

UNIVERZITET U BEOGRADU

Marijana R. Pantović Pavlović

***IN SITU* SINTEZA I KARAKTERIZACIJA
TANKIH BIOKOMPATIBILNIH KOMPOZITNIH
PREVLAKA HIDROKSIAPATIT/PASIVNI
OKSID ZA POTENCIJALNU UPOTREBU U
MEDICINI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

Marijana R. Pantović Pavlović

***IN SITU* SYNTHESIS AND
CHARACTERIZATION OF THIN
BIOCOMPATIBLE
HYDROXYAPATITE/PASSIVE OXIDE
COMPOSITE COATINGS FOR POTENTIAL
MEDICAL USE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021.

Mentori doktorske disertacije:

Dr Nenad Ignjatović, naučni savetnik,
Institut tehničkih nauka SANU, Beograd
Profesor po pozivu, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Niš

Dr Sanja Eraković Pantović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Beograd

Članovi komisije:

1. Prof. dr Vladimir Panić, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku
Srbiju, Beograd

2. Dr Igor Pantić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd

3. Prof. dr Branko Bugarski, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet,
Beograd

Datum odbrane: 10.11.2021.

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija "In situ sinteza i karakterizacija tankih biokompatibilnih kompozitnih prevlaka hidroksiapatit/pasivni oksid za potencijalnu upotrebu u medicini" urađena je u Laboratoriji za elektrohemijska ispitivanja Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju u okviru projekta „Nov pristup dizajniranju materijala za konverziju i skladištenje energije“ OI 172060 finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Nenadu Ignjatoviću sa Instituta tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti na nesebičnoj pomoći, srpljenju i savetima koji su mi pomogli da uspešno uradim doktorsku disertaciju.

Dr Vladimiru Paniću iz Centra za elektrohemiju IHTM zahvaljujem se na pruženoj šansi da budem deo njegove istraživačke grupe, kao i za nesebično svakodnevno deljenje znanja, za svaki savet, sugestiju i pomoć pri izradi doktorske disertacije.

Dragom kolegi i supruzi dr Miroslavu Pavloviću iz Centra za elektrohemiju IHTM zahvaljujem se na svakodnevnoj stručnoj pomoći pri izradi eksperimenata i objašnjavanju dobijenih rezultata, kao i na još većoj podršci i razumevanju i na svakoj lepoj reči.

Veliku zahvalnost dugujem dr Jasmini Stevanović na podršci, razumevanju, na svim prijateljskim savetima, stručnim sugestijama, nesebičnoj pomoći i zalaganju u izradi teze.

Prof. dr Milici Gvozdenović, prof. dr Aleksandru Marinkoviću i prof. dr Đorđu Veljoviću sa Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu zahvaljujem se na stručnoj pomoći pri analizi dobijenih rezultata. Zahvaljujem se dr Vesni Kojić sa Instituta za onkologiju Vojvodine, kao i dr Tanji Barudžiji i dr Ljiljani Veselinović sa Instituta „Vinča“ na perfektnoj saradnji. Zahvaljujem se svim kolegama iz Centra za elektrohemiju IHTM, dr Nebojši Nikoliću na prijateljskim savetima i podršci, dr Boretu Jegdiću, dr Sanji Eraković Pantović, dr Aleksandru Dekanskom, dr Sanji Stevanović, dr Milici Košević, dr Gavrilu Šekularcu, dr Nataši Vukićević, dr Vesni Cvetković, dr Dušanu Tripkoviću, dr Miroslavi Varničić, dr Mariji Mihailović i kolegici Jovanki Kovačini.

Hvala mojoj porodici na podršci, pozitivnoj energiji, na svakom divnom trenutku koji smo proveli zajedno, na svakoj šali, na ljubavi, hvala im što su verovali u mene.

Marijana Pantović Pavlović

SAŽETAK

Definisanje nove metode anodizacije/anaforetske depozicije za nanošenje kalcijum fosfatnih i hibridnih prevlaka na bazi kalcijum fosfatnih keramika na titanijumske spustrate sa unapredjenim svojstvima je bio predmet doktorske disertacije koja je pred Vama. Ova doktorska disertacija daje doprinos rešavanju problema višestepenog pred-tretmana i post-tretmana površine radi dobijanja prevlake na supstratu, adhezije prevlake, antimikrobnih i citotoksičnih svojstava koja se javljaju kod biomaterijala. Primarno se bavi kreiranjem i optimizacijom novog *in situ* procesa anodizacije/anaforetske depozicije za dobijanje multifunkcionalnih kompozitnih biomaterijala. *In situ* metoda rezultira u poboljšanoj adheziji bioaktivne prevlake, povećanoj bioaktivnosti i biokompatibilnosti sa povećanim antimikrobnim svojstvima i odsustvom citotoksičnosti. Izučavani biomaterijali ostvaruju poboljšana svojstva kao što su: otpornost na koroziju, odsustvo toksičnosti za ljudsko telo i odgovarajuća čvrstoća što omogućava njihovo potencijalno korišćenje u medicini i stomatologiji. Cilj ove doktorske disertacije je bio kreiranje novog *in situ* procesa anodizacije/anaforetske depozicije i adekvatna modifikacija parametara procesa za nanošenje kompozitnih kalcijum fosfatnih prevlaka na titan i njegove legure, pri čemu se inovativnost ogleda u objedinjavanju procesa sinteze kalcijum fosfatne prevlake i modifikacije površine supstrata delimičnom inkorporacijom keramičke prevlake u kristalnu strukturu supstrata. Karakterizacija ovako dobijenih prevlaka je obavljena različitim fizičko-hemijskim, biohemijskim i biološkim metodama.

Ispitivanja su obuhvatila morfološku karakterizaciju i morfološke promene kalcijum fosfatnih prevlaka elektronskim mikroskopijama, pri čemu su korišćene sledeće tehnike karakterizacije: mikroskopija atomskih sila – AFM, skenirajuća elektronska mikroskopija – SEM i visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija FE-SEM. Hrapavost podloge se određivala metodama AFM i ručnim meračem linearne hrapavosti (Handheld Roughness Tester). Metodom merenja difrakcije X-zraka (XRD) utvrđeni su kristalografski i fazni sastavi, kao i strukturne promene kompozita. Ova metoda je korišćena i pri dokazivanju bioaktivnosti prevlaka na bazi amorfne kalcijum fosfata bez i sa hitozan oligosaharid laktatom (ChOL). Atenuiranom totalno reflektujućom infracrvenom spektroskopijom sa Furijevom transformacijom (ATR-FTIR) je dokazana uspešnost novog *in situ* procesa, prvenstveno kada je u pitanju dobijanje hibridnih multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka sa ChOL. Otpornost na koroziju modifikovane titanske površine novom *in situ* tehnikom sa simultanom anaforetskom depozicijom kalcijum fosfatnih prevlaka ispitana je potenciodinamičkim polarizacionim studijama i potenciostatskom

elektrohemijskom impedansnom spektroskopijom (PEIS). Bioaktivnost dobijenih kalcijum fosfatnih prevlaka je ispitavana nakon 3, 7 i 10 dana potapanja u simuliranoj telesnoj tečnosti (SBF), a ispitivanje bioaktivnosti (*in vitro*) je obavljeno upotrebom SEM i FE-SEM tehnika, XRD i FTIR. Antimikrobna svojstva multifunkcionalnih kompozitnih biomaterijala su testirana na gram-pozitivne bakterije soja *Staphylococcus aureus* i gram-negativne bakterije soja *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Citotoksičnost ispitivanih biomaterijala je određivana pomoću DET testa (Dye exclusion test) i urađen je kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test). Ovi testovi su korišćeni za ispitivanje preživljavanja ćelija humanih fibroblasta pluća (MRC-5).

U prvoj fazi je obavljena optimizacija procesa anodizacije titanskog supstrata, a u drugoj optimizacija *in situ* sinteze kompozitnih hidroksiapatit/titan oksid (HAp/TiO₂) i amorfni kalcijum fosfat/titan oksid (ACP/TiO₂) prevlaka na titanskoj podlozi. Anodizacija je obavljena na 30, 60 i 90 V, a ispitivane su morfologije tretirane površine, linearna i površinska hrapavost pomoću FE-SEM, AFM i ručnog merača linearne hrapavosti. Analizom linearne i površinske hrapavosti pokazano je da titan anodizovan na 60 V ima najveću hrapavost, dok pri anodizaciji na 90 V dolazi do ravnjanja površine.

Najveća hrapavost površine titanskog supstrata je dobijena pri anodizaciji na 60 V. Imajući to u vidu novi *in situ* proces sinteze kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake, koji se sastoji od istovremenih procesa formiranja TiO₂, taloženja HAp i ugradnje HAp u TiO₂ rešetku, je izveden pri navedenom naponu. Površina titanske podloge je bila potpuno pokrivena kompozitnom prevlakom, bez vidljivih pukotina, dok je adhezija, kvantifikovana ASTM D3359-02 standardom, znatno poboljšana u poređenju sa istim prevlakama dobijenim kataforetskim procesima, čak i bez sinterovanja prevlaka. Pripremljene prevlake su okarakterisane skenirajućom elektronskom mikroskopijom, Furieovom transformacionom infracrvenom spektroskopijom, rendgenskom difrakcijom i elektronski disperzivnom spektroskopijom. *In situ* proces je omogućio dobijanje uniformne i adherentne HAp/TiO₂ kompozitne prevlake na titanu. Budući da manja veličina HAp kristala unutar jako poroznih struktura prevlake poseduje poboljšanu sposobnosti vezivanja za razne biomolekule, očekivano je dobijena prevlaka koja poseduje željenu pokrivenost površine i kompaktnost. Dobijena prevlaka je obećavajući kandidat za koštane implantate imajući u vidu utvrđenu smanjenu krtost i poboljšanu adheziju.

Nano amorfni kalcijum fosfat/titan dioksid i nano amorfni kalcijum fosfat/titan dioksid/hitozan oligosaharid laktat (ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL) kompozitne prevlake su po prvi put uspešno sintetisane novom *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije na titanskoj podlozi. Formiranje ovih kompozitnih prevlaka potvrđeno je skenirajućom elektronskom mikroskopijom, difrakcijom X zraka (XRD) i atenuiranom totalno refleksujućom infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (ATR-FTIR). Dokazano je da se novi *in situ* proces

odvija sa poboljšanom adhezijom prevlake i odličnom pokrivenošću površine. Izvođenjem procesa na 90 V površina je glađa i javlja se mogućnost kristalizacije komponenti tokom produženog vremena taloženja. Može se zaključiti da je, posle ispitivanja adhezije prema ASTM D3359-02 standardu, adhezija na najvišem petom nivou i primetna je odlična i potpuna pokrivenost površine. Promena kalcijum fosfatne suspenzije dovodi do poboljšanja procesa *in situ* anodizacije/anaforetske depozicije, a ovakva prevlaka se može, sa stanovišta adhezije, dalje koristiti u biomedicinske svrhe bez procesa sinterovanja.

Oba multifunkcionalna kompozitna biomaterijala imaju poboljšanu korozivnu stabilnost, dok je ACP/TiO₂/ChOL prevlaka otpornija na koroziju u odnosu na ACP/TiO₂. Pokazano je da se na samom početku procesa taloženja pretežno odvija formiranje TiO₂/ChOL sloja, nakon čega sledi inkorporiranje ChOL u ACP uz istovremeni rast TiO₂. Ovaj mehanizam taloženja kao rezultat ima stvaranje visoko adherentne, uniformne, stabilne prevlake sa velikom otpornošću na koroziju. *In vitro* bioaktivnost je ispitivana potapanjem uzoraka u simuliranu telesnu tečnost (SBF). Na površini ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL dolazi do formiranja apatita sličnog koštanom apatitu nakon potapanja u SBF, što je dokazano XRD i FTIR tehnikama. Iako ACP/TiO₂ ne pokazuje antibakterijsku aktivnost, uzorci ACP/TiO₂/ChOL pokazuju 3 do 4 puta smanjenje broja *Staphylococcus Aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, posle 420 minuta. Verovatni mehanizam je vezivanje ChOL sa bakterijskim ćelijskim zidom, inhibirajući rast bakterijske ćelije, menjajući propustljivost ćelijske membrane i dovodeći do ćelijske smrti.

Ispitivanja citotoksičnosti su ukazala da ne dolazi do značajnog umanjenja preživljavanja zdravih MRC-5 ćelija kod ACP/TiO₂ kompozitnog uzorka, a prisustvo ChOL u ACP/TiO₂/ChOL prevlaci ostvaruje unapređena svojstva, prevlaka ne samo da nije citotoksična, već poboljšava ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i viabilnost ćelija.

ABSTRACT

Completely new method of anodization/anaphoretic deposition for the deposition of calcium phosphate and hybrid coatings based on calcium phosphate ceramics on titanium substrate with improved properties was the objective of the doctoral dissertation in front of you. The dissertation contributes to solving the problem of multistage pretreatment and posttreatment of the surface in order to obtain a coating on the substrate, adhesion of the coating, antimicrobial and cytotoxic properties that occur in biomaterials. It primarily deals with the application and optimization of the new *in situ* anodizing/anaphoretic deposition process for obtaining multifunctional composite biomaterials. The *in situ* method leads to improved bioactive coating adhesion, increased bioactivity and biocompatibility of biomaterials with increased antimicrobial properties and absence of cytotoxicity. Studied biomaterials have improved characteristics such as: corrosion resistance, absence of toxicity for the human body and adequate strength, which enables their possible use in biomedicine. The objective of this doctoral dissertation was to define a completely new *in situ* anodizing/anaphoretic deposition process and adequate modification of process parameters for the application of composite calcium phosphate coatings on titanium and its alloys, wherein innovation is reflected in combining calcium phosphate coating synthesis and surface modification by partially incorporating a ceramic coating into the crystalline structure of the substrate. The characterization of the coatings obtained in this manner was performed by various physico-chemical, biochemical and biological methods.

The experiments of morphological characterization and morphological changes of calcium phosphate coatings included following electronic microscopy characterization techniques: atomic forces microscopy - AFM, scanning electron microscopy - SEM and field emission scanning electron microscopy FE-SEM. The substrate roughness was determined by AFM and Handheld Roughness Tester methods. The X-ray diffraction (XRD) method was used for determination of crystallographic and phase compositions as well as composites structural changes. This method was also used to demonstrate the bioactivity of amorphous calcium phosphate coatings with and without chitosan oligosaccharide lactate (ChOL). Attenuated totally reflective Fourier transform infrared spectroscopy with (ATR-FTIR) was used to prove the successful execution of the new *in situ* process, primarily when it comes to obtaining hybrid multifunctional composite coatings with ChOL. The corrosion stability of the modified titanium surface by a novel *in situ* technique with simultaneous anaphoretic deposition of calcium phosphate coatings was examined by potentiodynamic polarization studies and potentiostatic electrochemical impedance spectroscopy

ABSTRACT

(PEIS). The bioactivity of the obtained calcium phosphate coatings was examined after 3, 7 and 10 days of immersion in simulated body fluid (SBF), and the bioactivity assay (*in vitro*) was performed using SEM and FE-SEM, XRD and FTIR techniques. The antimicrobial properties of multifunctional composite biomaterials were tested on gram-positive bacteria strain *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. The cytotoxicity of the tested biomaterials was determined using DET (Dye exclusion test) and colorimetric test with tetrazolium salts (MTT-test). These tests were used to examine the viability of human lung fibroblast cells (MRC-5).

Primarily the optimization of the anodization process of the titanium substrate for the subsequent *in situ* synthesis of the composite hydroxyapatite /titanium oxide (HAp/TiO₂) and amorphous calcium phosphate /titanium oxide (ACP/TiO₂) coatings on the titanium substrate was performed. Anodization was performed at 30, 60 and 90 V, and the surface morphologies, linear and surface roughness were investigated using FE-SEM, AFM and linear roughness tester. Analysis of linear and surface roughness showed that titanium anodized at 60 V had the highest roughness, while anodizing at 90 V resulted in surface flattening.

As the greatest surface roughness was obtained by anodizing at 60 V, new *in situ* synthesis process of composite anHAp/TiO₂ coating, consisting of simultaneous TiO₂ formation processes, HAp deposition and incorporation of HAp into the TiO₂ lattice, was performed at this voltage. The titanium substrate surface was completely covered by the composite coating, with no visible cracks, while the adhesion quantified by ASTM D3359-02 was significantly improved compared to the same coatings obtained by cataphoretic processes, even without sintering process. The prepared coatings were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction and electron dispersive spectroscopy. Uniform and adherent HAp/TiO₂ composite coating on titanium substrate was obtained by this novel *in situ* process. Since smaller size of HAp crystals within highly porous coating structures is of improved binding ability to various biomolecules, our coating is of excellent coverage and compactness. The obtained coating can be good candidate for bone implants due to reduced brittleness and improved adhesion.

Nano-amorphous calcium phosphate/titanium oxide and nano-amorphous calcium phosphate/titanium oxide/chitosan oligosaccharide lactate (ACP/TiO₂ and ACP/TiO₂/ChOL) composite coatings on titanium substrate have been successfully synthesized for the first time by new, simultaneous *in situ* anodization/anaphoretic deposition method. The formation of these composite coatings was confirmed by scanning electron microscopy, X-ray diffraction (XRD), and attenuated total reflectance Furrier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). It has been shown that this new *in situ* process is occurring, with improved coating adhesion and excellent surface coverage. By performing the process at 90 V, the surface is smoother and there is a possibility of

ABSTRACT

crystallization of the components during extended deposition times. After the adhesion test according to ASTM D3359-02 standard, it can be concluded that the adhesion is at the highest level (level 5) and excellent and complete surface coverage is observed. Changing the calcium phosphate suspension form HAp to ACP leads to an improvement of the in situ anodization/anaphoretic deposition process, and this coating can, from an adhesion point of view, be used for biomedical purposes without sintering process.

Both multifunctional composite coatings have improved corrosion stability, whereas the ACP/TiO₂/ChOL coating showed better corrosion stability. It was shown that at the very start of the deposition process, formation of TiO₂/ChOL layer takes place predominantly, which is followed by the inclusion of ChOL into ACP with simultaneous growth of TiO₂. This deposition mechanism resulted in the formation of strongly-bonded uniform stable coating with high corrosion resistance. *In vitro* bioactivity was investigated by immersion of the samples in simulated body fluid (SBF). There is in-bone-like apatite formation on both ACP/TiO₂ and ACP/TiO₂/ChOL surfaces upon immersion into SBF, which was proven by XRD and FTIR. While ACP/TiO₂ shows no antibacterial activity, ACP/TiO₂/ChOL samples exhibited 3 to 4- fold decreases in the number of *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* respectively, after 420 min. Probable mechanism is binding ChOL with bacterial cell wall, inhibiting its growth, altering the permeability of cell membrane and leading to cell death.

Cytotoxicity studies show that there is no significant reduction in the survival of healthy MRC-5 cells in the ACP/TiO₂ composite sample, and the presence of ChOL in the ACP/TiO₂/ChOL multifunctional composite coating provides a biomaterial that is not only non-cytotoxic, but improves cell proliferation, differentiation and cell viability.

SADRŽAJ

Sažetak	V
Abstract	VIII
Sadržaj	XI
Nomenklatura	XV
1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Biomaterijali	5
2.2. Metalni biomaterijali	9
2.2.1. Titan i legure titana	10
2.3. Keramički biomaterijali	13
2.3.1. Kalcijum fosfatna keramika	13
2.3.1.1. Amorfni kalcijum fosfat (ACP)	13
2.3.1.2. Hidroksiapatit (HAp)	17
2.4. Polimerni biomaterijali i biopolimeri	19
2.4.1. Hitozanska struktura i svojstva	21
2.4.2. Hitozan oligolaktat	23
2.5. Kompozitni materijali	25
2.5.1. Istorija kompozitnih materijala	25
2.5.2. Kategorije kompozitnih materijala	26
2.6. Kalcijum fosfatni kompozitni materijali	27
2.6.1. Upotreba biomaterijala kao osnovnog (bulk) materijala	28
2.6.1.1. Kalcijum fosfatni bulk materijali	28
2.6.2. Upotreba kalcijum fosfata kao punioca (filler)	30
2.6.3. Tanke kalcijum fosfatne prevlake i filmovi	32
2.6.3.1. Hibridni keramički kompozitni materijali na metalnim supstratima	33
2.7. Metode nanošenja kalcijum fosfatnih prevlaka i filmova	34

2.7.1. Površinska obrada supstrata	35
2.7.1.1. Mehaničke metode za modifikaciju topografije površine supstrata.....	35
2.7.1.2. Hemijska i električna obrada.....	36
2.7.2. Tehnike toplotnog prskanja	37
2.7.3. Tehnike taloženja parom	37
2.7.4. Mokre tehnike	38
2.7.5 Najčešće metode za dobijanje HAp prevlaka.....	39
2.7.6. Prevlake na bazi hitozana.....	40
2.8. Elektroforetsko taloženje.....	41
2.8.1. Karakteristike suspenzije.....	44
2.8.2. Karakteristike EPD procesa	46
2.8.3. Elektroforetska mobilnost	46
2.9. Nova <i>in situ</i> metoda anodizacije/anaforetske depozicije kalcijum fosfatnih prevlaka	48
3. Cilj istraživanja	51
4. Eksperimentalni deo.....	53
4.1. Priprema površine titana.....	54
4.2. Sinteza hidroksiapatitnog praha nano veličine	54
4.3. Sinteza praha amorfno kalcijum fosfata nano veličine.....	55
4.4. Priprema suspenzija za nanošenje kompozitnih prevlaka	55
4.4.1. Priprema HAp suspenzije za kataforetsko taloženje	55
4.4.2. Priprema HAp suspenzija za anaforetsko taloženje	56
4.4.3. Priprema ACP i ACP/ChOL suspenzija za anaforetsko taloženje	56
4.5. Anodizacija titanskih supstrata i anaforetsko taloženje HAp, ACP i ACP/ChOL prevlaka na titanskom supstratu	57
4.6. Ispitivanje prevlaka u rastvoru simulirane telesne tečnosti	58
4.7. Metode karakterizacije	60
4.7.1. Difrakcija X-zraka.....	60

4.7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija i visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija	61
4.7.3. Spektroskopija infracrvene svetlosti sa Furijeovom transformacijom u modu totalne refleksije	61
4.7.4. Merenje adhezije kalcijum fosfatnih prevlaka na titanske supstrate	62
4.7.5. Elektrohemijska merenja	62
4.7.6. Merenja hrapavosti površine	63
4.7.6.1. Merenja hrapavosti površine (RMS) AFM mikroskopijom	65
4.8. Ispitivanje antimikrobnih svojstava prevlaka	66
4.9. Ispitivanje citotoksičnosti prevlaka	67
4.9.1. Čelijske linije	67
4.9.2. Testovi za ispitivanje citotoksičnosti	67
4.9.2.1. DET (Dye exclusion test)	67
4.9.2.2. Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test)	68
5. Rezultati i diskusija	69
5.1. Optimizacija parametara taloženja - anodizacija titana	70
5.2. Kataforetsko taloženje HAp i <i>in-situ</i> Anodizacija/anaforetsko taloženje kalcijum fosfatnih prevlaka	74
5.2.1. Morfološka analiza uzoraka HAp prevlaka	74
5.2.2. Morfološka analiza uzoraka ACP i ChOL modifikovanih ACP prevlaka	83
5.2.3. Morfološka analiza bioaktivnosti ACP/TiO ₂ i ACP/TiO ₂ /ChOL prevlaka na titanu potopljenih u SBF	85
5.3. Morfološko i Elektrohemijsko ispitivanje uzoraka	87
5.3.1. FE-SEM morfološka analiza	87
5.3.2. Potenciodinamičke polarizacione studije	88
5.3.3. Potenciostatska elektrohemijska impedansna spektroskopija (PEIS)	93
5.4. XRD analize uzoraka	97
5.5. FTIR analize uzoraka	102
5.6. Ispitivanje hrapavosti uzoraka	107

SADRŽAJ

5.6.1. Hrapavost anodizovanih titanskih supstrata.....	107
5.6.2. Hrapavost kompozitne anHAp/TiO ₂ prevlake na titanskom supstratu	110
5.6.3. Hrapavost kompozitnih ACP/TiO ₂ i ACP/TiO ₂ /ChOL prevlaka na titanskim supstratima	112
5.7. Ispitivanje adhezije kalcijum fosfatnih prevlaka.....	114
5.8. Antibakterijska aktivnost.....	116
5.9. Citotoksičnost multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka	118
6. Zaključci.....	121
Literatura	126
Biografija.....	164
Prilog 1	168
Prilog 2.....	169
Prilog 3.....	170

NOMENKLATURA

LISTA SIMBOLA

Simbol	Značenje
a	radijus radne elektrode
A	površina elektrode
A_k	adsorbancija kontrolnog uzorka
A_s	adsorbancija ispitivanog uzorka
b	radijus kontra elektrode
B	empirijski koeficijent za izračunavanje polarizacionog otpora
C_c	kapacitivnost prevlake
CI	citotoksičnost
C_s	koncentracija mase čestica u suspenziji
CPE_c	kapacitivnost prevlake
CPE_{dl}	kapacitivnost dvojnog sloja
CPE_p	kapacitivnost u porama
d	međuatomsko rastojanje
D_p	prosečna debljina kristalita
E	a) jačina električnog polja b) potencijal
E_b	potencijal proboja
E_{corr}	korozioni potencijal
E_{OCP}	potencijal otvorenog kola
f	a) faktor efikasnosti EPD procesa b) frekvencija
f_{kr}	Henrijev koeficijent
I	jačina struje
j	gustina struje
j_{corr}	gustina struje korozije
K	konstanta (0,9)
$\%K$	frakcija preživelih ćelija
l	a) dužina cilindrične elektrode b) merna dužina
m	masa prevlake
M	metal
M_w	molekulska težina
n	a) broj ćelija po ml b) vrednost CPE eksponenta
N	broj kolonija
N_k	broj živih ćelija u kontrolnom uzorku
N_s	broj živih ćelija u ispitivanom uzorku

Simbol	Značenje
P	poroznost
PE	efikasnost zaštite od korozije
pK_a	konstanta disocijacije kiseline
r	a) radijus čestce b) razblaženje
R_a	aritmetička srednja vrednost apsolutnih vrednosti odstupanja profila od srednje vrednosti
R_c	otpor prevlake
R_{ct}	otpor prenosa naelektrisanja
R_p	difuzioni otpor u porama
R_p	otpor polarizacije
R_q	RMS - kvadratni koren aritmetičke srednje vrednosti kvadrata odstupanja profila od srednje vrednosti
R_s	otpor rastvora
R_y	zbir visine najvišeg pika profila od srednje linije i dubine najdublje profilne doline od srednje linije
S_m	srednji razmak između vrhova profila na srednjoj liniji
t	vreme taloženja
u_c	brzina rastvaranja prevlake
V	a) potencijalna razlika b) zapremina
x	priosečan broj ćelija u 16 kvadrata
X	broj ćelija u 1 ml suspenzije
y	odstupanje profila
Y	frekventno nezavisna realna konstanta CPE
Y_c	frekventno nezavisna realna konstanta CPE prevlake
Y_{dl}	frekventno nezavisna realna konstanta CPE dvojnog sloja
Y_p	frekventno nezavisna realna konstanta CPE pora
Z_{CPE}	impedansa strujnog kola
Z'	realni deo impedanse
Z''	imaginarni deo impedanse

GRČKI SIMBOLI

Simbol	Značenje
β_a	anodni nagib Tafelove krive
β_c	katodni nagib Tafelove krive
$\beta_{1/2}$	širina difrakcionog maksimuma izmerena na poluvisini maksimuma
δ	debljina prevlake
ε	dielektrična permitivnost
ε_r	dielektrična permitivnost medijuma
ε_0	dielektrična permitivnost vakuuma
ζ	zeta potencijal
η	viskoznost
θ	a) upadni ugao b) ugao rasipanja svetlosti
λ	talasna dužina rendgenskog zračenja
μ	elektroforetska pokretljivost
v_c	brzina čestice u suspenziji pri granici faza
ϕ_s	zapreminska koncentracija čestica u suspenziji
ϕ_c	zapreminska koncentracija čestica u prevlaci
ω	ugaona frekvencija

SKRAĆENICE

Skraćenica	Značenje
ACP	amorfni kalcijum fosfat
AFM	mikroskopija atomskih sila
anHAp	hidroksiapatitna prevlaka dobijena anaforetskim procesom taloženja
Alg	alginat
APS	atmosfersko plazma raspršivanje
ATCP	amorfni trikalcijum fosfat
ATR-FTIR	atenuirana totalno reflektujuća infracrvena spektroskopija sa Furijeovom- transformacijom
BCC	zapreminska kubna rešetka
BCP	dvofazni kalcijum fosfat
BMP	koštani morfogenetski protein
CaP	kalcijum fosfatna keramika
catHAp	hidroksiapatitna prevlaka dobijena kataforetskim procesom taloženja
CE	kontra elektroda
Ch	hitozan
ChOL	hitozan oligosaharid laktat
CMC	kompoziti sa keramičkom matricom
CNT	ugljenične nano cevi
CP	kalcijum fosfati
CVD	hemijsko taloženje parom
D3	holekalciferol, vitamin D3
DCP	amorfni dikalcijum fosfat
DCPD	dikalcijum fosfat dihidrat
DDA	stepen deacetilacije
DET	test odbacivanja boje (Dye exclusion test)
DLPLG	poli(d,l-laktid-ko-glikolid
DMEM	Dulbekov modifikovani Eagle medijum
DMF	dimetil formamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ECM	vanćelijski matriks
EDS	energetski disperzivna spektroskopija X-zračenja
EEK	ekvivalentno električno kolo
EPD	elektroforetsko taloženje
FCS	fetalni serum govečeta
FE-SEM	visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Skraćenica	Značenje
HAp	hidroksiapatit
HCP	gusto pakovana šestougaona rešetka
HI	hijaluronat
HVOF	prskanje pri velikoj brzini sa oksigenovanim gorivom
JCPDS	difrakcioni standardi prahova združenog komiteta – Joint Committee Powder Diffraction Standards
LB	Luria-Bertani agar
MC3T3-E1	ćelijska linija osteoblasta iz kalvarije losa
MHB	Miler Hinton Brot tečna hranljiva podloga
MMC	kompoziti sa metalnom matricom
MTT	kolorimetrijski test sa tetrazonijum solima
MRC-5	ćelijska linija humanih fibroblasta pluća
MWCNT	višeslojne ugljenične nanocevi
Oc	osteoklast
OCP	a) oktakalcijum fosfat b) potencijal otvorenog kola
Op	osteopontin
rhBMP-2	osteogeni rekombinantni ljudski morfogenetski protein-2
RMS	hrapavost površine
RNK	ribonukleinska kiselina
SBF	rastvor simulirane telesne tečnosti
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SPM	mikroskopija sa skenirajućom probom
TCP	trikalcijum fosfat
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
TGF	faktor rasta
TTCP	tetrakalcijum fosfat
UZ	ultrazvuk, ultrazvučni
VCC	broj živih ćelija
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta
WE	radna elektroda
XANES	rentgenska apsorpcija blizu ivice strukture
XRD	difrakcija X zraka
ZKE	zasićena kalomelova elektroda

1. UVOD

1. UVOD

Biomaterijali su ostvarili sveobuhvatnu primenu u medicini i svakodnevnom životu ljudi, gde se svake godine milioni pacijenata širom sveta susreću sa biomaterijalima u vidu pejsmejкера, veštačkih kukova, u zubarskim ordinacijama, kod hirurških zahvata, u farmaciji kod nosača lekova i ciljanih terapija i u mnogim drugim oblastima [1].

Metalni biomaterijali predstavljaju posebnu grupu biomaterijala najčešće korišćenih u ortopedskim primenama. Uprkos široko rasprostranjenoj primeni, primena metala kao biomaterijala može dovesti do neuspeha primene usled različitih faktora [2]. Glavni izazovi koje biomaterijal mora da prevaziđe da bi bio dobar kandidat za primenu u medicini su odgovarajuća čvrstoća, adhezija, biokompatibilnost, bioaktivnost, antimikrobno svojstvo, necitotoksičnost i otpornost na koroziju. Titan je jedan od malog broja biokompatibilnih metala koji je našao primenu u medicini i stomatologiji, jer poseduje pogodna svojstva kao što su čvrstoća, žilavost, gustina, nizak Jungov moduo, otpornost na koroziju i biokompatibilnost, što ga čini odgovarajućim materijalom za biomedicinske primene [3–6]. Usled povećane korozione otpornosti titana i njegovih legura u kiselinama, ovi materijali predstavljaju izbor za modifikaciju radi primene u biomedicini [7,8]. Takođe je pokazano da titan nije idealna zamena za koštano tkivo zbog njegove razlike u fizičkim i hemijskim osobinama u odnosu na kosti, koja se ogleda u lošijoj osteoprovodnosti i osteoinduktivnosti [9,10].

U cilju povećanja bioaktivnosti, osteointegracije i osteoindukcije, te poboljšanja antimikrobnih i necitotoksičnih svojstava, potrebna je modifikacija njegove površine nanošenjem biokompatibilnog materijala. Materijali koji se nanose na površinu titana su uglavnom kalcijum fosfatne (CaP) keramike, koje, u zavisnosti od vrste, mogu da imaju blisku hemijsku strukturu i sličnosti sa mineralnim sastavom kostiju (jedan od primera je hidroksiapatit, HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ove kalcijumfosfatne modifikacije mogu služiti kao podstrekači formiranja novog koštanog tkiva [11–14]. HAp je porozne strukture i usled bioaktivnosti dolazi do njegove delimične resorpcije i zamene prirodnim koštanim ćelijama [15].

Razvoj hibridnih polimer/keramika kompozitnih prevlaka na metalima kao biomaterijala predmet je istraživanja širom sveta. Kompozitni biomaterijali ove grupe mogu da poseduju poboljšana mehanička svojstva [16] i da izbegnu potrebu za visokotemperaturnim sinterovanjem prevlaka. Pogodan kandidat za takav hibridni kompozitni biomaterijal je hitozan koji je prirodni i resorbabilni polisaharid dobijen iz morskih životinja. Značajna svojstva ovog biopolimera su: enzimska razgradnja, sposobnost vezivanja i isporuke faktora rasta i poboljšana ćelijska adhezija [17]. Primetan je visok trend uključivanja biološki aktivnih molekula u prevlake, poput proteina i faktora rasta kako bi se poboljšala interakcija sa koštanim tkivom. Dodavanje senzitivnih biomolekula ne može da se prilagodi procesima koji se odvijaju na visokim temperaturama, a koji su potrebni za pripremu neorganskih bioaktivnih prevlaka. U skladu sa time, metode obrade

kompozitnih bioaktivnih prevlaka na sobnoj temperaturi, poput elektroforetskog taloženja (EPD), predstavljaju aktivno polje istraživanja. EPD se može koristiti za proizvodnju uniformnih prevlaka sa kontrolisanim svojstvima na složenim i poroznim strukturama, na sobnoj temperaturi i bez potrebe za skupom proizvodnom opremom [18].

Elektroforetsko taloženje je jedna od metoda modifikacije površine koja se koristi za poboljšanje bioaktivnosti površina depozicijom CaP čestica na TiO₂-pasiviranu elektrodu pod visokim naponom [19,20]. Problem kod EPD tehnike, kao i kod većine drugih, se ogleda u činjenici da EPD tehnika ne daje zadovoljavajuću adheziju CaP prevlake koja je izrazito podložna raslojavanju. Poboljšanje kompaktnosti prevlake i potpuna inkorporacija CaP čestica može biti zasnovana na formiranju kompozitnog sistema CaP i oksida titana sa postepenim i kontinuiranim faznim prelazima umesto jasno definisane granične površine.

Fenomen odsustva adhezije prevlake kao rezultat ima raslojavanje, pucanje prevlake i odsustvo mehaničke i hemijske veze između površinskog sloja i metala. Potencijalno rešenje ovog problema idejno se može zasnivati na metodama modifikacije površine supstrata i/ili CaP prevlake. Modifikacije površine titana mogu biti mehaničke, hemijske, elektrohemijske, fizičke i uključuju peskarenje, formiranje nanoporozne strukture TiO₂ postupkom anodizacije, nanošenje prevlake kalcijum fosfatne keramike ili hemijski tretman površine.

U ovoj doktorskoj disertaciji je kreirana inovativna metoda *in-situ* dobijanja kompozitnih prevlaka na bazi kalcijum fosfatne keramike na titanu jednostepenim postupkom, i to simultanim procesom anodizacije supstrata sa anaforetskom depozicijom kalcijum fosfatne keramike ili kalcijum fosfatne keramike modifikovane biopolimerima iz suspenzija. Cilj ove doktorske disertacije je definisanje parametara novog *in situ* procesa anodizacije/anaforetske depozicije i adekvatna modifikacija istih za nanošenje kompozitnih kalcijum fosfatnih prevlaka na titan i njegove legure, poboljšanje adhezije kao i karakterizacija ovako dobijenih prevlaka različitim fizičko-hemijskim i biološkim metodama. Takođe jedan od ciljeva je da se ispita bioaktivnost novih kompozitnih materijala, njihovo antimikrobno dejstvo i citotoksičnost i da se predloži materijal sa sveobuhvatno najboljim rezultatima za potencijalna istraživanja za primenu u medicini.

Predmet rada ove doktorske disertacije je bila *in situ* sinteza prevlaka na bazi kalcijum fosfata i modifikacija podloge od titana i njegovih legura procesom anodizacije. U literaturi se može naći jednovremeni tretman supstrata uz formiranje HAp prevlake metodom plazma elektrolitičke oksidacije – elektroforetskog taloženja PEO-EPD [20], međutim, ovaj postupak ima niz nedostataka (zahteva instrumentaciju koja generiše visoke napone, itd.).

2. TEORIJSKI DEO

2.1. BIOMATERIJALI

Postoji veliki broj materijala sa različitim primenama. U ovom kontekstu, biomaterijali se ističu zbog svoje sposobnosti da budu u kontaktu sa tkivima i tečnostima ljudskog tela. Biomaterijal je bilo koja supstanca koja je kreirana da se poveže sa biološkim sistemima za medicinsku upotrebu - bilo iz terapijskog ili dijagnostičkog ugla. Biomaterijali se uglavnom koriste za zamenu ili nadogradnju strukturnih komponenti ljudskog organizma kako bi se nadomestila oštećenja do kojih dolazi zbog starenja, bolesti ili nesrećnih slučajeva [21]. Proučavanje biomaterijala spada u domen nauke o biomaterijalima ili inženjerstva biomaterijala. Tokom svoje istorije nauka o biomaterijalima i inženjerstvo biomaterijala su doživeli stabilan i snažan rast, jer su mnoge kompanije uložile velike količine novca u razvoj novih proizvoda [22].

Biomaterijali su se značajno i neprekidno razvijali tokom poslednjih pedeset godina, a obuhvataju aspekte medicine, stomatologije, biologije, hemije, inženjerstva tkiva i nauke o materijalima. Oni mogu biti izvedeni iz prirode ili sintetizovani u laboratoriji primenom različitih hemijskih pristupa koji koriste metalne komponente, polimere, keramiku ili kompozitne materijale. Mnogostruka primena biomaterijala kao što su zamene zglobova, koštane ploče, koštani cement, veštački ligamenti i tetive, zubni implantati za fiksiranje zuba, proteze krvnih sudova, srčani zalisci, veštačko tkivo, kontaktna sočiva i implantati dojke čini ih sastavnim delom svakodnevice [23]. Biomaterijali se takođe svakodnevno koriste u stomatološkim aplikacijama, hirurgiji i isporuci lekova. Na primer, biomaterijal sa imobilisanim farmaceutskim proizvodima se može aplikovati u telo, što omogućava produženo oslobađanje leka tokom dužeg vremenskog perioda. U budućnosti se očekuje da će biomaterijali poboljšati regeneraciju prirodnih tkiva, promovišući kako obnavljanje strukturnog, funkcionalnog, metaboličkog i biohemijskog ponašanja, tako i biomehaničke performanse [24]. Biomaterijal takođe može biti autotransplantat, alograft ili ksenograft koji se koristi kao materijal za transplantaciju. Dizajn novih, jeftinih, biokompatibilnih materijala presudan je za poboljšanje životnih uslova i dobrobiti stanovništva s obzirom na sve veći broj ljudi kojima su potrebni implantati [25], pa je neophodno da procesi koji se koriste za proizvodnju biomaterijala budu pristupačni, brzi i laki za izvođenje. Postoji nekoliko metodologija za pripremu novih bioaktivnih, biokompatibilnih materijala sa osteokonduktivnošću i osteoinduktivnošću [26–32].

Preko 90% starije svetske populacije pati od trauma povezanih sa kostima, poput osteoporoze, karcinoma kostiju, reumatoidnog artritisa ili nezgoda, koje zahtevaju postupke zamene kičmenih pršljenova, kukova i kolena biomaterijalima [33]. Stoga postoji velika potražnja za odgovarajućim biomaterijalom sa prihvatljivom kombinacijom niskog modula elastičnosti i visoke čvrstoće, velike otpornosti na habanje i zamor, superiorne otpornosti na koroziju u telesnom

2. TEORIJSKI DEO

okruženju, velike dugovečnosti, biokompatibilnosti i bez citotoksičnosti [34]. Za zamenu obolelih kostiju primenjeni su različiti veštački koštani materijali, kao što su keramika, metali, polimeri i njihovi kompoziti. U poređenju sa polimerima i keramikom, metali i njegove legure smatraju najprihvatljivijim izborom za nadoknadu oštećenih nosivih kostiju zbog njihovih visokih mehaničkih svojstava, gde je, prema nekim statistikama, napravljeno preko 70% proizvedenih implantatskih uređaja metalnih biomaterijala [35–37].

Najčešća primena biomaterijala u medicini je u vidu zamenskih kukova, protetskih srčanih zalistaka, neuroloških proteza i ugrađenih sistema za doziranje i dostavu lekova. Kada se biomaterijal koristi u telu znatan vremenski period naziva se implantat, kada je trajno fiksiran u telu za dugoročnu primenu do kraja životnog veka naziva se proteza [38].

