as bones and can promote the formation of new bony tissue. By combining titanium alloy with HAp one can develop a new biomaterial with excellent mechanical and biological properties.

This paper aims to review biomaterials based on titanium alloys and HAp as a medical implant composites. Also, common methods of combining HAp and titanium, their biocompatibility and behaviour *in vitro* and *in vivo* are discussed.

*Key words:* medical implants, titanium, hydroxyapatite, biomaterial, biocompatibility.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Biomaterijali</b> .....	2
2.1. Ponašanje biomaterijala <i>in vivo</i> .....	3
2.2. Titanij i titanijeve legure .....	3
2.3. Hidroksiapatit .....	4
2.4. Kompozit HAp-Ti kao implantat .....	4
<b>3. Biokompatibilnost</b> .....	7
3.1. Razvoj biokompatibilnosti .....	7
3.2. Kako utjecati na biokompatibilnost titanija? .....	8
<b>4. Proizvodnja HAp-Ti kompozita</b> .....	9
4.1. Sinteriranje .....	9
4.2. Klasične metode sinteriranja .....	9
4.3. Sinteriranje uz pomoć plazme .....	11
<b>5. Metode pripreme prevlaka HAp na metalima</b> .....	14
5.1. Plazma naštrcavanje .....	14
5.2. Elektrokemijska depozicija .....	14
5.3. Sol-gel metoda .....	15
<b>6. Biokompatibilnost HAp-Ti kompozita</b> .....	17
6.1. <i>In vitro</i> bioaktivnost .....	17
6.2. <i>In vitro</i> citokompatibilnost .....	18
6.3. <i>In vivo</i> biokompatibilnost .....	19
<b>7. Zaključak</b> .....	21
<b>8. Literatura</b> .....	22
<b>9. Životopis</b> .....	27

## 1. Uvod

Kost je kompleksno živo tkivo koje posjeduje definiranu strukturu raspoređenu po različitim hijerarhijskim razinama. U suštini je kompozit sačinjen od organske faze (većinski udio kolagen) u kojoj se nalaze anorganski kristali koji sadrže kalcij i fosfate [1]. Iako kostur ima vitalnu ulogu u tijelu sisavaca (u smislu da služi kao strukturna potpora, osnova pokretljivosti i kao zaštita unutarnjih organa), podložan je oštećenjima uslijed ozljeda ili degenerativnih bolesti koje se pripisuju starenju. Zbog toga, od najranijih vremena, postoji potreba za popravkom oštećenog tvrdog tkiva.

Prvi pokušaji zamjene tvrdog tkiva s biomaterijalima usmjereni su na povratak osnovnih funkcija popravkom defekata nastalih ozljedom ili bolešću, uz minimalnu imunološku reakciju organizma. Taj tip materijala se danas opisuje kao 'bioinertan', a odsutnost bilo kakve toksične reakcije smatrao se uspješnim ishodom. Izraz 'bioinertnosti' treba pažljivo koristiti jer će svaki materijal uveden u fiziološku okolinu na neki način reagirati s njim. Za medicinske implantate, bioinertnost se definira kao minimalna razina reakcije prema tkivu domaćina u kojem se implantat prekriva tankim vlaknastim nevezanim filmom. Kao što je to slučaj s mnogim biomedicinskim implantatima, materijali koji se upotrebljavaju u početku su bili zamišljeni za potpuno različitu ulogu. Najbolji primjeri za to su cement za kost i neke metalne slitine. U novije vrijeme interes se sve više pomiče u smjeru biokeramike zbog njenih povoljnih svojstava poput odlične otpornosti na koroziju, biaktivnosti i otpornosti na trošenje [2].

Metali koji se danas najčešće koriste u medicinske svrhe su titanij i njegove legure. Titanijeve implantate karakteriziraju bolja mehanička svojstva u odnosu na ljudsku kost, što bi moglo uzrokovati preuzimanje opterećenja s kosti i time uzrokovati njenu resorpciju. Jedan od načina da se taj problem riješi je upotreba kompozitnog materijala temeljenog na titanijevoj matrici ili matrici neke titanijeve legure modificirane hidroksiapatitnom (HAp) keramikom. Dodatak hidroksiapatita u metalni materijal dovodi do poboljšanja biokompatibilnosti te omogućuje integraciju implantata s koštanim tkivom [3].



## 2. Biomaterijali

Biomaterijal je sintetički ili prirodni, biokompatibilni materijal ili uređaj koji pomnim dizajnom slijedi unaprijed definiranu aktivnost u biološkom sustavu. Svojim karakteristikama oponaša željenu biološku funkciju, a da pri tome ne uzrokuje kratkoročne ni dugoročne štetne posljedice okolnim ili udaljenijim tkivima [4]. Znanost o biomaterijalima je interdisciplinarno područje koje se bavi proučavanjem fizioloških i bioloških karakteristika materijala te njihovu interakciju s biološkom okolinom. Područje biomaterijala praćeno je stalnim i snažnim rastom, a ujedinjuje aspekte medicine, biologije, kemije te inženjerstva materijala. Najintenzivniji razvoj i proučavanje usmjereno je prema sintezi biomaterijala, njihovoj optimizaciji, karakterizaciji, testiranju te proučavanju bioloških interakcija između tkiva domaćina i samog materijala [5]. Biokompozitni materijali su razvijeni s ciljem da ujedine bioaktivna svojstva keramike i mehanička svojstva metala ili polimera [6]. Dugogodišnji rad i trud znanstvenika iz raznih polja znanosti jasno je vidljiv upravo u mnogobrojnosti raznovrsnih materijala za izradu umjetnih kostiju koji danas postoje [7].

Tablica 1. Popis sintetskih i prirodnih materijala koji se koriste u medicinske svrhe [5].

<i>Primjena</i>	<i>Materijal</i>
<b>Kostur</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- zamjena zgloba (kuk, koljeno)</li><li>- pločica za fiksiranje loma</li><li>- koštani cement</li><li>- pomoćne tvari za zacjeljivanje</li><li>- umjetna tetiva ili ligament</li><li>- dentalni implantat</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- titanij, Ti–Al–V legura, nehrđajući čelik, polietilen</li><li>- nehrđajući čelik, kobalt–krom legura</li><li>- poli(metil metakrilat)</li><li>- hidroksiapatit</li><li>- Teflon, Dacron</li><li>- kalcijev fosfat</li></ul>
<b>Kardiovaskularni sustav</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- umjetne krvne žile</li><li>- srčani zalistak</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Dacron, Teflon, poliuretan</li><li>- nehrđajući čelik, ugljik</li></ul>
<b>Organi</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- umjetno srce</li><li>- umjetna koža</li><li>- umjetni bubreg (hemodijaliza)</li><li>- stroj za srce i pluća</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- poliuretan</li><li>- silikon–kolagen kompozit</li><li>- celuloza, poliakrilonitril</li><li>- silikonska guma</li></ul>
<b>Osjetila</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- umjetna pužnica</li><li>- intraokularna leća</li><li>- kontaktna leća</li><li>- koronarni stent</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- platinske elektrode</li><li>- poli(metil metakrilat), silikonska guma, hidrogel</li><li>- silikon-akrilat, hidrogel</li><li>- kolagen, hidrogel</li></ul>

## 2.1. Ponašanje biomaterijala *in vivo*

Po načinu ponašanja *in vivo*, razni biomaterijali mogu se podijeliti na:

- Bioaktivne materijale (npr. materijali na osnovi kalcij-fosfata, CaP) – koji mogu potaknuti rast novog koštanog tkiva u fiziološkim uvjetima. Dodatno, novonastalo koštano tkivo će se kemijski vezati za implantat.
- Bioinertni materijali (npr. titanij, titanijeve legure, korund ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), itd.) – pokazuju vrlo slabe interakcije s okolnim tkivom. Na implantatu se može stvoriti zaštitna vlaknasta ovojnica vezivnog tkiva uslijed razvoja okolnog.
- Biotolerantni materijali (npr. nehrđajući čelik, poli(metil metakrilat) itd.) – će stvoriti ovojnicu koja neće prijanjati uz implantat [8].

Ovisno o stabilnosti implantata u fiziološkim uvjetima u tijelu domaćina, implantati se mogu kategorizirati kao biorazgradivi, biorezistentni i bioresorbirajući. Biorazgradivi materijali se razgrađuju postepeno unutar tijela domaćina. Suprotno tome, biorezistentni materijali se ne razgrađuju ni pod kakvim uvjetima unutar tijela domaćina. Bioresorbirajući materijali su biomaterijali na temelju kalcijevih fosfata ( $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijevi fosfati), koji omogućuju opskrbu terapijskih tvari (npr.  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{PO}_4^{3-}$ ), tijekom kontroliranog otapanja koje je ključno za brže zacjeljivanje koštanog tkiva [8].