Materijali koji se koriste za izradu medicinskih implantata i proteza moraju da zadovolje određene kriterijume i poseduju prihvatljiva svojstva biokompatibilnosti, netoksičnosti, otpornosti na koroziju, izdržljivosti, čvrstoće, žilavosti i niske vrednosti modula elastičnosti [21]. Biokompatibilnost podrazumeva da telesne ćelije imaju izrazit afinitet prema materijalu koji se implantira u živi organizam. Netoksičnost predstavlja jedno od primarnih svojstava koje omogućava da oslobađanje metalnih jona i drugih produkata ne utiče na pojavu patološkog procesa bilo koje vrste u organizmu. Otpornost prema koroziji se ogleda u odsustvu korozije u dodiru sa živim tkivima u idealnom slučaju. Biokompatibilni materijali implantirani u ljudski organizam trebalo bi da funkcionišu bez ikakvih oštećenja tokom svog životnog veka sa minimalnim oslobađanjem čestica prilikom pojave trenja i habanja.

Biomaterijali se koriste za nadoknadu dela tela ili funkcije tela, pri čemu tu nadoknadu izvode na siguran, pouzdan, ekonomski i fiziološki prihvatljiv način. Različiti biomaterijali se koriste pri lečenju bolesti ili povreda skeletnog sistema.

Uspeh primene biomaterijala ili implantata u velikoj meri zavisi od tri faktora: svojstva i biokompatibilnosti implantata, zdravstvenog stanja primaoca i veštine hirurga koji implantira i prati njegov napredak [39].

Biomaterijali su takođe našli široku primenu u popravci, zameni ili uvećanju obolelih ili oštećenih delova mišićno-koštanog sistema poput kostiju, zglobova i zuba. Deo primene biomaterijala je sumirana na Slici 2.1.

2. TEORIJSKI DEO



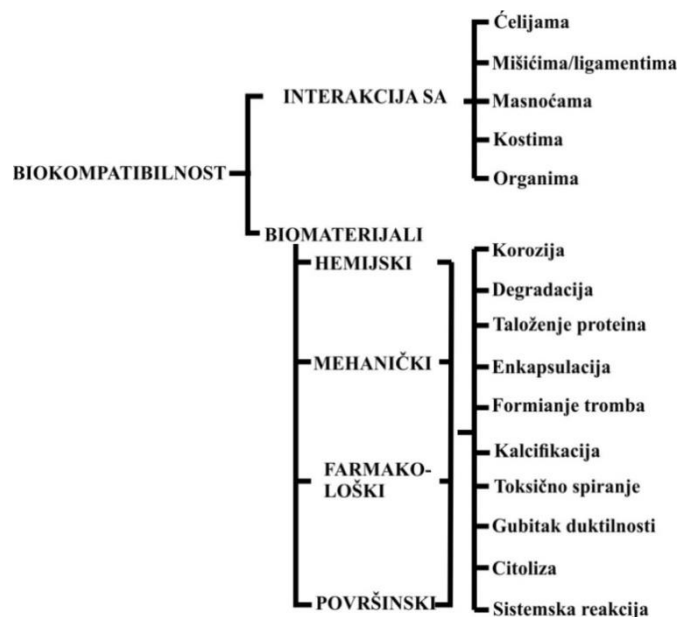
Slika 2.1. Klinička upotreba neorganskih biomaterijala [40]

Tokom godina se široko debatovalo o definiciji biokompatibilnosti materijala. Konačno značenje i mehanizmi koji su obuhvaćeni fenomenom biokompatibilnosti još uvek nisu postignuti. Generalno, biokompatibilnost definiše sposobnost biomaterijala da održi ćelijsku aktivnost, uključujući molekularne signalne sisteme, bez provociranja ili izazivanja lokalnih ili štetnih efekata na domaćinu [41]. Materijali su biokompatibilni kada ostvaruju očekivani blagotvorni odgovor tkiva i klinički relevantne performanse. Ostale komponente biokompatibilnosti su citotoksičnost, genotoksičnost, mutagenost, kancerogenost i imunogenost. Biokompatibilnost se obično procenjuje na test životinjama, histološkim i patološkim ispitivanjima susednih tkiva i odgovorima domaćina kao što su imunogeni, kancerogeni i trombogeni odgovori [41]. Trebalo bi napomenuti da interakcije između materijala i tkiva uključuju složene pojave u kojima tkivo i materijal međusobno utiču jedni na druge.

Biokompatibilnost materijala (Slika 2.2) se može definisati kao sposobnost materijala da odgovori na zadovoljavajući način pri određenoj primeni kod domaćina. To znači da sam materijal ili proizvodi koji se mogu izlučivati iz tog materijala ne uzrokuju smrt ćelije, hroničnu upalu ili druga oštećenja ćelijskih ili tkivnih funkcija [41]. Implantati ne samo da moraju da budu biološki sigurni i stabilni u pogledu citotoksičnosti i degradacije, već moraju da odgovaraju biološkim

2. TEORIJSKI DEO

zahtevima svake strukturne biokompatibilnosti [41]. Drugim rečima, oblik, unutrašnja struktura i dizajn implantata trebalo bi da budu prilagođeni svojstvima tkiva koje treba zameniti.



Slika 2.2. Šematska ilustracija biokompatibilnosti [42]

Pored ovih primarnih zahteva, biokompatibilnost površine poseduje primarnu ulogu, jer je upravo površina ta koja je u direktnom kontaktu sa živim organizmom. Stoga je potrebno na odgovarajući način prilagoditi i modelovati izložene površine u pogledu njihovih hemijskih, fizičkih, bioloških i morfoloških svojstava [43].

Klasifikacija interakcija implanata sa tvrdim tkivom data je u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Klasifikacija interakcija implanata sa tvrdim tkivom [43]

Vrsta interakcije	Tip interakcije
Biokompatibilna	Oslobađanje supstanci u toksičnim koncentracijama koje dovode do neharmoničnih efekata sa živim organizmom, a koje mogu dovesti do odbacivanja implantata
Biotolerantna	Otpuštanje supstanci, ali ne u toksičnim koncentracijama koje mogu dovesti do inkapsulacije unutar vezivnog tkiva
Bioinertna	Nema ispuštanja otrovnih materija
Bioaktivna	Pozitivna interakcija sa diferencijacijom tkiva koja dovodi do bliske adhezije i međusobnog povezivanja duž interfejsa implantata i tkiva

Lista u Tabeli 2.2 ilustruje neke prednosti i nedostatke za tri glavne grupe sintetičkih materijala koji se koriste za implantataciju.

Tabela 2.2. Opšte poređenje materijala za implantate [44]

Klasa materijala	Prednosti	Nedostaci
Metali	Jaki	Korodiraju u fiziološkom okruženju
	Otporni na habanje	Velika vrednost Jungovog modula elastičnosti
	Tvrđi	Velike vrednosti gustine
	Laki za izradu	Obično nisu bioaktivni Nisu resorbabilni
Polimeri	Hemijski otporni	Mehanički slabi
	Tvrđi	Mala vrednost Jungovog modula elastičnosti
	Laki za izradu	Obično nisu bioaktivni
	Niske vrednosti gustine	Nisu resorbabilni
Keramika	Biokompatibilna	Mala zatezna čvrstoća
	Otporna na habanje	Teška za obradu
	Lagani kompoziti	Male vrednosti žilavosti
		Nije elastična

2.2. METALNI BIOMATERIJALI

Metali se koriste kao biomaterijali najmanje 2000 godina [45]. Međutim, tek u prvom i drugom svetskom ratu počinju naširoko da se koriste kao uređaji za unutrašnju fiksaciju i zamenu kostiju. Metalni biomaterijali se uglavnom koriste za humane implantate zahvaljujući njihovim različitim svojstvima, kao što su mehanička čvrstoća, otpornost na koroziju i biokompatibilnost. Iako postoje brojni metali koji su našli primenu u medicini, kao što su nerđajući čelici, legure kobalt-hrom, kobalt–nikl, titan i njegove legure, Nitinol pametna (smart) legura, zubni amalgami, zlato, metalna stakla i biorazgradivi metali [46], nekoliko njih (kao što su titan (Ti), legure na bazi Ti, platina (Pt) i austenitni nerđajući čelik (316L)) primenjeno je za ortopedske i biomedicinske primene [47–49]. Način obrade i čistoća metala određuju njegova svojstva. Neke karakteristike metalnih materijala su njihove velike vrednosti zateznih čvrstoća, velika izdržljivost, otpornost na ciklično opterećenje (zamor) i otpornost na vremenski zavisne deformacije (puzanje). Ovi materijali su generalno pronašli primenu u izradi implantata kao što su proteze kuka, proteze zglobova kolena, zubni implantati, kardiovaskularni uređaji, hirurški instrumenti itd.

Prva legura metala razvijena specijalno za ljudsku upotrebu je vanadijum čelik koji je korišćen za izradu ploča prilikom loma kosti (Šerman ploče) i zavrtnja. Metali i legure koje se najčešće koriste za medicinske uređaje uključuju nerđajući čelik, titan i njegove legure i legure na bazi kobalta [50].

2. TEORIJSKI DEO

Pored nabrojanih prednosti, biokompatibilnost metalnih implantata ipak izaziva veliku zabrinutost jer implantati mogu da korodiraju u *in vivo* okruženju [51]. Posledice korozije su raspad implantatnog materijala i štetan uticaj proizvoda korozije na okolna tkiva i organe. Neki od produkata reakcija korozije štetni su za organe u blizini implantata. Joni nikla (Ni) oslobođeni korozijom implantata od legure nikal-titan (NiTi) jedan su od primera ovih nusproizvoda [47,52,53]. Jedan od najvažnijih aspekata pogodnosti materijala za bio-primenu je veća otpornost na koroziju i, posledično, niža toksičnost zbog oslobođenih metalnih jona [54].

2.2.1. Titan i legure titana

U poređenju sa drugim metalima, titan je relativno nov inženjerski materijal. Njegova komercijalna primena započela je četrdesetih godina prošlog veka, a kao implantabilni materijal uvedena je tek 1960-ih [55], ali su istraživači tek tokom 1980-ih počeli da shvataju superiornost titana u odnosu na druge materijale za primenu u medicini. Danas su titan i njegove legure postali preferirani izbor za primenu u ortopedskoj hirurgiji usled odgovarajućih mehaničkih svojstava, prihvatljive otpornosti na koroziju i same kompatibilnosti titana od strane kostiju [36,56,57]. Komercijalno čist titan i legure titana (Ti-6Al-4V (Ti 64), Ti-6Al-7Nb, Ti-5Al-2.5Fe, TiNi, Ti-13Nb-13Zr i Ti-15Mo-3Zr-3Al) su široko rasprostranjeni u ortopedskim zamenama i drugim primenama koje imaju kontakt sa kostima.

Mala gustina titana (4.5 g/cm^3) i mehano-hemijska svojstva su omogućila široku primenu titana kao implantata [58]. Bot, Beaton i Davenport su 1940. godine prvi put implantirali titan laboratorijskim životinjama [59] i zaključili su da je titan materijal koji se prihvatljivo pokazao pod *in vivo* uslovima u poređenju sa nerđajućim čelikom i legurama na bazi Co-Cr.

Dva najčešće upotrebljena materijala na bazi titana su čist Ti (ASTM F67) i Ti-6Al-4V (ASTM F136) [60]. Ovi materijali su izazvali veliko interesovanje za primenu kao noseći implantati zbog svojih prihvatljivih mehaničkih svojstava (zatezna čvrstoća i otpornost na zamor), hemijske stabilnosti (otpornost na koroziju) i biokompatibilnosti u *in vivo* uslovima. Komercijalno čisti Ti se uglavnom bira za primene gde je otpornost na koroziju najvažnije mehaničko svojstvo. Ti-6Al-4V (ASTM F136) je alfa-beta legura, čije mehaničko ponašanje i hemijska stabilnost zavise od vrste termičke i mehaničke obrade [61]. Mehanička svojstva i klinička primena Ti legura su navedeni u Tabeli 2.3.

Titan (Ti) migrira kroz β prelaz na temperaturi od 882°C (T_β). Na T_β titan poprima gusto pakovanu šestougaoonu rešetku (HCP), koja se naziva α -Ti, a iznad T_β , zapreminski kubnu rešetku (BCC), β -Ti. Dodavanje α ili β -stabilizujućih legirajućih elemenata u titan dovodi do mogućnosti postojanja obe faze. Ugrađivanje Al (α -stabilizatora) i V (β -stabilizatora) čini Ti 64 $\alpha + \beta$

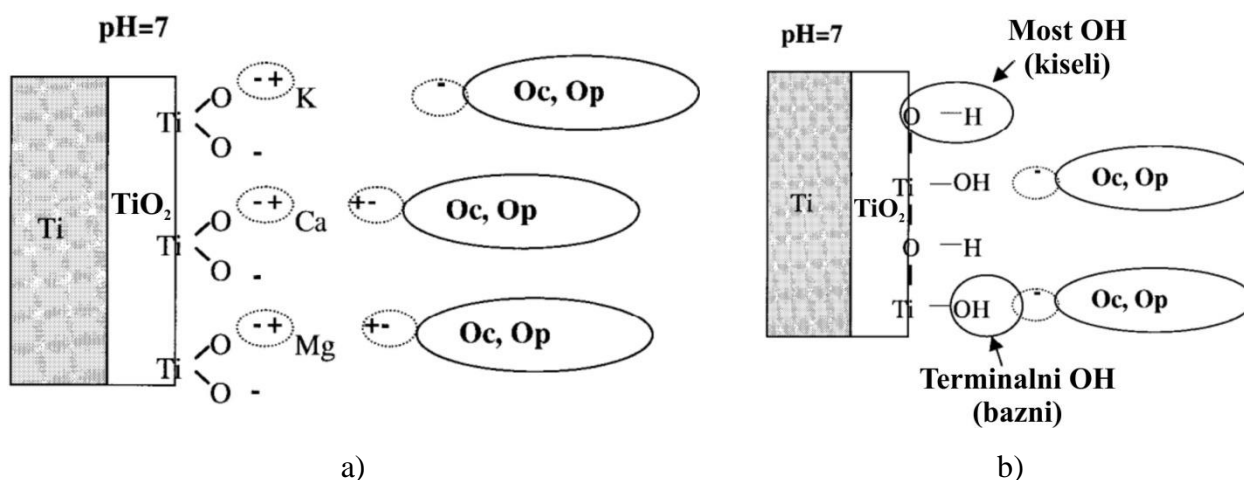
2. TEORIJSKI DEO

dvofaznim materijalom uz postojanje HCP α faze i preostale BCC β faze na sobnoj temperaturi [62].

Tabela 2.3. Mehanička svojstva i klinička primena materijala zasnovanih na Ti [50]

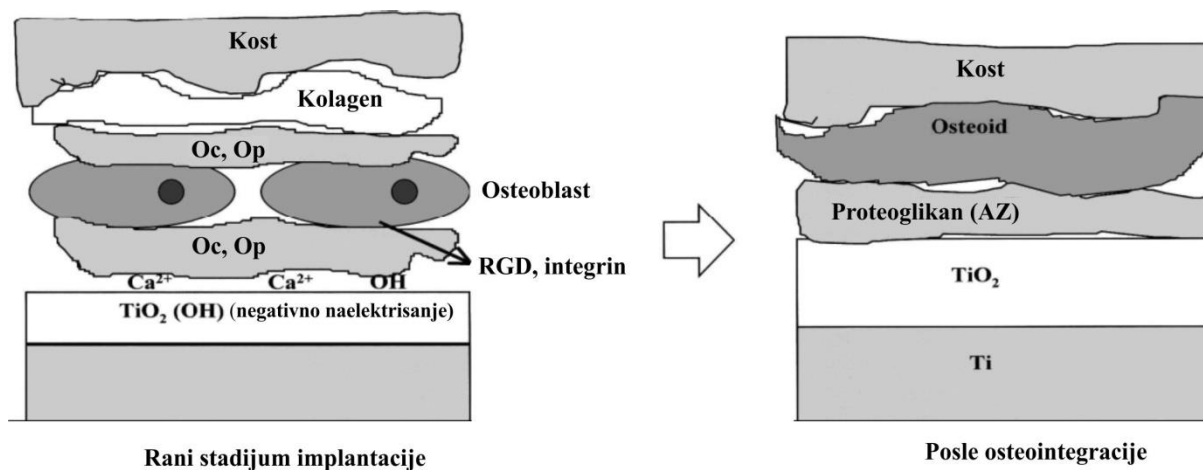
Oznaka legure	Jungov moduo elastičnosti (GPa)	Zatezna čvrstoća (MPa)	Izduženje (%)	Klinička primena
Čist Ti (ASTM F67)	102-110	240-550	15-24	Kućišta za pejsmejkere, kućišta za uređaje za pomoć u ventrikularnim operacijama, ugradne pumpe za ciljano doziranje lekova, zubni implantati, zavrtnji i fiksatori kod operacija kičme
Ti-6Al-4V (ASTM F136)	110	930	10-15	Totalna artroplastična zamena zglobova, pre svega kukova i kolena
Ti-6Al-7Nb (ASTM F1295)	105	860	10	Femoralni stemovi kuka, ploče za fiksiranje lomova, komponente kičme, ekseri, šipke, zavrtnji i žice
Ti-13Nb-13Zr (ASTM F1713)	79-84	973-1037	10-16	Ortopedski implantati

Titan i njegove legure su poznate po svojoj osteokonduktivnosti (blizak kontakt sa koštanim tkivom u međusloju) [63,64]. Ova svojstva se pripisuju oksidnom TiO_2 sloju na površini čistog titana koji se spontano formira u atmosferskim uslovima usled visoke reaktivnosti titana sa kiseonikom. Ovaj nanometarski pasivni sloj koji deluje kao međusloj između biološkog medijuma i implantata, nije odgovoran samo za veliku otpornost titana na koroziju, već može da privuče osteogene proteine poput osteokalcina (Oc) i osteopontina (Op), glavnih proteina koji doprinose osteointegraciji [65]. Slika 2.3 ilustruje mogući mehanizam osteointegracije titana. Na $\text{pH}=7$ negativno naelektrisan sloj TiO_2 (površina implantata) i Oc, Op su povezani pozitivno naelektrisanim jonima kalcijuma, koji se nalaze u okolnoj telesnoj tečnosti (Slika 2.3a). Alternativno, Oc i Op grupe mogu biti privučene i vezane za implantat putem premošćavanja terminalnih OH radikala za sloj TiO_2 na površini titana (Slika 2.3b) [65,66].



Slika 2.3. Mehanizam adsorpcije osteogenih proteina na titan [65]. (Oc: osteokalcin, Op: osteopontin). a) Mehanizam posredovan kalcijumovim jonima i b) Mehanizam posredovan terminalnim OH radikalima

Osteoblasti proizvode isključivo Oc i Op. Njihovo vezivanje za titan dovodi do migracije ćelija osteoblasta u smeru ka implantatu (ćelijska adhezija). Oc i Op koji okružuju ćelije pokreću formiranje kostiju stvaranjem kolagena koji se mineralizuje (Slika 2.4) [65].



Slika 2.4. Osteointegracija titanskog implantata (AZ: zona amorfne strukture) [65]

2.3. KERAMIČKI BIOMATERIJALI

Keramički materijali su neorganska jedinjenja metalnih ili nemetalnih materijala sa jonskom ili kovalentnom međuatomskom vezom, koji se najčešće dobijaju na povišenim temperaturama.

Klasa keramičkih materijala koji se koriste za reparaciju skeletnih i drugih tvrdih tkiva se obično naziva biokeramika. Biokeramike mogu biti bioinertne (glinica, cirkonijum), bioresorbilne (trikalcijum fosfat) ili bioaktivne (hidroksiapatit, bioaktivna stakla i staklokeramika) [50]. Klasifikacija biokeramike je prikazana u Tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Vrste vezivanja biokeramike za tkiva [24]

Vrste vezivanja	Vrste biokeramike
Gusta, neporozna, gotovo inertna keramika pričvršćuje se rastom kostiju u nepravilnosti površine cementiranjem uređaja u tkivo ili utiskivanjem u defekt (morfološka fiksacija)	Al_2O_3 , ZrO_2
Kod poroznih implantata dolazi do urastanja kosti, gde se kost mehanički pričvršćuje za materijal (biološka fiksacija)	Porozni hidroksiapatit, Porozni metali sa prevlakom od hidroksiapatita
Površinsko reaktivna keramika, stakla i staklokeramika se direktno vezuju hemijskim vezama sa kostima (bioaktivna fiksacija)	Bioaktivna staklokeramika, Hidroksiapatiti velike gustine, Bioaktivna stakla
Resorbabilna keramika i stakla u komadu ili praškastom obliku dizajnirani da se polako zamenjuju kostima	Kalcijum sulfat (gips), Trikalcijum fosfat, Kalcijum fosfatne soli, Bioaktivno staklo

Uspeh keramičkih materijala u kliničkoj praksi zavisi od njihove sposobnosti da indukuju regeneraciju kostiju i rast kostiju u međusloju tkivo-implantat bez prelaznog sloja vlaknastog tkiva. Željena svojstva implantirane biokeramike su: netoksičnost, nekancerogenost, nealergičnost, nezapaljivost, biokompatibilnost i biofunktionalnost tokom svog životnog veka u domaćinu.

2.3.1. Kalcijum fosfatna keramika

2.3.1.1. Amorfni kalcijum fosfat (ACP)

Amorfni kalcijum fosfat (ACP) je termin koji se odnosi na amorfne faze kalcijum ortofosfata. Amorfne kalcijum fosfatne faze su jedan od najčešćih oblika minerala kalcijum fosfata

2. TEORIJSKI DEO

(CaP) u biološkim organizmima [67]. Pronađene su u mitohondrijama eukariotskih i prokariotskih ćelija, a ACP se još uvek smatra prekursorskom fazom minerala u kostima kod kičmenjaka, mada je to vrlo diskutabilno i kontroverzno i tek treba da se tačno utvrdi.

Amorfna kalcijum fosfatna faza je posredna faza u dobijanju nekoliko vrsta kalcijum fosfata taloženjem. ACP je prisutan u mnogim biomaterijalima i preparatima. Javlja se kao prevlaka metalnih endoproteza dobijenih različitim tehnikama, bilo kao prelazna faza ili kao krajnji proizvod [68]. Koristi se u samosušećim injekcijskim cementima, kod kojih je odgovoran za reakciju sušenja. Pored toga, ACP se nalazi u kompozitnim materijalima koji se koriste u odontologiji kao remineralizujuća faza cakline i dentina, te njegovu upotrebu za formulisanje pasti za zube kao sredstva za remineralizaciju rana karijesnih lezija [68,69].

ACP se javlja u mnogim biološkim sistemima, posebno u primitivnim organizmima, gde se veruje da služi kao rezervoar kalcijumovih i fosfatnih jona. Minerali koji se uglavnom sastoje od kalcijuma i fosfata su najzastupljeniji u zubima i egzoskeletnim strukturama kod morskih beskičmenjaka [70].

Pitanje nastanka ACP faze kod mineralnog razvoja kostiju, pre finalne kristalizacije faze slične hidroksiapatitu (HAp), bilo je neprimetno čak i u najranijoj fazi formiranja tkiva kod velikog broja istraživanja [71–74]. Novija istraživanja pokazuju prisustvo ACP mineralne komponente kod kostiju koje se razvijaju, ali ne i kod već formiranih kostiju [75]. Postojanje ACP kod kičmenjaka još uvek nije eksperimentalno dokazano osim kod specifičnih lokacija, poput struktura unutrašnjeg uha ajkulinih embriona i kod mleka sisara [70,71]. Koristeći nekoliko tehnika, kao što su Furieova transformisana infracrvena spektroskopija (FTIR), Ramanska spektroskopija i rentgenska apsorpcija blizu ivice strukture (XANES), skenirajuća elektronska mikroskopija visoke rezolucije (SEM) i transmisiona elektronska mikroskopija (TEM), nekoliko autora je nedavno predstavilo dokaze postojanja prolaznog oblika ACP u nekoliko mineralizovanih tkiva, kao što su novoformirana zubna gleđ kod miševa, novoformirane kosti peraja zebra ribica i u ranoj unutarmembranskoj mineralizaciji morune [76–78]. Na pitanje pojave ACP faze u novomineralizovanim tkivima kičmenjaka usled nedostatka nepobitnih dokaza nema odgovora.

U literaturi se mogu pronaći brojne reference vezane za dobijanje različitih vrsta ACP koje se u osnovi razlikuju po atomskom odnosu Ca/P. Amorfni trikalcijum fosfat (ATCP), sa atomskim odnosom Ca/P=1,5 i hemijskom formulom $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, se najčešće može naći u amorfnom talogu dobijenom u alkalnim sredinama sa pH opsegom od 9 do 11. Ovaj sastav odgovara tačno i jasno definisanom jedinjenju i može se naći kod ACP koji je dobijen na visokim temperaturama.

U kiselijim rastvorima amorfni kalcijum fosfat može da sadrži HPO_4^{2-} jone umesto PO_4^{3-} , što dovodi do manjeg Ca/P odnosa. U nekim istraživanjima je dobijen odnos od čak 1,15 [79]. Takve faze su nestabilne i vrlo brzo se pretvaraju u dikalcijum fosfat dihidrat (DCPD)

2. TEORIJSKI DEO

(CaHPO₄·2H₂O). U eksperimentima rađenim na 30 °C i 42 °C, Ca/P odnos u ranoformiranim čvrstim fazama je varirao u odnosu od 1,35 do 1,38.

U nevedenim ili etanol-voda medijumima mogu se dobiti ACP faze znatno manjeg odnosa Ca/P, kao što su amorfni oktakalcijum fosfat (OCP) [Ca₈H₂(PO₄)₄·nH₂O] ili amorfni dikalcijum fosfat (DCP) (CaHPO₄) [79–82]. ACP faze sa Ca/P odnosom većim od 1,5 se mogu dobiti samo u prisustvu stranih dodatih jona, najčešće karbonatnih i oksidnih jona. To je slučaj sa ACP fazama dobijenim tokom procesa dobijanja HAp plazma sprej pirolizom, pri čemu ove faze mogu da sadrže oksidne jone [68].

Trebalo bi istaći da se i sastav najčešćeg oblika ACP, tj. ATCP, može menjati tokom procesa starenja, jer dolazi do stvaranja HPO₄²⁻ i OH⁻ jona [83]:



Ovo dovodi do nastanka niza jedinjenja predstavljenih formulom koja je data u Jednačini 2.2:

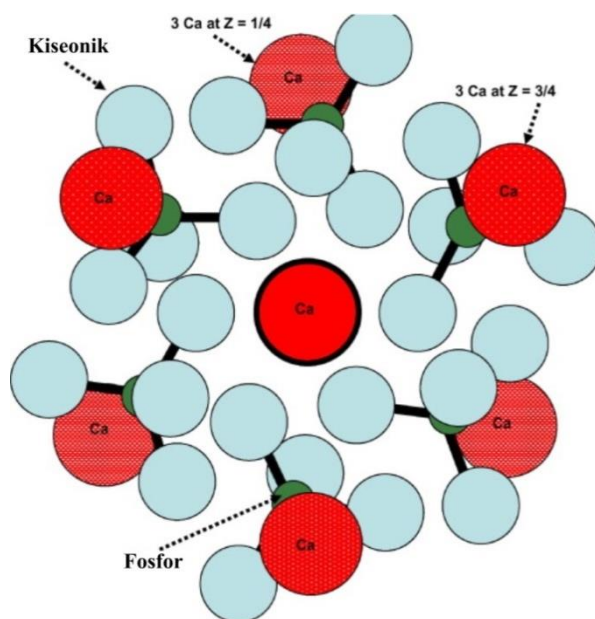


Navedena reakcija prethodi kristalizaciji apatita sa deficitom kalcijuma kada je $x = 1$ [69].

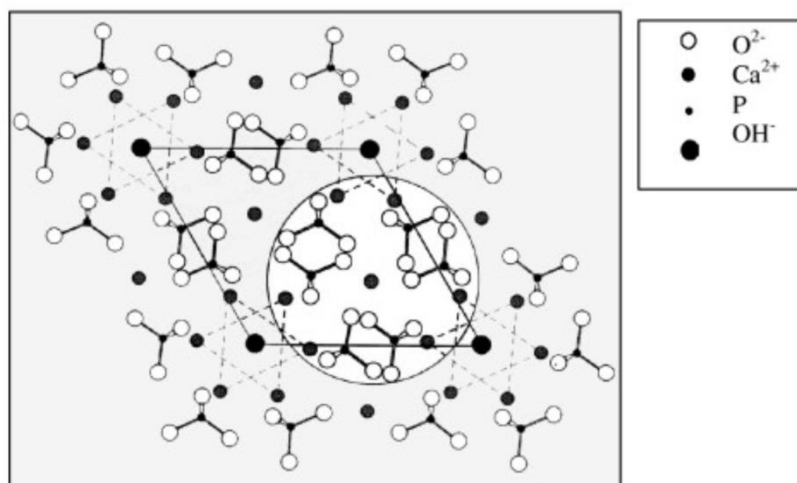
Bets i Posner [84] su prvi definisali strukturu ATCP na osnovu funkcije radijalne distribucije. Formula ATCP odgovara hemijskoj formuli Ca₉(PO₄)₆, pri čemu je Ca₉(PO₄)₆ jedinica prosečnog prečnika od 0.95 nm i ova jedinica se naziva Posnerov klaster.

Posnerovi klasteri odgovaraju lokalnom rasporedu kalcijumovih i fosfatnih jona koji postoje u strukturi apatita i poseduju S₆ simetriju. Posnerov klaster je prikazan na Slici 2.5 [69]. Ovaj raspored je analogan rasporedu kod nekoliko drugih jedinjenja, kao što su apatiti, OCP i β-trikalcijum fosfat (TCP). Odnos izvorne strukture Posnerovog klastera i strukture apatita predstavljen je na Slici 2.5b. Teorijska ispitivanja stabilnosti različitih klastera kalcijuma i fosfata sa većim brojem jona potvrdila su da Posnerovi klasteri imaju najstabilniji raspored [85].

Raspored klastera u većim strukturama nije dobro poznat. Istaloženi ATCP sadrži veliku količinu vode, za koju se smatra da je samo delimično prisutna u međuklasternom prostoru, što omogućava povezivanje Posnerovih klastera u veće sferne jedinice prečnika 20–300 nm [86]. Druga vrsta vode, koja je labavije vezana, je jednostavno adsorbovana na ove klasterne.



a)



b)

Slika 2.5. Struktura amornog kalcijum-fosfata. (a) Posnerov klaster sa S_6 simetrijom [69]. Tri kalcijumova jona se preklapaju formirajući kolonu na C_3 osi figure koja se nalazi na $z=0, 1/2$ i 1 .

Dve druge grupe od po tri kalcijumova jona se nalaze na periferiji klastera na $z=3/4$ i $z=1/4$ pozicijama. Atomi fosfora iz fosfatnih grupa se nalaze na položaju $z=1/2$, sa dva atoma kiseonika iz fosfatnog tetraedra. Ukupni hemijski sastav odgovara $Ca_9(PO_4)_6$. (b) Originalni model Posnerovog klastera koji pokazuje svoj odnos sa apatitnom strukturom [87]

ACP se konvertuje u hidroksilovani apatit u vodenom medijumu. Ova reakcija se odigrava u suspenzijama i stanjima sličnim gelu, na istaloženim vlažnim uzorcima i na liofilizovanim i zagrejanim prahovima [71,83,88]. Kod ovih uzoraka se mogu primetiti neke zajedničke karakteristike:

- Prvo se javlja period indukcije tokom kojeg se amorfno stanje zadržava;

- Zatim dolazi do kristalizacije koja se odvija prilično brzo i prati sigmoidalni rast [69];
- Konverzija ATCP u apatit je „autokatalitička“;
- U većini reakcija konverzije koje se javljaju na fiziološkom pH;
- Dobijeni apatit je hidrosilovan, osetljiv na kalcijum i sadrži hidrogen fosfatne vrste.

ACP se uglavnom može dobiti na dva glavna načina:

- u vodenom rastvoru pri niskoj temperaturi ili korišćenjem visokoenergetske obrade (mokri postupak)
- na visokim temperaturama (suvi postupak).

U zavisnosti od načina dobijanja i eksperimentalnih uslova (prezasićenost rastvora, pH, itd.), sintetisani ACP može imati Ca/P odnos u rasponu od 1 do 2, pa čak i više [69,79]. Sinteza ACP mokrim postupkom je zasnovana na dvostrukom razlaganju soli kalcijuma i fosfata u vodenoj ili vodeno-alkoholnoj sredini [89,90]. ATCP (Ca/P = 1,5) se može dobiti različitim postupcima u rastvoru, ali svaka od ovih metoda zahteva snažno i brzo mešanje i taloženje. Većina sinteza se izvodi na sobnoj temperaturi i zahteva visoku stopu prezasićenosti.

U cilju prevencije konverzije i/ili fazne transformacije neophodno je čuvanje ACP prahova u zamrzivaču. Čak i posle sušenja u eksikatoru ili liofilizatoru, ACP sadrži od 10-20% vode. Suvi ACP se može dobiti zagrevanjem ACP praha na temperaturi od 450°C u vakuumu ili vazduhu, pri čemu nema promene strukture [91].

Suvi, zagrevani ATCP je stabilniji od nezagrevanog ACP i može se skladištiti na sobnoj temperaturi. Generalno, ACP se dobija iz koncentrovanih rastvora i na vrlo visokim prezasićenostima rastvora, te je taloženje trenutno. Kad je zasićenost rastvora manja dolazi do perioda indukcije.

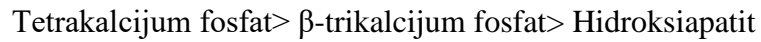
Suvim postupcima ACP se dobija brzim potapanjem topljenog CaP. Niskotemperaturno formiranje ACP podrazumeva jonsko rasprašivanje CaP. Ovi postupci uglavnom dovode do formiranja faza sa različitim sastavima, koji ponekad sadrže nečistoće i nisu pogodni za pripremu većih količina čistog ACP. U odsustvu drugih mineralnih jona izuzev Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona, sastav amorfnе faze je analogan anhidrovano istaloženom ATCP [92]. Kalcijum je uglavnom jedini katjon, dok anjoni, osim fosfata kao što je O^{2-} , mogu biti prisutni kod visokotemperaturne amorfnе faze, što dovodi do povećanja Ca/P odnosa (> 1.5). Ovo je posebno primetno kod ACP dobijenog nanošenjem HAp prevlaka plazma sprej pirolizom [92].

2.3.1.2. Hidroksiapatit (HAp)

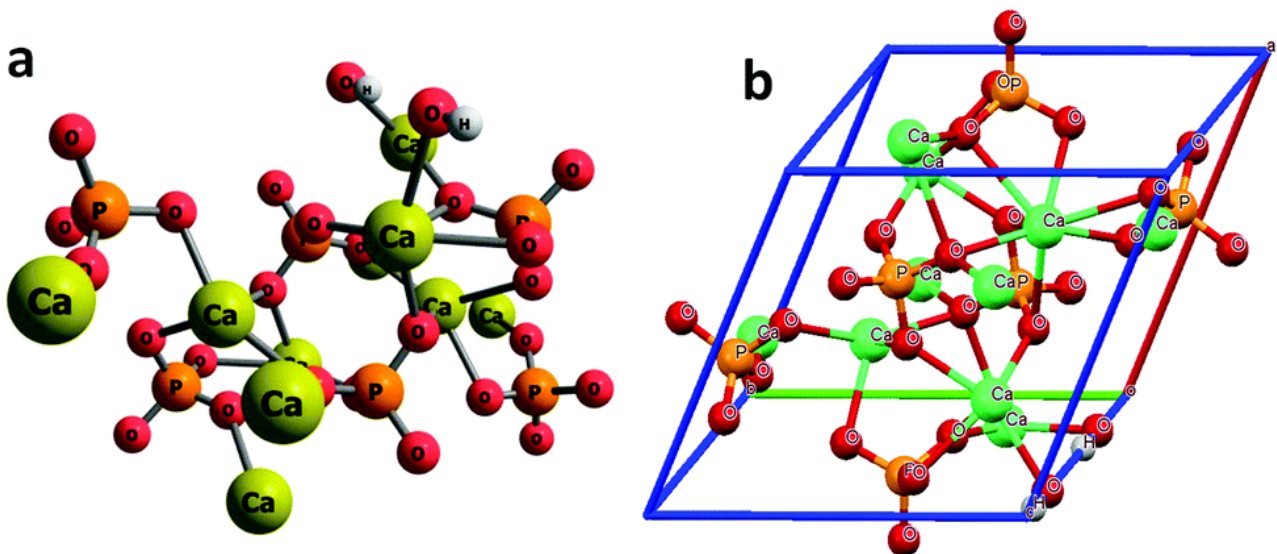
HAp je prvi komercijalno dostupan kalcijum-fosfatni proizvod i korišćen je u stomatologiji i medicini u svojim gustim i poroznim oblicima. Brzine rastvaranja nekih vrsta kalcijum-fosfata u

2. TEORIJSKI DEO

simuliranim fiziološkim uslovima su ispitivane sa naglaskom na hidroksiapatit, β -trikalcijum fosfat i tetrakalcijum fosfat. U *in vitro* uslovima je pokazano da rastvorljivost ovih materijala opada na sledeći način [93]:



Kalcijum-fosfati (CP), odnosno ponajviše hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), našli su široku primenu u inženjerstvu koštanog tkiva zbog svoje odlične biokompatibilnosti, bioaktivnosti, netoksičnosti i hemijskog sastava sličnog prirodnom koštanom tkivu, a učestvuju i u metaboličkim procesima organizma [94,95]. Hidroksiapatit se kod živih organizama javlja u tvrdim tkivima kao mineralna faza pa je iz tih razloga bio predmet mnogih istraživanja. Mineralni deo zuba i kostiju sadrži apatit kalcijuma i fosfora sličnog kristalnom HAp. Prirodna kost se sastoji od 70 mas.% HAp, odnosno 50 vol.% HAp. Sintetički, stehiometrijski HAp ima formulu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ i pripada širokoj grupi minerala koji sadrže kalcijum koga okružuju fosfatne (PO_4^{3-}) grupe. Molekularna konfiguracija i izgled kristalne strukture su prikazani na Slici 2.6.



Slika 2.6. a) Molekularna struktura HAp koja pokazuje njegov elementarni sastav i b) kristalna struktura HAp u jediničnoj ćeliji [96]

Molekularna konfiguracija HAp sastoji se od 40 mas.% Ca, 18,5% P i 3,38% OH radikala sa odnosom Ca/P od 1,67. Jedinična ćelija HAP sastoji se od heksagonalne kristalne strukture koja ima vrednosti parametara rešetke $a = 0,942 \text{ nm}$ i $c = 0,688 \text{ nm}$ sa prostornom grupom $P6_3/m$ (Slika 2.6b) [96]. Jedinična ćelija HAp sadrži 14 jona kalcijuma, od kojih je šest jona unutar jedinične ćelije, dok se ostalih osam nalazi na periferiji, deleći susednu jediničnu ćeliju. Pored toga, od ukupno deset fosfatnih jona jedinične ćelije, dva se nalaze unutar jedinične ćelije, a osam na periferiji. Bez obzira

2. TEORIJSKI DEO

na to, svih osam hidroksidnih jona pozicionirano je na ivici deleći po četiri jedinične ćelije. Tako, u proseku, ćelija HAP uključuje deset jona kalcijuma, šest fosfatnih jona i dva hidroksilna jona (Slika 2.6b). Karakteriše ga molarni odnos kalcijuma i fosfora (Ca/P) od 1,67. Koeficijent toplotnog širenja je $13,3 \times 10^{-6} \cdot \text{W/m K}$, proizvod rastvorljivosti, K_{sp} , iznosi 34×10^{-59} , toplotna provodnost HAP je $0,72 \text{ W/m K}$, a sračunata gustina iznosi $3,219 \text{ g/cm}^3$ [97–100]. HAP se dosta sintetiše i koristi za proizvodnju različitih oblika implantata (čvrstih i poroznih), kao i prevlaka na drugim implantatima.

Biokompatibilnost hidroksiapatita je jedno od važnijih svojstava ovog biomaterijala. Hidroksiapatit formira direktnu hemijsku vezu sa tvrdim tkivima. Nakon implantacije čestica ili poroznih blokova hidroksiapatita u kost, nova lamelarna porozna kost se formira u roku od 4 do 8 nedelja [101].

Sintetički HAP se razlikuje po sastavu od minerala iz kostiju, pošto, pored jona kalcijuma, fosfora, kiseonika i vodonika, koštani minerali sadrže i niz jonskih supstitucija u svojoj rešetki, a sam odnos kalcijuma i fosfora u kostima može biti i nestehiometrijski sa $\text{Ca/P} \neq 1,67$ [102]. Moguće su zamene kalcijumovih i fosfatnih jona u strukturi hidroksiapatita jonima drugih elemenata. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , CO^{2-} , Cl^- i F^- su glavni zamenski joni. Minerali kostiju se razlikuju u raznovrsnosti i količini supstituisanih jona, a supstitucija zavisi od velikog broja faktora, kao što su genetske i pojedinačne karakteristike i unutrašnje okruženje mineralizovanih struktura [103].

Magnezijum je jedan od bitnih elemenata za sve žive organizme. 60–65% ukupne količine Mg u ljudskom telu se nalazi u kostima i zubima, a preostalih 35–40% Mg se nalazi u ostatku tela [104]. U literaturi se mogu naći podaci da Mg joni mogu da poboljšaju biokompatibilnost i bioaktivnost CaP keramike [105–107]. Manjak magnezijuma negativno utiče na sve faze koštanog metabolizma, uzrokujući prekid rasta kostiju, smanjenje osteoblastnih i osteoklastnih aktivnosti, osteopeniju i krhkost kostiju [108].

2.4. POLIMERNI BIOMATERIJALI I BIOPOLIMERI

Polimeri su molekuli dugog lanca koji se sastoje od velikog broja malih ponavljajućih jedinica poznatih kao monomeri. Polimeri pripadaju porodici makromolekula i predstavljaju značajnu klasu biomaterijala. Polimeri se mogu dobiti iz prirodnih izvora ili iz sintetičkih organskih izvora [50].