## 2.2. Titanij i titanijeve legure

1791. godine William Gregor, amaterski kemičar iz Cornish-a, primijetio je da pomoću magneta može odvojiti određenu komponentu iz crnog taloga jedne obližnje rijeke. Danas je poznato da je ta ruda ustvari ilmenit, jedna od dvije glavne rudače titanija. Zatim je odvojio željezo iz dobivenog crnog praha s klorovodičnom kiselinom te mu je preostalo talog u obliku titanijovog oksida. 1932. godine William Kroll otkriva proces koji omogućuje komercijalnu eksploataciju titanija iz rudače [9]. Četrdesetih godina dvadesetog stoljeća titanij i njegove legure počinju se sve više koristiti u medicini, aeronautici i kemijskoj industriji. Pred kraj drugog svjetskog rata tehnologija prerade titanija i titanijevih materijala sve više prelazi iz domene vojne uporabe u svijet svakodnevice. Do 1940. već su se postigli i prvi zadovoljavajući rezultati s titanijevim implantatima. No najveći napredak u korištenju titanija kao implantata za koštano tkivo zahvaljujemo Brånemarkovu otkriću osteointegracije. Istraživanja i razvoj titanijevih legura za primjenu u medicini se i dalje nastavljaju zbog

mnogobrojnih jedinstvenih karakteristika poput visoke specifične čvrstoće, male gustoće i bioinertnosti. Titanij ima gustoću od  $4.5 \text{ g/cm}^3$  i talište na temperaturi od  $1668 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vlačna čvrstoća pri sobnoj temperaturi iznosi  $1400 \text{ MPa}$ . Pri visokim temperaturama titanij počinje reagirati s drugim tvarima. Titanijeve legure se odlikuju visokom otpornošću na koroziju pri sobnoj temperaturi zbog površinskog oksidnog sloja. Te legure se mogu podijeliti na  $\alpha$ -, ( $\alpha + \beta$ )- i  $\beta$ -tip.  $\beta$ -tip legure imaju najniži Youngov modul, koji je po vrijednosti najbliži Youngovom modulu kosti ( $10 - 30 \text{ GPa}$ ) [10].

### 2.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAp) je jedna od apatitinih struktura koje opažamo u stijenama. Apatitina struktura ima osnovnu formulu  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ . X u formuli mogu zamijeniti razne funkcionalne skupine poput hidroksilne ( $-\text{OH}$ ) kod hidroksiapatita, fluoridne ( $\text{F}^-$ ) kod fluoroapatita i kloridne ( $\text{Cl}^-$ ) za kloroapatit. Sintetski HAp se primjenjuje diljem svijeta kao zamjena za oštećeno koštano tkivo u ljudskom tijelu. HAp ima sposobnost vezanja i poticanja rasta koštanog tkiva zbog kemijske i strukturne sličnosti s mineralima prirodne kosti. Pri visokim temperaturama HAp se razgrađuje. Postupak započinje dehidroksilacijom na oko  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  na zraku ili oko  $850 \text{ }^\circ\text{C}$  u atmosferi bez vlage. Sljedeći korak razgradnje je nastajanje tetrakalcij fosfata (TTCP) i trikalcij fosfata (TCP). TCP se sastoji od  $\beta$ -TCP na temperaturama nižim od  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  i od  $\alpha$ -TCP na temperaturama višim od  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ . HAp gubi većinu hidroksilnih grupa iznad  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$  te zbog toga značajno gubi na masi. Neka istraživanja pokazala su da iznad  $1350 \text{ }^\circ\text{C}$  čvrstoća HAp drastično opada. HAp je jedan od istraživanih materijala za zacjeljivanje kosti. HAp se može relativno jednostavno i jeftino dobiti u obliku praha. Jedan od prvih istraživačkih radova koji ga je koristio u biomedicinske svrhe bili su Levitt i sur., koji su pomoću tehnike vrućeg prešanja hidroksiapatitnog praha dobili korisne oblike za uporabu u biološkim eksperimentima [10].

### 2.4. Kompozit HAp-Ti kao implantat

Prednosti primjene metala su njihova dobra mehanička svojstva poput visoke žilavosti i čvrstoće na savijanje. No korozija, trošenje implantata (što uzrokuje otpuštanje metalnih iona) i prijenos naprezanja s kosti na metal (eng. *stress shielding*) uzrokuju iritaciju, upalu i odvajanje implantata. Dodatno, bioinertnost metalnih implantata rezultira slabim povezivanjem s kosti *in vivo*. Iako je utvrđeno da su keramički biomaterijali pogodni za

zamjenu koštanog tkiva zbog biokompatibilnosti, otpornosti na koroziju i tlačne čvrstoće, krtost keramike je glavni faktor koji utječe na oštećenja implantata već u ranoj fazi primjene. Klasičan primjer je hidroksiapatit. Razlog zašto se HAp tako često koristi za zamjene ili popravke koštanog tkiva je biološka sličnost anorganskom dijelu kosti. Kost se smatra biokompozitom HAp-a i kolagena. To je i razlog zašto sintetski kompoziti na temelju HAp-a i kolagena mogu puno bolje imitirati sastav kosti. Zbog slabih mehaničkih svojstava kao i problema vezanih uz proizvodnju pri visokim temperaturama (kod sinteriranja pri visokim temperaturama dolazi do denaturiranja kolagena), HAp-kolagen kompoziti ne zadovoljavaju zahtjeve visokog opterećenja.



*Slika 1.* Implantati HAp-Ti kompozita [11].

Materijali poput legura Co-Cr, titanija, legura titanija i nehrđajućeg čelika se još uvijek ekstenzivno koriste u medicinske svrhe, no potrazi za idealnim materijalom ne nazire se kraj. Razlog tome je što materijali pod uvjetima složenog fiziološkog okruženja tijekom dužeg perioda počinju otpuštati štetne ione (npr.  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ). Stvaranje čestica nanometarskih veličina glavni je uzrok nekroze i upale tkiva. Te čestice mogu isto tako krvlju dospjeti do organa poput srca, jetre ili pluća što može uzrokovati ozbiljna oštećenja organa. Bioinertna i biotolerantna priroda dodatno otežava situaciju. Međutim, takvi materijali mogu se modificirati površinskim prevlakama od bioaktivnih materijala poput kalcijevih fosfata ili

hidroksiapatita. Međutim, loša povezanost temeljnog materijala i površinskog sloja kao i napuknuća premaza tijekom upotrebe materijala mogu izazvati ozbiljne probleme za zdravlje pacijenta. Također, elastični modul implantata u idealnom slučaju mora biti isti kao od kosti, uz istovremeno poboljšanje žilavosti i čvrstoće. Biomaterijal na temelju HAp-a i metala može se primijeniti kao potencijalni neporozni implantat, kod kojeg metalna faza pridonosi boljim mehaničkim svojstvima. Odabir metalne faze je ograničen upravo mehaničkim svojstvima i biokompatibilnošću. Usporedbom  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ , nehrđajućeg čelika i titanija, pronađeno je da je titanij najbolja faza za ortopedsku primjenu zbog izvrsne otpornosti pri fiziološkim uvjetima, niske gustoće ( $4.540 \text{ g/cm}^3$ ), kao i nižeg modula elastičnosti ( $\sim 110 \text{ GPa}$ ) od legure Co-Cr ( $\sim 230 \text{ GPa}$ ) i nehrđajućeg čelika ( $\sim 205 \text{ GPa}$ ) [8].

### 3. Biokompatibilnost

Najčešće upotrebljavana definicija biokompatibilnosti glasi: „Biokompatibilnost je sposobnost materijala da uzrokuje prikladan odziv tkiva tijekom specifične primjene“ [12]. Primjeri „prikladnog odziva“ uključuju otpornost na zgrušavanje krvi, otpornost na bakterijsku kolonizaciju te normalno i nesmetano zacjeljivanje. Primjeri specifične primjene su hemodijalitičke membrane, urinarni kateteri, umjetni kukovi itd. Biomaterijal koji se koristi kao implantat ne smije biti citotoksičan. Citotoksičnost je uzrokovana povećanom koncentracijom metalnih iona u krvi. Također, važan uvjet je da materijal ostaje stabilan tijekom svoje funkcije [8]. Zbog toga se pod pojmom biokompatibilnosti često spominje jednostavno objašnjenje da je to sposobnost nekog materijala da ne šteti tijelu, te da potiče proces zacjeljivanja [10]. Iako je ova definicija točna, ne pruža uvid u dublja promatranja poput mjerenja i poboljšanja biokompatibilnosti. Proceduralna definicija proizlazi iz ISO standarda o biokompatibilnosti. Postoji niz testova koji su strogo definirani, a materijal koji zadovolji na svakom od tih testova može biti opisan kao biokompatibilan. U tablici 2. nakratko su opisani neki od testova za biokompatibilnost [12].