Sintetički polimerni materijali se široko koriste kao medicinski materijali za jednokratnu upotrebu, protetski materijali, zubni materijali, implantati, pregrade, u eksterokorporalnim uređajima, inkapsulantima, polimernim sistemima za dostavu lekova, proizvodima od tkiva i

2. TEORIJSKI DEO

ortodozama poput metalnih i keramičkih supstituenata. Razlog za to pripada njihovoj biokompatibilnosti, sterilizabilnosti, adekvatnim mehaničkim i fizičkim svojstva kao i mogućnosti obrade kao što je prikazano u Tabeli 2.5 [109].

Tabela 2.5. Zahtevi koje moraju ispuniti biomedicinski polimeri [109]

Svojstvo	Opis
Biokompatibilnost	Nekancerogenost, nezapaljivost, netoksičnost i nealergični odgovor
Sterilizabilnost	Autoklav, suvo zagrevanje, etilenoksid, gas i zračenje
Fizičke osobine	Čvrstoća, elastičnost i trajnost
Mogućnost obrade	Mašinska obrada, oblikovanje, ekstrudiranje i formiranje vlakana

Prednosti polimera kao biomaterijala su:

- Polimeri se lako mogu oblikovati u različite složene oblike i strukture;
- Obezbeđuju širok spektar različitih sastava i fizičkih svojstava;
- Površinska svojstva se mogu lako modelovati.

Nedostaci polimera kao biomaterijala su:

- Poteškoće u sterilizaciji;
- Lako apsorbuju vodu i biomolekule iz okruženja i na taj način menjaju površinsku hemiju;
- Budući da su meki materijali, polimeri se mogu mehanički ishabati i pokvariti;
- Mogu proizvoditi različita jedinjenja u telo pri *in vivo* uslovima [50].

Sintetski polimerni biomaterijali u domenu stabilnosti mogu biti bioresorbilni kao i bioneresorbilni. Bioresorbilni polimeri na bazi laktida, glikolida itd. predmet su brojnih istraživanja iz razloga njihove netoksičnosti (krajnji produkti njihove razgradnje se nesmetano uključuju u Krebsov ciklus). U okviru polimernih biomaterijala izdvaja se i posebna podgrupa a to su polimeri prirodnog porekla.

Prirodni polimeri su poznati po sličnosti sa vanćelijskom matricom, dobrim biološkim performansama, svojstvenom ćelijskom interakcijom i ćelijskom ili enzimskom degradacijom [110]. Oni poseduju zadovoljavajuću količinu bioloških signala koji podstiču povoljne ćelijske reakcije. Proteinski polimeri, polihidroksialkanoati i polisaharidi predstavljaju tri glavne grupe prirodnih polimernih biomaterijala. Kako je u disertaciji korišćen polisaharid, u nastavku je dat pregled ove vrste prirodnih bioresorbilnih polimera.

Polisaharidni polimeri su poznata grupa prirodnih polimera kod kojih su saharidni, odnosno šećerni monomeri, međusobno povezani O-glikozidnim vezama, koje se mogu javiti kod bilo koje hidroksilne grupe monosaharida. Ovi materijali se dobijaju iz mikrobnih, biljnih ili životinjskih izvora i netoksični su, a u interakciji sa ćelijama poseduju zahtevanu i prihvatljivu

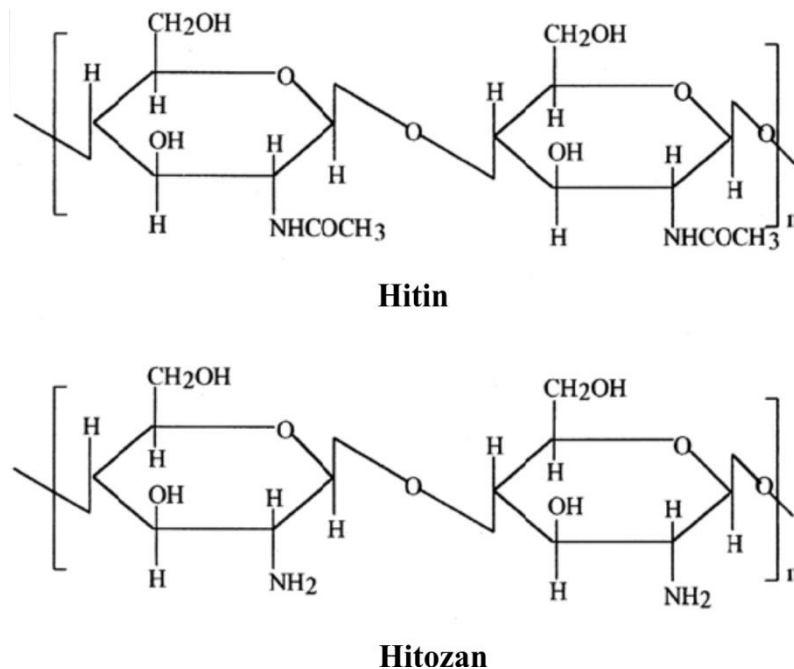
2. TEORIJSKI DEO

hemokompatibilnost i uglavnom koštaju manje od ostalih biopolimera [111]. Hitozan, alginat, skrob, hijaluronan i hondroitin sulfat su primeri polisaharida koji se proučavaju kao biomaterijali.

Pošto je hitozan, odnosno njegov kopolimer hitozan oligosaharid laktat, biopolimer koji je korišćen pri izradi ove doktorske disertacije, njegova svojstva i primena, kao potencijalnog ortopedskog biomaterijala, detaljno su razmotreni u daljem tekstu.

2.4.1. Hitozanska struktura i svojstva

Hitozan (CH) je linearni, polisaharidni, katjonski polimer koji se sastoji od $\beta(1\rightarrow4)$ -glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Dobija se N-deacetilacijom hitina natrijum hidroksidom. Hitin se prirodno nalazi u oklopu rakova i insekata. Molekularna struktura hitina i hitozana prikazana je na Slici 2.7 [112,113].



Slika 2.7. Molekularna struktura hitina i hitozana [113]

Stepen deacetilacije (DDA) polimera hitina, preračunato u odnosu na procenat primarnih amino grupa u molekulu hitozana, varira, jer se proces deacetilacije hitina gotovo nikada ne završava. Komercijalne serije hitozana obično imaju DDA između 70% i 95% i molekulsku masu od 10-1000 kDa [114]. Kako je hitozan kopolimer, na osnovu njegove molekulske težine (M_w), DDA i sekvence, njegova svojstva (npr. pK_a) se mogu modifikovati [113,115]. Hitozan deluje kao slaba baza usled prisustva amino grupa, rastvara se u vodenim rastvorima pri niskoj pH vrednosti kao rezultat protonizacije amino grupa na glukozaminu i taloži se na pH većem od njegovog pK_a . Za tipični hitozan sa DDA 80% ili manjim i M_w od oko 200 kDa, pK_a je približno 6,3. Kako je

2. TEORIJSKI DEO

prelazni opseg hitozana iz rastvorljivog u nerastvorljiv blizu neutralne pH vrednosti, hitozan je pogodan za biološku upotrebu. Prisustvo amino i hidroksilnih grupa u hitozanskoj strukturi olakšava različite hemijske modifikacije ovog polimera [115].

U *in vivo* uslovima enzim lizocim najčešće hidrolizuje *N*-acetilovane ostatke hitozana, što posledično kao rezultat dovodi do razgradnje polimera. Osim enzimske razgradnje, rastvaranje u vodenim rastvorima takođe igra ulogu u razgradnji hitozana. Prema tome, primećeno je produženo vreme razgradnje za vrlo niske ili vrlo visoke vrednosti DDA, dok srednje vrednosti deacetilacije pokazuju najbržu stopu razgradnje [116]. U literaturi se mogu pronaći podaci o vezivanju i proliferaciji humanih orbitalnih kožnih fibroblasta u *in vitro* uslovima na hitozanskim skafoldima koji su pokazali biomehaničku kompatibilnost [117], kao i podaci o ubrzanoj angiogenezi (formiranju novih krvnih sudova) i male fibrozne enkapsulacije hitozana u telu [118].

Pošto je većina faktora rasta povezana sa anjonskim i negativno naelektrisanim molekulama (glikozaminoglikani), hitozan kao katjonski polimer je pogodan kandidat za isporuku faktora rasta usled elektrostatičke interakcije između dva molekula [119]. Pozitivno naelektrisanje takođe ima ključnu ulogu u vezivanju ćelija [120]. Usled pređašnje navedenog, DDA hitozana utiče na ćelijsku adheziju, što se pripisuje većoj gustini katjonskih naelektrisanja pri velikim vrednostima DDA, boljoj interakciji sa negativno naelektrisanim ćelijskim membranama i poboljšanoj ćelijskoj adheziji [116]. Pored toga, primećena su i antibakterijska svojstva ovog polimera. Pokazalo se da hitozan smanjuje stopu infekcije koju uzrokuje *S. aureus* kod kunića [121]. Ovo je povezano sa asocijacijom amino grupa sa anjonima na ćelijskom zidu bakterija i rezultujućim suzbijanjem biosinteze, kao i onemogućavanjem masenog transporta preko ćelijskog zida bakterija, što dovodi do ubrzavanja smrti bakterijske ćelije [122].

Ovaj biopolimer je adekvatan kandidat za biomedicinske primene, posebno u inženjerstvu tkiva usled svoje antibakterijske aktivnosti [123–125], antimikotik [126], mukoadhezivnosti [127], analgetskog delovanja [123,126] i hemostatskih svojstava [123,128]. Hitozan i njegovi derivati su vrlo atraktivni kandidati za kompozitne skafolde, jer se razgrađuju tokom formiranja novih tkiva bez upalnih reakcija ili toksične degradacije [129]. Zbog svoje kontrolisane biorazgradivosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti, koristi se za šavove, zavoje za rane, prilikom zamene kostiju, u tkivnom inženjerstvu i kao nosač lekova ili gena [123,130–132]. Interesantna primena koja se tiče samopovezujućeg kalcijum-fosfatnog (CP) cementa: hitozan glicerofosfat pomešan sa CP i limunskom kiselinom formira injekcioni samosušeći sistem za popravku ili punjenje kostiju [123]. Hitozan ima sposobnost da promoviše vezivanje osteogenih progenitornih ćelija, olakšavajući tako stvaranje kostiju [133].

Hitozan je izučavan u različitim oblicima u ortopediji i to kao: aditiv za koštani cement, kompozitni biorazgradivi skafold za sisteme za isporuku lekova i ćelija i za funkcionalizaciju

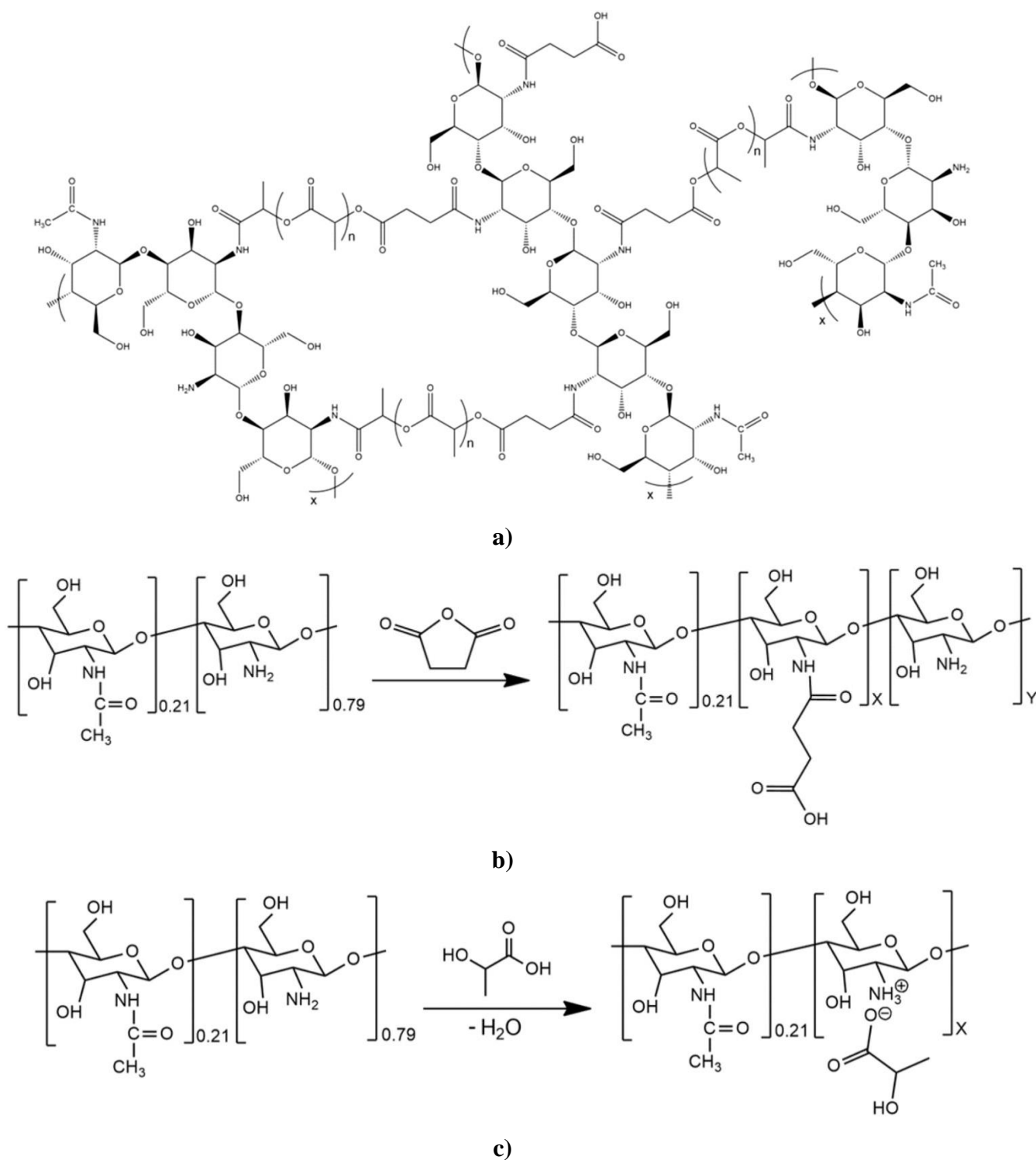
metalnih implantata [17]. Interesovanje za ovaj polimer kao skafold potiče iz činjenice da se može oblikovati u porozne strukture sa kontrolisanom veličinom pora, pružajući tako mogućnost za infiltraciju skafolda koštanim ćelijama i krvnim sudovima. Pored toga, *in vitro* istraživanja skafolda koji sadrže ćelije osteoblasta su pokazala diferencijaciju i proliferaciju ćelija i taloženje matrice bogate mineralima [120]. Hitozanski skafoldi i sušteraste matrice sa prisutnim faktorima rasta [134–136], kao i skafoldi hitozana kombinovanog sa kolagenom [137] koji sadrže modifikovan faktor rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) su proučavani za primenu u kostima i perodontalnoj kosti. U poslednje vreme hitozanski skafoldi se sve detaljnije proučavaju u cilju isporuke koštanih morfogenetskih proteina kako bi se podržala funkcija osteoblastičnih ćelija [138–140].

2.4.2. Hitozan oligolaktat

Graftovanje hitozana u cilju poboljšanja postojećih željenih svojstava, kao i u cilju dobijanja njegovih derivata je predmet novijih istraživanja. U literaturi se mogu pronaći različiti postupci graftovanja hitozana sa detaljima o eksperimentalnim uslovima sinteze, fizičkim svojstvima graftovanih derivata i mehanizmima reakcije različitih metoda sinteze određenog broja graftovanih derivata hitozana [141–145].

U cilju dodatnog poboljšanja bilo u mehaničkim, tako i u biosvojstvima, istražena je inovativna formulacija: hitozan sa poli(mlečnom kiselinom), oligo(DL-laktidom) i sa sistematskom promenom u međusobnoj veličini i udaljenosti graftovanih delova na hitozansku osnovu [145], kao i sinteza ovog graftovanog kopolimera u vidu umreženih komponenti hitozana i oligo (DL-laktidom) [144].

Na Slici 2.8 je prikazana hemijska šema mreže hitozana sa oligo(DL-laktidom). Mehanizam dobijanja hitozan oligo(DL-laktida) uključuje stvaranje prelaznog stanja u obliku laktatne soli na amino lokacijama hitozanskog lanca, kao što je prikazano na Slici 2.8c, uz paralelno odvijanje reakcije između N-sukcinil hitozana i hidroksilne grupe DL-laktida.



Slika 2.8. a) Šematski prikaz mreže: hitozanski lanci povezani preko segmenata oligo (DL mlečne kiseline). Neke karboksilne grupe mogu biti prisutne usled prisustva derivata N-sukcinil hitozana koji se koristi u pripremi mreže i b) sinteza N-sukcinil hitozana [144].

U literaturi se može sresti kopolimer hitozana sa poli (DL-laktidom) i njegovim derivatima. Ova jedinjenja uključuju kopolimer niskomolekularnog hitozana i DL-laktida, zatim hidroizolacionog hitozan-g-(L-laktid-ko-citratna kiselina) [146–148]. Hitozan-g-(L-laktid) je

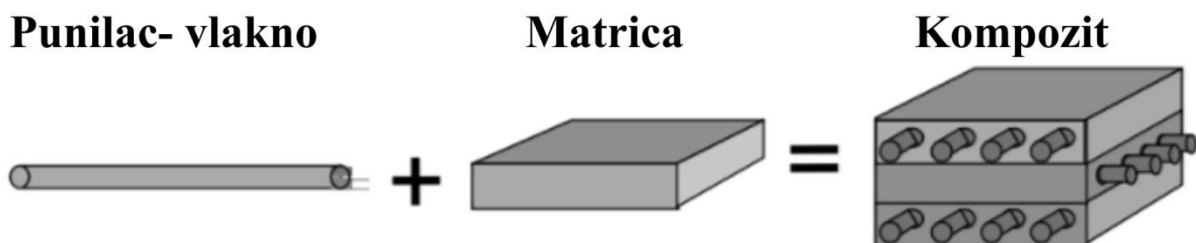
2. TEORIJSKI DEO

sintetizovan bez upotrebe katalizatora, a *in vitro* kultivacija fibroblasta pokazuje da je brzina ćelijskog rasta mnogo brža od brzine rasta ćelija na hitozanu. Rezultat sugeriše da se hitozan-g-(L-laktid) može upotrebiti kao skafold u inženjerstvu materijala [149]. Takođe, ovaj materijal se može koristiti za terapiju ciljane dostave lekova [141]. Hitozan-g-oligo (L-laktid) se može koristiti kao biomaterijal usled biokompatibilnosti PLLA i hitozana, a ista je značajno poboljšana usled uvođenja oligo (L-laktida) u hitozan u vidu bočnih lanaca. Graftovani kopolimeri su rastvorljivi u DMSO, DMF i sirćetnoj kiselini [143].

Osnovno neželjeno svojstvo, koje imaju sve polimerne strukture koje se koriste u inženjerstvu tkiva, je nedostatak mehaničke čvrstoće i krutosti. Da bi se došlo do rešenja ovog nedostatka potrebno je kombinovati polimerne strukture sa bioaktivnom keramikom i staklima u kompozitne sisteme, što je tema Poglavlja 2.9.

2.5. KOMPOZITNI MATERIJALI

Kompozitni materijal se sastoji od dva ili više materijala koji zajedno čine potpuno novi materijal [150,151]. Slika 2.9 prikazuje jedan od primera kompozitnog materijala koji se sastoji od polimerne matrice impregnirane vlaknima. Kompozitni materijal objedinjava svojstva oba materijala, i u isto vreme poseduje nova unapređena svojstva. [152].



Slika 2.9. Primer kompozitnog materijala sa vlaknastim puniocem

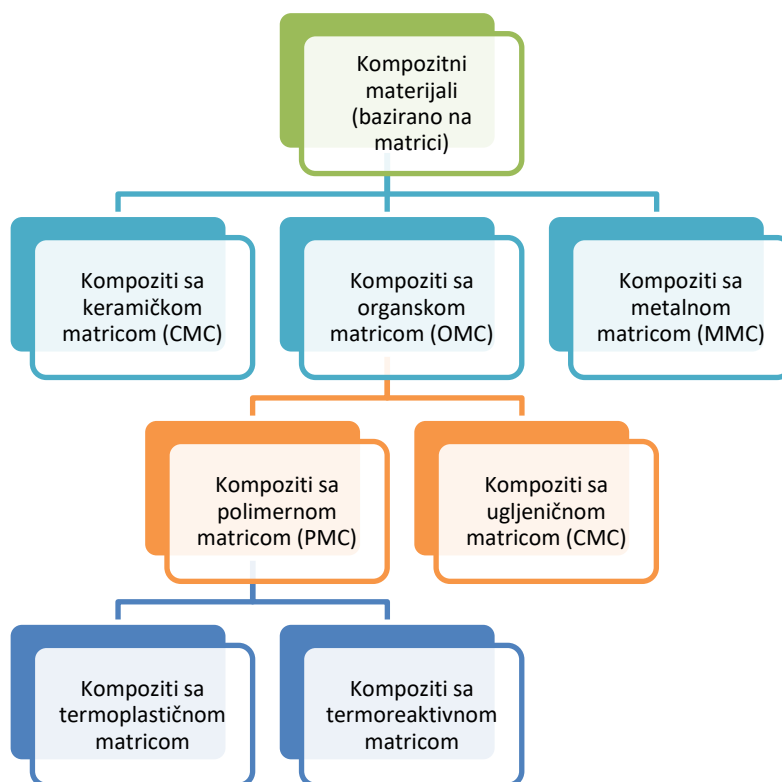
2.5.1. Istorija kompozitnih materijala

Ljudi su koristili kompozitne materijale još u drevnim vremenima, ali je njihovo postojanje ustanovljeno tek 1930. Drevni Egipćani nisu imali saznanja o kompozitnim materijalima, ali su za izgradnju kuća koristili prve poznate kompozitne materijale. Egipćani su koristili glinu i slamu da naprave cigle za svoje domove. Upotreba ovih materijala je činila cigle jačim, pri čemu oni nisu znali da ti materijali zajedno formiraju jaču ciglu u poređenju sa običnom ciglom izgrađenom samo od gline. Drugi primer kompozitnog materijala koji se koristio u prošlosti može se pronaći u lukovima koje su koristili Mongoli. Oni su svoje lukove izrađivali koristeći drvo, tetive stoke i

svilu, koja je lagana, kratka i jaka. Ovi kratki i snažni lukovi su pružali lakoću upotrebe tokom jahanja pri čemu su imali minimalan ili nikakav gubitak snage [152]. U Prvom i Drugom svetskom ratu kompozitni materijali su korišćeni za izradu aviona, što je pomoglo smanjenju težine aviona, povećanju njihove brzine i poboljšanju performansi. Kasnije su se kompozitni materijali koristili i u automobilskoj industriji. Automobilska industrija koristi ove materijale u proizvodnji šasija i tela vozila, jer su kompozitni materijali lagani i dovoljno robusni da zamene aluminijum [153].

2.5.2. Kategorije kompozitnih materijala

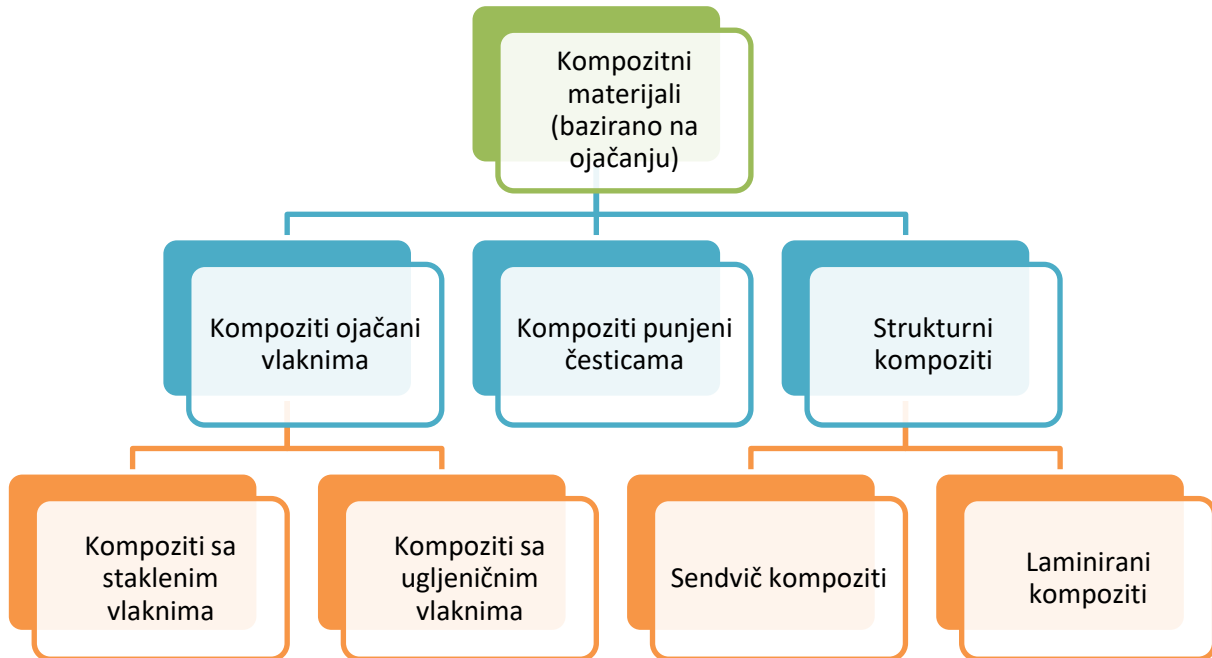
Postoje dve osnovne vrste kompozitnih materijala (na osnovu njihovog porekla): prirodni i veštački kompozitni materijali. Primer kompozitnog materijala prisutnog u prirodi je drvo, koje predstavlja kompozit lignina i celuloze [151,154]. Veštački kompozitni materijali su oni materijali koji se ne mogu pojaviti u prirodi i koji su isključivo proizvod ljudskog rada. Za izradu veštačkog kompozitnog materijala koristi se dva ili više materijala. Tehnologija za proizvodnju kompozitnih materijala se poboljšala poslednjih godina, te se susrećemo sa kompozitima sa metalnom matricom (MMC), kompozitima sa keramičkom matricom (CMC) i kompozitima sa polimernom matricom (PMC) što je prikazano na Slici 2.10.



Slika 2.10. Klasifikacija kompozitnih materijala na osnovu matrice

Na osnovu ojačanja (Slika 2.11), podela kompozita je dalje razvrstana u tri vrste:

- čestični kompoziti (kompoziti punjeni česticama),
- kompoziti ojačani vlaknima i
- strukturni kompoziti [155].



Slika 2.11. Klasifikacija kompozitnih materijala na osnovu punilaca

2.6. KALCIJUM FOSFATNI KOMPOZITNI MATERIJALI

Sa sve većom upotrebom ortopedskih implantata širom sveta, i dalje postoji veliko interesovanje za razvoj novih tehnologija za dalje poboljšanje efikasnih kliničkih performansi savremenih tretmana. Dizajn implantata uključuje aspekte materijala kao osnovnog, u vidu punioca i kao prevlake. Smatra se da novi biomaterijali ili nove formulacije postojećih biomaterijala poboljšavaju njihova svojstva kao što je npr. habanje i stabilnost, kao i interakcija sa okolnim biološkim okruženjem [156]. Takođe, sve je veći fokus na prilagođavanju svojstava bioapsorbujućih i kompozitnih materijala sa puniocima za privremenu upotrebu u telu. Privremeni implantati mogu u svom sastavu da sadrže ćelije, signalne faktore ili materijale za skafolde u cilju boljeg obnavljanja funkcije tkiva [156]. Iako se mnoge vrste prevlake, kao što su prevlake nanešene postupkom plazme ili sinterovane prevlake naširoko koriste na implantatima, cilj poboljšanja

njihovih osteointegrativnih kvaliteta i antimikrobnih svojstava je kontinuirani poduhvat. U situacijama kada su potrebne zamene za kosti, traže se poboljšanja u sintetičkim graftovanim materijalima.

2.6.1. Upotreba biomaterijala kao osnovnog (bulk) materijala

Savremeni materijali, poput titana i legura titana, kobalt hroma, polietilena i keramike (hidroksiapatit, glinica, cirkonija), široko su prihvaćeni kao osnovni biomaterijali za ortopedske implantate, ali i dalje postoji rastući interes za razvojem novih biomaterijala ili novih formulacija postojećih, ali manje korišćenih biomaterijala. Ovi materijali moraju uzeti u obzir biokompatibilnost i njihova mehanička svojstva, kao što su čvrstoća, habanje i nosivost [82,156]. Bioapsorbujući materijali i njihovi kompoziti nastavljaju da imaju sve veću primenu, sa rastućim fokusom na prilagođavanje svojstava materijala bioapsorbujućih komponenti.

2.6.1.1. Kalcijum fosfatni bulk materijali

Veoma uspešni biomaterijali za regeneraciju i rekonstrukciju kostiju su biokeramike. Dva najčešće korišćena materijala su HAp i TCP [157]. Da bi se poboljšala efikasnost HAp CaP skafolda koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva, proučavano je nekoliko različitih pristupa, kao što su modifikacija hemije skafolda, zasejavanje skafolda matičnim ćelijama koštane srži i ugradnja faktora rasta, kao što su transformacioni faktor rasta-b (TGF-b), koštani morfogenetski protein (BMP) i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) u skafoldu [158].

Pokazano je da ugradnja silikata u HAp skafolde može poboljšati bioaktivnost skafolda [159] i može dalje poboljšati ćelijsku adheziju humanih osteoblasta [160,161]. Druge *in vitro* studije o uključivanju Si u HAp skafolde pokazale su da proliferacija i morfologija osteoblasta zavise od sadržaja Si i da može postojati optimalna koncentracija za ćelije [162]. Slični istraživački naponi pokazali su da uključivanje Si u HAp poboljšava biološku aktivnost skafolda [163–168]. Istraživači su pokazali da je osteoindukcija povezana ne samo sa sastavom materijala, već i poroznošću. Na primer, pokazano je da hibridni skafold sastavljen od Si-stabilizovanog TCP/HAp sa poroznošću od 60% poroznosti dovodi do veće osteokondukcije u odnosu na HAp skafolde sa poroznošću od 80% [169].

U novije vreme je pokazano da kada se mezenhimske matične ćelije zaseju u kolagene hidrogelove, ćelije izlučuju veći nivo osteokalcina i talože veće količine Ca u poređenju sa dvodimenzionalnim strukturama [170]. Kada su ćelije dalje stimulisane osteoinduktivnim suplementima, ćelijske kulture su razvile poboljšana biomehanička svojstva, uključujući veliku

2. TEORIJSKI DEO

krutost i čvrstoću na lom, kao i morfološke karakteristike koje se tipično javljaju kod kostiju. Dalje, ove ćelije su povećale krutost i čvrstoću na lom na vremenski zavisani način, što sugerira da su mezenhimske matične ćelije bile podvrgnute diferencijaciji osteoblasta. U sličnoj studiji, CaP cementni skafoldi prevučeni kolagenom su posejani mezenhimijskim matičnim ćelijama pupčane vrpce i pokazano je da mezenhimske matične ćelije pokazuju odličnu proliferaciju, diferencijaciju i sintezu koštanih minerala [156,171]. U modelu miša sa teškom imunodeficijencijom, kombinovane endotelne ćelije umbilikalne vene i mezenhimske matične ćelije posejane su same ili u dekalifikovanu, obrađenu goveđu kopulastu kost, a ovi implantati su ugrađeni u defekte kritične veličine kalvarije [172]. Formiranje novih krvnih sudova je bilo izraženo u drugom slučaju, a mezenhimske matične ćelije podržavale su formiranje kostiju.

Pored terapija skafolda obogaćenih ćelijama, pokazalo se da faktori rasta takođe igraju kritičnu ulogu u inženjerstvu tkiva. U defektu kranijalne kosti prečnika 5 mm kod pacova, kada se skafolda zasnovana na PLLA obogati BMP-2 ili sintetičkim proteinom povezanim sa BMP-2, kost se taloži brže nego na čistim skafoldama [173]. U kranijalnom defektu kritične veličine kod miševa, CaP skafoldi obogaćeni sa 5 mg/mL VEGF pokazali su povećanu gustinu krvnih sudova i veće taloženje kostiju u makroporama skafolda u poređenju sa grupom koja je sadržala samo skafolde [174]. Dalje je pokazano da je kinetika oslobađanja VEGF bila od vitalnog značaja za ove procese, jer je kratkotrajno oslobađanje VEGF kao rezultat imalo privremeno ograničenu angiogenezu i nije pojačalo stvaranje kostiju. Druge studije su dodatno potvrdile ove nalaze, u kojima su skafoldi sa BMP-2 i VEGF pokazali pojačanu vaskularizaciju i novo formiranje kostiju [156,175,176].

In vitro i *in vivo* studije su se pokazale obećavajućim za hibridne koštane skafolde u smislu normalizacije strukture i funkcije kosti. Međutim, i dalje ostaju izazovi u optimizaciji karakteristika skafolda kako bi se u potpunosti vratila funkcionalnost kostiju. Skafold u početku mora biti dovoljno čvrst da podnese mehaničke sile mikrookoline; međutim, takođe bi trebalo da se razgradi i omogući prirodno formiranje kosti kako bi se obnovila prirodna struktura i funkcija kosti. Ovu ravnotežu otežava heterogenost prirode kostiju, koja se sastoji od kortikalne kosti i spužvaste kosti, od kojih svaka ima izrazito različita mehanička svojstva, sastav i poroznost. Stoga bi idealan koštani skafold takođe trebalo da ima mikrodomene koje odražavaju ove razlike u karakteristikama materijala [156].

Makroporoznost (pore prečnika $> 100 \mu\text{m}$) i međusobna povezanost pora sintetičkog HAp omogućavaju optimalnu adheziju, proliferaciju i diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija, kao i revaskularizaciju i posledično urastanje nove kosti kada se implantira *in vivo* [177–179]. Međutim, relativno visok odnos Ca/P i kristaliničnost smanjuju stopu procesa resorpcije HAp [180]. Pokazano je da kada su porozni hidroksiapatitni cilindri ugrađeni u spužvastu kost zečeva, zabeleženo samo 5,4% smanjenje zapremine nakon šest meseci, dok ovaj broj kod keramike sa trikalcijum fosfatom

2. TEORIJSKI DEO

iznosi 85,4% pod istim uslovima [177]. Shodno tome, preostali graftovi hidroksiapatita unutar kostiju domaćina ugrozili bi unutrašnju čvrstoću kosti na mestu kalusa usled smanjenja gore pomenutih mehaničkih svojstava [181]. Stoga se HAp češće primenjuje kao prevlaka na implantatima i spoljnim fiksatorima ili na mestima sa malim mehaničkim naprezanjem [179,182,183].

Ovi nedostaci mogu se delimično prevazići nedavnim unapređenjem nanokristalnog HAp, sa kojim se dobija veći odnos površine i zapremine. Ova površina ne samo da značajno smanjuje temperaturu sinterovanja HAp keramike, već dovodi i do povećane stope resorpcije [184]. Međutim, ovo povećanje nije primećeno u kliničkom posmatranju [185]. S druge strane, takođe su se činili napor da se poboljšaju mehaničke performanse nano-HAp ugrađivanjem ugljeničnih nanocevi (CNT) [184,186,187]. Dodatak CNT-a, s jedne strane, povećao je poroznost sa oko 2,52% (čisti nano-HAp) na 7,93% (uz dodatak 2 tež.% CNT-a). S druge strane, napon pri lomu od 1,88 MPa/m², što je slično onom kao kod ljudske porozne kosti, postignut je kada je količina CNT iznosila 1 mas.% [179].

2.6.2. Upotreba kalcijum fosfata kao punioca (filler)

Druga forma upotrebe kalcijum fosfatnih keramika i kompozita kalcijum fosfatne keramike je u vidu punilaca koštanih i zubnih defekata u medicini i stomatologiji, ali i kao nosača lekova u farmaciji. Uspeh biomaterijala u telu zavisi od mnogih faktora kao što su svojstva, dizajn i biokompatibilnost tog materijala, kao i od drugih faktora koji nisu pod kontrolom inženjera, uključujući tehniku koju koristi hirur, zdravlje, stanje i aktivnosti pacijenta [39]. Najčešće korišćeni kalcijum fosfat u proizvodnji implantata je hidroksiapatit, jer je to materijal najbliži mineralnoj komponenti kostiju. HAp je ostvario željena svojstva kao što su biokompatibilnost, bioaktivnost, osteoprovodljivost, direktno vezivanje za kosti itd. [188–191]. Međutim HAp nije jedini korišćeni kalcijum fosfat u formi punioca. Osim HAp primenu su ostvarili i β -trikalcijum fosfat (β -TCP) i dvofazni kalcijum fosfat (BCP) koji se sastoji od smeše hidroksiapatita (HAp) i β -trikalcijum fosfata (TCP) [189]. Studije o nadoknađivanju gubitka kostiju bile su usmerene na upotrebu sintetičkih materijala a u formi punioca, na bazi hidroksiapatita koji imitiraju prirodnu kost u pogledu svojstava i strukture [192–195]. Kada se koristi kao materijal za zamenu kostiju, hidroksiapatit obezbeđuje uspešnu osteogenezu [194], kao i željenu kompaktnost i kontakt sa okolnim tkivom [196]. Razvoj nanotehnologije omogućio je da se na nano skali dizajnira hidroksiapatitni kompoziti koji ne samo da su pogodni za široku upotrebu, već obezbeđuju kvalitet potencijalnih rekonstrukcija [197–199]. Manipulacija uslovima sinteze omogućava postizanje željenih svojstava, oblika i veličine hidroksiapatita [195–198].

2. TEORIJSKI DEO

Poli (d,l-laktid-ko-glikolid) (DLPLG) se naširoko koristi kao nosač u sistemima sa kontrolisanim oslobađanjem/iskorukom zbog svoje biorazgradivosti i relativno dobre biokompatibilnosti [200]. Kopolimeri glikolida sa l-laktidom i d,l-laktidom su razvijeni za uređaje i za primenu lekova [201]. DLPLG se koristi u inženjerstvu tkiva, lekova i genskoj terapiji, pripremi nanočestica za antikarcinogene lekove, itd. [189,202,203].

Sinteza i dizajniranje neorgansko-organskih hibrida je predmet mnogih istraživanja, kao i proizvodnja kalcijum-fosfata/bioresorbibilnog polimera a u formi punioca [204–209]. Pokazano je da β -trikalcijum fosfat (β -TCP) pospešuje osteogenezu i regeneraciju kostiju kod koštanih defekata kod pasa bez znakova inflamatorne reakcije [210]. Biokompozitni materijal, dvofazni kalcijum-fosfat (BCP) poli-DL-laktid-ko-glikolid (PLGA) - (BCP/PLGA), u kojem su BCP granule obložene bioresorbibilnim PLGA polimerom je sintetisan i dizajniran u formi punioca [211]. Visok nivo koštane regeneracije postignut je upotrebom BCP/PLGA za popunjavanje koštanih defekata kod 10 pacijenata [211]. Brza i jaka osteokonduktivnost primećena je nakon implantacije hidroksiapatita PLGA (HAp/PLGA) radi rekonstrukcije koštanog defekta zečeva [212].

Kompozitni biomaterijali kalcijum fosfat/DLPLG dobijeni su hidrolizom prekompozita α -trikalcijum fosfat-DLPLG na temperaturama bliskih fiziološkim [213]. Pokazano je da su ovako sintetisane kompozitne granule pogodne za popunjavanje različitih koštanih defekata. U drugom radu je pokazano da sferične kompozitne granule BCP prekrivene sa DLPLG olakšavaju prekomerni rast novoformiranog vaskularnog tkiva, fibroblasta i pojačavaju aktivnost i prijanjanje osteoblasta [211]. Pregledom literature nailazi se na novi dvofazni kompozitni biomaterijal kalcijum fosfat/poli (d, l-laktid-ko-glikolid) (BCP/DLPLG) pripremljen u obliku mikro- ili nano-sfera kalcijum-fosfata obloženog polimerom koji se upotrebljava kao punilac [189]. U preliminarnoj studiji ispitana je mogućnost zamene koštanog tkiva BCP/DLPLG popravljanjem alveolarnih kostiju i praćenjem alkalne fosfataze pacijenata.

Oblaganje HAp čestica bioresorbibilnim sintetičkim polimerima na bazi poli (laktid-ko-glikolne kiseline) (PLGA) je proizvelo materijale pogodne za popunjavanje koštanih defekata [214,215]. Jedna od strategija za dobijanje kompozitnih materijala za upotrebu u vidu punilaca je bila i poboljšanje biokompatibilnosti hitozana (Ch) i PLGA gde je HAp obložen sa dva različita polimerna sistema: Ch i mešavinom polimera Ch-PLGA [191]. Kompozitne čestice HAp/Ch pokazale su najveću antimikrobnu aktivnost prema sva četiri soja mikroba koja su testirana, ali su nakon rekonstrukcije koštanog defekta takođe izazvale inflamatorne reakcije u novonastalom tkivu gde je defekt pozicioniran. Oblaganje HAp polimernom mešavinom sastavljenom od Ch i PLGA dovelo je do smanjenja reaktivnosti i antimikrobne aktivnosti kompozitnih čestica, ali i do povećanja kvaliteta novonastalog koštanog tkiva u rekonstruisanom delu defekta [191].

2. TEORIJSKI DEO

Dizajn platformi za čestice za kontrolisanu isporuku lekova je od posebnog interesa za biomedicinsku zajednicu [216]. Interes za primenom nanočestica kalcijum fosfata kao nosača u ciljanoj i kontrolisanoj isporuci lekova i inženjerstvu tkiva brzo raste [217]. Nanočestice HAp su se do sada koristile kao nosači različitih farmaceutski aktivnih komponenti u kontrolisanoj isporuci lekova i gena [190,215,218]. Istovremeno je postignuto značajno poboljšanje procesa rekonstrukcije koštanog defekta zahvaljujući upotrebi sistema nanočestica na bazi HAp [215].