Tablica 2. Biološka evaluacija medicinskih uređaja prema ISO 10993-1.

- Zahtjevi za dobrobit životinja	- Ostaci sterilizacije
- Test na genotoksičnost i karcinogenost	- Razgradnja materijala
- Reproductivna toksičnost	- Iritacija i osjetljivost
- Interakcija sa krvlju	- Sistematska toksičnost
- <i>In vitro</i> citotoksičnost	- Priprema uzorka
- Lokalni efekti nakon implantacije	- Identifikacija i kvantifikacija produkata razgradnje

#### 3.1. Razvoj biokompatibilnosti

U samim počecima razvoja implantata, prikladan materijal trebao je pokazivati minimalnu ili nikakvu otrovnost za tijelo. Kako je razvoj napredovao u razmatranje se počela uzimati i sposobnost poticanja rasta novog tkiva. S ciljem da se postignu takva svojstva mnogobrojna istraživanja posvećena su dizajnu, pripravi i obradi materijala [10]. Za mnoge biomedicinske primjene u današnje vrijeme biomaterijal treba prije svega biti bioaktivan,

osteokonduktivan i osteoinduktivan. Bioaktivnost je svojstvo materijala da stvara direktnu vezu sa živim tkivom (npr. kostima). Ta se veza uspostavlja pomoću apatitnog sloja koji se stvara između implantata i kosti. Osteokonduktivnost se definira kao sposobnost implantata da služi kao okosnica za stvaranje nove kosti te time omogući adheziju osteoblasta, proliferaciju i diferencijaciju koštanih stanica. Osteoinduktivnost je sposobnost biomaterijala da potakne rast novog koštanog tkiva *in vivo*. Mnogobrojni izvori navode da uspjeh nekog biomaterijala uvelike ovisi o biokompatibilnosti, svojstvu oseintegracije, fizikalno-mehaničkim svojstvima, antibakterijskim svojstvima itd. [8]. Brånemark uvodi pojam osteointegracija kako bi opisao kontakt između površine titanija i kosti. Pojam biointegracija ima drugačije značenje: „...stimulacija rasta koštanog tkiva pomoću bioaktivne površine koja potiče direktnu vezu između implantata i okolnog koštanog tkiva...“. U ovoj definiciji bioaktivnost je sposobnost materijala da se poveže sa živim tkivom bez stvaranja posrednog sloja poroznog tkiva [13]. Ovaj generalni koncept biokompatibilnosti nedavno je proširen unutar područja inženjerstva tkiva u kojemu se *in vitro* i *in vivo* patofiziološki procesi koriste pomnim odabirom stanica, materijala kao i metaboličkih i biomehaničkih uvjeta da se stvori novo funkcionalno tkivo [5].

### **3.2. Kako utjecati na biokompatibilnost titanija?**

S obzirom na inertnu površinu titanijevih implantata, javlja se potreba za modifikacijom njegove površine kako bi se omogućilo stvaranje kovalentne veze s okolnim koštanim tkivom. Jedan od mogućnosti je prevlačenje površine titanija bioaktivnim filmom. Kao najčešća modifikacija titanijeve površine je upravo hidroksiapatit koji se koristi kao osteokonduktivna prevlaka za dentalne i ortopedске implantate [13]. Hrapavost površine implantata je vrlo bitna za vezanje implantata s tkivom. Stoga su porozne strukture i hrapave površine neophodne za poticanje srastanja kosti i implantata (osteointegracija). Na hrapavost i poroznost površine moguće je utjecati uvjetima proizvodnje potencijalnog implantata [10].

## 4. Proizvodnja HAp-Ti kompozita

Kompoziti na temelju hidroksiapatita i titanija mogu se pripremiti klasičnim ili naprednim metodama sinteriranja. Tradicionalno, HAp-Ti kompoziti se pripremaju miješanjem prašaka hidroksiapatita i titanija pomoću kugličnog mlina, nakon čega slijedi zbijanje smjese te sinteriranje pri relativno visokim temperaturama ( $\geq 1100$  °C) [14]. Nedavno, napredne metode poput SPS metode (eng. *Spark plasma sintering technique*) se upotrebljava za pripremu gustih i kompaktnih praškastih mješavina u kratkom vremenu [15-17].

### 4.1. Sinteriranje

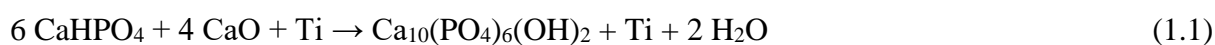
Tehnika sinteriranja poznata je još od davnih vremena. U prošlosti su se sinteriranjem izrađivali lonci, vaze, pločice i razni ukrasni elementi. Proces se temelji na kompresiji i očvršćivanju materijala primjenom topline i tlaka. U današnje vrijeme, osim u lončarstvu, sinteriranje se koristi i u praškastoj metalurgiji. Funkcionalne prevlake keramika na metalima (poznati i kao „*Cermets*“) omogućuju kombiniranje mehaničkih svojstava tvrdoće i čvrstoće te korozijske otpornosti [18]. Osim u tehničke svrhe, sinteriranje služi za oblaganje metala kreamikom radi produljenja životnog vijeka predmeta.

Dva parametra su posebno važna kod sinteriranja tradicionalnom metodom:

- 1.) Način rada (vrijeme i temperatura);
- 2.) Atmosfera u procesnom prostoru (vakuum, kisik, argon, itd.).

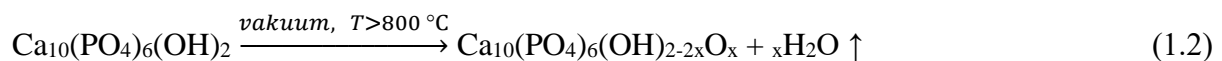
### 4.2. Klasične metode sinteriranja

Kao što je prethodno spomenuto, klasične metode sinteriranja temeljile su se na umiješavanju različitih praškastih sirovina. Tako su Fahami i sur. [19] koristili  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaO}$  i praškasti titani kao predložak za pripremu HAp-Ti kompozita mehano-kemijskom sintezom prema sljedećoj jednadžbi:





Konačan sastav i kristalnost produkta ovisi o udjelima pojedine sirovine kao i temperaturi i atmosferi sinteriranja. Važno je naglasiti da niski stupanj kristalnosti HAp praška rezultira povećanjem bioresorpcije i topljivosti u fiziološkoj sredini [20]. Zbog te činjenice Fahrami i suradnici pokušali su povećati stupanj kristalnosti s 13% na 69% žarenjem mljevenog praška pri 650 °C tijekom 2 h. Međutim, ovakav pristup uzrokovao je oksidaciju titanija i razgradnju HAp-a na  $\beta$ -TCP fazu. Chu i sur. [21] pristupaju tom problemu na drugačiji način. Priredili su HAp-Ti mješavinu s 20% HAp-a u kugličnom mlinu uz naknadno vruće prešanje na temperaturama 900 °C – 1000 °C. Primijetili su da sinteriranje pri 1000 °C dovodi do stvaranja  $\alpha$ -TCP i  $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$  faze. Razlika u koeficijentu linearne toplinske ekspanzije, ( $\alpha$ ), HAp ( $17,3 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ) [22] i titanij ( $8,4 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ) [23] rezultira slabim sinteriranjem [21]. Primijećeno je da dodatak titanijevog praška u HAp uzrokuje povećanje žilavosti od 0,7 do 1,0 MPa  $\text{m}^{1/2}$ . Iako se dodatkom Ti u HAp željelo postići značajno povećanje žilavosti, marginalno poboljšanje se pripisuje niskoj gustoći sinteriranog kompozita. U jednom ranijem radu, Nath i sur. [14] su priredili HAp-Ti kompozite s različitim masenim udjelima titanija (10 – 40%) koristeći sinteriranje bez pritiska. Primijećeno je da sinteriranje različitih sastava pri temperaturama od 1000 °C do 1400 °C na 2 h rezultira ekstenzivnim reakcijama sinteriranja te stvaranjem  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{TCP}$  i  $\text{CaTiO}_3$  (tablica 3.). Termodinamički izračuni pokazuju da je veća vjerojatnost oksidacije titanija klasičnim metodama sinteriranja zbog viših temperatura i dužeg vremena zadržavanja (uslijed reakcija HAp-a i  $\text{TiO}_2$  iznad 750 °C). Yang i sur. [24] pripremili su Ti-HAp kompozite s 10 i 20% masenog udjela HAp-a sinteriranjem pri 1100 °C u vakuumu kako bi se umanjila oksidacija titanija. FT-IR i XRD analize uzoraka HAp-Ti kompozita ukazale su na raspad HAp-a na  $\alpha$ -TCP i TTCP te stvaranje  $\text{Ca}_2\text{Ti}_2\text{O}_5$ . Porastom temperature odvija se sljedeća reakcija:



Vodena para koja nastaje reakcijom pod (1.2) reagira s titanijem i stvara  $\text{TiO}_2$  (1.3), koji zatim u kontaktu s HAp-om stvara  $\beta$ -TCP i  $\text{CaTi}_2\text{O}_5$  (1.4):



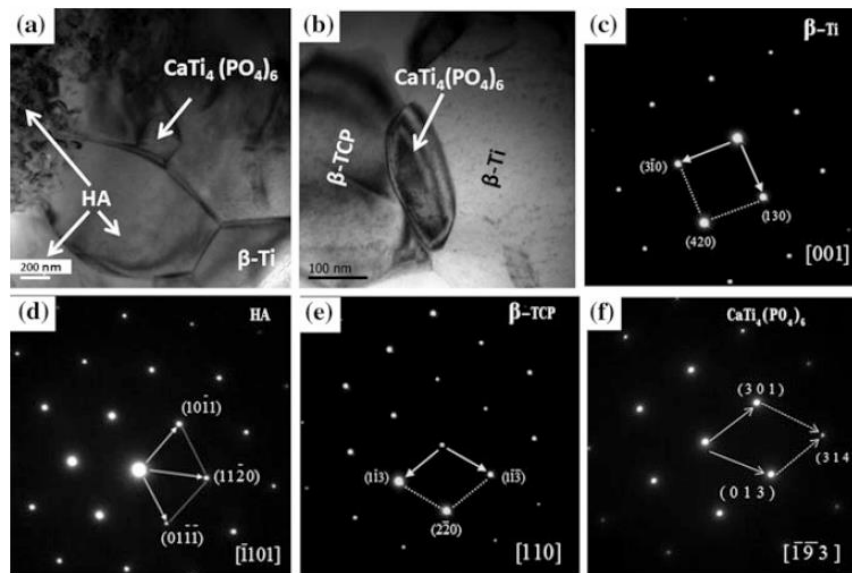
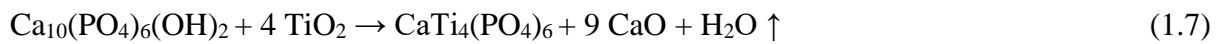
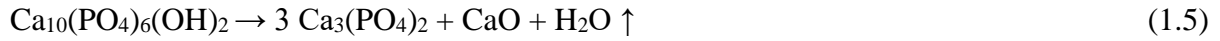
Klasičnim metodama sinteriranja nemoguće je zadržati titanij u sinteriranom proizvodu zbog oksidirajuće atmosfere. Stoga, inertne atmosfere poput argona pokazale su se kao moguće rješenje. Kako bi promatrali utjecaj zaštitne atmosfere na reakcije tijekom sinteriranja HAp-Ti kompozita, Ning i sur. [25] sinterirali su HAp-Ti kompozit s 50% titanija pri temperaturi od 1200 °C tijekom 30 minuta u atmosferi argona. Međutim, uočeno je stvaranje CaO, Ti<sub>2</sub>O, CaTiO<sub>3</sub>, TiP faza i α-Ti.

Zaključno, klasičnim metodama sinteriranja HAp-Ti kompozita čak i kod niskih temperatura (1000 °C) dolazi do ekstenzivne dehidroksilacije HAp-a i reakcije između HAp-a i titanija. Stvaranje TCP faze rezultira većom topljivošću implantata te nižom mehaničkom čvrstoćom tijekom primjene *in vivo*. Također, sinteriranjem pod zaštitnom atmosferom argona oksidacijski procesi nisu zaustavljeni zbog dužeg sinteriranja (≥1 h) i visokih temperatura (≥ 1000 °C).

### 4.3. Sinteriranje uz pomoć plazme

Jedna od mnogih naprednih tehnika sinteriranja je sinteriranje uz pomoć plazme (SPS) koja potencijalno nudi rješenje problema klasičnih metoda sinteriranja. Nakahira i sur. [15] promatrali su sinteriranje Ti-HAp kompozita s različitim udjelima HAp-a (20 – 25%) uz električni impuls (engl. *Pulsed electric current sintering*, PECS) pri temperaturama od 800 °C i 1000 °C pod tlakom od 30 MPa te u zaštitnoj atmosferi argona. Iako PECS metoda prigušuje oksidaciju titanija pri 900 °C, primijećeno je stvaranje TiO<sub>2</sub> u uzorcima sinteriranim pri 1000 °C. Mondal i sur. [26] su koristili tehniku sinteriranja uz pomoć plazme kako bi priredili kompozit na temelju β-TCP i Ti pri temperaturi od 1200 °C i tlaku od 50 MPa. Unatoč zadržavanju sastava, ovaj postupak rezultirao je stvaranjem CaTiO<sub>3</sub>. U jednom nedavnom radu, Kumar i sur. [16] objavili su rezultate opširnog istraživanja o sinteriranju uz pomoć plazme i faznom razvoju HAp-Ti kompozita s različitim masenim udjelom titanija (5, 10, 20%). Uvjeti proizvodnje prilagođeni su postizanju visoke čvrstoće kompozita s minimalnom reakcijom između HAp-a i titanija. XRD analiza potvrdila je većinsku prisutnost HAp-a i Ti u dobivenom produktu. Difrakcijska analiza odabranog područja snimljenog transmisijskim elektronskim mikroskopom (*slika 2*) ukazala je na prisutnost β-Ti, HAp i β-TCP kao i CaTi<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> faze na HAp-Ti međupovršini. Pretpostavlja se da je β-TCP faza nastala dehidroksilacijom HAp-a; CaTi<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> reakcijom β-TCP i TiO<sub>2</sub> ili reakcijom između HAp-a i TiO<sub>2</sub>. Također, prisutnost β-Ti upućuje na ograničenu β→α transformaciju titanija tijekom hlađenja pri temperaturi od 882 °C (temperatura fazne transformacije).

Nasuprot, Nath i sur. [14] te Rapacz-Kmita i sur. [27] opazili su izostanak dehidroksilacije HAp-a pri temperaturama sinteriranja ispod 1300 °C. U prisutnosti titanija i njegovog oksida, HAp počinje disocirati pri mnogo nižim temperaturama [24]. Mikrostruktura tih kompozita analizirana pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa upućuje na mogućnost stvaranja reakcijskih produkata između HAp-a i titanija tijekom sinteriranja što dovodi do stvaranja  $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ :



Slika 2. Mikrografije faza u HAp-Ti kompozitu (a-b); rezultati difrakcijske analize pojedinih faza (c-f) [16].

Tablica 3. Utjecaj metode sinteriranja na sastav sinteriranog HAp-Ti kompozita [14-16].

	Klasične metode sinteriranja				Napredne metode sinteriranja		
	<i>Sinteriranje bez pritiska, na zraku pri različitoj temperaturi</i>				<i>Sinteriranje uz električni impuls (PECS) u argonu</i>	<i>Sinteriranje uz pomoć plazme (SPS) u argonu</i>	
	1000 °C	1200 °C	1300 °C	1400 °C	900 °C	1000 °C	950 °C
HAp	HAp	HAp	HAp	HAp, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP, CaO	-	-	HAp
HAp-10%Ti	HAp, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, $\beta$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	-	-	HAp, Ti, TiO <sub>2</sub> , $\beta$ -TCP, CaO,
HAp-20% Ti	HAp, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, $\beta$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, $\beta$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	$\beta$ -TCP, CaO, TiO <sub>2</sub> , CaTiO <sub>3</sub>	HAp, Ti <sub>3</sub> O	HAp, Ti <sub>3</sub> O, TiO <sub>2</sub>	HAp, Ti, TiO <sub>2</sub> , Ti <sub>2</sub> O, $\beta$ -TCP, CaO, CaTi <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>

## 5. Metode pripreme prevlaka HAp na metalima

Postoji nekoliko tehnika za proizvodnju hidroksiapatitnih prevlaka za metalne implantate poput plazma naštrcavanja, elektrokemijske depozicije, sol-gel metode, elektroforetske depozicije, vrućeg izostatskog prešanja, depozicije laserom ili biomimetički [28].