Holekalciferol, vitamin D3, igra važnu ulogu u metabolizmu kostiju regulacijom vanćelijskog nivoa kalcijuma. U literaturi se može naći studija o efektima lokalne isporuke holekalciferola (D3) korišćenjem nanočesticastih nosača koji se sastoje od hidroksiapatita (HAp) i poli (d, l-laktid-ko-glikolida) (PLGA) [190]. Zadovoljavajuća biokompatibilnost u kontaktu sa MC3T3-E1 osteoblastima je pokazana kako za HAp/D3/PLGA sistem, tako i za čisti HAp. Za razliku od prethodno spomenutih materijala, HAp čestice obložene holekalciferolom (HAp/D3) pokrenule su nekrozu osteoblastičnih ćelija *in vitro* usled prebrzog oslobađanja holekalciferola. Veštački defekti indukovani u osteoporotičnoj kosti donje vilice pacova uspešno su rekonstruisani nakon implantacije nanočestica HAp obloženih sa holekalciferolom, kao i HAp/D3/PLGA nanočestica. Najveći nivoi pojačane angiogeneze, vaskularizacije, osteogeneze i diferencijacije koštane strukture postignuti su primenom HAp/D3/PLGA u formi punioca.

2.6.3. Tanke kalcijum fosfatne prevlake i filmovi

Posebno značajna primena CaP je u obliku prevlake. Svojstva metalnih implantata pogodnih za upotrebu u ortopediji su poboljšana nanošenjem HAp na njihovu površinu usled njegovih povoljnih osteokonduktivnih svojstava [219]. Generalno, budući da je većina procesa taloženja po svojoj prirodi neravnotežno, većina prevlaka se razlikuje od početnih materijala koji se koriste za taloženje. Sastav deponovanih prevlaka, filmova i slojeva nije uvek ograničen faznim dijagramima. Pored toga, izgleda da različita svojstva, poput kristalnosti i/ili stepena amorfizacije, mikrostrukture, površinske morfologije itd. zavise kako od procesa taloženja, tako i od primene ili neprimenjivanja tretmana pre i posle taloženja. Štaviše, usled specifičnih mehanizama formiranja, čiji detalji velike većine procesa su i dalje nepoznanica postoje brojne tehnologije za proizvodnju prevlaka različitih morfologija, struktura i svojstava. Skoro svaki postupak taloženja CaP može se izvesti uz istovremenu primenu dodatnih fizičkih sila, kao što su magnetno polje [220], ultraljubičasto zračenje [221] ili ultrazvučni tretman [222,223]. Sve ove promenljive pri izvođenju procesa unose dodatne razlike u sastav, strukturu, orijentaciju i druga svojstva CaP prevlaka.

2.6.3.1. Hibridni keramički kompozitni materijali na metalnim supstratima

Zbog loših mehaničkih svojstava biomaterijala zasnovanih na kalcijum fosfatnoj keramici, kombinovanje kalcijum fosfatne keramike sa biopolimerima postaje sve interesantnije [81,224]. U cilju poboljšanja bioaktivnosti, obradivosti i mehaničkih osobina, keramički biomaterijali se funkcionalizuju polimerima, faktorima rasta i drugim organskim i neorganskim jedinjenjima. Ovako dobijeni materijali predstavljaju hibridne keramičke kompozite. Kada su nanoseni na metalni supstrat predstavljaju hibridne keramičke kompozitne materijale na metalnim supstratima. U literaturi se mogu naći brojni primeri poboljšanja bioaktivnosti i mehaničkih svojstava keramičkih materijala na metalnim supstratima dodavanjem prirodnih biopolimera i drugih jedinjenja.

S obzirom na činjenicu da se implantati na bazi titanijuma (Ti) i dalje suočavaju sa problemom opuštanja jona i otkazivanja implantata usled sporog biološkog odgovora, niske stope osteointegracije i bakterijske infekcije implantata u kliničkoj primeni, dizajniran je titanski biomimetički skafold modifikovan procesom površinske mineralizacije i mehanizma adhezije na bazi kompozitne prevlake kalcijum-fosfata dopiran silicijumom (Van-pBNPs/pep @ pSiCaP). Prevlaka je sadržala Vankomicin (Van) polidopamin (pDA) i albumin (Van- pBNPs) nanočestice, kao i peptide za adheziju ćelija (GFOGER) [225]. Ovaj hibridni kompozit je nanosen na površinu Ti skafolda koji mimikrira vanćelijski matriks (ECM) prirodnog koštanog matriksa da bi se podstakla veća regeneracija tkiva. *In vitro* studija je pokazala da ovaj porozan Ti skafold sa funkcionalnom bio-površinom može olakšati ranu adheziju i proliferaciju ćelija i aktivirati ekspresiju $\alpha 2\beta 1$ receptora posredujući tako kod veće osteogene diferencijacije ćelija. Dizajnirani hibridni kompozit efikasno inhibira adheziju i rast *Staphylococcus epidermidis*, pokazujući dobra antibakterijska svojstva. Pokazana je pojačana sposobnost stvaranja kostiju u *in vivo* uslovima zahvaljujući doprinosu bioaktivnih hemijskih komponenata i prirodne strukture slične kostima.

Alternativni biomaterijali β – trikalcijum fosfat i hitozan, koji poseduju zadovoljavajuće elektrohemijsko ponašanje i bioaktivnost, korišćeni su kao prevlake nanete na metalne podloge kako bi se izbegla korozija i štetni biološki efekat [226]. Trikalcijum fosfatne (β -TCP) prevlake dobijene su postupkom elektrodepozicije. Prevlake dobijene na metalnim podlogama od nerđajućeg čelika 316L (hirurški kvalitet) funkcionalizovane su u odnosu na povećanje sadržaja hitozana (Ch). Prema tome, strukturne, hemijske i morfološke promene u konjugovanom kompleksu (β -TCP-Ch) mogle su se utvrditi molekularnom simulacijom. Različite karakterizacije β -TCP-Ch prevlaka pokazale su uticaj hitozana na kristaliničnost prevlake i morfologiju površine. Sa porastom udela hitozana, prevlake su se pokazale homogene i bez pukotina.

U literaturi se mogu pronaći rezultati ispitivanja prevlake srebrom supstituisanog hidroksiapatita/funkcionalizovane višeslojne ugljenične nanocevi (Ag-HA/f-MWCNT) na

2. TEORIJSKI DEO

implantatu od nerđajućeg čelika 316L (SS) dobijenog tehnikom sprej pirolize [227]. Rezultati pokazuju poboljšanu kristaliničnost sa porastom koncentracije srebra u HA/f-MWCNT. Morfologija Ag supstituisanih prevlaka HA/f-MWCNT otkrila je pravilne čestice poput štapića planarno raspoređenih, sa malom varijacijom veličine čestica usled povećanja koncentracije Ag. Nanokompoziti sa 1 i 3 mas.% Ag-HA/f-MWCNT pokazao je manje toksični efekat na normalne ćelije humanog osteoblasta. Efikasnosti korozije proizvedenih filmova u stimulisanoj telesnoj tečnosti otkrivaju porast polarizacionog otpora smanjenjem gustine struje (j_{corr}) usled povećanja koncentracije Ag.

Dvoslojni materijal titan dioksid - hidroksiapatit (HA) dobijen je postupkom u dva koraka (hemijska depozicija iz pare i sprej piroliza) na površini Ti supstrata sa tri različite morfologije i topografije [228]. Materijal pokazuje povećanu površinsku bioaktivnost i poboljšan životni vek implantata. Prevlake su pokazale zadovoljavajuće elektrohemijske performanse u veštačkoj pljuvački i smanjeno oslobađanje metalnih jona; takođe su poboljšana mehanička svojstva na nivou nano-kompozita kompozitnih materijala zahvaljujući funkcionalizaciji.

Kompozitna prevlaka polipirol-kalcijum-ortofosfat-hidroksiapatit je sintetisana na metalnoj površini implantata [229]. Prevlaka pokazuje tri puta veću elektrohemijsku otpornost na koroziju u poređenju sa čistom hidroksiapatitnom prevlakom. Prevlake pokazuju vrhunske sposobnosti osteokondukcije formiranjem stehiometrijskih sfernih čestica hidroksiapatita u roku od 7 do 14 dana od kontakta. Ovaj keramičko-polimerni kompozit je po prvi put razvijen funkcionalizacijom hlorofila.

Bioaktivne prevlake komercijalnog hidroksiapatita, hidroksiapatita dopiranog Mn^{2+} jonima i oktakalcijum fosfata na titanu su dobijene impulsnim laserskim taloženjem [230]. Funkcionalizovani biomimetički titanski implantati prevučeni nanostrukturisanim kalcijum fosfatnim prevlakama su uspešno testirani u *in vivo* uslovima. Rezultati sugerišu da nanostrukturirano taloženje CaP ima značajan potencijal za poboljšanje performansi titanskih implantata u kostima i da sastav i struktura kalcijum fosfatne prevlake imaju značajan uticaj na njihov biološki efekat.

2.7. METODE NANOŠENJA KALCIJUM FOSFATNIH PREVLAKA I FILMOVA

U većini postupaka potrebno je pripremiti površinu podloge pre nanošenja prevlake. Priprema se obično sastoji od čišćenja i odmašćivanja radi uklanjanja bilo kakve površinske kontaminacije koja proizilazi iz proizvodnje i skladištenja. Dalje, razne vrste mehaničkih

2. TEORIJSKI DEO

modifikacija površine se obično koriste za povećanje mehaničke adhezije između CaP prevlaka i supstrata. Pored toga, površina podloge može se hemijski tretirati, modifikovati i/ili funkcionalizovati da bi se podstaklo hemijsko vezivanje između prevlake i podloge [231]. Većina takvih tretmana izvodi se potapanjem, prskanjem, ispiranjem i/ili namakanjem, u zavisnosti kako od zahteva za kvalitetom, tako i od ograničenja podloge koju treba obložiti. Pored toga, postoje fizički tretmani koji dovode do stvaranja raznih vrsta površinskih modifikacija. Primeri uključuju toplotu [232,233], lučno pražnjenje [234,235], ultraljubičasto zračenje [235–237] i visokoenergetski jednosmerni snop elektrona [238] zračenje i laserski tretmani [239,240], koji dovode do oksidacije i delimičnog raspadanja vrlo tankog površinskog sloja podloge. Obično se koristi nekoliko uzastopnih tretmana površina podloge.

2.7.1. Površinska obrada supstrata

Titan se smatra bioinertnim materijalom zbog svoje nemogućnosti formiranja snažne hemijske veze sa živim tkivom. Morfologija i hemijski sastav površine titana i legura titana, kao što su hrapavost, topografija, vlažnost i hemijski sastav, izrazito utiču na ponašanje ćelija u smislu promocije ili inhibicije istih. Adhezija proteina, širenje ćelija, zauzimanje određenih oblika i organizacija ćelijskih vlakana se značajno razlikuju na različitim titanskim površinama [241]. Otkriveno je da ćelije GM7373 premošćavaju dublje brazde ($R_a > 0,35 \mu\text{m}$), istovremeno se poravnavajući paralelno sa plićim brazdama [242]. Površinski tretmani mogu povećati otpornost na *in vivo* koroziju između površine implantata i fiziološkog okruženja kako bi se sprečilo oslobađanje jona. Oslobađanje jona nije poželjno jer su joni, poput Al i Ni, potencijalno toksični za ćelije [243]. Uz pravilnu površinsku obradu, oslobađanje jona iz metalne podloge se značajno smanjuje. Ugljenična prevlaka smanjuje oslobađanje jona nikla iz ortodontske proteze napravljene od legure nikla i titana za 80% kada je umočena u fiziološki rastvor na 85°C tokom 5 dana [244]. U literaturi se takođe može pronaći da hidroksiapatitne prevlake smanjuju oslobađanje metalnih jona iz titanskih supstrata [245–248].

2.7.1.1. Mehaničke metode za modifikaciju topografije površine supstrata

Mehaničke metode za kontrolu morfologije površine implantata koje se koriste za menjanje, hrapavljenje ili poliranje površine istih uključuju sečenje, okretanje, poliranje i peskarenje [249]. Ove metode se obično koriste kao pripremni korak za dalji tretman, ali ponekad mehaničke metode predstavljaju i završni korak u pripremi površine implantata.

2. TEORIJSKI DEO

Peskarenje je najčešća mehanička metoda modifikacije površine. Ovaj postupak podrazumeva izlaganje metalnih površina strujanju peska pod visokim pritiskom. Peskarenje poboljšava kontakt kostiju sa metalom usled stvaranja hrapave površine sa velikom vrednošću slobodne površine. Samim tim se javlja veći broj potencijalnih mesta za koja se proteini i ćelije mogu vezati [250]. Iako je utvrđeno da hrapavost površine u rasponu od 0,8 μm do 1,9 μm ne utiče na adheziju ćelija ljudske koštane srži, proliferacija ćelija u pogledu ukupnog sadržaja proteina i aktivnosti alkalnog fosfata je prilično osetljiva na hrapavost [251]. Glinica je najčešće korišćen materijal za peskarenje. Međutim, usled strahovanja da će rezidualne Al_2O_3 čestice ugrađene u matricu inhibirati rast ćelija otpuštanjem štetnih aluminijumskih jona sve više se koriste druge čestice, poput TiO_2 , staklenih kuglica i čestice HAp. Pokazano je da se mišje osteoblastne ćelije (MC3T3-E1) slabije vezuju i razmnožavaju na Ti6Al4V površini peskarenoj Al_2O_3 nego na netretiranoj površini. Ovo se pripisuje površinskom sloju bogatom Al usled ugrađene glinice i pritiskom indukovane difuzije aluminijuma ka površini [252–254].

2.7.1.2. Hemijska i električna obrada

Hemijska obrada, kao što je čišćenje površine rastvaračem, hemijsko nagrizanje i pasivizacija, često prati peskarenje ili mašinsku obradu u cilju dalje modifikacije površinskih svojstava putem hemijskih reakcija između titanske podloge i određenih reaktanata. Kiselo nagrizanje (ečovanje), na primer, može da dovede do stvaranja mikroteksturisane površine titana, koja dalje može podstaći adheziju i proliferaciju ćelija [255–257]. Pasivizacija površine se postiže izlaganjem titanskog supstrata kiselim rastvorima poput azotne kiseline u cilju formiranja amornog TiO_2 sloja, kao i Ti_2O_3 i TiO . Ovaj sloj sprečava dalju oksidaciju titana tokom sterilizacije na suvom pri povišenoj temperaturi [258] i inhibira koroziju [259]. Anodizovana površina titana se dobija elektrohemijskim putem, što dovodi do poboljšane otpornosti na koroziju i habanje, usled postojanja delimično kristalnog oksidacionog filma, uglavnom rutila (TiO_2) [99,260–262] i poboljšane adhezije [263]. U zavisnosti od korišćenih elektrolita i primenjenog napona i struje, struktura oksidacionog sloja je različita i kreće se od tankog i kompaktnog sloja do kompozitnog kompaktnog sloja i stubaste porozne strukture [264]. Nakon što se proizvedu CaP prevlake, na iste se mogu primeniti različiti tipovi tretmana nakon nanošenja kako bi se obezbedila kristalizacija/rekristalizacija različitih faza, kao i da bi se poboljšala njihova fiksacija i isparili tragovi rastvarača zarobljeni unutar naslaga [265].

2.7.2. Tehnike toplotnog prskanja

Termičko prskanje je postupak u kome se topljeni ili toplotom omekšani materijali raspršuju na hladniju površinu da bi se na njega nataložili. Sirovina sa materijalom za prevlaku ili njegovim prekursorom može se zagrevati na različite načine, kao što je plamen visoke temperature ili mlaz plazme, pomoću kojih se termičko prskanje klasifikuje u prskanje plamenom, odnosno prskanje plazmom. Osnovna razlika između njih je maksimalna temperatura koja se može postići. U svakom slučaju, materijali za oblaganje se ubacuju u mlaz, gde se ili tope ili omekšavaju toplotom, a dobijene kapljice izravnavaju i pomeraju prema podlozi. Pošto se temperatura mlaza brzo smanjuje u zavisnosti od udaljenosti, kapljice se brzo stvrdnu i formiraju prevlake. Ovakve prevlake su obično laminarne [266]. Ove lamele prijanjaju za podlogu i predstavljaju gradivne blokove naslaga. Zbog veoma visokih temperatura obrade, tehnike termičkog raspršivanja uvek karakterišu velika kinetička energija komponentata fluksa, nesigurnost molekularnog sastava fluksa u rasponu od pojedinačnih atoma do kapljica (kapljice mogu sadržati i ostatke kristalne faze), kao i prisustvo jonizovanih komponentata. Pored toga, vrlo brzo hlađenje (do $\sim 10^6$ K/s) često dovodi do stvaranja metastabilnih, amorfni, morfološki i strukturno nehomogenih faza, kao i odstupanja od elementarnog sastava početnih prahova uzrokovana gubitkom isparljivih komponentata. Stoga je za tehnike termičkog raspršivanja unapred određen visok stepen neravnoteže. S obzirom na ovo, mehanizmi rasta termički raspršenih naslaga nisu uspostavljeni. U ove tehnike spadaju plazma prskanje [267,268] i prskanje pri velikoj brzini sa oksigenovanim gorivom (High velocity oxy-fuel spraying - HVOF) [269,270].

2.7.3. Tehnike taloženja parom

Treba napomenuti da se sve dostupne tehnike taloženja parom mogu široko podeliti u dve glavne grupe: fizičko i hemijsko taloženje parom (skraćeno PVD i CVD). Među njima, sve vrste PVD tehnika mogu se dalje klasifikovati u drugi skup od dve grupe: (1) one koje uključuju termičko isparavanje, gde se materijal zagreva dok njegov pritisak pare ne postane veći od pritiska okoline, i (2) one koji uključuju jonsko raspršivanje, gde visokoenergetski snopi jona ili elektrona udara u čvrstu metu i odbijaju atome sa njene površine [50,268]. Obično se PVD odvija u vakuumu; međutim, takođe se može izvoditi u prisustvu nekih gasova. Meta je izvorni CaP materijal. Podloge se stavljaju u komoru i dovode do propisanog pritiska. Raspršivanje se pokreće izmenom impulsa između jona i atoma mete usled sudara. Posle toga izbačeni atomi ili molekuli se talože na podlozi koja se takođe stavlja u istu vakuumsku komoru. Važna prednost ove vrste taloženja je ta što se čak i materijali sa vrlo visokim tačkama topljenja lako nanose. Za efikasan prenos impulsa, atomska

težina gasa koji raspršuje treba da bude blizu atomske težine mete, pa su Ne ili Ar poželjni za nanošenje lakih elemenata, dok se Kr ili Xe koriste za teške elemente. Međutim, za taloženje CaP može se koristiti i kiseonik [265]. Za nanošenje materijala koristi se nekoliko vrsta tehnika, kao što su: jonski snop [271], radio-frekventni (RF) magnetron [272,273], impulsni laser [274], elektronsko-ciklotron-rezonantna plazma [275].

2.7.4. Mokre tehnike

Kao što sledi iz definicije, sve vrste tehnika vlažnog taloženja iz rastvora ili suspenzija, kako vodenih, tako i nevodnih spadaju u mokre tehnike. Stoga se sve ove tehnike izvode na umerenim temperaturama [265,276]. Generalno, proces taloženja obično se zasniva na fenomenu heterogene nukleacije, čija kinetika zavisi od mnogih parametara kao što su prezasićenje rastvora, koncentracija reagensa, temperatura, hidrodinamika, prisustvo ili odsustvo primesa, nukleatora, inhibitora itd. U ove tehnike spadaju elektroforetsko taloženje, o čemu će biti reči u narednom poglavlju, elektrohemijsko taloženje, biomimetičko hemijsko taloženje, sol-gel depozicija, hidrotermalno taloženje i (elektro)spinovanje. Razlika između elektroforetskog i elektrohemijskog taloženja leži u tome da se kod elektroforetskog taloženja već pripremljene čestice CaP nanose na substrat iz suspenzije pod uticajem električnog polja, dok kod elektrohemijskog taloženja dolazi do određenih elektrohemijskih reakcija u elektrolitu, pri čemu se na elektrodi (najčešće katodi) odigrava reakcija taloženja CaP prevlake [265,277].

Po definiciji, sol je dvofazna suspenzija koloidnih čestica u tečnosti, dok se gelovi smatraju kompozitima jer se sastoje od čvrstog nosača ili mreže koja enkapsulira tečnu fazu ili višak rastvarača. Prema tome, sol-gel postupak je mokra hemijska tehnika koja uključuje prelazak iz tečnog sola u čvrstu fazu gela [265,278–280]. Koloidne čestice mogu biti u opsegu veličine 1–1000 nm; stoga su gravitacione sile na ove čestice obično zanemarive. Interakcije koje dominiraju među česticama su sile kratkog dometa i površinskiog naelektrisanja.

Biomimetičko taloženje je metoda kojom se na podlogama stvaraju biološki aktivne naslage apatita sličnog kostima uranjanjem u razne simulirane telesne tečnosti [281–284]. Mokro hemijsko taloženje je vrlo slično biomimetičkom taloženju. Razlike između njih leže u sastavima rastvora (rastvori za vlažno hemijsko taloženje mogu sadržati sve moguće jone i aditive, dok oni za biomimetičko taloženje moraju sadržati samo biološki relevantne) i temperaturi (mokro hemijsko taloženje može se vršiti na temperaturama od 0 do 100 °C, dok se biomimetičko taloženje mora izvoditi na temperaturama od ~ 20 do ~ 40 °C).

Spinovanje je postupak koji se koristi za nanošenje uniformnih tankih naslaga na ravne podloge, poput diskova i ploča. Podloga se potapa u suspenziju ili rastvor, a zatim povlači

konstantnom brzinom uz rotiranje, obično uz pomoć motora [285]. Kao alternativa suspenzija ili rastvor se mogu sipati na ravnu površinu rotirajuće podloge [286]. Rotaciono ceđenje i isparavanje rastvarača rezultiraju taloženjem. Nakon sušenja postupak se može ponoviti više puta za pripremu debljih prevlaka. Nakon taloženja, obično se vrši završna toplotna obrada radi poboljšanja fizičkih svojstava prevlaka [286–288].

Pored navedenih tehnika postoje i druge, alternativne tehnike, koje se ređe koriste i većina njih je spomenuta u samo par radova. Najpoznatije alternativne tehnike su aerosolno taloženje i sprej piroliza [265].

2.7.5 Najčešće metode za dobijanje HAp prevlaka

U literaturi se mogu naći brojne metode za sintezu HAp. Mikrotalasna metoda dovodi do stvaranja HAp prevlake koja ima sastav i strukturu sličnu kostima [289–293], pri čemu mikrotlasno zračenje značajno ubrzava hemijsku reakciju sinteze HAp smanjenjem energije aktivacije [294,295]. Kao pogodna metoda za pripremu mezoporoznih HAp nanočestica bez upotrebe šablona pokazala se mikrotalasna hidrotermalna metoda [296,297]. Drugi načini dobijanja hidroksiapatita su direktna ili indirektna hemijska taloženja, koja formiraju HAp kontrolisane morfologije i veličine čestica [298].

Najčešće korišćena metoda za proizvodnju HAp prevlaka je postupak atmosferskog plazma raspršivanja (APS) [299–301]. Ovo je postupak termičkog raspršivanja u kojem se čestice praha tope u plazma mlaznici i kreću se prema supstratu. Proces uključuje prolazak lako jonizujućeg gasa kroz električni luk, formiran između katode i anode, što kao rezultat ima stvaranje plazme. Formirana plazma je nestabilna i brzo se rekombinuje uz oslobađanje velike količine toplotne energije. Čestice se podhranjuju u ovaj mlaz visoke temperature, tope se i kreću se velikom brzinom prema supstratu. Temperature mogu biti veće od 15000 °C, zavisno od odabranih parametara procesa [301,302].

Atmosfersko (vazdušno) plazma raspršivanje je komplikovan proces, na koji utiče čak 50 parametara, i zbog toga odnos proces-svojstva-struktura još uvek nije u potpunosti razumljiv [303]. Pokazalo se da na stabilnost HAp prevlake u velikoj meri utiče njegova kristaliničnost i čistoća [304]. Visokoamorfne prevlake se brže rastvaraju što dovodi do brzog slabljenja i raspada prevlake [304,305], dok prevlake sa visokim stepenom kristaliničnosti imaju manje brzine rastvaranja i stoga su stabilnije u *in vivo* uslovima [306]. Problemi dobijanja HAp prevlake APS metodom je razgradnja HAp na visokim temperaturama, što dovodi do stvaranja manje stabilnih faza kalcijum-fosfata, kao što su: α -trikalcijum fosfat (α -TCP), β -trikalcijum fosfat (β -TCP), tetrakalcijum fosfat

(TTCP) i kalcijum oksid (CaO) [301,307]. Stoga je kontrola nad faznom čistoćom HAp prevlake od krucijalne važnosti.

Elektroforetsko taloženje (EPD) je svestrana i isplativa tehnika za proizvodnju i dobijanje naprednih HAp prevlaka [308]. EPD nudi mogućnost kontrole debljine i morfologije nanosene prevlake jednostavnim podešavanjem vremena taloženja i primenjenog napona [309,310]. Pregled literature pokazuje da je dosadašnji način elektroforetskog taloženja hidroksiapatitne prevlake bio kataforetsko taloženje. Kataforetsko taloženje HAp prevlake na titanu je dobro poznato i objašnjeno u literaturi [311,312], ali ostaje otvoreno pitanje vezano za adheziju prevlake na supstrat, gde i mala sila koja deluje na supstrat sa prevlakom dovodi do delaminacije iste. Kataforetske prevlake se obično sinteruju kako bi se prevazišao problem delaminacije [311]. Sinterovanje kataforetskih prevlaka povećava jačinu veze metal-keramika, ali treba napomenuti da je hidroksiapatitna struktura osetljiva na visoke temperature jer se razlaže na druge kalcijum-fosfatne strukture. Stoga, vreme trajanja procesa sinterovanja i izbor ispravne temperature važni su faktori, budući da se sa povećanjem temperature sinterovanja smanjuje efikasnost integracije implantata u kost [313]. Izvesno poboljšanje postiže se dvostepenim procesom - elektrolitičkom plazma oksidacijom u kombinaciji sa elektroforetskim taloženjem - PEO-EPD, koji stvara porozne hidroksiapatitne prevlake sa ugrađenim TiO₂ česticama na Ti [20].

2.7.6. Prevlake na bazi hitozana

Hitozan (Ch) ima odgovarajuća svojstva za formiranje filma. Zahvaljujući svojim biokompatibilnim karakteristikama koja su ranije napomenuta, hitozan se primenjuje kao prevlaka na metalnim implantatima. U literaturi se može naći pet tehnika nanošenja hitozanske prevlake.

Izliivanje iz rastvora je najjednostavniji metod za dobijanje prevlaka hitozana. *In vivo* i *in vitro* istraživanja na Ti i drugim metalnim implantatima sa izlivenim hitozanskim filmovima u kombinaciji sa osteogenim rekombinantnim ljudskim morfogenetskim proteinom-2 (rhBMP-2) su pokazala da filmovi podržavaju rast ćelija i pospešuju osteointegraciju [314–317].

Sukcesivno taloženje polikatjona i polianjona (poput alginata ili hijaluronske kiseline) radi dobijanja samosklopivih slojeva prevlake poznatih kao kompleks polielektrolita (PEC) predstavlja drugu tehniku. Elektrostatička interakcija između ovih polielektrolita i njihove gustine naelektrisanja, koja je zavisna od pH vrednosti, olakšava dobijanje prevlaka sa izraženim strukturnim karakteristikama. [318–320]. Ovom tehnikom su proizvedeni nanostrukturni filmovi hitozan alginata sa elastičnim svojstvima, koja se kreću od krutog do viskoelastičnog [321].

Treći pristup nanošenja hitozanske prevlake je upotreba rastvora NaCl i glutaraldehida za vezivanje hitozana na supstrat. Reakcija siliranja povećava jačinu veze za supstrat (1,5-1,8 MPa) u

poređenju sa jednostavnim izlivanjem rastvora (0,5 MPa) [322]. Čung i dr. [323] su ispitali uticaj površinske obrade titana i silanskog tretmana na adheziju prevlake hitozana. Njihovi rezultati ukazuju na značajno povećanje adhezije hitozanske prevlake na silansku prevlaku posle ovakvog tretmana titanskog supstrata.

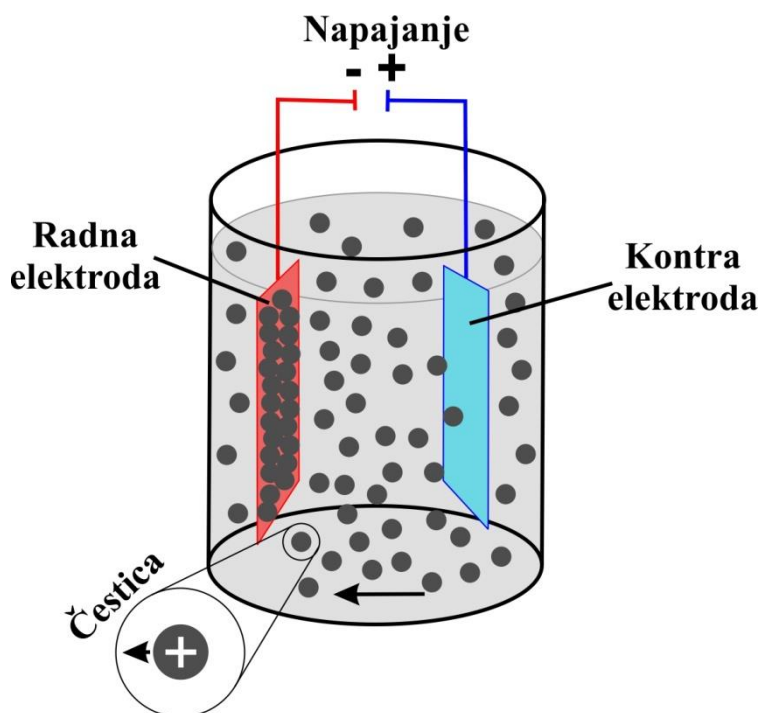
Četvrti pristup nanošenja hitozanske prevlake je elektrospinoвање, pri čemu se hitozanska nanovlakna elektrospinuju na površinu. Čelijska živost i odgovor na taloženje minerala ukazuju da nasumično orijentisana vlakna podstiču proliferaciju ćelija osteoblasta. Orijentacija može oponašati strukturu i funkcionalnost lokalnog tkiva tokom regeneracije mesta oštećenja [324].

Elektrodepozicija je peta tehnika nanošenja hitozanskih prevlaka, koja se, osim za nanošenje hitozana i njegovih derivata, koristi za površinsku funkcionalizaciju metalnih implantata i drugim polisaharidima (alginat (Alg), hijaluronat (HI) i želatin), biokeramikama i biostaklima. Pošto se polisaharidni biopolimeri ponašaju kao polielektroliti u rastvoru, oni mogu reagovati na električnu stimulaciju. U vodenim rastvorima CH je pozitivno naelektrisan dok Alg i HI imaju negativno naelektrisanje. Stoga taloženje ovih polimera može biti katodno (na negativnoj elektrodi) i anodno (na pozitivnoj elektrodi). Detaljnije objašnjenje ove metode je dato u Poglavlju 2.9.

2.8. ELEKTROFORETSKO TALOŽENJE

Elektroforetsko taloženje je jedna od najatraktivnijih metoda za dobijanje uniformnih prevlaka sa kontrolisanom mikrostrukturom. Ovom metodom je moguće dobiti prevlaku sa željenim svojstvima i na supstratima složenog oblika, porozne strukture i na sobnoj temperaturi bez potrebe za skupom procesnom opremom. Istovremeno taloženje polimera i keramike je jedna od najzanimljivijih karakteristika EPD [325,326].

Kod elektroforetskog taloženja čestice materijala koji se koristi za prevlaku su suspendovane u tečnom medijumu. Prilikom suspendovanja čestica na njihovoj površini se javlja površinsko naelektrisanje kao rezultat različitih mehanizama. Površinsko naelektrisanje omogućava kretanje čestica prema suprotno naelektrisanjoj elektrodi, tj. supstratu, primenom električnog polja. Shodno tome, katodni ili anodni film se nanosi na podlogu koja se po završetku procesa suši i po potrebi učvršćuje sinterovanjem (Slika 2.12). Morfologija i brzina taloženja prevlake se može kontrolisati podešavanjem parametara vezanih za suspenziju ili parametara vezanih za sam EPD proces.



Slika 2.12. Šematski prikaz elektroforetskog taloženja, koje prikazuje kretanje (elektroforezu) pozitivno naelektrisanih čestica sa katode na anodu

Različiti pokušaji su izvršeni u cilju opisivanja kinetike EPD taloženja. Hamaker [327] je dao jednačinu za masu (m) prevlake:

$$m = C_s \cdot \mu \cdot A \cdot E \cdot t \quad (2.3)$$

gde je: μ - elektroforetska pokretljivost, E - jačina električnog polja, A - površina elektrode, C_s - koncentracija mase čestica u suspenziji i t - vreme taloženja.

Sarkar i Nikolson [328] su naveli da postoji slična jednačina za cilindrične i koaksijalne elektrode (Jednačina 2.4), a elektroforetska pokretljivost je definisana prema izrazu:

$$m = \frac{lV\zeta\varepsilon_0\varepsilon_r C_s t}{3\ln\left(\frac{a}{b}\right)\eta} \quad (2.4)$$

gde su: ε_0 relativna permitivnost vakuuma, ε_r relativna permitivnost medijuma, ε permitivnost ($\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$), ζ zeta potencijal, η viskoznost suspenzije, l dužina cilindrične elektrode, a i b poluprečnici radne i kontra elektrode, redom, a V predstavlja potencijalnu razliku između elektroda.

Istraživanja EPD su dovela do razmatranja granica između tri različite faze:

- faze taloženja
- faze suspenzije
- faze koja sadrži malo ili nimalo čestica.

2. TEORIJSKI DEO

Sam proces taloženja je objašnjen kretanjem ovih faza u vremenu. Ova činjenica zahteva uključivanje dodatnih izraza u Jednačine 2.3 i 2.4, uključujući zapreminsku koncentraciju čestica u suspenziji (Φ_s) i koncentraciju čestica u prevlaci (Φ_c) [329], što je prikazano Jednačinom 2.5.

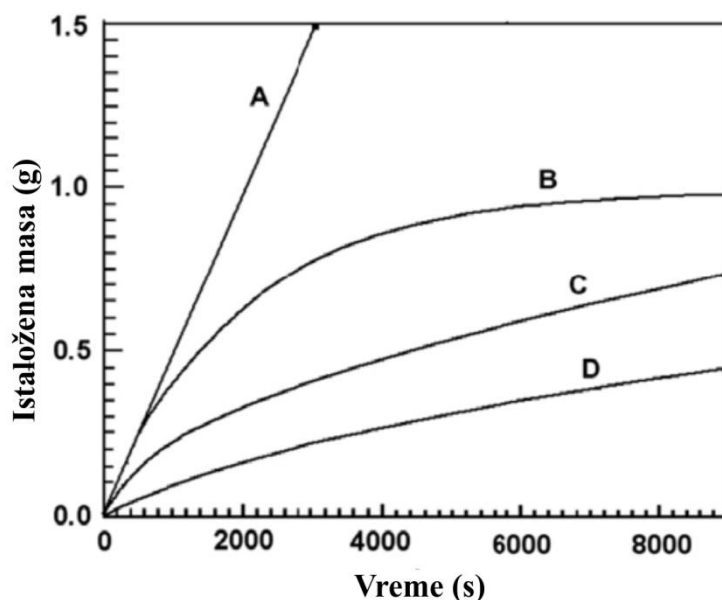
$$u_c = \frac{d\delta}{dt} = -v_c \frac{\Phi_s}{\Phi_c - \Phi_s} \quad (2.5)$$

gde je: u_c - brzina rastvaranja prevlake, δ - debljina prevlake, v_c - brzina čestice u suspenziji pri granici faza, a $\Phi_c = 1 - \varepsilon$ -faktor pakovanja, ε je poroznost.

Hamakerova jednačina je primenljiva samo za kratka vremena taloženja, jer linearna varijacija mase u vremenu u Jednačini 2.3 podrazumeva da su svi ostali parametri konstantni tokom taloženja. Da bi razmotrili ostale eksperimentalne uslove, Sarkar i Nikolson [328] su predložili da za beskonačno male vremenske intervale važi modifikovana Hamakerova jednačina, odnosno Jednačina 2.6.

$$\frac{dm}{dt} = f \cdot \mu \cdot A \cdot E \cdot C_s \quad (2.6)$$

u kojoj je $f \leq 1$ faktor efikasnosti koji sugerise da neće sve čestice dovedene na površinu elektrode učestvovati u taloženju. Na osnovu ove pretpostavke autori su modelovali varijaciju mase prevlake u funkciji vremena za četiri različita stanja koja su prikazana na Slici 2.13 [328].



Slika 2.13. Šema kinetike EPD: (A) konstantna struja /konstantna koncentracija suspenzije; (B) konstantna struja/opadajuća koncentracija suspenzije; (C) konstantan napon/konstantna koncentracija i (D) konstantan napon/opadajuća koncentracija suspenzije [328]

2. TEORIJSKI DEO

Poređenjem krivih A i C dolazi se do zaključka vrednog da, iako se brzina taloženja kod krive C (konstantan napon) s vremenom dramatično smanjuje, ova brzina ostaje konstantna kod krive A (konstantna struja), a krajnji prinos kod krive A je znatno veći. Ovo odstupanje krive C od krive A nije posledica promene koncentracije suspenzije već je posledica formiranja izolacionog sloja prevlake. Ovaj izolacioni sloj uzrokuje pad napona po jediničnoj dužini suspenzije, pri čemu se napon smanjuje tokom taloženja pri konstantnom naponu (kriva C).

Za izvođenje procesa elektroforetskog taloženja mogu se koristiti kako vodeni, tako i organski rastvarači. Prednosti primene suspenzija na vodenoj osnovi su manji troškovi, manje ekoloških pitanja koja se tiču odlaganja tečnosti, manja vrednost potrebnog električnog polja i brža kinetika [325]. Uprkos tim činjenicama, jedan od glavnih problema vodenih suspenzija je elektroliza vode pri malim naponima (teoretski iznad 1,24 V). To izaziva izdvajanje kiseonika i vodonika na anodi i katodi, a samim tim taložene prevlake čini poroznim. Visoke gustine struje u procesu uzrokuju Džulovo zagrevanje sistema, nestabilnost taloženja i koroziju metalnih podloga [330]. Gore navedeni problemi se mogu rešiti upotrebom organskih rastvarača. Mala moć disocijacije ovih tečnosti za razvoj površinskog naelektrisanja čestica se nadoknađuje upotrebom jačeg električnog polja.

2.8.1. Karakteristike suspenzije

Važan parametar procesa elektroforetskog taloženja je suspenzija, koja mora biti dobro stabilizovana, homogena i bez aglomerisanih čestica [325]. U prisustvu polarnih rastvarača, npr. vode, većina supstanci ispoljava površinski električni napon. Do razvoja naelektrisanja na površinama čvrstih čestica može doći iz različitih razloga: disocijacija ili jonizacija površinskih grupa (ovaj faktor zavisi od pH vrednosti suspenzije), reapsorpcija jona koji određuju potencijal, apsorpcija specifičnih jona na površini čestica (površinski aktivne supstance - surfaktanti), izomorfna zamena rešetke i pucanje naelektrisane površine kristala [328].

Čestice su suspendovane u fluidnom medijumu interakcijom tri različite sile: Van der Valsove privlačne sile, elektrostatičke odbojne sile i sterne (polimerne) sile (ova poslednja nije uvek prisutna). Da bi suspenzija bila stabilna, elektrostatičke odbojne i/ili sterne sile moraju biti dominantne nad Van der Valsovom silom koja pokušava da aglomerira čestice [325,331].

Različiti parametri vezani za suspenziju utiču na EPD proces. Fina disperzija čestica u suspenziji je kritična za dobijanje homogenog taloga. Povećanje veličine čestica dovodi do njihove precipitacije usled uticaja sile gravitacije, izazivajući nejednaku debljinu prevlake [325]. Smanjenje veličine čestica takođe omogućava bolju kontrolu pukotina koje se mogu javiti usled skupljanja prevlake tokom faze sušenja [332].

2. TEORIJSKI DEO

Relativna propusnost (ili dielektrična konstanta) tečnog medijuma (ϵ) treba da ima optimalnu vrednost. Tečnosti sa malom vrednošću dielektrične konstante imaju nedovoljnu moć disocijacije, te stoga ne dolazi do taloženja. Tečnosti sa velikom vrednošću dielektrične konstante imaju veliku jonsku koncentraciju, a samim tim i veličinu dvojnog sloja (objašnjeno u Poglavlju 2.8.3), te se smanjuje elektroforetska pokretljivost čestica [333].

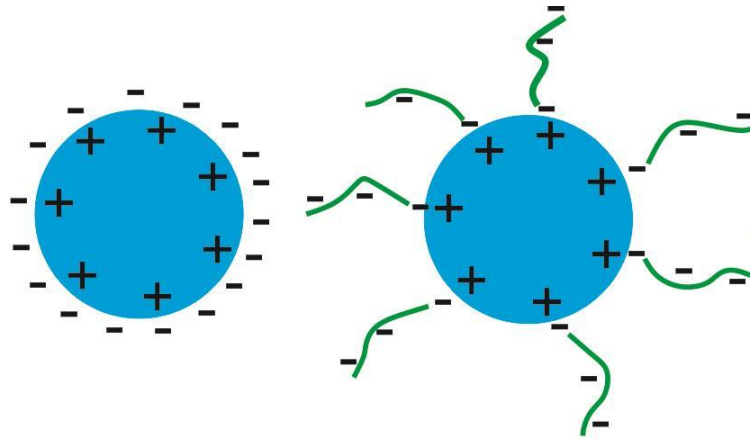
Provodnost suspenzije treba da bude u određenom rasponu kako bi bila povoljna za taloženje. Kako su joni u suspenziji nosioci struje kod EPD procesa, električna provodnost suspenzije dobija na značaju i treba biti prilagođena u cilju održavanja pokretljivosti čestica usled prisustva prevelikog broja jona i izbegavanja gubitka stabilnosti suspenzije usled naelektrisanja čestica (u neprovodnim tečnostima) [330]. Mala viskoznost suspenzije je takođe favorizovana usled veće pokretljivosti čestica [325].