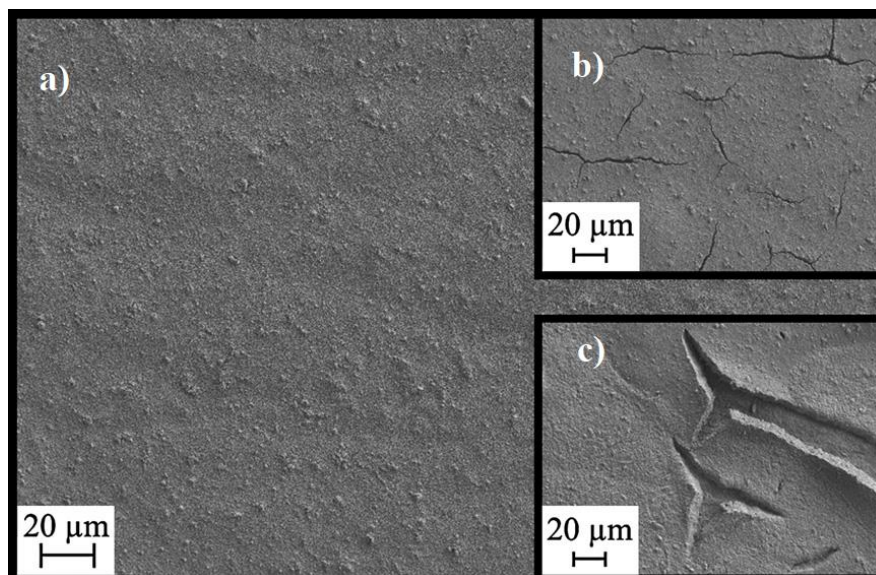
### 5.1. Plazma naštrcavanje

Plazma naštrcavanje trenutno je jedina metoda koja je odobrena od FDA agencije (engl. *Food and Drug Administration*) za oblaganje implantata. Glavni nedostaci ove metode su nejednolike debljine prevlake, loše prianjanje na metal, nečistoće i niska kristaličnost prevlake. Dugoročnim kontaktom s tjelesnim tekućinama dolazi do smanjenja čvrstoće i životnog vijeka takve prevlake zbog resorpcije hidroksiapatita. Svi ti faktori kumulativno utječu na pogoršanje mehaničkih svojstava poput vlačne čvrstoće, otpornosti na trošenje, tvrdoće i žilavosti. Zbog toga se sve više koriste metode poput elektrokemijske depozicije ili sol-gel metode [28].

### 5.2. Elektrokemijska depozicija

Prednosti ove metode su kratko vrijeme procesa te homogenost prevlake [29]. Mogućnost stvaranja homogene prevlake znatno poboljšava čvrstoću vezanja prevlake i implantata. Kuo i Yen [30], istraživali su depoziciju HAp na titanij pomoću elektrokemijske metode. Prevlaka se sastojala od kalcijevog fosfata dihidrata ( $\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) i  $\beta$ -trikalcij fosfata. Stavljanjem u vodenu otopinu  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  došlo je do transformacije početne prevlake u HAp. Ispitivanje adhezije pokazalo je dobru povezanost prevlake s metalom (106,3 MPa) unatoč debljini prevlake od samo 18,6  $\mu\text{m}$ . Elektrokemijsko oblaganje metala s HAp koristeći klasične metode smanjuje raspad HAp-a, ali uzrokuje defekte na površinama [31]. Zbog stvaranja velikih količina mjehurića vodika [32], oni se vežu uz površinu metala i time onemogućuju nukleaciju i depoziciju kalcijevog fosfata što uzrokuje nejednolikost sloja [31, 33]. Popa i sur. [33] promatrali su uzorke titanija i legure Ti6Al4V presvučene slojem HAp, uzorke bez tretirane površine i uzorke prevučene slojem brušita. Najbolje rezultate biološke karakterizacije dali su uzorci titanija modificirani hidroksiapatitom. Zhao i sur. [29] priredili su HAp prevlake direktno na anodizirani titanij

pomoću elektrodepozicijske metode u simuliranoj tjelesnoj tekućini (engl. simulated body fluid, SBF). HAp je pokazao odličnu bioaktivnosti i povećanje debljine prevlake nakon 4 dana uranjanja u SBF. *In vivo* istraživanja na zečevima pokazala su da je povezivanje takvog implantata s kosti zamjetno veće [34]. Frauchiger i sur. [35] primijetili su da uranjanjem titanijaa u elektrolit kalcijeva bifosfata, kalcijeva acetata, natrijeve EDTA i NaOH, dolazi do stvaranja prevlake s omjerom kalcija i fosfata  $Ca/P = 1,3$ . Takva prevlaka ima bolja mehanička svojstva. O. Albayrak i sur. [36] promatrali su utjecaj različitog napona (10, 20 i 50 V) na depoziciju  $TiO_2$  i HAp na uzorcima Ti6Al4V legure. Primijećeno je da povećanjem napona nastaje sve više pukotina na prevlaci. Naknadnim sinteriranjem HAp prevlake, pukotine postaju sve veće (slika 3).



Slika 3.  $TiO_2$  film dobiven uz napon od 20 V (a);  $TiO_2$  film dobiven uz napon od 50 V (prije sinteriranja) (b);  $TiO_2$  film dobiven uz napon od 50 V (nakon sinteriranja) (c).

### 5.3. Sol–gel metoda

Sol–gel metoda se sve više istražuje za primjenu u oblaganju biomaterijala s ciljem poboljšanja vezanja *in vivo*. Stoch i sur. [37] priredili su uzorke Ti i Ti6Al4V legura prevučениh s HAp-om. Bioaktivnost uzoraka proučavana je uranjanjem u SBF u trajanju od 19 dana. Utvrđeno je da sloj HAp može potaknuti rast hidroksiapatitinog sloja *in vitro*. Bryington i sur. [38] usporedili su utjecaj predobrade metala na biološku aktivnost. Prva skupina materijala imala je predobradu pjeskarenjem i tretman kiselinom nakon čega se površina prevukla HAp filmom, dok je druga skupina materijala pripravljena bez predobrade.

*In vivo* istraživanje pokazalo je veće vezanje implantata s kosti kod uzoraka s predobradom. M. Yusoff i sur. [39] istraživali su utjecaj polimerne faze na karakteristike HAp prevlaka. Dodatak polikaprolaktona (PCL) u HAp stvara pore na površini prevlake koje mogu izazvati osteointegraciju. Uzorak Ti6Al4V s 30% PCL/HAp dao je zadovoljavajuću debljinu prevlake od 184  $\mu\text{m}$  bez napuknuća. Manjak napuknuća prevlake štiti od korozije i otpuštanja štetnih iona u tijelo domaćina [40].

Jedna od modernih modifikacija metalnih površina je nanošenje oksidnog sloja neposredno prije sol–gel metode. Na primjer,  $\text{TiO}_2$  je oksid koji se učestalo primjenjuje za poboljšanje povezanosti HAp i titanija [41]. Novije metode temelje se na dodatku ugljičnih nanocijevi (CNTs) u HAp radi poboljšanja mehaničkih svojstava. Ji i sur. [42] pripravili su prevlaku HAp-CNT/ $\text{TiO}_2$  koja pokazuje odlično povezivanje s metalnom površinom i čvrstoću od 35,2 MPa.

## 6. Biokompatibilnost HAp-Ti kompozita

Poboljšanje mehaničkih svojstava ne smije uzrokovati pogoršanje bioloških i obratno. Postoje mnoga istraživanja na temu biokompatibilnosti pojedinih materijala, HAp i titanija (ili titanijevih legura), ali malo je radova o biokompatibilnosti kompozita HAp-Ti. U sljedećim odlomcima ukratko će se razmatrati bioaktivnost, citokompatibilnost i biokompatibilnost HAp-Ti kompozita proizvedenih naprednim metodama sinteriranja.