Zeta potencijal čestica utiče na uspostavljanje stabilnosti čestica u suspenziji, pravac kretanja čestica, pokretljivost čestica i gustinu filma. Elektrostatičke i Van der Valsove sile između naelektrisanih čestica utiču na ukupnu stabilnost sistema. Mala elektrostatička odbojnost dovodi do aglomeracije čestica, a veoma velika elektrostatička odbojnost ne dozvoljava taloženje na elektrodi. Stoga treba prilagoditi zeta potencijal čestica dodavanjem određenih provodnih sredstava poput kiselina, baza i posebno apsorbovanih jona ili polielektrolita [334].

Kao što je napomenuto, iako bi trebalo održati veliku stabilnost suspenzije pomoću parametara kao što su mala veličina čestica i adekvatan zeta potencijal, za formiranje prevlake je neophodno osigurati nestabilno stanje u blizini elektroda [328], pri čemu se ova nestabilnost može izazvati stvaranjem jona usled elektrolize ili električnim pražnjenjem čestica.

Zahvaljujući elektrostatičkoj sili, čestice sa istoimenim naelektrisanjem se odbijaju zadržavajući ih u suspenziji. S druge strane privlače suprotno naelektrisane jone koji čine difuzni dvostruki sloj povećavajući suspendabilnost i stabilnost.

Drugi način suspendovanja ili poboljšanja suspendabilnosti čestica je interakcija sa polielektrolitima, npr. hitozan, alginat ili hondroitin sulfat. Ako polielektrolit poseduje suprotno naelektrisanje u poređenju sa čvrstom površinskom česticom, polielektrolit i čestica se mogu međusobno vezati. Ostatak polimernog lanca deluje kao micela oko čestica, povećavajući suspendabilnost, dok njegov lanac odbija ostale polimerne lance elektrosternim silama (sterna odbojnost) [325,331]. Na Slici 2.14 dat je grafički prikaz elektrostatičkog i sternog fenomena.



Slika 2.14. Šematski prikaz elektrostatičkog i sternog mehanizma stabilizacije suspenzija.

a) elektrostatička stabilizacija i b) sterna stabilizacija

2.8.2. Karakteristike EPD procesa

Parametri koji utiču na EPD proces su: vreme taloženja, jačina električnog polja, koncentracija čestica i provodnost supstrata. Prinos prevlake na supstratu se povećava sa vremenom, a brzina prinosa zavisi od uslova procesa. Pri konstantnom naponu brzina taloženja tokom EPD procesa je konstantna na početku, a potom opada i odstupa od linearnog trenda [335]. Ovaj fenomen je objašnjen formiranjem izolacionog sloja (prevlake) na elektrodi koji smanjuje efekat električnog polja i dolazi do pada jačine struje.

Iako se količina prevlake povećava s porastom napona, ovo povećanje negativno utiče na stabilnost električne struje i na kvalitet prevlake. Primenom električnog polja velikih vrednosti dolazi do taloženja čestica velikom brzinom, što istim ne daje priliku da se efikasno pozicioniraju u prevlaci. Kako bi se izbegao ovaj problem predlaže se primena napona srednjih vrednosti [325].

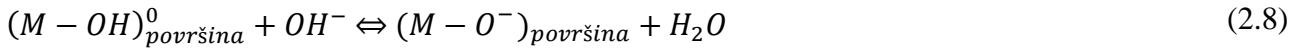
2.8.3. Elektroforetska mobilnost

Kad prahovi dođu u dodir sa polarnom tečnošću dolazi do stvaranja naelektrisanja putem pet različitih mehanizama na površini čestica:

- disocijacija ili jonizacija površinskih grupa na česticama što zavisi od pH suspenzije;
- ponovna adsorpcija jona koji određuju potencijal;
- adsorpcija jonizovanih tenzida;
- izomorfna supstitucija i
- razbijanje površinskih naelektrisanja kristala [335].

2. TEORIJSKI DEO

Prvi mehanizam se obično javlja kod oksidnih površina. Na ovim površinama količina i znak naelektrisanja zavise od pH vrednosti. Pošto se oksidne površine sastoje od velikog broja amfoternih hidroksilnih grupa, mogu se javiti sledeće reakcije:

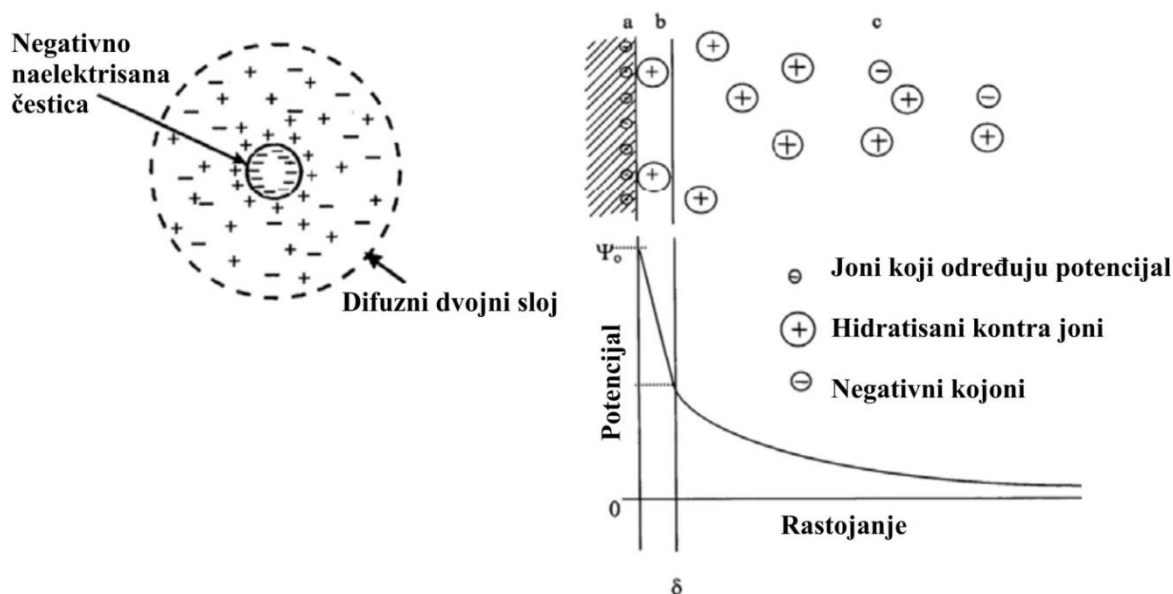


pri čemu se Reakcija 2.7 odvija pri niskim, a Reakcija 2.8 pri visokim pH vrednostima.

Usled ovog površinskog naelektrisanja, oko čestica se formira sloj jona sa suprotnim naelektrisanjem (kontra-joni), dok se slično naelektrisani joni (ko-joni) u medijumu odbijaju od čvrste površine. Ova konfiguracija čestica i jona se naziva „električni dvojni sloj“. Primenom električnog polja, suprotni joni i čestice se kreću u suprotnim smerovima, ali zahvaljujući silama privlačenja koje deluju na suprotne jone, jedan deo njih se kreće zajedno sa česticom, i ovaj sloj se naziva „krmni sloj“ [326]. Šire rasprostranjeni suprotni joni formiraju „difuzni dvojni sloj“. Razlika električnog potencijala između ova dva sloja naziva se „zeta (ξ) potencijal“ [325] (Slika 2.15). Zeta potencijal igra ključnu ulogu u brzini kojom se čestica kreće, kao i u njenoj mobilnosti. Mobilnost je definisana prema Jednačini 2.9:

$$\mu = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta} f(\kappa r) \quad (2.9)$$

gde je: ε_0 - permitivnost vakuuma, ε_r - relativna permitivnost rastvarača, ξ - zeta potencijal, η - viskozitet rastvarača i $f(\kappa r)$ - Henrijev koeficijent koji zavisi od odnosa debljine dvostrukog sloja ($1/\kappa$) i radijusa jezgra (r) čestice [325].



Slika 2.15. Šema dvojnog sloja koji okružuje naelektrisanu česticu u suspenziji, (a) površinsko naelektrisanje, (b) krmni sloj i (c) difuzni sloj suprotnih jona [336]

Brzina naelektrisanih čestica koje se kreću pod uticajem električnog polja zavisi od četiri različite sile:

- sila ubrzanja usled uticaja električnog polja na naelektrisane čestice;
- viskozno vučenje tečnosti;
- sila usporjenja usled uticaja električnog polja na kontra jone i
- sila opuštanja izazvana izobličenjem u dvostrukom sloju kada se pomera pozitivno i negativno središte naelektrisanja [326].

2.9. NOVA *IN SITU* METODA

ANODIZACIJE/ANAFORETSKE DEPOZICIJE

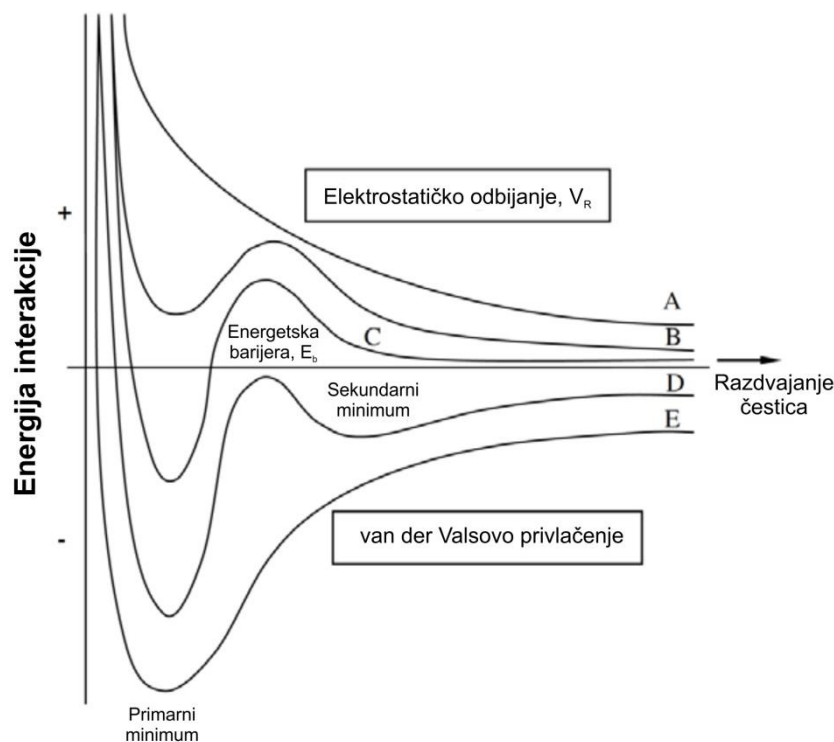
KALCIJUM FOSFATNIH PREVLAKA

U ovoj doktorskoj disertaciji je kreirana i prikazana nova metoda nanošenja kalcijum fosfatnih i hibridnih prevlaka na bazi kalcijum fosfatnih keramika na titanijumske supstrate. Pregledom literature nije pronađena metodologija ovakvog načina nanošenja prevlake na nosač. Ova metoda je bazirana na elektroforetskom taloženju kalcijum fosfatnih prevlaka. Novina se ogleda u sinergiji i simultanom izvođenju više procesa. Prvi proces je anodizacija površine supstrata, gde dolazi do povećanja hrapavosti površine i stvaranja pasivnog oksidnog filma na površini supstrata. Drugi proces koji se simultano odvija je nanošenje CaP prevlake na supstrat sa

2. TEORIJSKI DEO

istovremenom delimičnom ugradnjom CaP u kristalnu rešetku, kao i taloženjem oligosaharidne komponente prevlake. Novina se ogleda i u činjenici da je po prvi put umesto katodnog obavljeno anodno taloženje, pa je suspenzija imala negativno naelektrisane koloidne čestice koje se talože na radnu anodu (supstrat). U disertaciji su definisani parametri koji utiču na pokrivenost sustrata, mobilnost, adheziju prevlake, izvodljivost samog procesa. Ovi parametri uključuju vreme taloženja, napon taloženja, koncentraciju CaP u suspenziji, ali su i definisani parametri koji dovode do stvaranja antimikrobnih i necitotoksičnih prevlaka, kao što je koncentracija hitozan oligosaharidne komponente.

„DLVO teorija“ koloidnih sistema je kvantitativna teorija nazvana po istraživačima Derjaguinu, Landauu, Verveiu i Overbeeku koji su je osnovali [272, 273]. Prema ovoj teoriji stabilnost suspendovanih čestica određuje se interakcijom između privlačnih Van der Valsovih sila i odbojnih elektrostatičkih sila između čestica. Ukupna potencijalna energija ove interakcije na određenoj udaljenosti među česticama pokazuje različite oblike na osnovu jonske jačine sistema (Slika 2.16). Pri odgovarajućim vrednostima jonske sile dolazi do „elektrostatičke stabilizacije“ koloida. S druge strane, u prisustvu hidrofilnih polimera, treba uzeti u obzir još jedan važan faktor. U slučaju adsorpcije ovih makromolekula na česticama, sile odbijanja između njih dovode do „sterne stabilizacije“ koja poboljšava disperziju čvrstih prahova.



Slika 2.16. Ukupna potencijalna energija u odnosu na rastojanje između dve čestice (A do E: povećanje jonske sile suspenzije); A = spontana disperzija; B = nema primarne koagulacije usled velike energetske barijere; C, D = slaba sekundarna minimalna koagulacija; E = brza koagulacija u primarni minimum [325]

2. TEORIJSKI DEO

Maksimum na krivima (Slika 2.16) predstavlja potencijalnu energetska barijeru usled približavanja dve čestice. Energetska vrednost barijere je funkcija elektrostatičkih sila i njena vrednost je određena ζ – potencijalom i krmenim slojem, pa je povezana sa stabilnošću suspenzije. Taloženje čestica se dešava ako je sistem u stanju da savlada ovu prvu barijeru i ako je primarni minimum dovoljno dubok da ima pretežni efekat Van der Valsovih sila. Takva pojava se dešava kod srednje jonske sile, krive C i D (Slika 2.16), gde je C stabilnija suspenzija. Sekundarni minimum na krivoj D povezan je sa koncentrovanijom suspenzijom elektrolita koja može da indukuje reverzibilnu flokulaciju čestica. Reverzibilna flokulacija se može prevazići odbojnim silama kada se udaljenost smanji ili dodavanjem više rastvarača u suspenziju pomerajući se na krivu C. Ako čestice u suspenziji u kojoj vladaju jake jonske sile ne poseduju dovoljnu silu odbijanja, suspenzija je potpuno nestabilna i dolazi do koagulacije (kriva D).

Predloženi su različiti mehanizmi za formiranje prevlaka EPD procesom. Flokulacija akumulacijom čestica, neutralizacija naelektrisanja čestica, elektrohemijska koagulacija čestica i električna dvoslojna distorzija sa proređivanjem su četiri glavna mehanizma predstavljena u različitim istraživanjima [337].

Novina kod procesa *in situ* anodizacije/anaforetskog taloženja prikazanog u ovoj disertaciji ogleda se u samom sastavu suspenzije, koja ispoljava ponašanje koje je opisano u Poglavljima 2.6 i 2.7. Za razliku od kataforetskog procesa, jedinična micela stabilne suspenzije je negativno naelektrisana, pa se taloženje odvija na pozitivnoj anodi. Dodatkom hitozan oligosaharid laktata ova micela je dodatno stabilizovana, a podešavanjem karakteristika suspenzije i samog *in situ* procesa dolazi do stvaranja kompaktne i stabilne prevlake na supstratu.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja sadrže:

1. Određivanje parametara procesa anodizacije i karakterizacija tako dobijene površine titanskog supstrata bez prevlake posle procesa anodizacije u pogledu:
 - određivanja odgovarajućih karakteristika procesa anodizacije, kao što su napon i vreme taloženja u cilju određivanja optimalnih parametara,
 - određivanja fizičko-hemijskih karakteristika površine supstrata, kao što su morfologija površine supstrata, hemijski i kristalografski sastav prevlake i hrapavost,
 - određivanje mehanizma nastajanja i rasta pasivne prevlake na supstratu.
2. Definisane parametara novog *in situ* procesa anodizacije/anaforetske depozicije i njihova adekvatna modifikacija za nanošenje kompozitnih i hibridnih kalcijum fosfatnih prevlaka na titan i njegove legure u pogledu:
 - određivanja početnog sastava materijala za dobijanje stabilnih suspenzija za naknadno nanošenje na supstrat u vidu kompozitne prevlake,
 - određivanja odgovarajućih karakteristika *in situ* procesa anodizacije/anaforetskog taloženja, kao što su napon i vreme taloženja.
3. Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika prevlaka dobijenih novim *in situ* procesom anodizacije/anaforetske depozicije u pogledu:
 - određivanja fizičkih karakteristika prevlaka, kao što su morfologija prevlake, adhezija prevlake na supstrat, kompaktnost prevlake i hrapavost,
 - određivanja hemijskih karakteristika prevlaka, kao što su hemijski i kristalografski sastav prevlake sa predlogom mehanizma nastajanja prevlake i koroziona stabilnost.
4. Ispitivanje bioaktivnosti, citotoksičnosti i antimikrobnih svojstava dobijenih prevlaka različitim biohemijskim i biološkim metodama za potencijalnu upotrebu kompozitnih biomaterijala u biomedicinske svrhe u pogledu:
 - određivanja bioaktivnosti dobijenih kompozitnih i hibridnih biomaterijala potapanjem uzoraka u rastvor simulirane telesne tečnosti,
 - određivanja citotoksičnosti materijala na ćelijsku liniju MRC-5 humanih fibroblasta pluća,
 - određivanja antimikrobnih svojstava dobijenih biomaterijala na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske kulture.

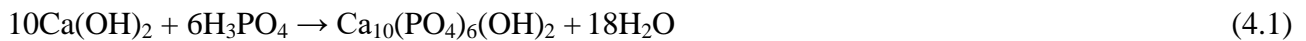
4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. PRIPREMA POVRŠINE TITANA

Titanske pločice proizvođača Aldrich, čistoće 99,7 %, dimenzija (20 × 10 × 0,89) mm su korišćene za eksperimente optimizacije parametara *in situ* procesa anaforeze, kao i za procese *in situ* anaforetskog taloženja HAp, HAp/ChOL, ACP i ACP/ChOL kao podloge. Titanske pločice su brušene silicijum karbidnim (SiC) brusnim papirima sa veličinama zrna od 600, 800, 1000, 2000 i 3000 nakon čega su pločice polirane do ogledalskog sjaja upotrebom glinice sa veličinom zrna od 1 μm, 0,3 μm i 0,05 μm. Svi uzorci su zatim isprani i očišćeni u etanolu u ultrazvučnom kupatilu SONICOR S-101 sa 130 W snage i 40 kHz piezoelektričnim ultrazvučnim transduserom tokom 30 min. Uzorci su čuvani u etanolu do početka eksperimenata u cilju sprečavanja spontane oksidacije titana na vazduhu.

4.2. SINTEZA HIDROKSIAPATITNOG PRAHA NANO VELIČINE

Hidroksiapatitni prah nano veličine je sintetisan modifikovanom precipitacionom hemijskom metodom u reakciji kalcijum hidroksida i fosforne kiseline, kao što je prikazano Jednačinom 4.1:



Kalcijum hidroksid je dobijen dodavanjem kalcijum oksida, CaO, u malim količinama u destilovanu vodu tokom 10 minuta, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, pri brzini od 200 o/min, pri čemu je dobijena suspenzija Ca(OH)₂. Kalcijum oksid je dobijen kalcinacijom CaCO₃ (proizvođača Sigma) analitičke čistoće žarenjem tokom 5 h na 1000 ° C u atmosferi vazduha. U cilju dobijanja hidroksiapatitnog praha, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, fosforna kiselina je dodavana kap po kap u stehiometrijskoj količini u suspenziju Ca(OH)₂ u skladu sa Jednačinom (4.1). Reakcija je prekinuta kada je dodata potrebna količina fosforne kiseline, a pH vrednost je dostigla 7,4–7,6. Dobijena suspenzija je zagrevana na 94 ± 1 °C tokom 30 min uz konstantno mešanje pola sata. Nakon sedimentacije, gornji bistri sloj rastvora je dekantiran. Suspenzija je sušena „spray dry“ metodom na 120 ± 5 °C u granulisanu prah [311].

4.3. SINTEZA PRAHA AMORFNOG KALCIJUM FOSFATA NANO VELIČINE

Amorfni kalcijum fosfat je dobijen naglim dodavanjem 150 ml 26,6 mas.% rastvora $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ u 400 ml rastvora $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ koji je dobijen mešanjem 7 ml H_3PO_4 , 165 ml NH_4OH i 228 ml H_2O . Dobijeni rastvor je konstantno mešan na magnetnoj mešalici brzinom od 100 o/min na 50 °C tokom 60 minuta. Tokom procesa mešanja dobijen je fini talog u obliku gela, koji je ostavljen da ostari 15 s pre nego što je sakupljen. Sakupljeni gel je ispran vodom i centrifugiran na 4000 o/min u Hettich Universal 320 centrifugi na 5 °C tokom 1 sata. Ovako dobijen talog je osušen zamrzavanjem na -30 °C pri pritisku od 0,37 bara tokom 1 sata. Završno sušenje je urađeno na -40 °C i pritisku od 0,12 bara u trajanju od 2 sata.

4.4. PRIPREMA SUSPENZIJA ZA NANOŠENJE KOMPOZITNIH PREVLAKA

Kao što je napomenuto u Poglavlju 3 (Cilj istraživanja), ova doktorska disertacija se bavi novom *in-situ* anaforetskom metodom dobijanja kompozitnih prevlaka na bazi kalcijum fosfatne keramike na titanu jednostepenim postupkom. Hidroksiapatit i amorfni kalcijum fosfat su taloženi iz etanolskih suspenzija, a priprema suspenzija je urađena kao što je navedeno u narednim poglavljima. Kako bi se utvrdio uticaj tipa elektroforetskog taloženja na adheziju prevlake na titanski supstrat, HAp je taložen kataforetski i anaforetski, a u cilju utvrđivanja uticaja tipa kalcijum fosfatne prevlake na adheziju, ACP je taložen anaforetski.

4.4.1. Priprema HAp suspenzije za kataforetsko taloženje

Za kataforetično taloženje pripremljena je HAp suspenzija u apsolutnom etanolu u ukupnoj zapremini od 100 ml. Suspenzija je sadržala 10 mg/ml HAp praha koji je dobijen kao što je objašnjeno u Poglavlju 4.2., odnosno odmeravanjem 1,0000 g HAp praha i dodavanjem u 100 ml apsolutnog etanola. Posle dodavanja HAp praha u apsolutni etanol, ovako dobijena suspenzija je zaronjena u ultrazvučnu kadu SONICOR S-101 snage 130 W sa piezoelektričnim ultrazvučnim transduserom od 40 kHz na period od 15 minuta kako bi se postiglo homogeno i stabilno stanje. HCl je dodat za podešavanje pH vrednosti na 2,00 u cilju povećanja stabilnosti suspenzije.

4.4.2. Priprema HAp suspenzija za anaforetsko taloženje

U cilju *in situ* anaforetskog taloženja HAp prevlake sa simultanom i istovremenom anodizacijom površine pripremljena je HAp suspenzija u apsolutnom etanolu u ukupnoj zapremini od 100 ml. HAp suspenzija je bila sledećeg sastava: odmereno je 1,0028 g HAp praha, koji je dobijen kao što je objašnjeno u Poglavlju 4.2., kako bi se dobila suspenzija 10 mg/ml praha u apsolutnom etanolu i dodato je 10 mas.% rastvora NaOH dok se nije dobio rastvor HAp u etanolu pH vrednosti 10,00. Urađen je isti postupak ultrazvučnog tretmana suspenzije kao i za kataforetično taloženje tokom 15 minuta u cilju postizanja homogenog i stabilnog stanja. NaOH je dodat u cilju podešavanja pH vrednosti na 10,00 i u cilju povećanja stabilnosti suspenzije za anaforetsko taloženje.

4.4.3. Priprema ACP i ACP/ChOL suspenzija za anaforetsko taloženje

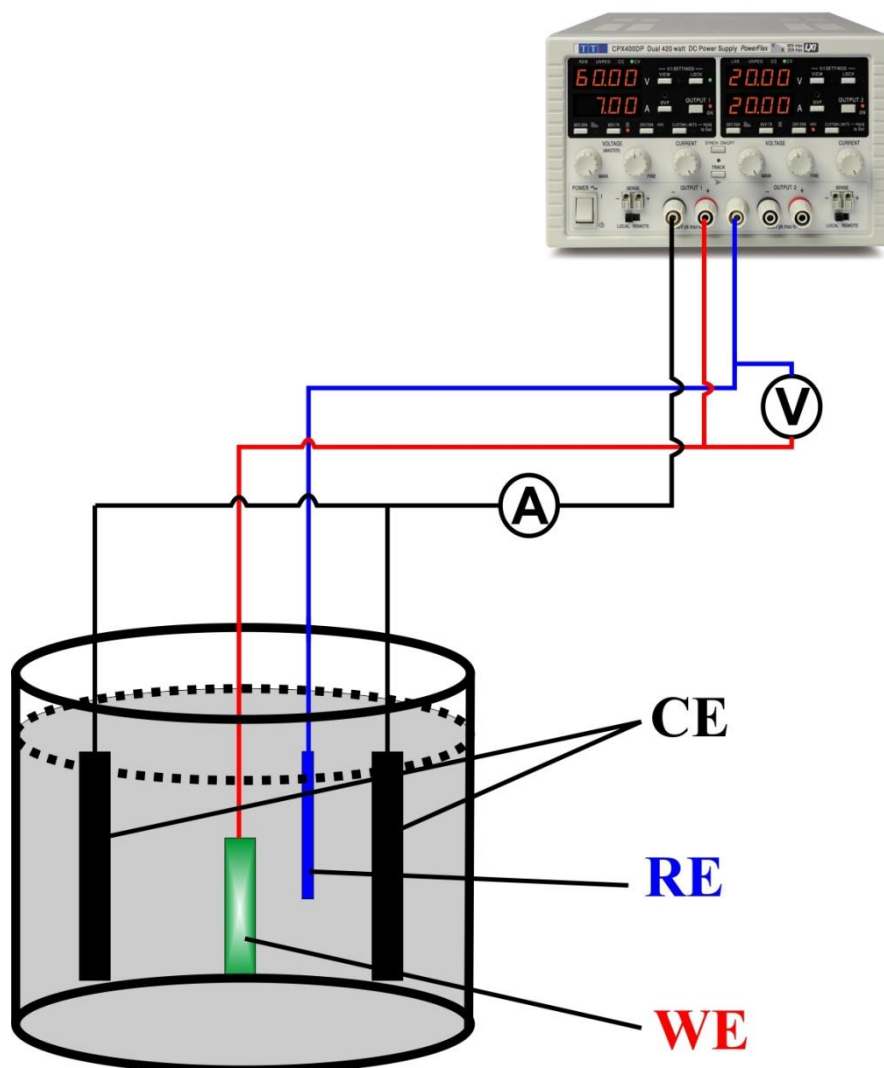
Ispitivane su anaforetski istaložene prevlake amorfnog kalcijum fosfata sa i bez prisustva hitozan oligolaktata. Procesom *in situ* anaforetskog taloženja nanese su ACP i ACP/ChOL prevlake iz odgovarajućih etanolskih suspenzija. Za anaforetsko taloženje ACP napravljena je suspenzija ACP koji je pripremljen kao što je objašnjeno u Poglavlju 4.3. odmeravanjem 1,0000 g ACP u 100 ml apsolutnog etanola u cilju dobijanja suspenzije koncentracije 1 mas.%. Suspenziji je dodat 10 mas.% rastvor NaOH dok se nije dobila suspenzija pH vrednosti 10,00. Suspenzija je zaronjena u ultrazvučnu kadu SONICOR S-101 snage 130 W sa piezoelektričnim ultrazvučnim transdjuserom od 40 kHz na period od 15 minuta kako bi se postiglo homogeno i stabilno stanje. Suspenzija za dobijanje amorfnog kalcijum fosfatne prevlake sa hitozan oligolaktatom pripremljena je na sličan način. Odmereno je 1,0000 g ACP i 0,0500 g hitozan oligolaktata (proizvođač Sigma) molarne mase $M_w = 5000$ i dodat je 10 mas.% rastvor NaOH. NaOH je dodat u cilju podešavanja pH vrednosti na 10,00 i u cilju povećanja stabilnosti suspenzije za anaforetsko taloženje. Za razliku od svih prethodnih suspenzija, ACP/ChOL suspenzija nije tretirana u ultrazvučnom kupatilu usled razdvajanja i aglomeracije suspendovanih ChOL čestica primenom ultrazvuka, već je suspenzija tretirana na rotacionoj magnetnoj mešalici Heidolph MR 3001 K pri brzini mešanja od 200 o/min, koja ne dovodi do razdvajanja suspendovanih čestica.

4.5. ANODIZACIJA TITANSKIH SUPSTRATA I ANAFORETSKO TALOŽENJE HAP, ACP I ACP/CHOL PREVLAKA NA TITANSKOM SUPSTRATU

Anodizacija površine titana, dimenzija ($20 \times 10 \times 0,89$) mm i površine tretirane kao što je opisano u Poglavlju 4.1. je izvedena u standardnoj troelektrodnoj elektrolitičkoj ćeliji postavljenoj na rotacionu magnetnu mešalicu sa brzinom mešanja od 200 o/min i na temperaturi 25 °C. Pripremljeni titanski uzorak je korišćen kao anoda, dok je kao katoda korišćen par pločica od nerđajućeg čelika 1Cr18Ni9Ti, dimenzija ($20 \times 10 \times 0,89$) mm, koje su bile postavljene paralelno na rastojanju od 10 mm u odnosu na radnu elektrodu. Zasićena kalomelova elektroda (ZKE) je korišćena kao referentna elektroda. Elektrolit korišćen za anodizaciju titana je bio vodeni rastvor koji sadrži 50 vol.% 0,1 M natrijum hidroksida (NaOH) i 50 vol.% apsolutnog etanola. Sve hemikalije korišćene u eksperimentima su bile analitičkog kvaliteta proizvođača Sigma-Aldrich, a rastvori su pripremljeni korišćenjem dvostruko dejonizovane vode. Kao izvor napajanja korišćen je CPX400DP potencioestat/galvanostat proizvođača Aim and Thurlby Thandar Instruments (Ujedinjeno Kraljevstvo). Anodizovanje je izvršeno primenom napona od 30 V, 60 V i 90 V. Proces anodizacije je vođen sve dok na anodu nije naneta ukupna količina naelektrisanja od 1,13 C. Nakon anodizacije, uzorci titana su uklonjeni iz kupatila i isprani dvostruko dejonizovanom vodom. Uzorci su čuvani u etanolu, a pre daljih ispitivanja sušeni su u sušnici na 80 °C tokom 30 minuta.

Trideset minuta pre *in situ* anaforetskog taloženja, kao i sve vreme tokom taloženja, sve suspenzije su mešane na rotacionoj magnetnoj mešalici pri brzini od 200 o/min u cilju homogenizacije čestica u suspenzijama i održavanja stabilne suspenzije. Kao i kod eksperimenata anodizacije površine titana, anaforetsko taloženje je izvedeno u standardnoj troelektrodnoj elektrohemijskoj ćeliji. Radna elektroda (anoda) je bila titanska pločica dimenzija ($20 \times 10 \times 0,89$) mm i pripremljena kao što je opisano u Poglavlju 4.1., dok je kao katoda korišćen par pločica od nerđajućeg čelika 1Cr18Ni9Ti, dimenzija ($20 \times 10 \times 0,89$) mm, koje su bile postavljene paralelno na rastojanju od 10 mm u odnosu na radnu elektrodu (Slika 4.1). ZKE je korišćena kao referentna elektroda. HAp, ACP i ACP/ChOL prevlake na titanu su taložene pri konstantnom naponu od 60 V.

HAp, ACP i ACP/ChOL prevlake na titanu su taložene na konstantnom naponu od 60 V tokom 3 minuta za sve elektrohemijske, fizičko-hemijske i biološke analize. Dobijene prevlake su sušene na vazduhu tokom 24 h, na temperaturi od 25 °C.



Slika 4.1. Šema aparature za anaforetsko taloženje (CE – kontra elektroda - katoda, WE – radna elektroda - anoda, RE – referentna elektroda)

4.6. ISPITIVANJE PREVLAKA U RASTVORU SIMULIRANE TELESNE TEČNOSTI

Bioaktivna keramika se spontano vezuje za koštano tkivo preko biološki aktivnog sloja apatita koji se formira na bioaktivnim keramičkim površinama u telu [338–340]. Prema tome, suštinski zahtev veštačkog materijala je mogućnost vezivanja za koštano tkivo putem formiranja apatita na površini materijala koji nalikuje kostima [341]. Pokazano je da je formiranje apatita na bioaktivnoj keramici reproduktibilno, čak i u acelularnoj simuliranoj telesnoj tečnosti sa koncentracijama jona koje su približne koncentracijama istih u krvnoj plazmi čoveka [340].

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Tabela 4.1. Sastav SBF rastvora sa jonskim koncentracijama sličnim ljudskoj krvnoj plazmi

Reagensi	c (g/dm ³)
NaCl	7,996
NaHCO ₃	0,350
KCl	0,224
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,228
MgCl ₂ ·2H ₂ O	0,305
CaCl ₂	0,278
Na ₂ SO ₄	0,071
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057
1M HCl	40 ml

SBF se široko koristi za *in vitro* procenu bioaktivnosti veštačkih materijala ispitivanjem njihove sposobnost stvaranja apatita u tečnosti [342]. S druge strane, SBF se takođe koristi za pripremu bioaktivnih kompozita formiranjem apatita sličnog koštanom apatitu na raznim vrstama supstrata [343].

Simulirana telesna tečnost je pripremljena dodavanjem reagenasa navedenih u Tabeli 4.1, pri čemu su sve hemikalije, proizvođača Sigma, prethodno sušene u sušnici na 50 °C u trajanju od 2 h. Hemikalije su dodavane redom kojim se pojavljuju u Tabeli 4.1 u 1 dm³ dvostruko dejonizovane vode [344] i to u vrednostima mase koje su merene na analitičkoj vagi sa tačnošću od 10⁻⁴ g. Merenje je izvršeno u temperiranoj prostoriji dovoljno brzo tako da vlaga iz vazduha nije imala uticaja na merenja. pH vrednost dobijenog rastvora je 7,4, a rastvor je čuvan u frižideru u cilju prevencije bilo kakvih promena. Sva merenja koja su uključivala korišćenje SBF rastvora su izvršena na temperaturi od 37 °C.

In vitro ispitivanje bioaktivnosti sprovedeno je primenom *Kokubo i sar.* [344] protokola opisanog u ovom Poglavlju u cilju procene sposobnosti formiranja apatita na kompozitnim prevlakama. Bioaktivnost je procenjena vertikalnim potapanjem nataloženih uzoraka u plastičnu bočicu koja sadrži 40 ml rastvora simulirane telesne tečnosti, održavanog na 37 °C tokom 3, 5 i 10 dana. SBF se svakodnevno pažljivo menjao da bi se održala koncentracija jona. Svaki od uzoraka je nežno ispran dejonizovanom vodom i osušen na 37 °C pre karakterizacije SEM i XRD metodama.

4.7. METODE KARAKTERIZACIJE

4.7.1. Difrakcija X-zraka

Difrakcija X zraka (engl. *X-ray Diffraction, XRD*) je tehnika pomoću koje je moguće dobiti informacije o međuatomskim rastojanjima unutar kristalne rešetke ispitivanog materijala [345]. Ova tehnika se zasniva na usmeravanju snopa monohromatskog rendgenskog zračenja ka ispitivanom materijalu i snimanju odgovora materijala, pri čemu rasuti X zraci iz uređenih atoma kristalne rešetke međusobno interferiraju dajući izražene difrakcione signale u određenom pravcu. Ovi pravci difrakcije snopa monohromatskih X zraka su u direktnoj vezi sa oblikom i dimenzijama jedinične ćelije kristalne rešetke, a sam intenzitet difrakcije zavisi od rasporeda atoma unutar jedinične ćelije. Međuatomsko rastojanje u jediničnoj ćeliji kristalne rešetke d , upadni ugao θ i talasna dužina X-zraka λ su međusobno povezani putem Bragove jednačine (4.2):

$$d = \frac{\lambda}{\sin 2\theta} \quad (4.2)$$

Primenom metode merenja difrakcije X zraka moguće je napraviti razliku između amornih i kristalnih materijala. Amorfni materijali ne pokazuju karakteristične pikove već difuzione razvučene pikove sa manje ili više pravilnim baznim linijama, dok kristalni materijali pokazuju karakteristične pikove koji su specifični za svaki kristalni tip supstance. Upravo usled navedenih karakteristika, metodom difrakcije X zraka pod širokim uglom se mogu detektovati polimorfni oblici različitih materijala. Difraktogrami svake određene supstance stoga predstavljaju svojevrsan otisak prsta te supstance, bilo ona kristalna ili amorfna. Upoređivanjem difraktograma nepoznatog uzorka sa difrakcionim šablonima poznate supstance može se izvršiti identifikacija nepoznate supstance [346].

Difrakcijom X zraka su ispitivani fazni sastavi i strukturne promene HAp, ACP i ACP/ChOL prevlaka pre i posle potapanja i držanja u SBF rastvoru. Za ova ispitivanja je korišćen Philips PW 1051 difraktometar proizvođača Royal Philips, Amsterdam, Holandija sa Ni filterovanim Cu K α zračenjem talasne dužine $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. Tehnika skeniranja u rasponu uglova od $2\theta = 10\text{--}80^\circ$ uz interval merenja od $0,05^\circ$ je korišćena za merenje stepena difrakcije, a vreme snimanja je iznosilo 50 s za svaku tačku. Fazna analiza rezultata je urađena upoređivanjem i korišćenjem PDF-2 (Powder Diffraction File) podataka iz dostupnih baza podataka upotrebom komercijalnog kompjuterskog programa EVA V.9.0.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

U cilju utvrđivanja srednje vrednosti veličine kristalita (D_p) korišćena je Šererova jednačina (4.3). Šererova jednačina je korišćena na (002) kristalnoj ravni i uglu difrakcije $2\theta = 25,8^\circ$:

$$D_p = \frac{K\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (4.3)$$

gde je D_p veličina kristalita, K koeficijent koji iznosi 0,9, λ talasna dužina, $\beta_{1/2}$ širina XRD pika na poluvisini i θ ugao difrakcije.

4.7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija i visoko-rezoluciona skenirajuća elektronska mikroskopija

Metoda skenirajuće elektronske mikroskopije (*eng.* SEM) je korišćena za ispitivanje morfologije površina HAp, ACP i ACP/ChOL prevlaka na titanskim supstratima. Za ispitivanje morfologije su korišćeni SEM JEOL JSM-5800 pri naponu struje na vlaknu od 20 keV i visoko-rezolucioni skenirajući elektronski mikroskop (*eng.* FE-SEM) TESCAN MIRA 3 XMU takođe pri naponu struje na vlaknu od 20 keV. Morfologija prevlaka je ispitivana pre i posle potapanja i držanja u SBF rastvoru. U cilju povećanja provodnosti uzoraka, a pre snimanja, na uzorke je nanet sloj zlata na naporivaču Polaron SC502 Sputter coater. Hemijski sastav HAp, ACP i ACP/ChOL prevlaka je određen energetsom disperzionom spektroskopijom (EDS) na SEM JEOL JSM-5800 na koji je povezan SiLi detektor karakterističnih rendgenskih zraka proizvođača Oxford Instruments, Velika Britanija. Rad SiLi detektora je kontrolisan Isis 3.2 softverskim paketom.

4.7.3. Spektroskopija infracrvene svetlosti sa Furijeovom transformacijom u modu totalne refleksije

Metoda infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom u ATR modu (*eng.* ATR-FTIR) je korišćena za ispitivanje valentnih vibracija važnih funkcionalnih grupa na površini HAp, ACP i ACP/ChOL prevlaka na titanu pre i posle potapanja i držanja u SBF rastvoru tokom 10 dana. Za ATR-FTIR merenja korišćen je Michelson MB Serija Bomen infracrveni spektrometar proizvođača Artman Braun. Snimanja su rađena u oblasti talasnih brojeva od 500 do 3800 cm^{-1} , a rezolucija snimanja je bila 4 cm^{-1} . Rezultati su usrednjeni i tako prikazani.

4.7.4. Merenje adhezije kalcijum fosfatnih prevlaka na titanske supstrate

Adhezija je ispitivana *ad hoc* kvalitativno i kvantitativno. Kvalitativno ispitivanje adhezije je primenjeno kod upoređivanja kataforetskih HAp i *in situ* anaforetskih anHAp/TiO₂ prevlaka. *Ad hoc* kvalitativno ispitivanje adhezije je testirano pomoću ultrazvučnog tretmana (UZ), tako što su istaloženi catHAp i anHAp/TiO₂ uzorci potopljene u čaše sa dvostruko dejonizovanom vodom, a čaše su potopljene u UZ kupatilo SONICOR S-101 snage 130 W sa 40 kHz piezoelektričnim ultrazvučnim transdjuserom na period od 2 min. Naime, konzistentnost prevlake nakon tretmana u UZ kupatilu posle 2 min je vizuelno ispitana, odnosno posmatralo se da li je i u kojoj količini prevlaka ostala na podlozi. Posle tretmana u UZ kupatilu ispitivanje kvaliteta adhezije i konzistencije kalcijumfosfatnih prevlaka urađeni su precizni zarezni na površini ispitivanih uzoraka. Zarezivanje prevlaka izvedeno je ručno, korišćenjem hirurškog sečiva od martenzitnog hirurškog nerđajućeg čelika 440. *Ad hoc* kvalitativno određivanje adhezije je izvedeno posmatranjem zarezane površine i površine u blizini ogrebotine na SEM mikroskopu.

Kvantitativno određivanje adhezije istaloženih kompozitnih anHAp/TiO₂, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka istaloženih *in situ* procesom anodizacije/anaforetske elektrodepozicije na titanskim supstratima je određeno prema ASTM D 3359-02 standardnoj test metodi za merenje adhezije trakom; test unakrsnog zarezivanja (B), a rezultati ispitivanja adhezije prevlaka su posmatrani pod Olympus CX41 optičkim mikroskopom.

4.7.5. Elektrohemijska merenja

Elektrohemijska impedansna spektroskopija (EIS) je tehnika koja je korišćena za ispitivanje korozijske stabilnosti ACP i ACP/ChOL prevlaka na titanu, kao i za ispitivanje korozijske stabilnosti čistog titana kao referentnog uzorka. Sva elektrohemijska ispitivanja su rađena u rastvoru SBF na temperaturi od 37 °C. Za izvođenje elektrohemijskih potenciodinamičkih i impedansnih spektroskopskih merenja korišćena je prilagođena elektrohemijska ćelija sa tri elektrode. Radna ćelija je imala mogućnost zadavanja i održavanja željene temperature radnog fluida. Radne elektrode su bile ispitivani uzorci (Ti pločica, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na Ti), kontra elektroda je bila platinska mrežica, dok je referentna elektroda bila zasićena kalomelova elektroda (ZKE). Ispitivana površina uzoraka je iznosila 1 cm². Svi izmereni i pomenuti potencijali u elektrohemijskim merenjima su iskazani u odnosu na ZKE. Sva elektrohemijska merenja su urađena uporebom Reference 600™ potenciostata/galvanostata/ZRA (Gamry Instruments Inc., Warminster, PA, USA). Podaci o impedansi snimani su na potencijalu

4. EKSPERIMENTALNI DEO

otvorenog kruga (OCP) u širokom frekvencijskom opsegu (100 kHz – 10 mHz) koristeći 10 mV efektivnu amplitudu sinusoidnog ulaznog napona. Impedansni spektri su analizirani i fitovani pomoću ZView® softvera [347,348]. Potenciodinamička merenja su rađena počevši od katodnog potencijala od -250 mV do anodnog potencijala od 250 mV u odnosu na E_{OCP} , kao i od katodnog potencijala od -1 V do anodnog potencijala od 4 V u odnosu na E_{OCP} . Brzina skeniranja je bila 1 mV/s. E_{OCP} merenja su rađena tokom vremena od 2400 s (40 min), a rezultati su beleženi na svakih 0,5 s ili $\pm 0,001$ mV promene E_{OCP} .

4.7.6. Merenja hrapavosti površine

Hrapavost površine, ili jednostavno hrapavost (RMS), predstavlja jednu od komponenti površinske teksture, a kvantifikuje se odstupanjima u pravcu vektora normalnog na površinu od njenog idealnog oblika. U slučaju kada su odstupanja velika, površina je hrapava, a kada su mala, površina je glatka. Hrapavost površine, Ra , se obično koristi za označavanje i prikazivanje nivoa hrapavosti površine [349]. Hrapavost je važan parametar koji utiče na tribološko ponašanje površina [350].

Linearna hrapavost površine je merena prenosnim uređajem za merenje linearne hrapavosti TR 200 proizvođača Innovatest. Ovaj uređaj radi tako što se vrh, odnosno tip, uređaja postavi na površinu čiju hrapavost treba izmeriti, podese se parametri merenja na uređaju i pritisne se dugme za automatsko merenje i analizu površinske hrapavosti. Kada se meri hrapavost površine, tip se postavlja na deo površine i zatim se tip automatski prevlači po površini konstantnom brzinom. Tip beleži hrapavost površine ostrim vrhom. Hrapavost izaziva pomeranje tipa što rezultuje promenom induktivnih vrednosti indukcionih kalema, čime se stvara analogni signal koji je proporcionalan površinskoj hrapavosti na izlaznom kraju fazno osetljivog ispravljača. Nakon pojačanja i konverzije signala, isti ulazi u sistem za prikupljanje podataka. Nakon toga, prikupljeni podaci se obrađuju digitalnim filtriranjem i izračunavanjem parametara, a rezultati merenja se mogu očitati na LCD ekranu, štampati preko štampača i preneti na računar za dalju obradu.

Parametri hrapavosti koji su mereni upotrebom TR 200 uređaja su:

- Ra - aritmetička srednja vrednost apsolutnih vrednosti odstupanja profila od srednje vrednosti na ukupnoj dužini uzorkovanja (Slika 4.2a i Jednačina 4.4)

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (4.4)$$

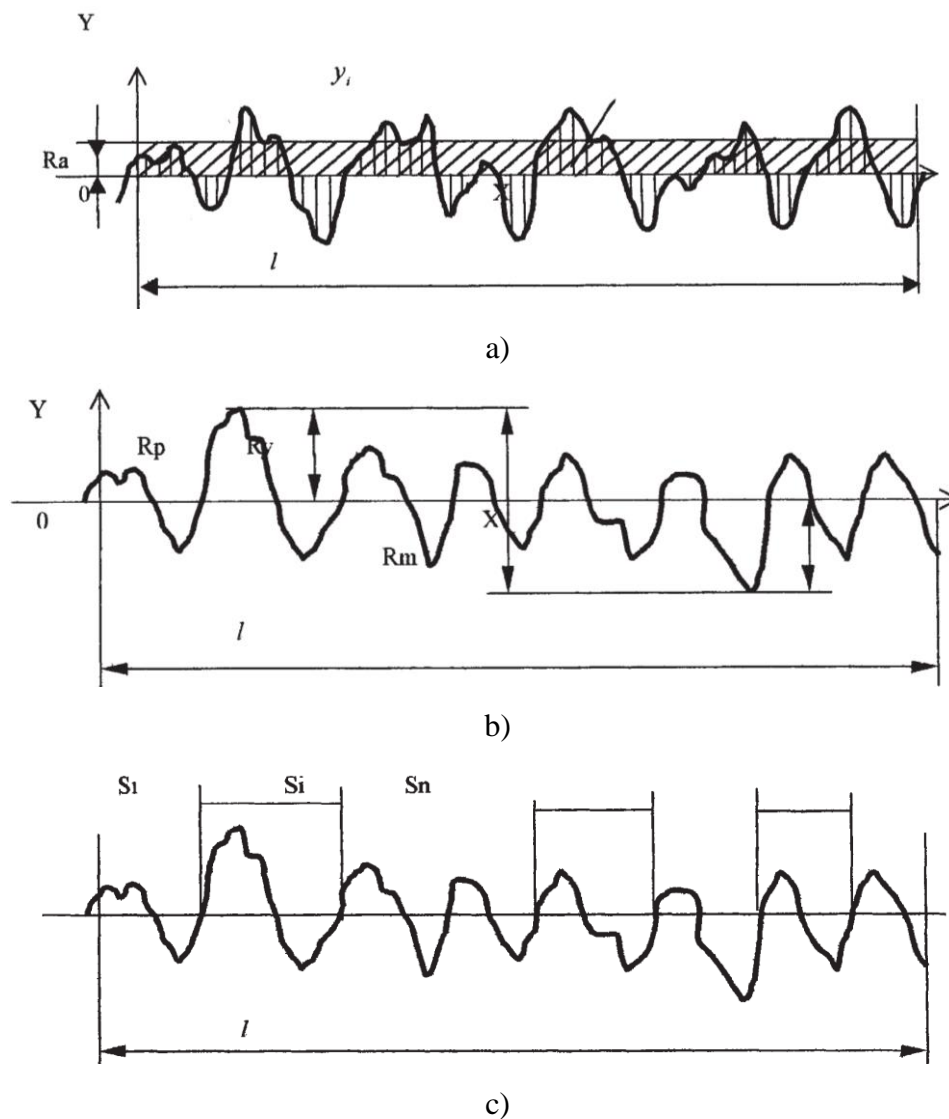
- Rq ili RMS - kvadratni koren aritmetičke srednje vrednosti kvadrata odstupanja profila od srednje vrednosti na ukupnoj dužini uzorkovanja (Jednačina 4.5)

4. EKSPERIMENTALNI DEO

$$Rq = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.5)$$

- Ry - zbir visine najvišeg pika profila od srednje linije i dubine najdublje profilne doline od srednje linije na ukupnoj dužini uzorkovanja (Slika 4.2b)
- Sm - srednji razmak između vrhova profila na srednjoj liniji na ukupnoj dužini uzorkovanja (Slika 4.2c i Jednačina 4.6).

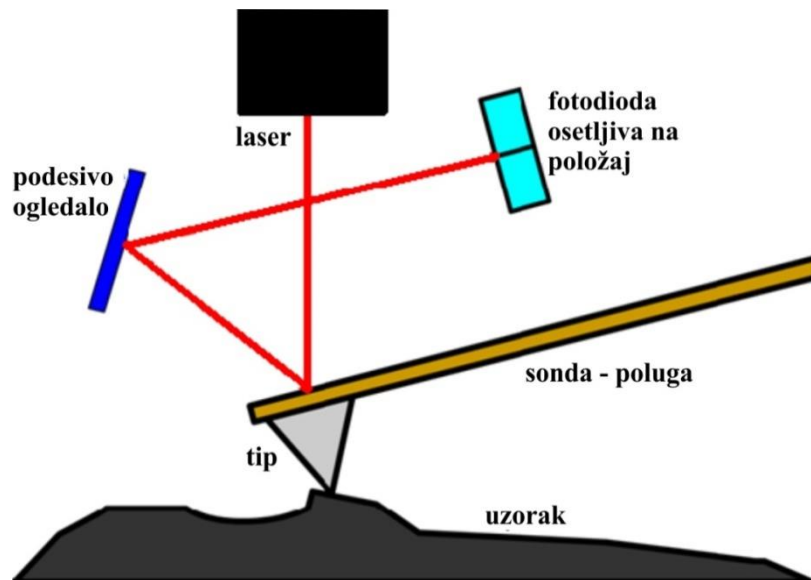
$$Sm = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Si \quad (4.6)$$



Slika 4.2. Razne vrednosti linearne hrapavosti i načini na koje se računaju: a) Ra , b) Ry , i c) Sm

4.7.6.1. Merenja hrapavosti površine (RMS) AFM mikroskopijom

Mikroskopija atomskih sila (AFM) je vrsta mikroskopije gde se sonda može koristiti u fizičkom kontaktu sa supstratom radi dobijanja topografskih podataka kao i svojstava materijala. Pomeraji sonde se beleže pomoću refleksije laserskog zraka koji se odbija sa gornje strane sonde na fotodiodu koja je osetljiva na položaj zraka. Princip rada AFM mikroskopa je prikazan na Slici 4.3. Postolje sa uzorkom se obično pokreće pomoću piezoelektričnog materijala na čiju morfologiju utiče električno polje. Piezoelektrični materijali imaju svojstvo da promena električnog polja uzrokuje male i izrazito precizne pokrete sonde. Sposobnost preciznog i brzog pomeranja sonde predstavlja važnu karakteristiku SPM-a poznatu i kao povratna sprega. U slučaju SPM-a ili AFM-a, povratne sprege se koriste u cilju održavanja sila, udaljenosti, struja, amplituda, i dr. konstantnim.



Slika 4.3. Šematski prikaz rada AFM mikroskopa

Sve je važnije karakterisati hrapavost površine na nanometarskoj skali, pa i na manjoj. AFM je jedina tehnika koja nudi neuporedivu trodimenzionalnu prostornu rezoluciju i mogućnost morfoloških merenja većine vrsta materijala. AFM pruža potpunu 3D kvantifikaciju površine snimanjem topografije (visine) površine.

Topografije dobijenih polimernih kompozita su ispitivane mikroskopom za merenje atomskih sila, tip "Nanoscope III" AFM "Multi Mode Scanning Probe Microscope", proizvođača "Digital Instruments" u kontaktnom modu. Podaci mikroskopije obrađeni su softverom NanoScope Analysis i dobijene su informacije o površinskoj hrapavosti površine.

4.8. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNIH SVOJSTAVA

PREVLAKA

Antibakterijska svojstva i antimikrobna aktivnost multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL ispitivana su na Gram-pozitivnan soj patogenih bakterija *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 i Gram-negativan soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ATCC 15692, na Mueller Hinton Broth (MHB) tečnoj hranljivoj podlozi metodom utrljavanja. Kolonije bakterijskih sojeva (*P. aeruginosa* PAO1 i *S. aureus*) su temperirane na 37 °C i ostavljene preko noći bez aeracije da bi se dobila prekončna bakterijska kultura. Izmerena je optička gustina prekončne kulture upotrebom monohromatske svetlosti talasne dužine 600 nm, a zatim je optička gustina podešena na 0,4 razblaživanjem sa MHB medijumom da bi se dobilo 10⁸ bakterija po ml [351]. Ove prekončne kulture su dalje razblaživane. Serijska razblaženja uzoraka su mešana sa rastopljenim Luria-Bertani (LB) agarom i sipana u petri šolje, odakle su dalje uzimani alikvoti na početku eksperimenta i uzastopno svakog sata tokom 7 sati inkubacije. Netretirane i nemodifikovane Ti pločice su korišćene kao kontrola (slepa proba). Za utvrđivanje krive rasta merenjem optičke gustine bakterija korišćen je spektrofotometar MRC UV-6300PC Double Beam, Izrael.

U cilju određivanja broja bakterijskih ćelija na kraju eksperimenta, bakterije koje su se razvile posle 420 minuta inkubacije (poslednja dva merenja) posejane su na sterilne čvrste MHA hranljive podloge. Zasejano je po 100 µl sadržaja iz erlenmajera koji je razblažen kako bi se dobio prebrojiv broj kolonija na petri šolji, a sve je utrljano sterilnim staklenim štapićem. Razređenja su napravljena korišćenjem 0,01 M MgSO₄. Petri šolje su inkubirane 16 sati na 37 °C, nakon čega je prebrojan broj izraslih kolonija na osnovu koga je, određen broj bakterija u mililitru uzorka pomoću Jednačine 4.7.

$$N = \frac{n}{r * V} \quad (4.7)$$

Gde je n broj ćelija po ml uzorka, N broj prebrojanih kolonija na petri šolji, r je razblaženje stoka koji je korišćen a V je zapremina koja je zasejana u mililitrima.

U autoklavu sterilisane su i hranljive podloge. Sterilizacija svih uzoraka i hranljivih podloga rađena je u autoklavu vodenom parom pod pritiskom od 1 bar na temperaturi od 121 °C u vremenu od 20 minuta.

4.9. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI PREVLAKA

4.9.1. Čelijske linije

Ispitivanja su izvršena na ćelijskoj liniji humani fibroblasti pluća (MRC-5), koje rastu zalepljene za podlogu suda (Costar, 25cm³) u medijumu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) sa 4,5 g/l glukoze i 10 % FCS (fetal calf serum, Sigma). Medijum sadrži antibiotik-antimikotik rastvor (Sigma). Čelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5 % CO₂ (Heraeus). Presađivana je dva puta nedeljno a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1 % tripan plavim [352]. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90 %.

4.9.2. Testovi za ispitivanje citotoksičnosti

DET (Dye exclusion test) i kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test) su korišćeni za ispitivanje preživljavanja ćelija humanih fibroblasta pluća (MRC-5) [353]. MTT test je baziran na 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidu (MTT) koji metabolišu samo žive ćelije i pri merenju aktivnosti sukcinil dehidrogenaze u mitohondrijama vijabilnih ćelija se može proceniti broj preživelih ćelija.

4.9.2.1. DET (*Dye exclusion test*)

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje (Center well, Falcon) na ispitivane uzorke ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanu u koncentraciji 2×10⁵ ml⁻¹. U kontrolnim uzorcima nije bilo supstanci. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ narednih 48 h. Po isteku inkubacije, nakon 48 h vrši se brojanje ćelija uz pomoć invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je Neubauerova komorica gde se ćelije broje u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata tako da ih ima ukupno 64. Dalje se uzima 100μl ćelija i tome doda 100μl boje 0,1 % tripan-plavo. Promućka se intenzivno i nekoliko kapi nanese na oba polja komorice za brojanje. Tripan-plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju nebojene. Broj ćelija u 1 ml suspenzije se izračunava iz Jednačine 4.8:

4. EKSPERIMENTALNI DEO

$$X = x \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000 \quad (4.8)$$

gde je 10 dubina komore, 2 faktor razblaženja, 1000 je zapreminski koeficijent a x predstavlja broj ćelija u 16 kvadrata (prosečan broj ćelija u 4×16 kvadrata).

Citotoksičnost je računata prema Jednačini 4.9, a izražava se u procentima. Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti, a računa se prema Jednačini 4.10.

$$CI = (1 - N_s/N_k) \times 100 \quad (4.9)$$

$$\%K = (N_s/N_k) \times 100 \quad (4.10)$$

U Jednačinama 4.9 i 4.10 promenljive imaju sledeće značenje: CI je citotoksičnost, N_k predstavlja broj ćelija u kontrolnim uzorcima, N_s je broj ćelija u ispitivanim uzorcima, a $\%K$ je frakcija preživelih ćelija, uzoraka sa ispitivanom supstancom.

4.9.2.2. Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test)

Ćelije su skupljane u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1 % tripan plavom [354]. Vijabilne ćelije su posejane u petrijeve šolje (50mm, Center well, Falcon) u koje su stavljani ispitivani uzorci ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanu, u koncentraciji 2×10^5 ml⁻¹. Kontrolni uzorci nisu sadržali ni jednu od ispitivanih supstanci, uključujući čist titan. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ narednih 48 h. Po isteku inkubacije urađeno je presejavanje ćelija sa ispitivanih supstanci u svež medijum. Vijabilne ćelije su posejane (5×10^3 na 100µl) u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ narednih 48 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre ispitivanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µl po otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 µl 0.04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost je računata prema Jednačini 4.11, a izražava se u procentima. Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti, a računa se prema Jednačini 4.10.

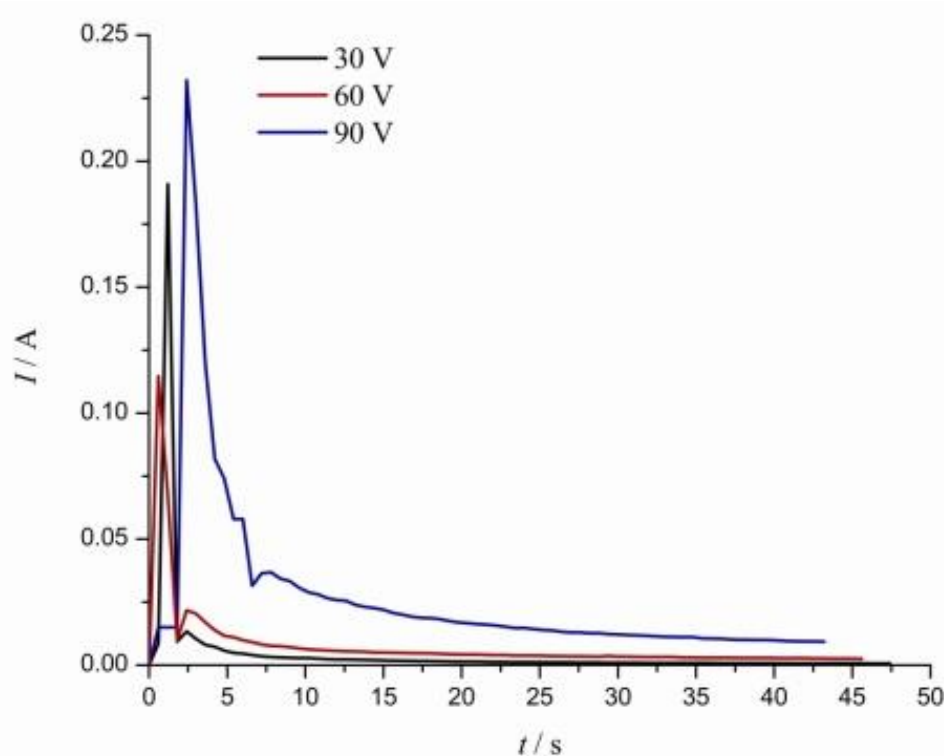
$$CI = (1 - A_s/A_k) \times 100 \quad (4.11)$$

U Jednačini 4.11 promenljive imaju sledeće značenje: CI je citotoksičnost, A_k je apsorbancija kontrolnih uzoraka, a A_s je apsorbancija ispitivanih uzoraka.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. OPTIMIZACIJA PARAMETARA TALOŽENJA - ANODIZACIJA TITANA

Kako bi se ispitaio uticaj napona na morfologiju površine pri procesu anodizacije titanskog supstrata, bilo je potrebno definisati količinu naelektrisanja koju primi titanska anoda prilikom procesa anodizacije kao konstantu. Razlozi izvođenja procesa anodizacije titanskog supstrata primenom 1,13 C električnog naelektrisanja na anodi su velika brzina i kratko vreme procesa anodizacije kada se proces anodizacije izvodi na 90 V. Budući da je proces vrlo brz kada se izvodi na 90 V, produženjem vremena izvođenja anodizacije, odnosno povećanjem električnog naelektrisanja koji prima Ti anoda, smanjuje se greška merenja. Ova karakteristika se može videti na Slici 5.1 na kojoj je prikazana primenjena struja na anodi u odnosu na vreme anodizacije u prvih 50 sekundi procesa.



Slika 5.1. Prikaz struje primenjene na anodi u odnosu na vreme u prvih 50 sekundi postupka anodizacije. Površina Ti supstrata iznosi 2 cm^2

Sa Slike 5.1 se uočava strujni pik koji se javlja u prvim sekundama procesa anodizacije, kada se i odigra najveći deo procesa anodizacije i kada je najveći deo količine naelektrisanja prenesen na anodu. Kako se formira neprovodni oksidni sloj titana na površini supstrata, jačina

5. REZULTATI I DISKUSIJA

struje brzo opada i potom nastavlja sa trendom konstantnog opadanja tokom izvođenja eksperimenta [263,355,356]. Ukupna količina naelektrisanja primenjena na anodi se može izračunati integraljenjem krive $I=I(t)$, pri čemu integral predstavlja površinu ispod krivih $I=I(t)$. Površine ispod početnih pikova anodizacije, koje pokazuju količine naelektrisanja primenjenih na anodi u prvim sekundama sprovođenja eksperimenata, su: 0,154 C za 30 V, 0,208 C za 60 V i 0,843 C za 90 V. Dakle, za primenu količine naelektrisanja od 1,13 C na anodi je bilo potrebno 5235 sec za 30 V, 1785 sec za 60 V i samo 49 sec za 90 V.

Tabela 5.1 prikazuje vremensku raspodelu za primenu različitih količina naelektrisanja na uzorke titanskih supstrata pri različitim naponima anodizacije.

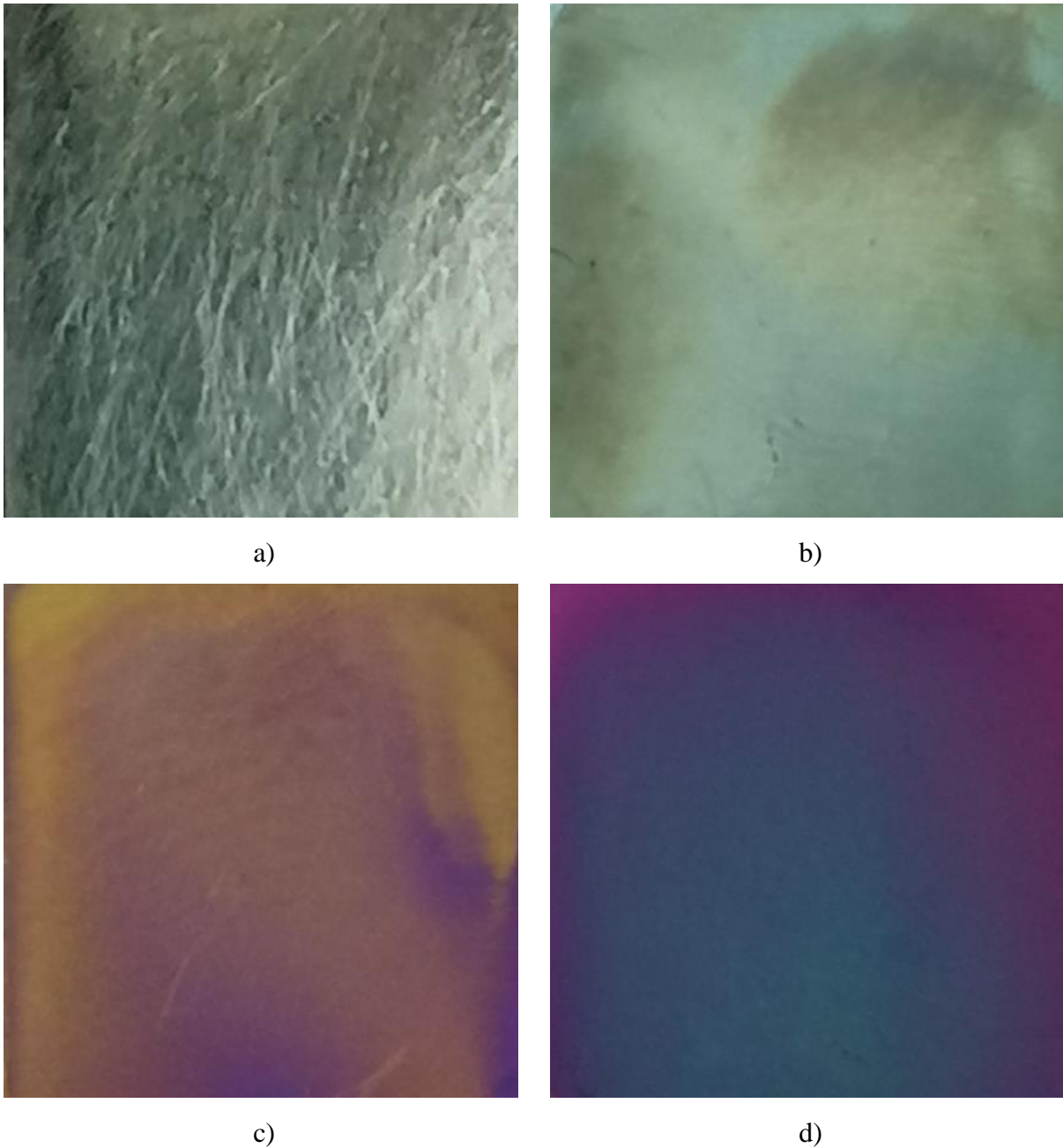
Tabela 5.1. Raspodela vremena za primenu količine naelektrisanja na anodi tokom procesa anodizacije za različite napone

Količina naelektrisanja, C	Napon anodizacije, V		
	30	60	90
	Vreme, s		
0,90	4211	1039	30
1,00	4747	1403	39
1,13	5235	1785	49

Slika 5.2 prikazuje izgled neobrađene površine titana, kao i anodizovanih titanskih supstrata pri različitim naponima anodizacije, odnosno pri 30 V, 60 V i 90 V. Neanodizovana polirana Ti pločica je metalnosive boje sa metalnim ogledalskim sjajem (Slika 5.2a). Međutim, posle procesa anodizacije na 30 V podloga postaje tirkizna, pri čemu je bilo potrebno 5235 s da bi Ti supstrat primio količinu naelektrisanja od 1,13 C (Slika 5.2b). Ova promena boje ukazuje da se na površini formirao oksidni sloj. Povećanjem primenjenog napona na površini titana na 60 V, pri čemu je primenjena količina naelektrisanja bila konstantna i iznosila 1,13 C, površina anodizovanog sloja postaje narandžasta, sa primesama ljubičastih mrlja na površini narandžastog oksidnog sloja (Slika 5.2c). Ova promena boje ukazuje da se stvorio novi oksidni sloj za koji je bilo potrebno 1785 s kako bi titanska pločica primila već pomenutu količinu naelektrisanja. Daljim povećanjem napona anodizacije na 90 V, površina titana poprima tamnoplavu boju, pri čemu su ivice i dalje ljubičaste (Slika 5.2d). Vreme potrebno za primanje količine naelektrisanja od 1,13C je iznosilo samo 49 s. Može se zaključiti da se boja oksidnog sloja anodizovanog titanskog supstrata koji primi količinu naelektrisanja od 1,13 C menja od tirkizne do žute, potom narandžaste, ljubičaste i na kraju tamnoplave [357,358]. Nepostojanje jednolične boje se može objasniti primarnom raspodelom gustine struje, pri čemu gustina struje nije ista u centru podloge i na ivicama [359]. Usled primarne

5. REZULTATI I DISKUSIJA

raspodele gustine struje, ukupna struja i količina naelektrisanja primenjene na titanskom supstratu nisu iste u svakoj tački podloge.



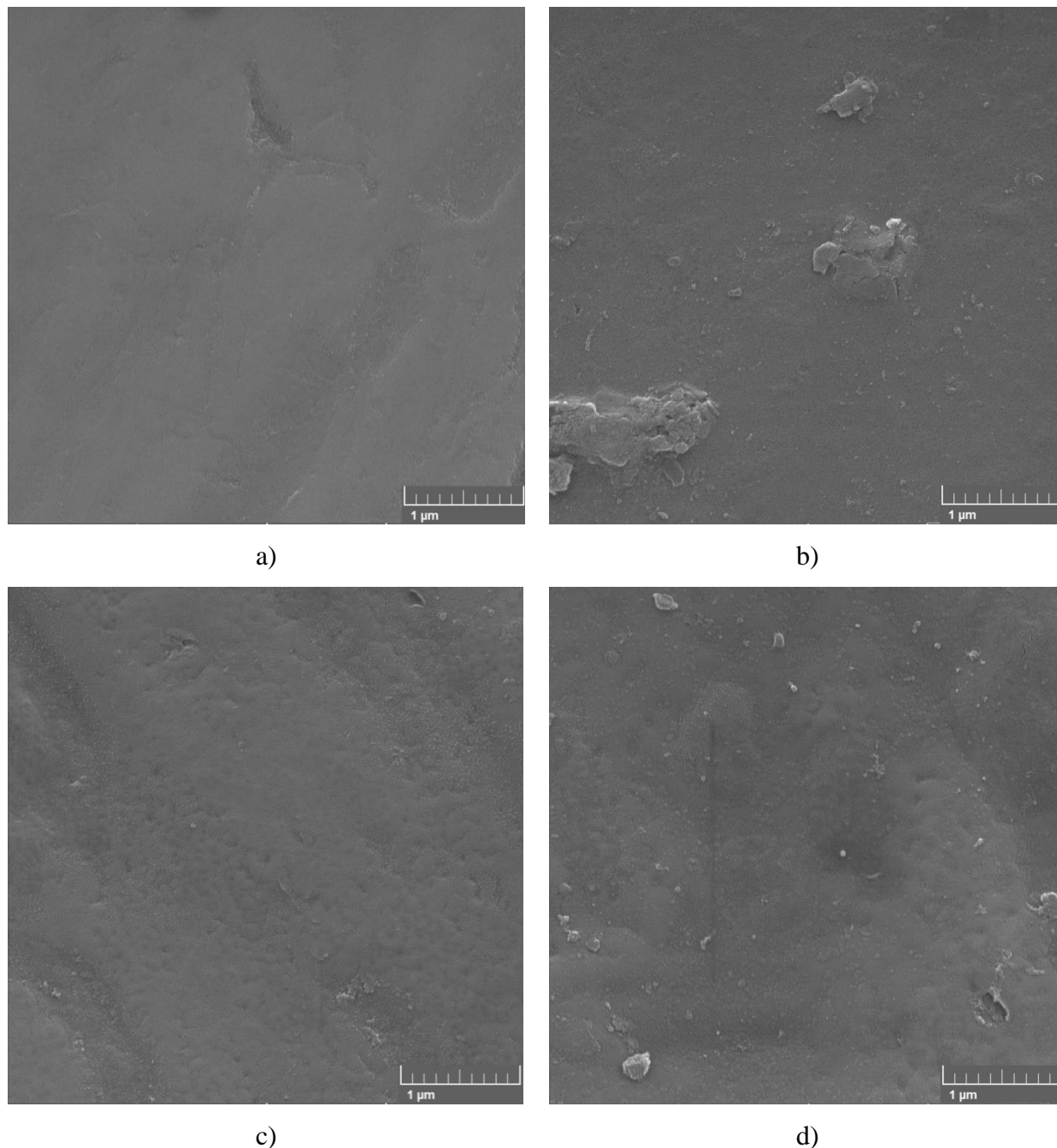
Slika 5.2. Slike sa optičkog mikroskopa titanskog supstrata a) poliranog, bez anodizacije, b) anodizovanog na 30 V, c) anodizovanog na 60 V i d) anodizovanog na 90 V.

Veličina slika je 5×5 mm

Slika 5.3 prikazuje FE-SEM slike površinskih morfologija titanske podloge i anodnih oksidnih filmova dobijenih primenom različitih napona tokom procesa anodizacije, održavajući primenjenu količinu naelektrisanja na anodi konstantnim. Pre anodizacije, površina poliranog

5. REZULTATI I DISKUSIJA

uzorka je glatka i homogena (Slika 5.3a). Povećanjem napona anodizacije može se primetiti povećanje hrapavosti površine za 30 V i 60 V (Slike 5.3b i 5.3c), dok, iako vizuelno izgleda da se hrapavost povećava za 90 V, istina je da dolazi do izravnavanja površine (Slika 5.3d), što je potvrđeno linearnim i površinskim analizama hrapavosti (Slike 5.26 i 5.27d i Tabele 5.10 i 5.11).



Slika 5.3. FE-SEM slike koje prikazuju površinsku morfologiju a) neanodizovanog titanskog supstrata i anodnih oksidnih filmova na titanu dobijenih anodizacijom na b) 30 V, c) 60 V i d) 90 V

Morfologija površine titanskog uzorka anodizovanog na 30 V, što odgovara Slici 5.3b, pokazuje da proces anodizacije na 30 V dovodi do stvaranja kompaktnog oksidnog sloja na površini

Ti supstrata, sa malim ispupčenjima koja odgovaraju sekundarnim oksidnim česticama. Ova ispupčenja zaista predstavljaju sekundarne oksidne čestice, jer je razlika između njih i primarnog oksidnog sloja evidentna. Izvođenje postupka anodizacije na 60 V dovodi do potpunog prekrivanja površine titana sekundarnim oksidnim slojem, a podloga dobijena procesom anodizacije na 60 V ima povećanu hrapavost u odnosu na neanodizovanu Ti pločicu i Ti pločicu anodizovanu na 30 V. Ova karakteristika se može videti na Slici 5.3c. S druge strane, anodizacija na 90 V još više modifikuje hrapavost površine supstrata (Slika 5.3d), u smislu da površina postaje glađa. Pikovi i doline se horizontalno šire, odnosno šupljine se ispunjavaju, te proces na 90 V smanjuje RMS hrapavost. Detaljnija analiza RMS hrapavosti je opisana u Poglavlju 5.5.

5.2. KATAFORETSKO TALOŽENJE HAP I *IN-SITU* ANODIZACIJA/ANAFORETSKO TALOŽENJE KALCIJUM FOSFATNIH PREVLAKA

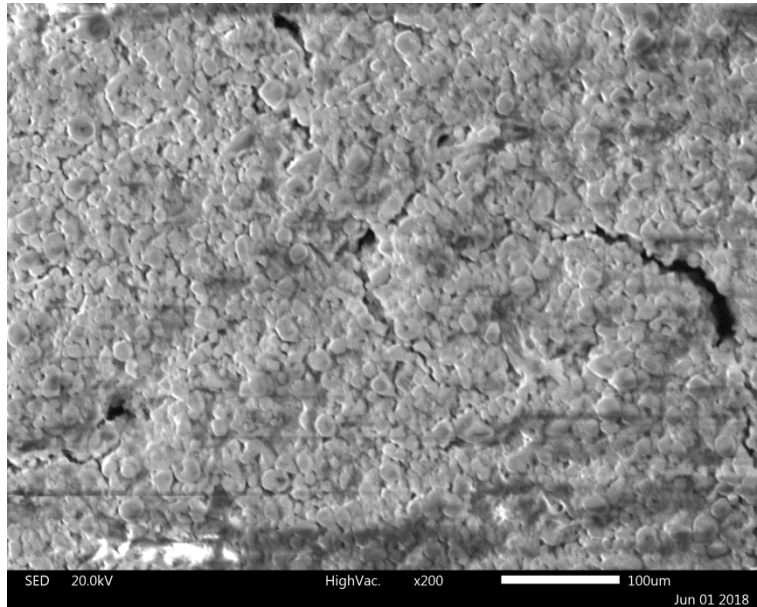
Posle analize rezultata anodizacije titanskih supstrata, što je objašnjeno u Poglavlju 5.1., odlučeno je da se svi eksperimenti kataforetskog taloženja hidroksiapatita, *in-situ* anaforetske sinteze hidroksiapatitnih/titan oksidnih i *in-situ* anaforetske sinteze amorfnihi kalcijum fosfatnih/titan oksidnih prevlaka izvode na 60 V. Napon od 60 V je izabran iz razloga što je anodizacijom titana na ovom naponu dobijena najhrapavija površina supstrata. Eksperimenti kataforetskog i *in situ* anaforetskog taloženja su postavljeni kao što je opisano u Poglavlju 4.

5.2.1. Morfološka analiza uzoraka HAp prevlaka

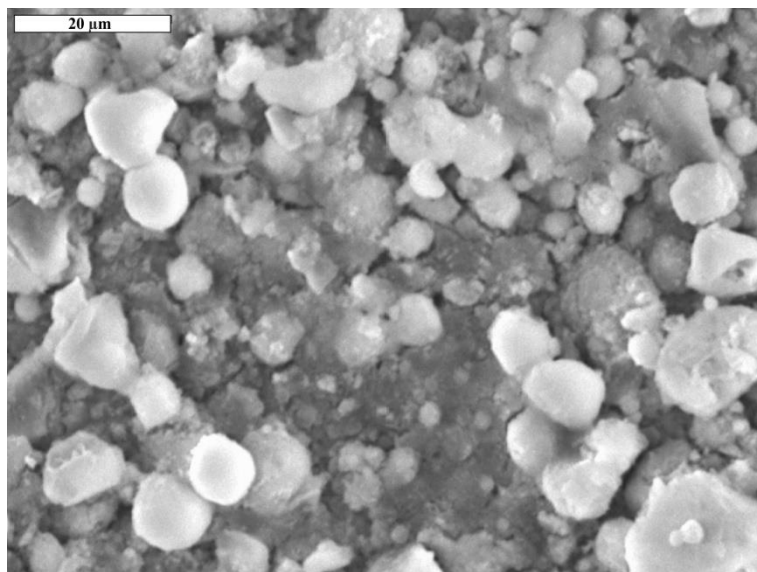
SEM slike kataforetski nanese HAp prevlake pod eksperimentalnim uslovima navedenim u eksperimentalnom delu prikazani su na Slici 5.4. Sa Slike 5.4a se vidi da kataforetski nanese HAp prevlaka (catHAp) sadrži veći broj pukotina. Detaljna morfološka struktura catHAp prevlake sa većim uvećanjem SEM mikroskopa prikazana je na Slici 5.4b. Sa slike se može videti da catHAp ima zrnastu strukturu. Pukotine na prevlaci koje se mogu videti na Slici 5.4a uglavnom nastaju usled različitih mehaničkih svojstava podloge i prevlake. Razlika se prvenstveno javlja kod Jungovog modula elastičnosti keramičke catHAp prevlake i titanske podloge, a potom kod različite tvrdoće, krutosti i koeficijenta termičke provodnosti dva materijala. U slučaju catHAp prevlaka, titan je elastičniji od keramičke hidroksiapatitne prevlake. Tipično ponašanje velike većine keramičkih suspenzija tokom sušenja je gubitak vode koji dovodi do stvaranja pukotina u keramičkim prevlakama. Postupak otpuštanja vode, kako iz suspenzije, tako i iz prevlake, se odvija

5. REZULTATI I DISKUSIJA

na granici između keramike i supstrata, kao i u većem delu materijala. Kako se površina keramičke prevlake skuplja stvaraju se pukotine na njenoj površini, čak i pri niskim temperaturama. Utvrđeno je da catHAp prevlake imaju izrazito slabu adheziju ako se nanose na netretiranu titansku površinu. Kao što je napomenuto u Poglavlju 2, adhezija kataforetskih keramičkih prevlaka se delimično poboljšava njihovim sinterovanjem na povišenim temperaturama.



a)



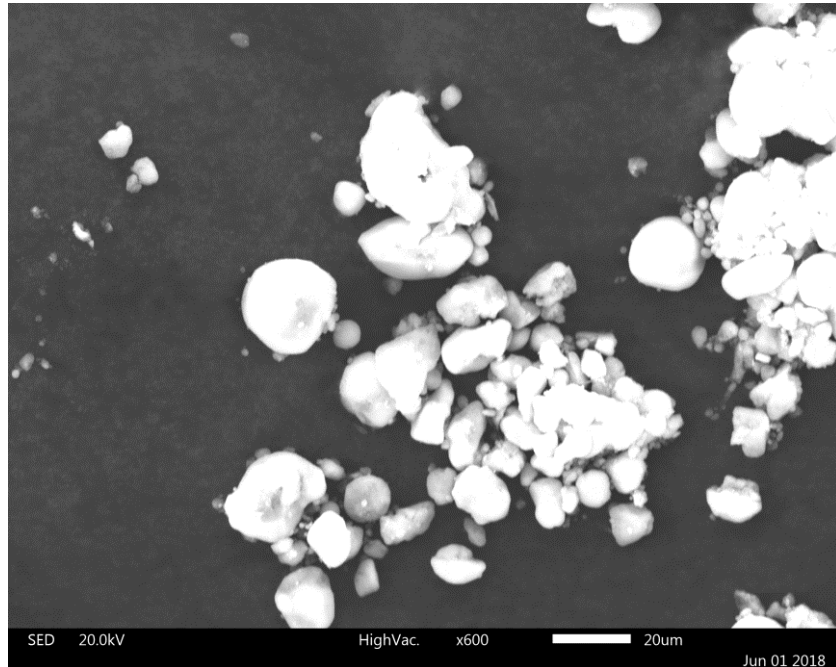
b)

Slika 5.4. SEM slike catHAp prevlake : a) uvećanje $\times 200$, b) uvećanje $\times 1500$

Ispitivanje adhezije catHAp prevlaka na titanu je kvalitativno testirano pomoću ultrazvučnog tretmana (UZ), tako što su istaloženi catHAp uzorci potopljeni u čašu sa dvostruko dejonizovanom vodom, a ta čaša je potopljena u UZ kupatilo 2 minuta. Naime, konzistentnost

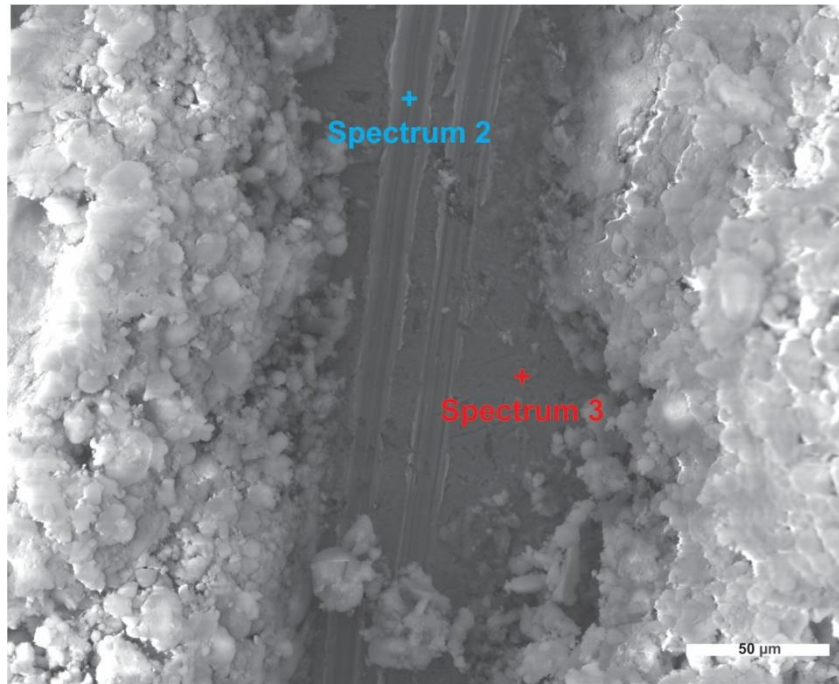
5. REZULTATI I DISKUSIJA

prevlake nakon tretmana u UZ kupatilu posle 2 minuta je vizuelno ispitana, odnosno posmatralo se da li je i u kojoj količini prevlaka ostala na podlozi. Pokazano je da proces ultrasonifikacije dovodi do gotovo potpunog odvajanja catHAp prevlake, a morfologija delaminirane catHAp prevlake se može videti na Slici 5.5.