### 6.1. *In vitro* bioaktivnost

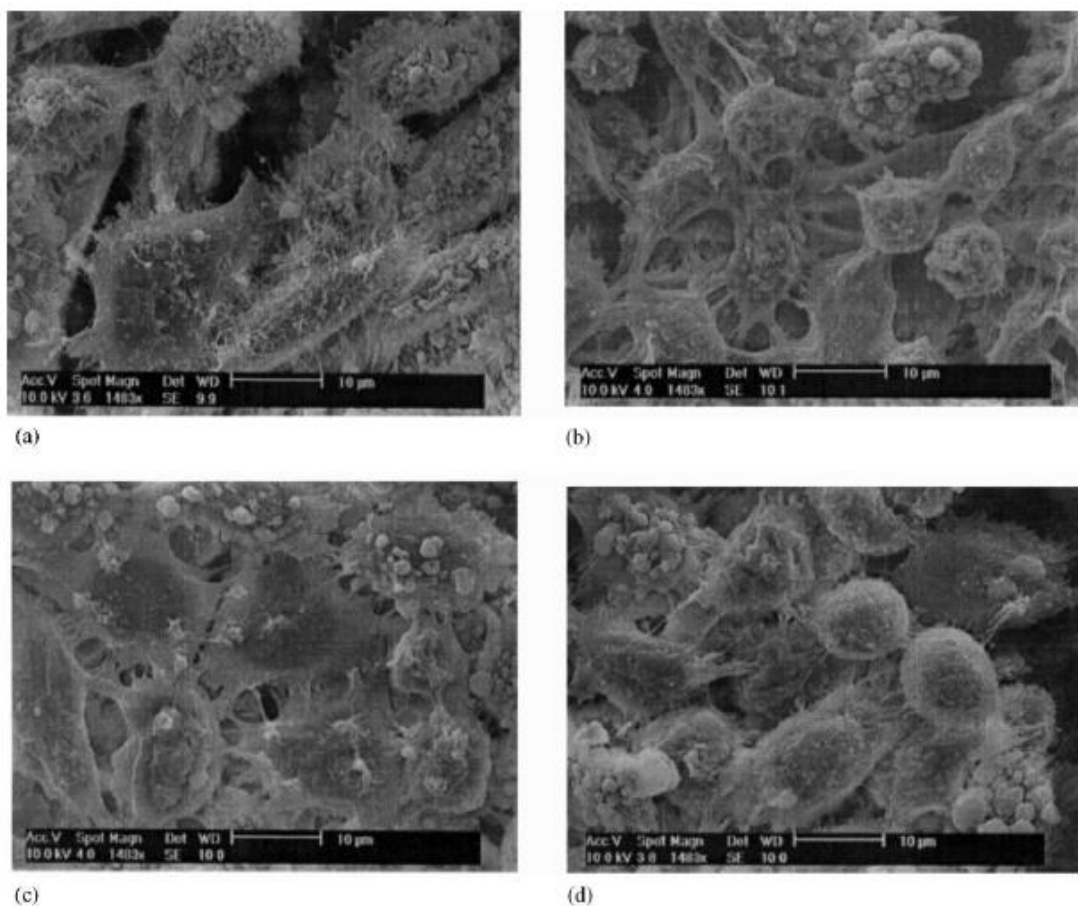
*In vitro* citokompatibilnost biomaterijala sa stanicama osteoblasta i njima sličnim stanicama je od iznimne važnosti tijekom razvoja materijala za primjenu u ortopediji. Međutim, materijal treba testirati i u simuliranoj tjelesnoj tekućini da bi mu se ocijenila bioaktivnost i time umanjio broj neuspješnih staničnih kultura. U takvim ispitivanjima često se proučava kemijska stabilnost ili način otapanja *in vitro*. Smatra se da je za povezivanje kosti i implantata *in vivo* potreban apatitini sloj [43, 44]. Problem koji se pri tome javlja je bioinertna priroda titanija kao i njemu sličnih biomaterijala koja ne dozvoljavaju nukleaciju i rast apatita tijekom *in vitro* biomineralizacije. Ning i sur. [25] ispitivali su *in vitro* biomineralizaciju HAp-Ti kompozita sinteriranog SPS metodom u SBF-u. SEM analiza uzoraka pokazala je prisutnost apatitinih kristala 2 sata nakon namakanja. U drugom istraživanju, *in vitro* biomineralizacija rezultirala je stvaranjem poroznog apatitnog sloja na površini HAp-Ti kompozita kada je maseni udio hidroksiapatita iznosio 20% [15]. Slične rezultate primijetili su i Kumar i sur. kod uzoraka HAp-Ti kompozita uronjenih u SBF na 42 dana pri 37 °C [45]. Kumar i sur. ističu kako je istaloženi sloj porozan s nodularnim oblicima apatitinih kristala koji su međusobno srasli. Iako je titanij korišten kao sekundarna faza u HAp-Ti kompozitu, nije bilo tragova  $Ti^{4+}$  iona u SBF otopini nakon otapanja tijekom 42 dana. Također, uočeno je da primarno amorfnu strukturu apatitnog sloja prelazi u kristalnu s vremenom inkubacije u SBF-u. Sampaio i sur. [46], pripremili su uzorke Ti-HAp kompozita koje su sinterirali pri različitim temperaturama (1100, 1200 i 1300 °C). Uzorci su promatrani svakih 24h tijekom 3 dana pomoću svjetlosnog mikroskopa. Poznato je da je Ti-HAp kompozit proizveden klasičnim metodama sinteriranja pri visokim temperaturama inertan [13], rezultati njihovog istraživanja pokazali su da testirani kompoziti povećavaju životnu aktivnost (vijabilnost) stanica osteoblasta. Tijekom jednog prijašnjeg istraživanja [47] uočeno



je da osteoblasti proizvode relativno visoke količine kolagena u prisutnosti Ti-HAp s 5% titanija sinteriranog pri 1300 °C.

## 6.2. *In vitro* citokompatibilnost

Citotoksičnost biomaterijala može se ispitati mjerenjem vijabilnosti i proliferacije stanica uzgojenih *in vitro*. Nath i sur. [14] pokazali su dobru staničnu adheziju L929 mišjih fibroblasta na kompozitima HAp-10Ti, HAp-20Ti i HAp-30Ti sinteriranima klasičnim metodama. Uzgojene L929 stanice pokazale su rašireniju morfologiju na kompozitnim materijalima u odnosu na čisti HAp što ukazuje na bolje prijanjanje stanica. Dobro definirana morfologija SaOs-2 stanica na HAp-Ti uzorku ukazuje na dobru vijabilnost stanica i potvrđuje citokompatibilnost HAp-Ti kompozita [45]. Imunohistokemijska analiza potvrdila je dobru citokompatibilnost HAp-Ti kompozita preko reorganizacije aktinskih filamenata. Također, stanična kultura s hFOB koštanim stanicama pokazala je povećanje stanične vijabilnosti dodatkom titanija u HAp. Dobiveni rezultati podržavaju pretpostavku o necitotoksičnosti titanija koji je prisutan kao sekundarna faza u HAp-Ti kompozitu. Ramires i sur. [48], promatrali su biokompatibilnost kompozitne TiO<sub>2</sub>/HAp prevlake dobivene sol-gel postupkom različitih omjera (TiO<sub>2</sub>:HA = 2:1, 1:1, 1:2). Istraživali su ponašanje ljudskih MG63 osteoblasta i mišjih 3T3 fibroblast stanica. Rezultati citotoksičnosti pokazali su da sastav materijala ne utječe na vijabilnost i proliferaciju stanica (*slika 4*). Comin i sur. [49], pripravili su kompozit sinteriranjem TiH<sub>2</sub> i hidroksiapatita dobivenog iz goveda pri 800 °C. Bioaktivnost uzoraka ispitivana je uranjanjem u SBF tijekom 10 dana pri čemu je ustanovljeno da nakon 10 dana dolazi do potpunog pokrivanja površine kalcijevim fosfatima. Također, stanična kultura NH3T3 stanica ukazala je na necitotoksičnost materijala kroz nesmetanu proliferaciju.

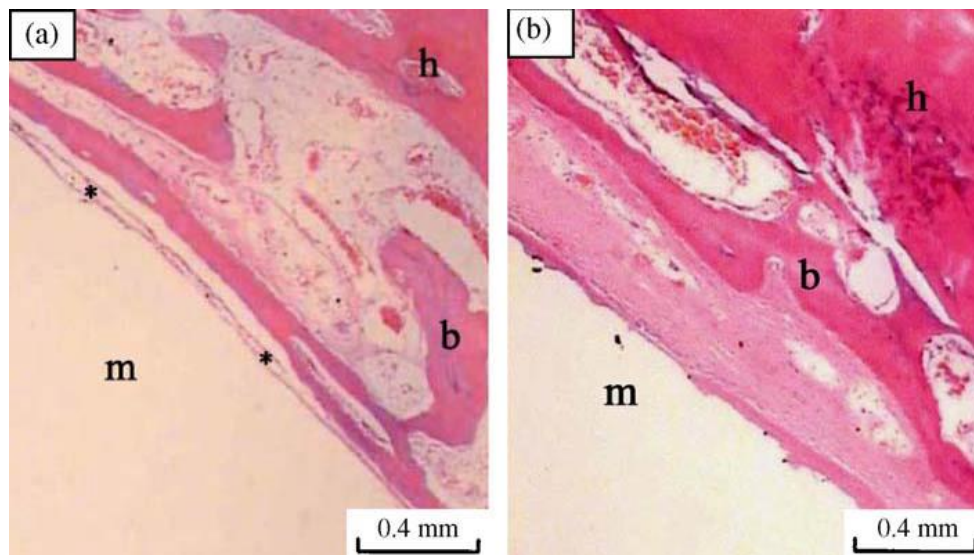


Slika 4. SEM mikrografije MG63 osteoblasta uzgojenih na (a) Ti; (b)  $\text{TiO}_2\text{:HA} = 2\text{:}1$ ; (c)  $\text{TiO}_2\text{:HA} = 1\text{:}1$ ; (d)  $\text{TiO}_2\text{:HA} = 1\text{:}2$  prevlakama nakon 10 dana [48].