Slika 5.5. SEM slika delaminirane catHAp prevlake u obliku praha koja je dobijena nakon tretmana uzorka ultrazvukom

U cilju ispitivanja kvaliteta HAp prevlake, odnosno adhezije i konzistencije titanskih uzoraka na koje je nanesen catHAp, na površini ispitivanih uzoraka urađeni su precizni zarezi. Zarezivanje catHAp prevlake izvedeno je ručno korišćenjem hirurškog sečiva od martenzitnog hirurškog nerđajućeg čelika 440. Adhezija je kvalitativno određena posmatranjem zarezane površine i površine u blizini ogrebotine na SEM slikama. Slika 5.6. prikazuje SEM mikrofotografiju catHAp prevlake, gde su crvenom i plavom bojom obeležena mesta na kojima su urađena EDS merenja catHAp uzorka.



Slika 5.6. SEM slika zagrebane površine catHAp prevlake sa mestima na kojima je izvršeno EDS merenje

Može se videti da zarezivanje u potpunosti uklanja sloj catHAp prevlake, otkrivajući samu titansku podlogu u blizini ogrebotine. Upoređujući morfologiju catHAp prevlake sa zarezanim uzorkom, mogu se utvrditi sledeće stvari: postupak zarezivanja je otkrio podlogu, pri čemu sam postupak dovodi do delimičnog odvajanja prevlake, odnosno vizuelno se može utvrditi delaminacija. Titanska podloga ispod delaminiranog dela catHAp prevlake ima sličnu strukturu kao čist Ti uzorak (Slika 5.3a). Ove tvrdnje su potvrđene EDS merenjima [99,360,361] čiji rezultati su dati u Tabeli 5.2.

Tabela 5.2. EDS merenja zagrebane površine catHAp prevlake

Zarez	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
catHAp, spektar 2	32.17	-	-	67.83	-
Delaminacija	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
catHAp, spektar 3	58.59	2.34	2.78	36.28	1.19

Na Slici 5.6, spektar 2, može se videti prisustvo samo supstrata, a spektar 3 pokazuje odnos Ca/P od 1,19, pri čemu je morfologija površine kod datog spektra slična Ti supstratu (Slika 5.3a). Ca/P odnos od 1,19 kod uzorka zarezane, odnosno delaminirane catHAp prevlake se objašnjava narušenom kristalnom rešetkom.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

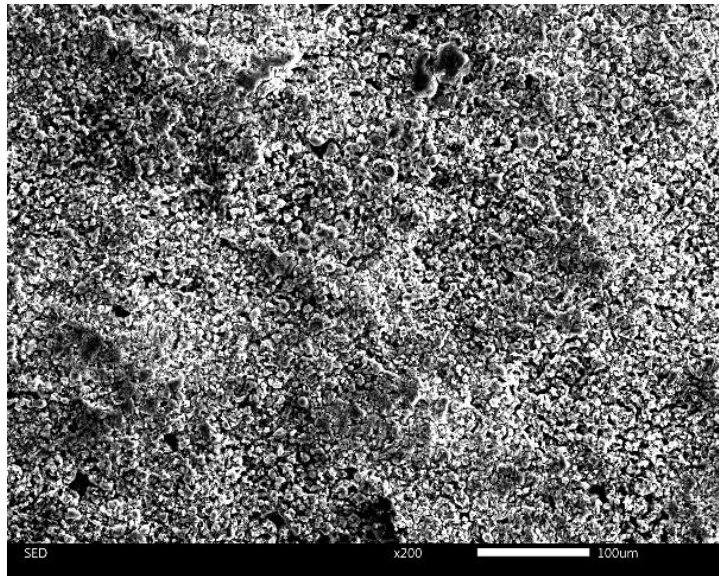
Pored zareza na catHAp prevlaci, EDS merenja su obavljena i na kataforetskim HAp prevlakama na kojima nisu vršena ispitivanja adhezije prevlake na supstrat, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.3. EDS merenja catHAp prevlake pokazuju prisustvo elemenata koji potvrđuju postojanje hidroksiapatita. Ovo se prvenstveno odnosi na Ca/P odnos čija je vrednost 1,71.

Tabela 5.3. EDS merenja catHAp prevlake na titanskom supstratu

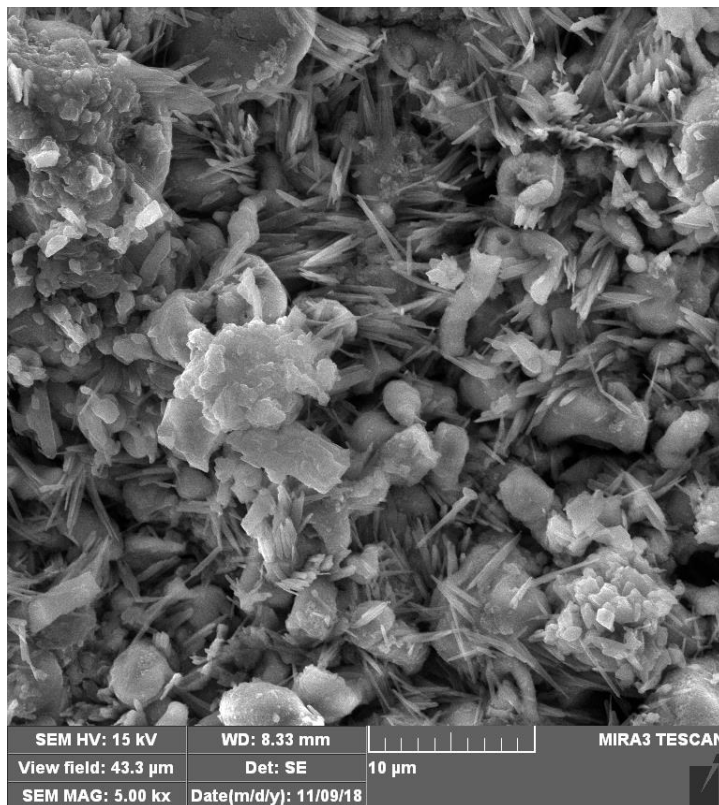
Prevlaka	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
catHAp	65.40	12.74	21.77	0.10	1.71

EDS merenja pokazuju da je Ca/P odnos kod catHAp prevlake veći od stehiometrijskog odnosa HAp (1,67). Iako se zna da je idealni stehiometrijski Ca/P odnos kod hidroksiapatita 1,67, utvrđeno je da postoje stabilne HAp faze u rasponu Ca/P odnosa od 1,3 do 1,8 [312]. Treba napomenuti da EDS merenja nisu previše precizna za utvrđivanje tačne količine i tačnog odnosa kalcijuma i fosfata, ali oni dokazuju prisustvo kalcijum fosfatne faze.

U cilju optimizacije kako procesa nanošenja hidroksiapatitne prevlake, tako i poboljšanja adhezije prevlake za titanski supstrat, taloženje hidroksiapatita je urađeno novom *in situ* anaforetskom metodom sa simultanom anodizacijom površine na način kao što je objašnjeno u eksperimentalnom delu [99,355,356,360–363]. Slika 5.7a prikazuje SEM slike sloja anaforetski istaložene hidroksiapatitne prevlake sa titan dioksidom (anHAp/TiO₂) na titanu, a Slika 5.7b, koja predstavlja SEM mikrofotografiju sa većim uvećanjem od 5000 x, prikazuje detaljnu morfologiju anHAp/TiO₂ kompozitne prevlake na kojoj se mogu uočiti igličasti i zrnati oblici hidroksiapatita. Sa Slike 5.7 se može videti da je došlo do taloženja anHAp/TiO₂ prevlake i, za razliku od catHAp prevlake, ne postoje vidljive pukotine. XRD, FTIR i EDS ispitivanja su potvrdila da je uzrok nastajanja ove kompaktne anHAp/TiO₂ prevlake bez pukotina nov *in situ* metod dobijanja, a rezultati ovih ispitivanja su približnije diskutovani u narednim Poglavljima.



a)



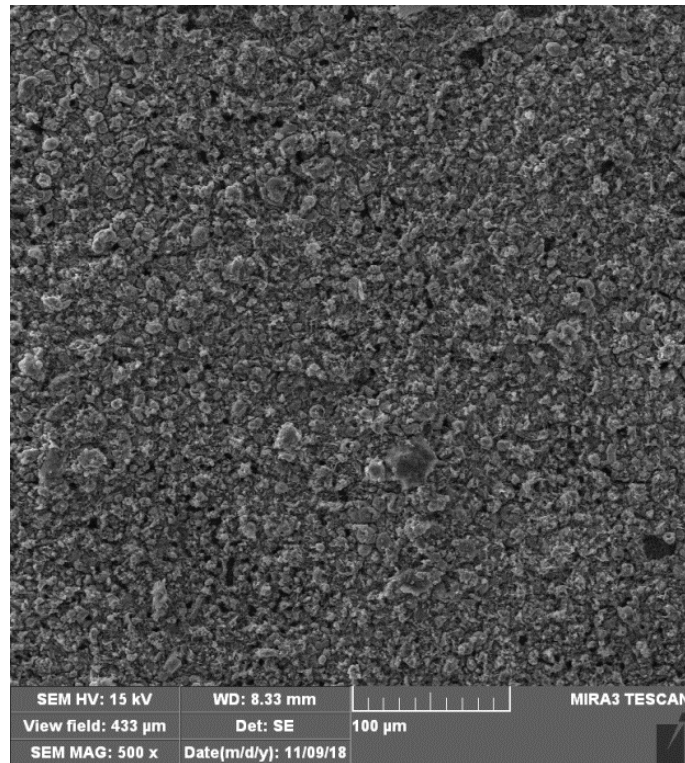
b)

Slika 5.7. SEM slike anHAp/TiO₂ prevlake dobijene novom *in situ* metodom: a) uvećanje × 200 i b) uvećanje × 2000

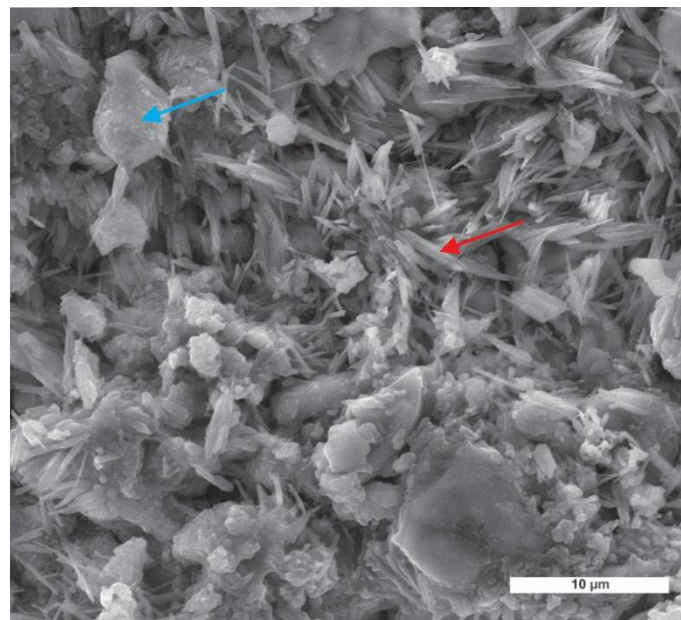
Kao i u kod catHAp uzoraka, adhezija anHAp/TiO₂ prevlake je ispitivana *ad hoc* pomoću ultrazvučnog (UZ) tretmana kao što je opisano u Poglavlju 4. Istaloženi anHAp/TiO₂ uzorak je potopljen u čašu sa dvostruko dejonizovanom vodom koja je potom zaronjena u UZ kupatilo 2 minuta, pri čemu nije došlo do odvajanja (delaminacije) ovakve prevlake. Kvantitativno

5. REZULTATI I DISKUSIJA

određivanje adhezije je opisano u Poglavlju 5.6, dok se iz ovog kvalitativnog eksperimenta može zaključiti da je adhezija anHAp/TiO₂ prevlake na titanski supstrat mnogo bolja nego adhezija catHAp prevlake.



a)



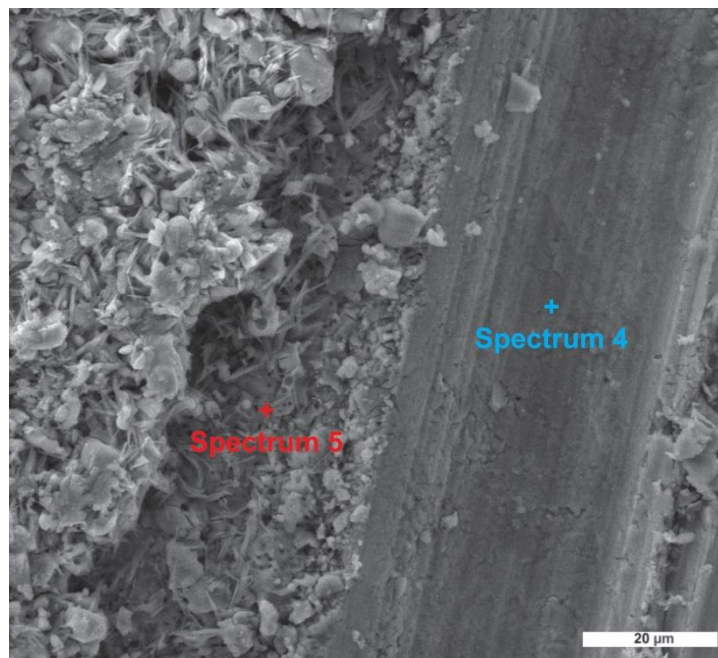
b)

Slika 5.8. FE-SEM slike kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake: a) uvećanje × 500 i b) uvećanje × 5000. Mogu se primeniti različite HAp morfologije

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Slika 5.8. prikazuje FE-SEM slike kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake na titanu. Sa slike 5.8a se vidi da na površini prevlake nema vidljivih pukotina. Formiranje TiO₂ u procesu anodizacije sa istovremenim taloženjem HAp predstavlja razlog zbog koga ne postoje pukotine. Prethodni stav je potvrđen XRD merenjima o kojima će biti reči u Poglavlju 5.3. Sa SEM slike na Slici 5.8b može se videti da se anHAp/TiO₂ prevlaka na titanu sastoji od različitih oblika čestica, tj. igličastih (crvena strelica) i zrnastih (plava strelica). Prilikom *in situ* taloženja anHAp/TiO₂ prevlake na titanu granularne čestice nastaju aglomeracijom rastućih igličastih čestica, koje u stvari u osnovi predstavljaju početni prah hidroksiapatita.

Za ispitivanje adhezije i konzistencije anHAp/TiO₂ prevlake na titanu urađeni su precizni zarezi na površini ispitivanih uzoraka [99,361,362]. Kao i u slučaju catHAp prevlake zarezivanje anHAp/TiO₂ prevlake je izvedeno ručnom metodom korišćenjem hirurškog sečiva od martenzitnog hirurškog nerđajućeg čelika 440. Adhezija je kvalitativno određena posmatranjem zarezane površine i površine u blizini ogrebotine na SEM slikama. Slika 5.9 prikazuje SEM mikrofotografiju sa mestima na kojima su urađena EDS merenja na anHAp/TiO₂ uzorku.



Slika 5.9. SEM slika zagrebane površine kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake sa mestima na kojima je izvršeno EDS merenje

Kao i u slučaju catHAp, kod anHAp/TiO₂ prevlake se može videti da zarezivanje u potpunosti uklanja sloj anHAp/TiO₂ prevlake otkrivajući titanski supstrat. Upoređujući morfologiju anHAp/TiO₂ prevlake sa morfologijom zarezanog uzorka koji na sebi ima anHAp/TiO₂ prevlaku može se zaključiti da zarezivanje otkriva titansku podlogu, sam proces zarezivanja dovodi do

5. REZULTATI I DISKUSIJA

delimične delaminacije anHAp/TiO₂ prevlake, a veličina delaminirane površine je vizuelno znatno manja kod anHAp/TiO₂ prevlake nego kod catHAp prevlake (Slika 5.9 i 5.6). Takođe se može zaključiti da titanska pločica, odnosno supstrat ispod delaminiranog dela anHAp/TiO₂ prevlake, kao i kod catHAp uzorka, ima sličnu strukturu kao anodizovani Ti (Slika 5.3c). Ove tvrdnje potvrđuju se EDS merenjima, a rezultati su dati u Tabeli 5.4.

Tabela 5.4. EDS merenja anHAp/TiO₂ zagrebane površine

Zarez	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
anHAp/TiO ₂ spektar 4	27.55	-	-	72.45	-
Delaminacija	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
anHAp/TiO ₂ spektar 5	62.60	3.26	5.02	29.12	1.54

Na Slici 5.9, spektar 4 se može videti da zarezivanje dovodi do pojave površine titanskog supstrata, a spektar 5 prikazuje prisustvo HAp sa Ca/P odnosom od 1,54, pri čemu je morfologija ove anHAp/TiO₂ prevlake tubularna. Ovaj odnos je približniji stehiometrijskom odnosu Ca i P koji se javlja kod HAp i koji iznosi 1,67, a koji je najstabilniji kalcijum fosfat u telu. Na Slici 5.9 se takođe može primetiti grublji površinski interfejs na delaminiranom delu supstrata sa hidroksiapatitom ugrađenim u rešetku TiO₂ što je potvrđeno XRD ispitivanjima.

Kao i u slučaju catHAp, EDS merenja su obavljena na anHAp/TiO₂ prevlaci, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.5. EDS merenja anHAp/TiO₂ prevlake su rađena kako na granularnim (Slika 5.8b, plava strelica), tako i na igličastim (Slika 5.8b, crvena strelica) zrnima prevlake i oba merenja pokazuju prisustvo elemenata koji potvrđuju postojanje hidroksiapatita sa Ca/P odnosom koji je približan Ca/P odnosu hidroksiapatita u telu.

Tabela 5.5. EDS merenja anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu

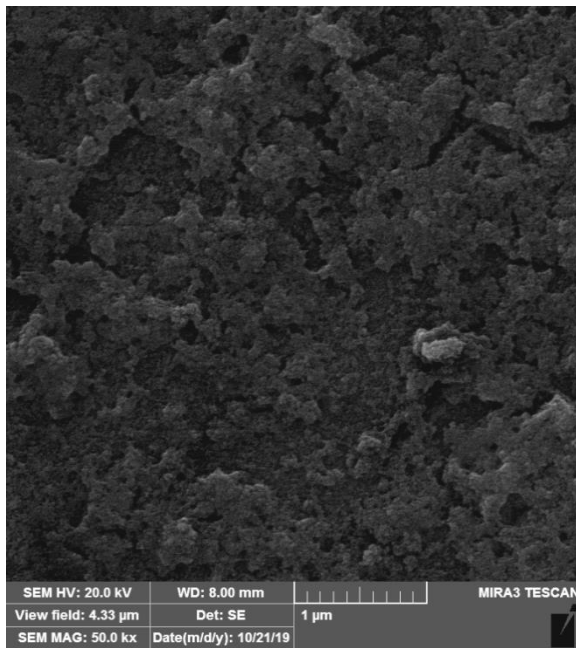
Prevlaka	O, at%	P, at%	Ca, at%	Ti, at%	Ca/P
anHAp/TiO ₂ igličasta crvena strelica Slika 5.8	70.73	2.61	4.54	22.12	1.74
anHAp/TiO ₂ granularna plava strelica Slika 5.8	50.76	6.57	11.49	31.18	1.75

5.2.2. Morfološka analiza uzoraka ACP i ChOL modificovanih ACP prevlaka

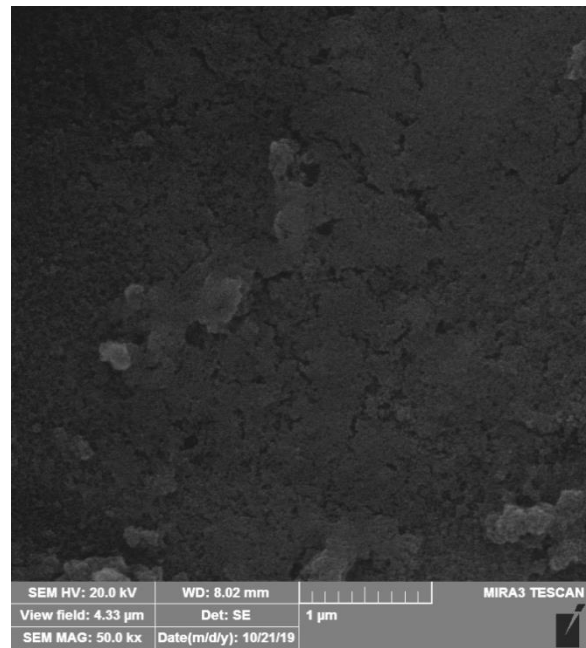
Pregledom literature je utvrđeno da do sada nije bilo pokušaja da se na bilo koji način sintetišu kompozitne ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlake. Stoga se u nastavku istraživanja pristupilo sintezi navedenih prevlaka na titanskom supstratu novim procesom *in situ* simultane anodizacije površine i anaforetske sinteze. Sinteza ovih prevlaka je izvršena primenom napona od 60 V i 90 V.

SEM slike ACP/TiO₂ kompozitnih prevlaka sintetisanih na 60 V i 90 V su prikazane na Slici 5.10a i 5.10c, dok su SEM slike ACP/TiO₂/ChOL kompozitnih prevlaka sintetisanih na 60 V i 90 V prikazane na Slici 5.10b i 5.10d. Posmatrajući Sliku 5.10, odnosno pojedinačne SEM slike, može se primetiti da prevlake u potpunosti prekrivaju površinu titanskog supstrata, a da se sama prevlaka od aglomerisanih čestica nano veličine, koja je u ovom slučaju manja od 100 nm. Ova zapažanja idu u prilog konstataciji da je mokrom precipitacionom metodom sinteze dobijen polazni ACP prah sa česticama koje su u nanometarskom opsegu. Sa Slike 5.10 se uočavaju dve potpuno različite prevlake sa stanovišta morfologije, i to: ACP/TiO₂ prevlaka sa aglomeratima koji su veći nego kod ACP/TiO₂/ChOL prevlaci i sa grubljom površinom i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka sa manjim brojem aglomerata, manjim aglomeratima i finijom površinom. Ispitivanje morfologije različitih prevlaka na Slici 5.10 nam ukazuje na to da je površina prevlaka koje su dobijene na višem naponu, odnosno na naponu od 90 V, manje hrapava, a takođe na prevlakama dobijenim primenom napona od 90 V nema primetnog pucanja istih, kao što je to slučaj sa prevlakama dobijenim na 60 V.

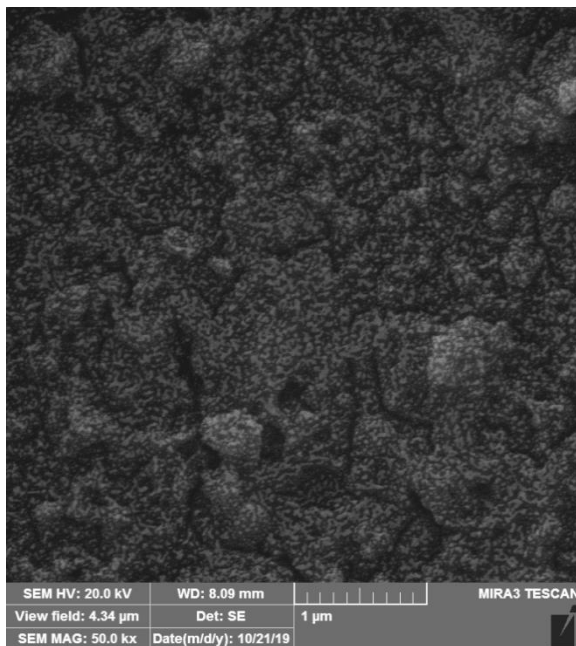
5. REZULTATI I DISKUSIJA



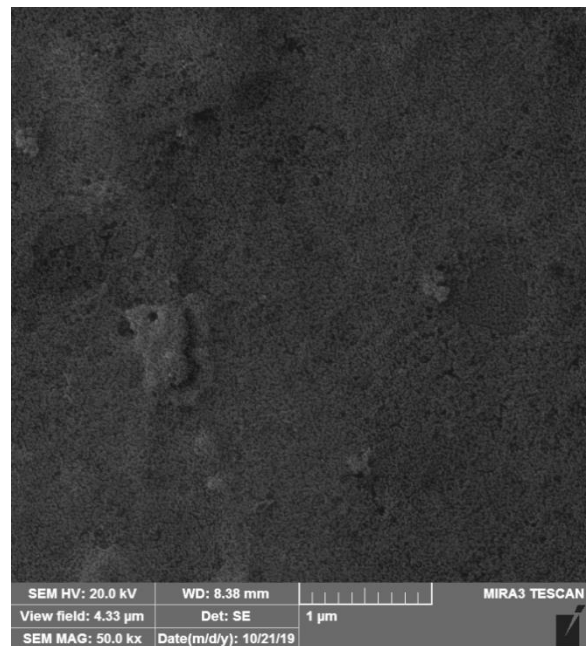
a)



b)



c)



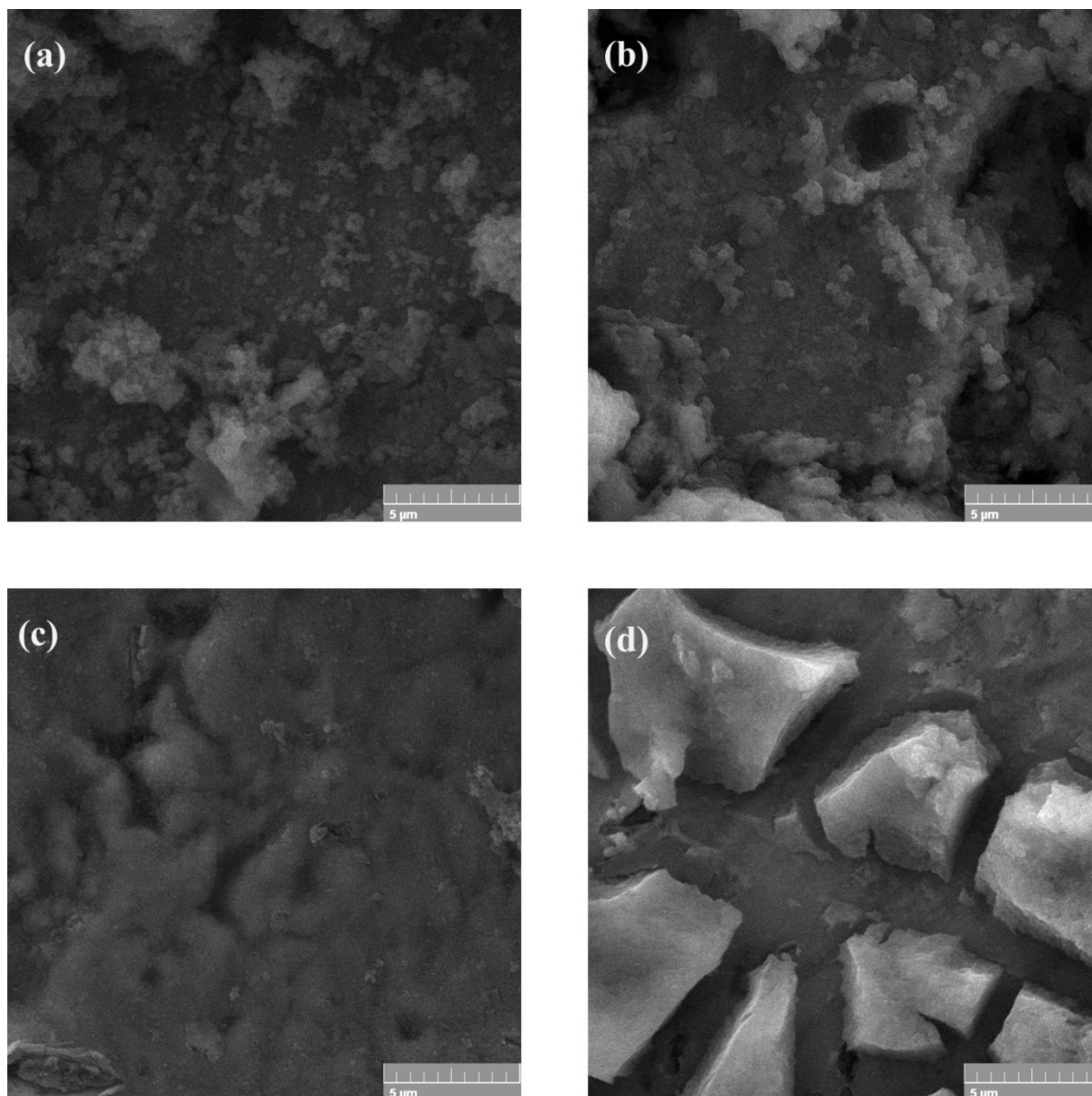
d)

Slika 5.10. SEM slike sintetisanih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka. a) ACP/TiO₂ prevlaka dobijena na 60 V, b) ACP/TiO₂ prevlaka dobijena na 90 V, c) ACP/TiO₂/ChOL prevlaka dobijena na 60 V i d) ACP/TiO₂/ChOL prevlaka dobijena na 90 V

5.2.3. Morfološka analiza bioaktivnosti ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanu potopljenih u SBF

Sposobnost stvaranja apatitnog sloja kada je supstrat u kontaktu sa biološkim fluidima (ili fluidima sličnim biološkim fluidima) naziva se *in vitro* bioaktivnost supstrata. Štaviše, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalni kompoziti na Ti podlogama formiraju sloj apatita sličnog kostima (što je kasnije dokazano XRD i FTIR merenjima) na svojim površinama nakon potapanja u SBF rastvor. Zbog toga su, u cilju procene biokompatibilnosti kompozitnih prevlaka, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalni kompoziti na Ti podlogama dobijeni na 60 V i tokom trajanja *in situ* procesa anodizacije/anaforskog taloženja od 3 minuta uronjeni u SBF rastvor i analizirani u različitim vremenskim periodima po potapanju. Morfologija površina ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozita pre potapanja u SBF rastvor prikazana je već na Slici 5.10a i 5.10c, dok su morfologije prevlaka uronjenih u SBF rastvor u različitim vremenskim periodima prikazani na Slici 5.11 [262].

Upoređivanjem Slika 5.10a i 5.11a, može se videti da je bilo potrebno 72 sata da novi sloj apatita počne da se formira na ACP/TiO₂ kompozitnoj površini, dok je za ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalni kompozitni uzorak 72 sata bilo dovoljno da uzorak u potpunosti bude prekriven novim slojem apatita (Slika 5.11c u poređenju sa Slikom 5.10c). Obe izjave su proistekle iz zapažanja da je morfologija prevlaka različita i da je vizuelni doživljaj i osećaj da je došlo do porasta hrapavosti površine. Različita morfologija novonastalog sloja apatita kod ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozita se javlja usled različite veličine i pristupačnosti mesta nukleacije, tj. dostupne slobodne površine za formiranje apatita. Budući da se ACP/TiO₂ prevlaka sastoji od većih aglomerata čestica nano veličine (Slika 5.10a), a površina joj je grublja od ACP/TiO₂/ChOL kompozitne površine, novi sloj apatita se neravnomerno stvara na površini. Ovaj sloj apatita se ne širi planarno, već raste preferentno vertikalno u odnosu na površinu. ACP/TiO₂/ChOL prevlaka ima veći broj manjih aglomerata, koji u stvari predstavljaju slobodno dostupna mesta nukleacije za formiranje sloja apatita. Shodno tome, novi sloj apatita raste uglavnom planarno u odnosu na površinu. Neravnomerna raspodela apatitnih sferičnih čestica se uočava na premazu ACP/TiO₂, dok je raspodela oblika apatitnih čestica glatka, ravnomerna i potpuna na ACP/TiO₂/ChOL površini nakon 72 sata potapanja u rastvor SBF.



Slika 5.11. FE-SEM slike koje prikazuju mikrostrukturu ACP/TiO₂ kompozitne prevlake uronjene u SBF tokom: a) 3 i b) 10 dana, i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake uronjene u SBF za: c) 3 i g) 10 dana.

Slike 5.11b i 5.11d pokazuju morfologije ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozitnih površina nakon 240 sati potapanja u rastvor SBF. Ono što je odmah uočljivo je da FE-SEM rezultati potvrđuju bioaktivnost oba multifunkcionalna kompozitna uzorka nakon potapanja u SBF. Novi sloj apatita u potpunosti pokriva celokupnu površinu uzorka u oba slučaja. Takođe je vidljiva i razlika u morfologiji površina kod ova dva uzorka. Novonastali sloj apatita u potpunosti je prekrrio ACP/TiO₂ kompozitnu površinu, a rast apatita se nastavlja stvaranjem novih nepravilnih, globularnih, sferičnih čestica na površini (Slika 5.11b). S druge strane površina ACP/TiO₂/ChOL kompozita je u

5. REZULTATI I DISKUSIJA

potpunosti prekrivena slojem apatita na kome je formiran kristalni HAp sa glatkim površinama. Formiranje HAp iz SBF je jedan od preliminarnih uslova koji pokazuje sposobnost *in vivo* vezivanja kompozita sa kostima. Pokazano je da apatit sličan koštanom apatitu nastao na površini implantata nakon potapanja u rastvor SBF pomaže u kaskadi ćelija i proteinskom signaliziranju, što kao rezultat ima formiranje novog koštanog tkiva [364]. Utvrđeno je da HAp sloj sličan koštanom poseduje izuzetnu osteokonduktivnost i pokazuje veliki afinitet ka živim koštanim ćelijama [365]. Stoga je razvoj HAp sloja na površini implantacionog materijala vitalni zahtev za osteointegraciju između živog koštanog tkiva i implantata.

Značajna bioaktivnost obe kompozitne prevlake potvrđena je stvaranjem sloja apatita nakon 240 h potapanja u SBF. Pored toga, ACP/TiO₂/ChOL prevlaka ima veću bioaktivnost u poređenju sa ACP/TiO₂ prevlakom.

5.3. MORFOLOŠKO I ELEKTROHEMIJSKO ISPITIVANJE UZORAKA

U cilju elektrohemijskih merenja i ispitivanja korozione stabilnosti prevlaka i uzoraka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanu su istaložene *in situ* anodizacijom/anaforskim taloženjem pri naponu od 60 V i vremenom trajanja procesa od 3 minuta. U narednim poglavljima biće prikazana detaljna elektrohemijska analiza koja je povezana sa morfološkom analizom ovih uzoraka.

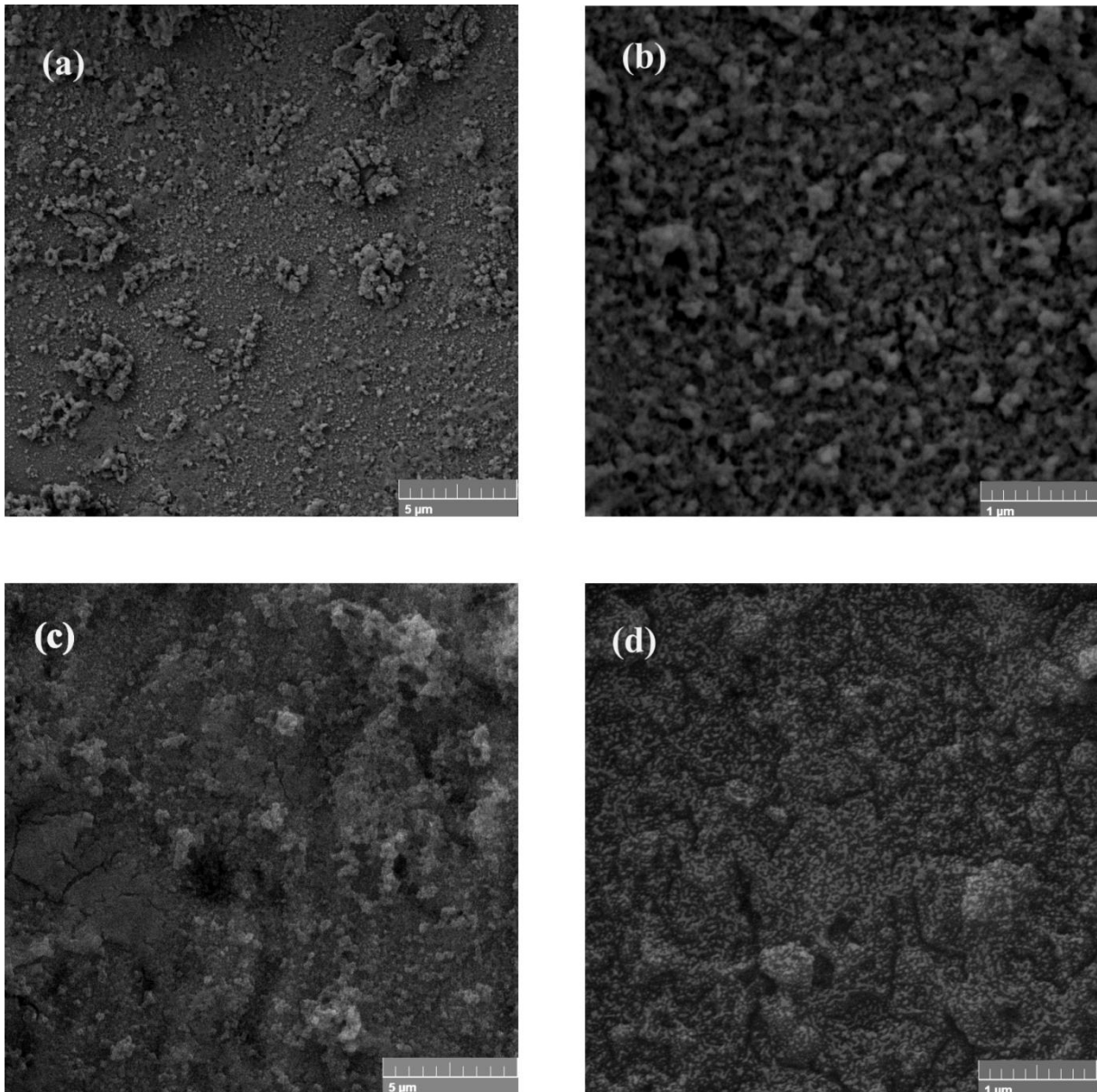
5.3.1. FE-SEM morfološka analiza

FE-SEM tehnika je korišćena za karakterizaciju morfologije površine i veličine sastavnih čestica sintetisanih kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanskim podlogama. FE-SEM morfologije kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL su predstavljene na Slici 5.12, gde su na Slikama 5.12a i 5.12b prikazane kompozitne ACP/TiO₂ prevlake pri različitim uvećanjima, a na Slikama 5.12c i 5.12d su prikazane multifunkcionalne hibridne kompozitne prevlake ACP/TiO₂/ChOL, takođe pri različitim uvećanjima.

FE-SEM slike pokazuju da sintetisane kompozitne i hibridne prevlake ravnomerno pokrivaju površinu podloge. Prevlake se sastoje od aglomeriranih nanočestica veličine manje od 100 nm. Kao što je već napomenuto, mogu se uočiti dve morfološki različite prevlake za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL. Može se primetiti da su ACP/TiO₂ aglomerati veći, pa je površina grublja nego kod ACP/TiO₂/ChOL hibridne multifunkcionalne kompozitne prevlake. Takođe je očigledno

5. REZULTATI I DISKUSIJA

prisustvo malih pukotina na površini kompozitne ACP/TiO₂/ChOL prevlake. Pretpostavka je da se pukotine prvenstveno stvaraju tokom jednostepenog *in situ* procesa anodizacije/anaforske elektrodepozicije [262].