### 6.3. *In vivo* biokompatibilnost

Iako se *in vitro* eksperimenti načelno mogu koristiti za početnu procjenu biomaterijala, odsutnost pravih fizioloških uvjeta tijekom eksperimenta ograničava primjenjivost takvih pokusa. Testiranjem *in vivo* biokompatibilnosti materijala dobivamo uvid u moguće posljedice interakcija materijala s kompleksnim okolišem koji je bogat enzimima i proteinima, gdje dolazi do promjena pH vrijednosti kao i utjecaj raznih unutarnjih ili vanjskih podražaja poput stresa. Zbog toga su *in vivo* eksperimenti kraj svakog proučavanja biokompatibilnosti biomaterijala. Biokompatibilnost HAp-Ti kompozita, Chu i sur. [21] istražili su *in vivo* ugradnjom HAp-Ti implantata (20% Ti) u lubanju novozelandskih bijelih zečeva. Histološka promatranja nakon tri tjedna od ugradnje upućuju na djelomičnu integraciju implantata s kosti domaćina. U početnom stadiju obnove (treći tjedan od ugradnje) uočeno je da prisutnost titanija smanjuje osteointegraciju u kompozitu. No, nakon 12 tjedana od implantacije uočena je kompletna integracija kompozitnog

materijala s kosti domaćina. Utvrđeno je da se produkti razgradnje HAp-a ( $\alpha$ -TCP) otapaju brže nego monolitni HAp u uvjetima fiziološke okoline. Time opskrbljuju tkivo ionima ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ ) potrebnima za brže zacjeljivanje [50]. U jednom drugom radu Chu i sur. [51], ispitivali su biokompatibilnost Ti, Ti-20%HAp i Ti-40%HAp *in vivo* (slika 5). Primijetili su da prisutnost sloja  $\text{TiO}_2$  (rutil) na površini titanija djeluje kao mjesto nukleacije apatita i time poboljšava povezivanje uzorka s prirodnim tkivom [52]. Kuroda i sur. [53] proučavali su osteokonduktivnost implantata prevučenog HAp prevlakom dobivenom mokrom metodom u odnosu na visokotemperaturne procese. Utvrdili su da HAp dobiven mokrom metodom ima bolju osteokonduktivnost u odnosu na visokotemperaturno dobiveni HAp zbog blagih uvjeta sinteze pri neutralnoj pH vrijednosti vodenog medija sinteze.



Slika 5. Histološka analiza stvaranja novog koštanog tkiva između kosti domaćina: (a) uzorak čistog Ti; (b) uzorak Ti-40%HAp. Oznake: m – implantat, b – novonastalo koštano tkivo, h – kost domaćina, \* - vlaknasto tkivo [51].

## 7. Zaključak

Područje biomaterijala je relativno mlado polje znanosti s oko 50 godina povijesti. Sve se više primjenjuje sistematizirani pristup problemima pacijenata. Istraživanja se temelje na novim hipotezama iz molekularne i stanične biologije, inženjerstva materijala i kliničke medicine. Biomaterijali za medicinske svrhe danas pokrivaju široko područje materijala i za primjenu moraju posjedovati točno određena svojstva. Najvažnije karakteristike koje bi implantat trebao imati su dobra mehanička svojstva i biokompatibilnost. Kod klasičnih metoda sinteriranja pojave kao dehidroksilacija HAp-a ili reakcije između HAp i Ti komponenata loše utječu na mehanička svojstva. Istraživanjem pojava koje smanjuju mehanička svojstva mogu se razviti bolji načini pripreme poput SPS metode. SPS metode omogućava ograničavanje reakcija između HAp i Ti. SPS je svakako korak naprijed u usporedbi s klasičnim metodama, ali neke negativne posljedice su uvijek prisutne. Kod prevlaka glavni problem je prijanjanje prevlake HAp na površinu Ti. Loša povezanost uzrokuje ljuštenje ili pucanje obloge što može uzrokovati ozbiljne posljedice za zdravlje pacijenta. Plazmatsko naštrcavanje se može koristiti za implantate jednostavnih geometrija, no pošto u današnje vrijeme implantati poprimaju sve kompleksnije oblike dobra alternativa bi bila elektrodepozicijska metoda. Naravno i ona ima određene negativne strane koje treba proučavati i optimizirati. Što se tiče biokompatibilnosti, iz priloženih radova jasno je vidljivo da kompozit HAp i Ti posjeduje izvanredna svojstva. Sličnost HAp-a s glavnim komponentama u kostima, te načini pripreme HAp-a koji imitiraju prirodan način stvaranja u kosti rezultiraju izvrsnim povezivanjem implantata s kosti pacijenta. Iako postoji niz tehnoloških procesa proizvodnje HAp-titan kompozita, i dalje ostaje pitanje optimizacije svojstava, smanjenje imunoloških reakcija i poboljšanja života pacijenta.

## 8. Literatura

- [1] F.C.M. Driessens, The mineral in bone, dentin and tooth enamel, *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* (89-7), 1980., 663–689.
- [2] S.M. Best, A.E. Porter, E.S Thian, J. Huang, *Bioceramics: Past, present and for the future*, *Journal of the European Ceramic Society* (28-7), 2008., 1319–1327.
- [3] M. Klimas, A. Dudek, The microstructure and selected properties of titanium-hydroxyapatite composites obtained by spark plasma sintering (SPS method), *Composites Theory and Practice* (13-3), 2013., 208-213.
- [4] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials* (30-30), 2009., 5897–5909.
- [5] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, 2004., 1–9.
- [6] E.S. Thian, J. Huang, S.M. Best, Z.H. Barber, W. Bonfield, Magnetron co-sputtered silicon containing hydroxyapatite thin films-an in vitro study, *Biomaterials* (26-16), 2005., 2947–2956.
- [7] L.L. Hench, *Bioceramics: from concept to clinic*, *Journal of American Ceramic Society* (74-7), 1991., 1487–1510.
- [8] A. Kumar, K. Biswas, B. Basu, Hydroxyapatite-titanium bulk composites for bone tissue engineering applications: a review, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* (103-2), 2015., 791–806.
- [9] C. Cui, B. Hu, L. Zhao, S. Liu, Titanium alloy production technology, market prospects and industry development, *Materials & Design* (32-3), 2011., 1684–1691.
- [10] A. Arifin, A.B. Sulong, N. Muhamad, J. Syarif, M.I. Ramli, Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: a review, *Materials and Design* (55), 2014., 165–175.
- [11] <http://apsmaterials.com/biomedical/hydroxyapatite-coating/>, pristup stranici 4.9.2018.
- [12] D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses, and medical applications*, Springer Verlag, 2001., 2–10.
- [13] E. Milella, F. Cosentino, C. Massaro, Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process, *Biomaterials* (22-11), 2001., 1425–1431.
- [14] S. Nath, R. Tripathi, B. Basu, Understanding phase stability, microstructure development and biocompatibility in calcium phosphate–titania composites, synthesized from

hydroxyapatite and titanium powder mix, *Materials Science and Engineering: Part C* (29-1), 2009., 97–107.

[15] A. Nakahira, K. Eguchi, Evaluation of microstructure and some properties of hydroxyapatite/Ti composites, *Journal of Ceramic Processing Research* (2-3), 2001., 108–112.

[16] A. Kumar, K. Biswas, B. Basu, On the toughness enhancement in hydroxyapatite-based composites, *Acta Materialia* (61-14), 2013., 5198–5215.

[17] K.M. Reddy, N. Kumar, B. Basu, Innovative multi-stage spark plasma sintering to obtain strong and tough ultrafine-grained ceramics, *Scripta Materialia* (62-7), 2010., 435–438.

[18] M. Karimi-Jafari, K. Kowal, E. Ul-Haq, S.A.M. Tofail, Spark plasma sintering of lead-free ferroelectric ceramic layers, *Coprehensive Material Finishing* (1), 2017., 347–357.

[19] A. Fahami, R. Ebrahimi-Kahrizsangi, B. Nasiri-Tabrizi, Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite, *Solid State Sciences* (13), 2011., 135–141.

[20] K.P. Sanosh, M.C. Chu, A. Balakrishnan, Y.J. Lee, T.N. Kim, S.J. Cho, Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition, *Current Applied Physics* (9-6), 2009., 1459–1462.

[21] C. Chu, P. Lin, Y. Dong, X. Xue, J. Zhu, Z. Yin, Fabrication and characterization of hydroxyapatite reinforced with 20 vol%Ti particles for use as hard tissue replacement, *Journal of Material Science: Materials in Medicine* (13-10), 2002., 985–992.

[22] O. Babushkin, T. Lindbäck, A. Holmgren, J. Li, L. Hermansson, Thermal expansion of hot isostatically pressed hydroxyapatite, *Journal of Material Chemistry* (4-3), 1994., 413–415.

[23] G. Lütjering, J.C. Williams, *Titanium*, New York: Springer, 2007., 442.

[24] Y. Yang, K.H. Kim, C.M. Agrawal, J.L. Ong, Interaction of hydroxyapatite–titanium at elevated temperature in vacuum environment, *Biomaterials* (25-15), 2004., 2927–2932.

[25] C.Q. Ning, Y. Zhou, In vitro bioactivity of a biocomposite fabricated from HA and Ti powder by powder metallurgy method, *Biomaterials* (23-14), 2002., 2909-2915.

[26] D. Mondal, L. Nguyen, I.H. Oh, B.T. Lee, Microstructure and biocompatibility of composite biomaterials fabricated from titanium and tricalcium phosphate by spark plasma sintering, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* (101-5), 2013., 1489–1501.

[27] A. Rapacz-Kmita, A. Ślosarczyk, Z. Paszkiewicz, Mechanical properties of HAp–ZrO<sub>2</sub> composites, *Journal of European Ceramic Society* (26-8), 2006., 1481–1488.

[28] R.I.M. Asri, W.S.W. Harun, M.A. Hassan, S.A.C. Ghani, Z. Buyong, A review of hydroxyapatite-based coating techniques: sol–gel and electrochemical depositions on

biocompatible metals, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (57), 2016., 95–108.

[29] X. Zhao, L. Yang, Y. Zuo, J. Xiong, Hydroxyapatite coatings on titanium prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid, *Chinese Journal of Chemical Engineering* (17-4), 2009., 667–671.

[30] M.C. Kuo, S.K. Yen, The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature, *Materials Science and Engineering: Part C* (20-1), 2002., 153–160.

[31] M.B. Kannan, Hydroxyapatite coating on biodegradable magnesium and magnesium based alloys, *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*, 2015., 289–306.

[32] S. Sobieszczyk, A. Zieliński, Coatings in arthroplasty: review paper, *Advances in Material Science* (8-4), 2008., 35–54.

[33] M.V. Popa, J.M. Calderon Moreno, M. Popa, E. Vasilescu, P. Drob, C. Vasilescu, S. Drob, Electrochemical deposition of bioactive coatings on Ti and Ti–6Al–4V surfaces, *Surface and Coatings Technology* (205-20), 2011., 4776–4783.

[34] B. Liang, S. Fujibayashi, M. Neo, J. Tamura, H.M. Kim, M. Cuhida, T. Kokubo, T. Nakamura, Histological and mechanical investigation of the bone-bonding ability of anodically oxidized titanium in rabbits, *Biomaterials* (24-27), 2003., 4959–4966.

[35] V. Frauchiger, F. Schlottig, B. Gasser, M. Textor, Anodic plasma-chemical treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications, *Biomaterials* (25-4), 2004., 593–606.

[36] O. Albayrak, O. El-Atwani, S. Altintas, Hydroxyapatite coating on titanium substrate by electrophoretic deposition method: Effects of titanium dioxide inner layer on adhesion strength and hydroxyapatite decomposition, *Surface and Coatings Technology* (202-11), 2008., 2482–2487.

[37] A. Stoch, W. Jastrzebski, E. Dlugon, W. Lejda, B. Trybalska. G.J. Stoch, A. Adamczyk., Sol–gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V, *Journal of Molecular Structures* (744-747), 2005., 633–640.

[38] M.S. Bryington, M. Hayashi, Y. Kozai, S. Vandeweghe, M. Andersson, A. Wennerberg, R. Jimbo, The influence of nano hydroxyapatite coating on osseointegration after extended healing periods, *Dental Materials* (29-5), 2013., 514–520.

[39] M.F.M. Yusoff, M.R.A. Kadir, N. Iqbal, M.A. Hassan, R. Hussain, Dipcoating of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composite coating on Ti6Al4V for enhanced corrosion protection, *Surface and Coatings Technology* (245), 2014., 102–107.

- [40] H. Hornberger, S. Virtanen, A. Boccaccini, Biomedical coatings on magnesium alloys—a review, *Acta Biomaterialia* (8-7), 2012., 2442–2455.
- [41] C.E. Wen, W. Xu, W.Y. Hu, P.D. Hodgson, Hydroxyapatite/titania sol–gel coatings on titanium–zirconium alloy for biomedical applications, *Acta Biomaterialia* (3-3), 2007., 403–410.
- [42] X. Ji, W. Lou, Q. Wang, J. Ma, H. Xu, Q. Bai, Sol–gel derived hydroxyapatite carbon nanotube/titania coatings on titanium substrates, *International Journal of Molecular Sciences* (13-4), 2012., 5242–5253.
- [43] L.L. Hench, Bioceramics, *Journal of the American Ceramic Society* (81-7), 1998., 1705–1728.
- [44] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *Journal of Biomedical Materials Research* (24-6), 1990., 721–734.
- [45] A. Kumar, S. Dhara, K. Biswas, B. Basu, In vitro bioactivity and cytocompatibility properties of spark plasma sintered HA-Ti composites, *Journal of Biomedical Materials Research: Part B* (101-2), 2013., 223–236.
- [46] B.V. Sampaio, G. Göller, F. N. Oktar, P. Valério, A. Goes, M. F. Leite, Biocompatibility evaluation of three different titanium-hydroxyapatite composites, *Key Engineering Materials* (284-286), 2005., 639–642.
- [47] P. Valério, F.N. Oktar, G. Goller, A. Goes, M.F. Leite, Evaluation of osteoblasts viability, alkaline phosphatase production and collagen secretion in the presence of TiHA, *Key Engineering Materials* (254-256), 2004., 777–780.
- [48] P. A. Ramires, A. Romito, F. Casentino, E. Milella, The influence of titania /hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour, *Biomaterials* (22-12), 2001., 1467–1474.
- [49] R. Comin, M.O. Cid, L. Grinschpun, C. Oldani, N.A. Salvatierra, Titanium-hydroxyapatite composites sintered at low temperature for tissue engineering: in vitro cell support and biocompatibility, *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* (15-2), 2017., 176–183.
- [50] B. Gang, H. Chung-Yuen, Effects of interface debonding on the toughness of ductile-particle reinforced ceramics, *International Journal of Solids and Structures* (26-5,6), 1990., 631–642.



- [51] C. Chu, X. Xue, J. Zhu, Z. Yin, In vivo study on biocompatibility and bonding strength of Ti/Ti-20 vol.% HA/Ti-40 vol.% HA functionally graded biomaterial with bone tissue in the rabbit, *Materials Science and Engineering: Part A* (429-1,2), 2006., 18–24.
- [52] E.S. Ghaith, T. Hayakawa, T. Kasuga, M. Nogami, Apatite formation on rutile type TiO<sub>2</sub> films formed by laser irradiation, *Journal of Materials Science* (41-8), 2006., 2521–2524.
- [53] K. Kuroda, M. Okido, Hydroxyapatite coating of titanium implants using hydroprocessing and evaluation of their osteoconductivity, *Bioinorganic Chemistry and Applications* (2012-10), 2012., 1–7.
- [54] K. Kuroda, M. Moriyama, R. Ichino, M. Okido, A. Seki, Formation and osteoconductivity of hydroxyapatite/collagen composite films using a thermal substrate method in aqueous solutions, *Materials Transactions* (50-5), 2009., 1190–1195.

## 9. Životopis

██ Osnovnoškolsko obrazovanje od 1. do 4. razreda obavio sam u OŠ „Koprivnički Ivanec“ u Koprivničkom Ivancu, a od 5. do 8. razreda u OŠ „Braća Radić“ u Koprivnici. Srednjoškolsko obrazovanje završio sam 2014. godine u Gimnaziji „Fran Galović“ u Koprivnici. Od 2014. godine pohađam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Bio sam demonstrator na vježbama iz kolegija Anorganska kemija akademske godine 2016./2017. Stručnu praksu obavio sam 2017. godine u sklopu Centralnog fizikalno-kemijskog laboratorija u Podravci d.d. u Koprivnici.