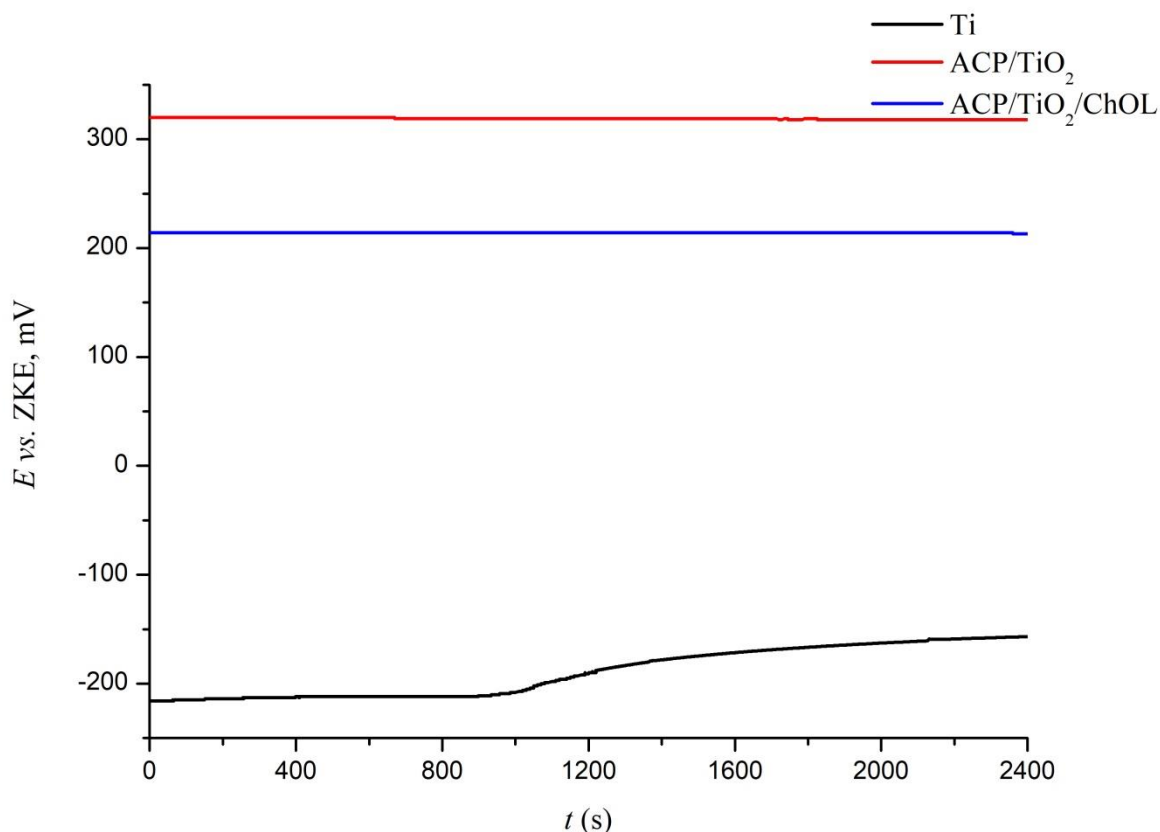
Slika 5.12. FE-SEM slike koje prikazuju mikrostrukturu multifunkcionalne kompozitne ACP/TiO₂ prevlake snimljene pri uvećanju od a) 10.000 i b) 50.000, i ACP/TiO₂/ChOL hibridne multifunkcionalne kompozitne prevlake snimljene pri uvećanju od c) 10.000 i d) 50.000.

5.3.2. Potenciodinamičke polarizacione studije

Slika 5.13 prikazuje krive potencijala otvorenog kola (OCP) snimljene pre polarizacionih merenja i potenciostatske elektrohemijske impedanse spektroskopije (PEIS). Da bi se postiglo

5. REZULTATI I DISKUSIJA

stabilno očitavanje E_{OCP} , uzorci su uronjeni u rastvor simulirane telesne tečnosti (SBF) tokom 40 minuta, a njihov E_{OCP} je beležen tokom čitavog perioda.



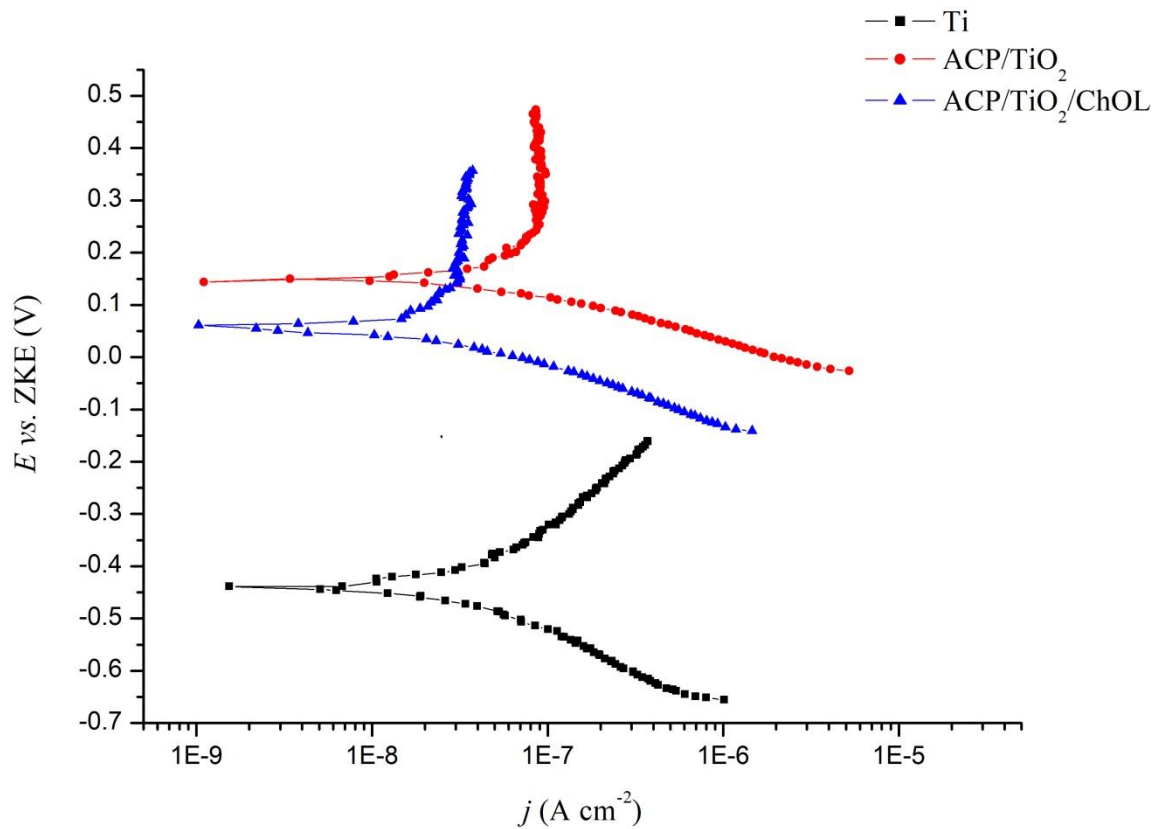
Slika 5.13. Rezultati OCP merenja čistog titana i multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanu tokom 2400 s.

Može se videti da i uzorci ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL imaju pozitivne i stabilne potencijale otvorenog kola. S druge strane, komercijalno čist titan (*grade 2 Ti*, cp-Ti), tretiran na način kako je objašnjeno u Odeljku 4.1, pokazuje negativno pomereni E_{OCP} koji se postepeno pomera u pozitivnom smeru. Potencijali *in situ* anodizovanih/anaforetski nanosenih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titan su stoga plemenitiji od potencijala cp-Ti, što signalizira bolju pasivizaciju i zaštitu površine [262,366,367]. E_{OCP} čistog cp-Ti započinje na -216 mV i pomera se prema pasivnom smeru, stvarajući pasivni zaštitni oksidni film [368]. Na kraju merenja nagib OCP se postepeno smanjivao s vremenom i konačno stabilizovao. Ova manifestacija pokazuje da je formirani pasivni film dostigao dinamičku ravnotežu između formiranja i rastvaranja filma [368–370].

Potenciodinamičke polarizacione krive čistog cp-Ti, kao i ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanu u rastvoru SBF pH vrednosti 7,4 prikazane su na Slici 5.14. Koroziona svojstva uzoraka se mogu proceniti pomoću gustine struje korozije, j_{corr} .

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Vrednosti potencijala korozije (E_{corr}), gustine korozione struje (j_{corr}), anodnih i katodnih nagiba (β_a i β_c) i otpora polarizacije (R_p) izvedene su iz polarizacionih krivih metodom Tafelove ekstrapolacije.



Slika 5.14. Potenciodinamičke polarizacione krive čistog Ti i multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanu mereno od katodnog potencijala od -250 mV do anodnog potencijala od +250 mV u SBF

Polarizacioni otpor (R_p) se izračunava pomoću Stern-Gerijeve jednačine (Jednačina 5.1):

$$R_p = \frac{B}{j_{corr}} = \frac{\Delta E}{\Delta j_{\Delta E \rightarrow 0}} \quad (5.1)$$

gde se B empirijski određuje iz katodnih i anodnih nagiba Tafelovih krivih (Jednačina 5.2)

$$B = \frac{\beta_a \beta_c}{2.3(\beta_a + \beta_c)} \quad (5.2)$$

Efikasnost zaštite od korozije (PE) kompozitnih prevlaka izračunata je pomoću Jednačine 5.3 [371]:

$$PE(\%) = \frac{R_p(\text{coating}) - R_p(\text{uncoated})}{R_p(\text{coating})} \times 100 \quad (5.3)$$

5. REZULTATI I DISKUSIJA

gde su $R_p(\text{coating})$ i $R_p(\text{uncoated})$ polarizacioni otpori multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanu, odnosno neprevučenog cp-Ti. Ukupna poroznost (P) kompozitne prevlake procenjena je pomoću Elsenerove empirijske jednačine (Jednačina 5.4) [262,372]:

$$P = \frac{R_p^0}{R_p} \times 10^{-\left(\frac{|\Delta E_{\text{corr}}|}{\beta_a}\right)} \quad (5.4)$$

gde su R_p^0 i R_p polarizacioni otpori neprevučenog Ti i multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka Ti, ΔE_{corr} je razlika između korozionog potencijala neprevučenog Ti i multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka Ti. Ove vrednosti se nalaze u Tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Elektrohemijski parametri dobijeni iz potenciodinamičkih polarizacionih merenja čistog Ti, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanu

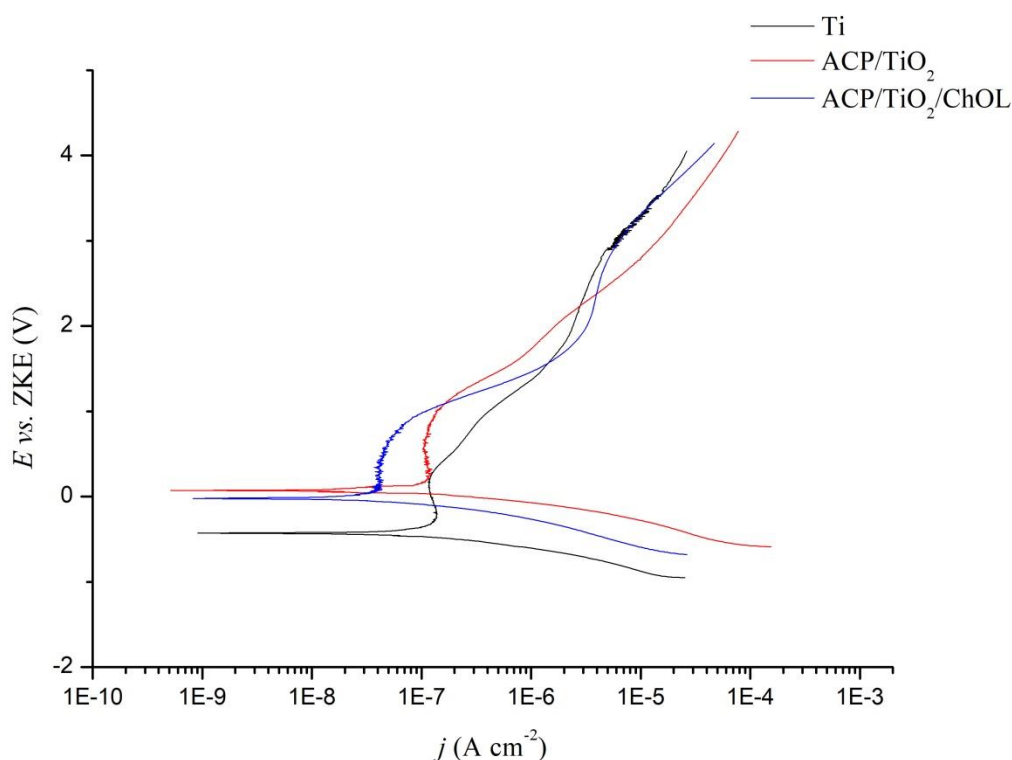
Uzorak	Ti	ACP/TiO ₂	ACP/TiO ₂ /ChOL
E_{corr} (mV vs ZKE)	-440	149	77
j_{corr} (nA cm ⁻²)	42	30	15
β_a (mV dec ⁻¹)	277	193	178
β_c (mV dec ⁻¹)	-163	-145	-115
PE (%)	–	11	46
P (%)	–	0.66	0.74
E_b (mV vs E_{OCP})	196	982	859

Iz polarizacionih krivih prikazanih na Slici 5.14, kao i rezultata iz Tabele 5.6, može se videti da su vrednosti gustine struje korozije niže za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanu u rastvoru SBF u poređenju sa gustinama struje korozije za cp-Ti. Stvaranje ACP i ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na površini Ti značajno poboljšava otpornost na koroziju samog titana. Bolja koroziona stabilnost postignuta je dodavanjem 5 mas.% ChOL u početnu suspenziju za anodizovanje u poređenju sa suspenzijom koja sadrži samo čist ACP. Korozioni potencijal se pomera u pozitivnom smeru i j_{corr} opada u prisustvu multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima merenja OCP. Multifunkcionalna kompozitna ACP/TiO₂/ChOL prevlaka je pokazala najmanju vrednost j_{corr} (15.38×10^{-9} A cm⁻²), koja je približno tri puta niža u poređenju sa vrednošću gustine struje korozije za čist uzorak cp-Ti, dok ACP/TiO₂ kompozitna prevlaka pokazuje j_{corr} vrednost koja je

5. REZULTATI I DISKUSIJA

50% niža u poređenju sa čistim uzorkom cp-Ti ($29.99 \times 10^{-9} \text{ A cm}^{-2}$). Bolja koroziona stabilnost ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzoraka ukazuje da na koroziono ponašanje i korozionu izdržljivost uzoraka u rastvoru SBF utiče stvaranje kako nehomogenih i homogenih oksida, tako i keramičkih i kompozitnih multifunkcionalnih slojeva. Zahvaljujući velikoj molekularnoj veličini i molekularnoj težini ChOL, pokrivenost titana je velika [262,373]. Inkluzija ChOL u ACP, uz istovremeno stvaranje titan dioksida, najverovatnije pomaže u stvaranju dobro povezanih, postojanih i stabilnih prevlaka na površini cp-Ti. Stoga se koroziona stabilnost ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozitnih prevlaka može pripisati zaštitnom sloju formiranom na površini titana koji inhibira direktan kontakt metalne površine sa rastvorom SBF.

Polarizacioni dijagrami u širem opsegu potencijala prikazani su na Slici 5.15. Pored već pomenutih parametara, kao što su E_{corr} , j_{corr} , β_a , β_c i R_p , može se odrediti i potencijal proboja (E_b) pasivnog filma. E_b se može odrediti na tački pregiba ili na proizvoljnoj vrednosti gustine struje iznad oštre promene nagiba. Vrednosti E_b su takođe prikazane u Tabeli 5.6.



Slika 5.15. Krive potenciodinamičke polarizacije golih multifunkcionalnih kompozitnih obloga Ti, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanijumu mereno od katodnog potencijala od -1 V do anodnog potencijala od $+4 \text{ V}$ u SBF

Na Slici 5.15 može se uočiti stabilno pasivno ponašanje za svaki od uzoraka. E_b vrednosti pokazuju da se ovo pasivno ponašanje javlja do vrednosti potencijala od 0,859 V za ACP/TiO₂/ChOL i do vrednosti potencijala od 0,982 V za ACP/TiO₂ uzorke. Ove vrednosti su

5. REZULTATI I DISKUSIJA

znatno veće od očekivanih postojećih redoks uslova koji se javljaju u ljudskom telu [374]. Kod kompozitnih prevlaka mogu se videti pozitivni pomaci E_b u poređenju sa čistim cp-Ti supstratom usled kompaktne pasivizacije.

Utvrđeno je da se velika otpornost materijala na koroziju ogleda u vrednostima R_p koje su $10^6 \Omega \text{ cm}^2$ i više [375]. Dobijeni rezultati sugerišu da su oba kompozitna materijala pokazala veće vrednosti R_p od čistog cp-Ti, iako sam cp-Ti ima R_p vrednost od $10^6 \Omega \text{ cm}^2$. Povećana otpornost na koroziju za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozitne prevlake u poređenju sa čistim titanskim uzorkom je posledica stvaranja zaštitnog sloja prema agresivnim jonima iz elektrolita. Prevlake ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL pomažu u zaštiti metalne površine od napada anjona, ali pored toga kompozitni film ChOL sadrži i ACP strukturu, a može da deluje i kao zaštitni sloj oko površine implantata Ti. To se može uočiti iz vrednosti poroznosti, pri čemu značajno smanjenje brzine korozije može biti povezano sa smanjenjem poroznosti u kompozitnom premazu (0,66 % za ACP/TiO₂ i 0,74 % za ACP/TiO₂/ChOL prevlake). Mala vrednost poroznosti jasno ukazuje na kompaktnu morfologiju kompozitnih prevlaka. Velike vrednosti R_p i male vrednosti poroznosti pokazuju relativno veću efikasnost zaštite u poređenju sa čistim Ti. Utvrđeno je da *in situ* anodizacija/anaforetско taloženje povećava adheziju multifunkcionalne kompozitne ACP/TiO₂/ChOL prevlake 24, a potenciodinamička polarizaciona merenja pokazuju povećanu otpornost na koroziju uzorka. Plemenitije vrednosti E_{corr} i niže vrednosti j_{corr} ukazuju na sposobnost ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih uzoraka da pruže bolju otpornost na koroziju (Slike 5.14 i 5.15 i Tabela 5.6).

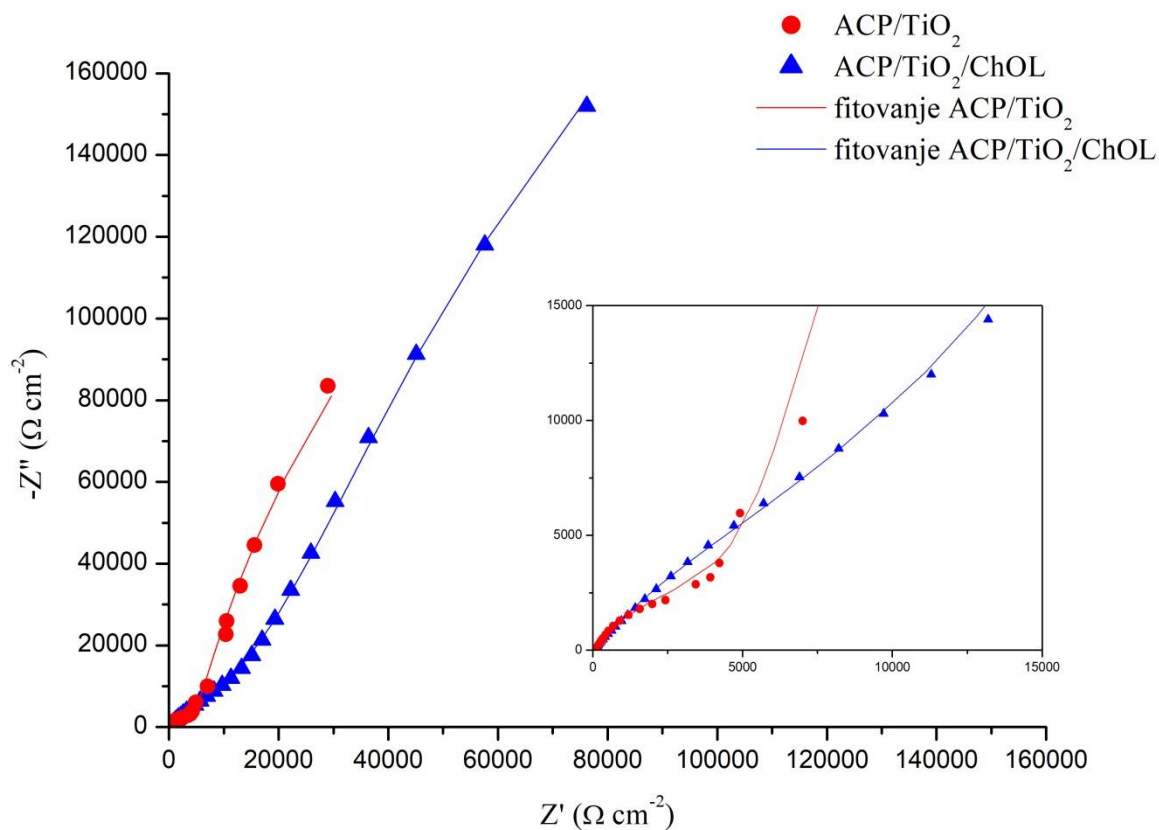
Još jedna specifična karakteristika može se uočiti sa Slike 5.15. Mogu se prepoznati dva očigledna pasivna područja kod cp-Ti i ACP/TiO₂/ChOL uzoraka, dok ovaj specifični aspekt nije jasno uočljiv kod ACP/TiO₂ uzorka. Iz perspektive elektrohemije, ChOL naglašava elektrohemijsko ponašanje čistog cp-Ti, ali u plemenitijem smeru i sa povećanom stabilnošću na koroziju. Uzorak ACP/TiO₂/ChOL jasno pokazuje pasivaciju u dva koraka. Inicijalno pasivno područje pokriva širok opseg potencijala i javlja se kao rezultat efektivnog blokiranja površine materijala prevlakom [376], dok se stabilna druga pasivizacija javlja zbog stvaranja kompaktnog pasivnog sloja na interfejsu podloga/prevlaka.

5.3.3. Potenciostatska elektrohemijska impedansna spektroskopija (PEIS)

Na osnovu dobijenih rezultata iz Tafelovih krivih korišćena je PEIS metoda za procenu korozione stabilnosti i korozionog ponašanja ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL kompozita na titanu u

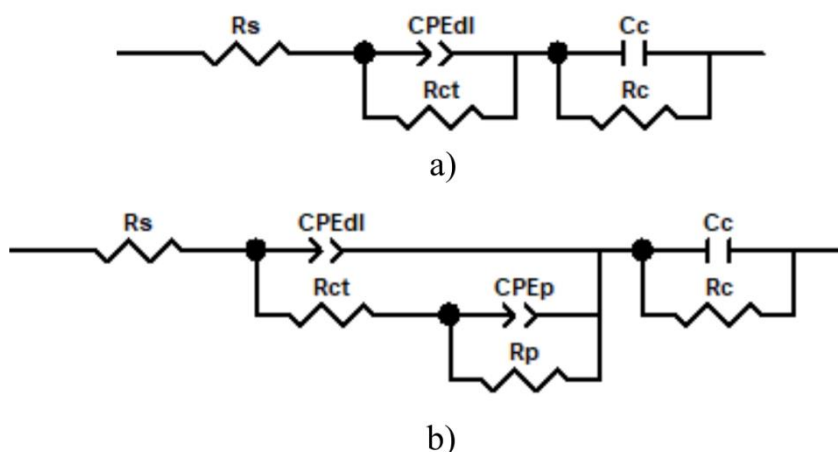
5. REZULTATI I DISKUSIJA

rastvoru SBF. Rezultati su prikazani Najkvistovim dijagramom u kompleksnoj na Slici 5.16. PEIS je sniman na E_{OCP} za oba uzorka.



Slika 5.16. Najkvistovi dijagrami u kompleksnoj ravni ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanu.

Kod oba uzorka kompozitnih materijala koji imaju multifunkcionalne prevlake javljaju se impedansne petlje velikih prečnika na visokim frekvencijama. Slika 5.17 prikazuje modele ekvivalentnih električnih kola (EEK) koji su korišćeni za fitovanje podataka sa Slike 5.16, a dobijeni su na osnovu podataka PEIS merenja. Impedansni spektri su fitovani pomoću EEK koja su bila sastavljena od sledećih elemenata R_s (CPEdlRct) (CPEcRc) za ACP/TiO₂ uzorak (Slika 5.17a), gde su R_s , R_c , CPEc, Rct i CPEdl otpor rastvora, otpor prevlake, kapacitivnost prevlake, otpor prenosa naelektrisanja koji je direktno povezan sa korozijom i kapacitivnost dvojnog sloja, redom. Za fitovanje PEIS podataka ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne prevlake na Ti korišćen je model R_s (CPEdl Rct (CPEpRp)) (CcRc) prikazan na Slici 5.17b, gde su Rp i CPEp, difuzioni otpor u porama i kapacitivnost pora, redom.



Slika 5.17. Ekvivalentna električna kola koja su korišćena za fitovanje PEIS podataka a) ACP/TiO₂ i b) ACP/TiO₂/ChOL višenamenskih kompozitnih obloga.

PEIS podaci su uspešno fitovani pomoću EEK prikazanim na Slici 5.17. Vrednosti χ^2 svih fitovanih podataka (prikazano punim linijama na Slici 5.16) su bile manje od 5×10^{-4} kroz 100 iteracija. Za ACP/TiO₂ kompozitnu prevlaku vremenska konstanta na visokim frekvencijama (RctCPEdl) se odnosi na spoljni porozni sloj, dok vremenska konstanta na niskim frekvencijama (RcCPEc) odgovara korozionom ponašanju i stabilnosti unutrašnjeg barijernog sloja [262,377]. Ove tvrdnje se takođe odnose i na ACP/TiO₂/ChOL prevlaku, ali se za ovaj uzorak može uočiti i difuzija SBF rastvora kroz pore, pri čemu je ponašanje prevlake (vremenska konstanta na niskim frekvencijama (RcCc)) kao pravog kondenzatora. Element sa konstantnim faznim uglom, CPE, se koristi u EEK umesto kondenzatora, C, kako bi se bolje objasnilo neidealno ponašanje kapacitivnih elementa (heterogenost površine, hrapavost površine, defekati na površini). Generalno, Jednačina 5.5 se koristi kao definicija CPE impedanse:

$$Z_{CPE} = [Y(j\omega)^n]^{-1} \quad (5.5)$$

gde je Y frekventno nezavisna realna konstanta CPE, ω je ugaona frekvencija ($\omega = 2\pi f$) u rad s⁻¹, f je frekvencija, n je vrednost CPE eksponenta između -1 (za idealni induktor) i 1 (za idealni kondenzator).

Dobijeni rezultati ispitivanih materijala iz merenja impedansne spektroskopije, a posle fitovanja i upotrebe EEK su prikazani u Tabeli 5.7.

Očigledna je strukturna sličnost impedansnih spektara oba biomaterijala. Ova sličnost je rezultat činjenice da elektrohemijski odziv biomaterijala zavisi od sličnosti njihovih zaštitnih slojeva na površini. Ipak, moguće je uočiti neke razlike.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5.7. Rezultati elektrohemijske impedansne spektroskopije za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanskim supstratima.

Uzorak	ACP/TiO ₂	ACP/TiO ₂ /ChOL
$R_s (\Omega \text{ cm}^2)$	63.85	46.94
$R_{ct} (\Omega \text{ cm}^2)$	5223	16700
$Y_{dl} (\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2})$	3.48×10^{-5}	1.86×10^{-5}
n	0.71	0.67
$C_{dl} (\text{F cm}^{-2})$	1.73×10^{-5}	7.15×10^{-6}
$R_p (\Omega \text{ cm}^2)$	-	32691
$Y_p (\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2})$	-	2.73×10^{-5}
n	-	0.5
$C_p (\text{F cm}^{-2})$	-	2.44×10^{-5}
$R_c (\Omega \text{ cm}^2)$	9.02×10^5	1.22×10^6
$Y_c (\text{s}^n \Omega^{-1} \text{ cm}^{-2})$	1.03×10^{-4}	-
n	0.90	-
$C_c (\text{F cm}^{-2})$	1.62×10^{-4}	9.51×10^{-5}

Iz dobijenih PEIS rezultata kako za ACP/TiO₂, tako i za ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake, vidi se da ACP/TiO₂/ChOL ima uniformniji unutrašnji pasivni sloj (film), sa pravim kapacitivnim odzivom (n_{dl} je 0,90 za ACP/TiO₂, a ACP/TiO₂/ChOL ima pravo kapacitivno ponašanje). Čini se da je ovaj unutrašnji sloj mnogo definisaniji kod ACP/TiO₂/ChOL nego kod ACP/TiO₂ kompozitnih prevlaka. Dakle, ovaj unutrašnji sloj značajno doprinosi zaštitnoj sposobnosti prevlake u celini. Dvostepena pasivacija i zaštita se mogu videti kod obe prevlake (Slika 5.15), dok je kod ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake prisustvo širih pora evidentno iz heterogenog karaktera spoljnog sloja (prisustvo CPEp i Rp). Ove pore se mogu uočiti na Slici 5.12d.

Na samom početku procesa *in situ* anodizacije/anaforetiskog taloženja primarno dolazi do formiranja sloja titan dioksida/ChOL, s obzirom da primenjeno EPD polje više utiče na ChOL usled veće polarnosti ChOL u poređenju sa ACP. Javlja se istovremena anodizacija Ti podloge i taloženje ChOL, a tek potom dolazi do taloženja ChOL/ACP. PEIS rezultati sugerišu da se u spoljnom sloju formiraju pore. Ove pore su veće nego u uzorcima ACP/TiO₂, a dolazi i do difuzije SBF kroz pore. Stoga konačna ograničenja difuzije kroz pore određuju ukupnu otpornost na koroziju

5. REZULTATI I DISKUSIJA

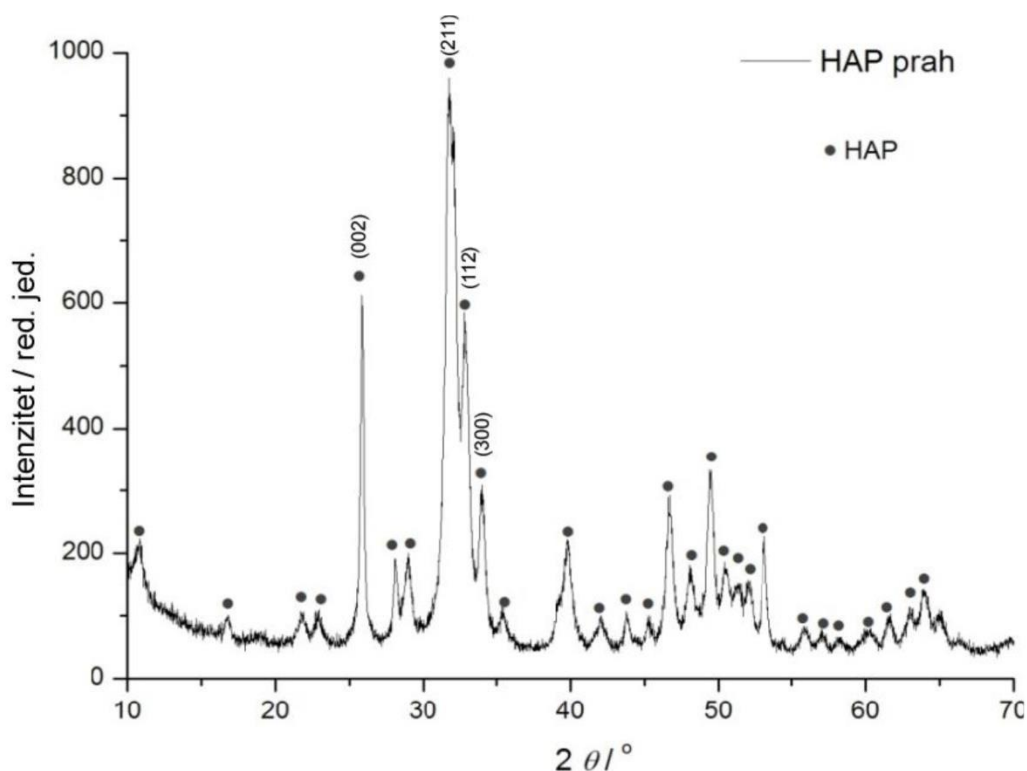
ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake. Jednom kada su se pojavile pore, prisustvo ChOL u tim porama je evidentno, a PEIS odziv prevlake oslikava njegovu kompaktniju i homogeniju strukturu.

Prema gore pomenutim razmatranjima, čini se da je homogeni pasivni zaštitni doprinos ACP/TiO₂/ChOL prevlake oslikan u onim EEK elementima koji se odnose na unutrašnju površinu prevlake. Komponente povezane sa spoljnom površinom, koja je u direktnom kontaktu sa rastvorom, su uglavnom definisane otpornošću u porama i procesima punjenja/praznjenja dvojnog sloja. Za pretpostaviti je da su procesi korozije lokalizovani u dnu pora (u pukotinama sloja). Ova konstatacija dobija smisao ako se pomnoži otpor prenosa naelektrisanja sa stvarnom raspoloživom površinom za koroziju. Drugim rečima, odnos R_{ct} ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka iznosi 0,32, što znači da je u uzorcima ACP/TiO₂/ChOL na raspolaganju samo 32% površine u odnosu na raspoloživu površinu ACP/TiO₂. Ova osobina se takođe može grubo proceniti upoređivanjem područja oko pukotina na Slici 5.12, gde površina pora/pukotina (Slika 5.12d) iznosi okvirno 1/3 snimljene površine. Realna pretpostavka je da je raspoloživa površina na dnu brazde dvostruko veća od vidljive površine brazde, pa je površina brazda otprilike jedna trećina veličine cele površine prevlake.

Kao što je već pomenuto, što je veći otpor prevlake, kao i njena kapacitivnost, to je uzorak otporniji na koroziju. Rezultati PEIS merenja se, prema tome, dobro slažu sa rezultatima dobijenim studijama potenciodinamičke polarizacije.

5.4. XRD ANALIZE UZORAKA

U cilju potvrde prisustva kalcijum fosfatnih prevlaka na titanskim supstratima, faznih sastava i struktura kalcijum fosfatnih prevlaka, kao i prisustva TiO₂ u kompozitnim prevlakama urađena su XRD ispitivanja. Difraktogram HAp praha je prikazan na Slici 5.18.



Slika 5.18. XRD difraktogram sintetisanog HAp praha

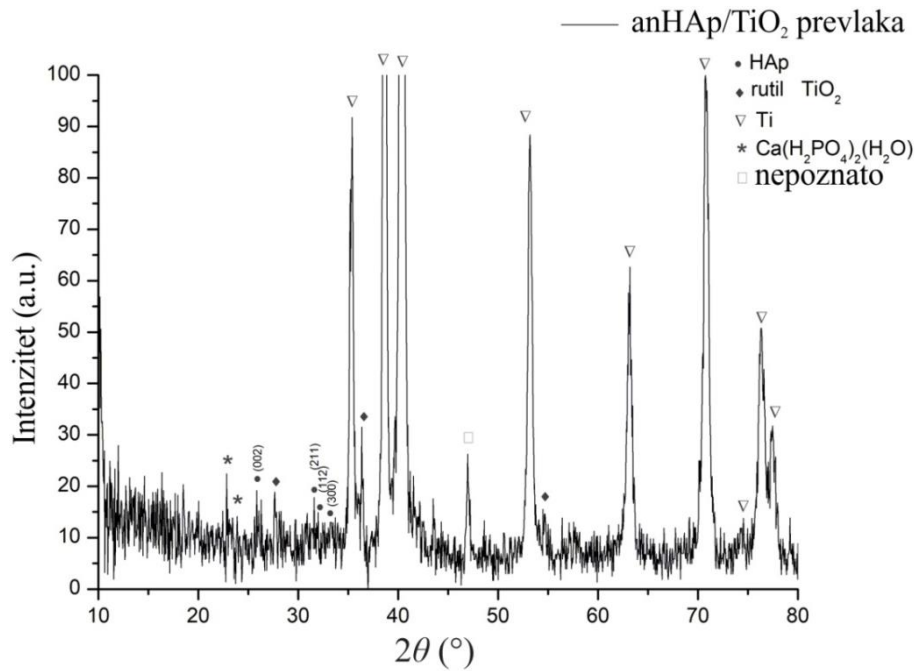
Upoređivanjem pikova sa XRD difraktograma HAp praha (Slika 5.18) sa JCPDS standardnom karticom broj 09–0432 za hidroksiapatit potvrđeno je da je dobijeni prah hidroksiapatit, pri čemu je dobijeno odlično preklapanje pikova. Ovaj rezultat pokazuje da je uspešno dobijen HAp prah modifikovanom precipitacionom metodom.

Na Slici 5.19 prikazani su rezultati XRD analize anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu dobijene *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije [99,360,361,363]. U nastavku teksta je razmatrana specifična fazna analiza.

Na difraktogramu se mogu uočiti karakteristični pikovi hidroksiapatita koji odgovaraju (002), (211), (112) i (300) kristalnim ravnima na $2\theta = 25,85^\circ$, $31,60^\circ$, $32,25^\circ$ i 33° , redom (rezultati odgovaraju JCPDS standardnoj XRD kartici br. 86–1199.). Ovi pikovi su delimično maskirani i naizgled niskog intenziteta usled dominantnih refleksija pikova Ti supstrata. Najintenzivniji pikovi na difraktogramu odgovaraju pikovima Ti pločice (očítani upotrebom JCPDS standardne XRD kartice br. 89-5009). Na difraktogramu se mogu očitati i specifične najintenzivnije XRD refleksije koje odgovaraju rutilnoj TiO₂ strukturi na $2\theta = 27,85^\circ$, $36,35^\circ$ i $54,80^\circ$ (očitano upotrebom JCPDS standardne XRD kartice br. 88-1173), iako su i ovi pikovi maskirani refleksijom Ti podloge. Prisustvo kalcijum-fosfatne faze je takođe potvrđeno i pikovima na $2\theta = 22,85^\circ$ i $24,10^\circ$ (koji su očitani upotrebom JCPDS standardne XRD kartice br. 70–0090). Pretpostavka je da se ova faza formira tokom procesa *in situ* taloženja usled lokalne promene pH vrednosti u blizini titanske

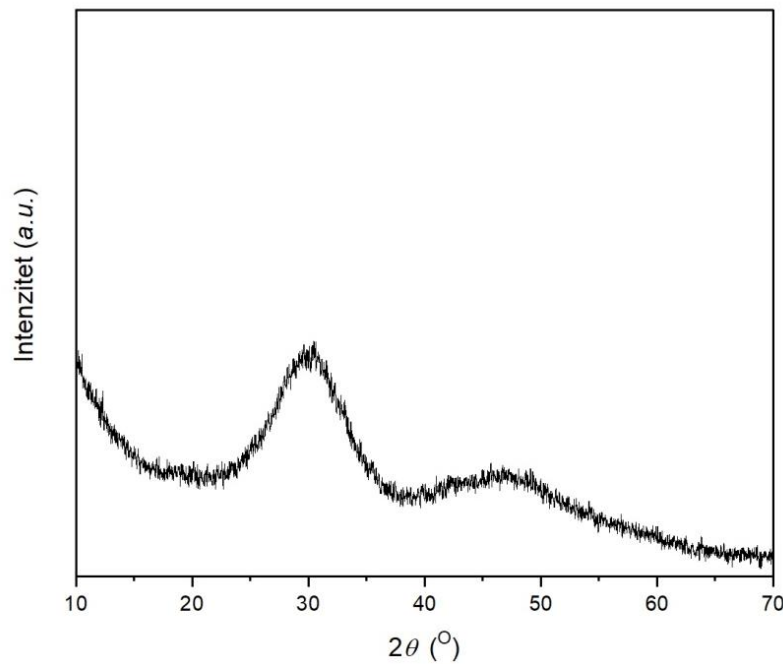
5. REZULTATI I DISKUSIJA

površine, kada dolazi do urušavanja negativno naelektrisane micela. Na $2\theta = 46,95^\circ$ se javlja neidentifikovani pik koji je takođe prisutan na XRD difraktogramu čistog Ti supstrata, te se zaključuje da ovaj pik predstavlja za sada neidentifikovanu fazu u Ti supstratu.



Slika 5.19. XRD difraktogram anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu

Slika 5.20. prikazuje rezultate XRD analize ACP praha sintetizovanog kao što je napomenuto u Poglavlju 4.

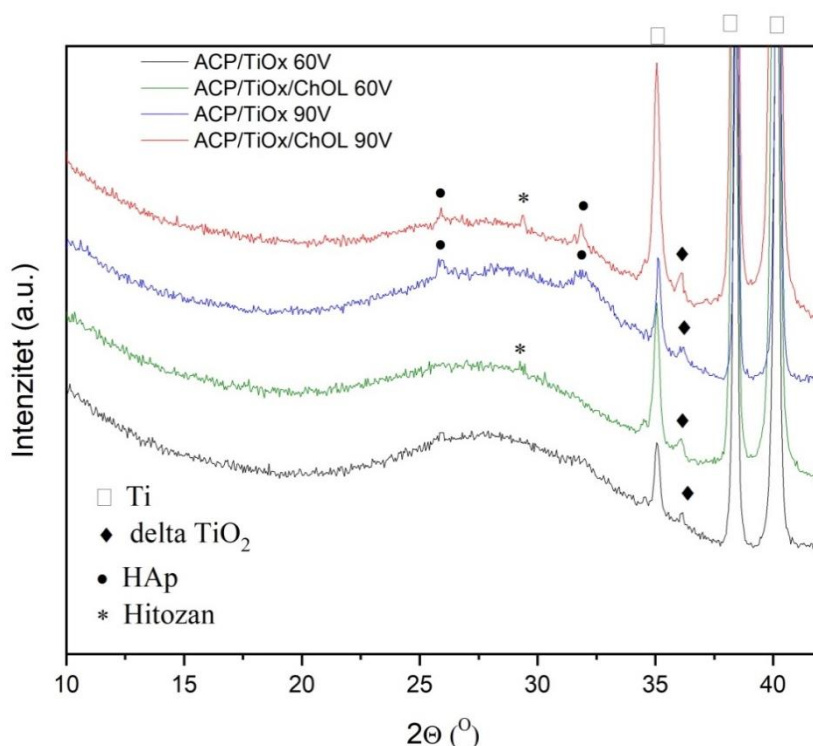


Slika 5.20. XRD difraktogram ACP praha koji je korišćen u eksperimentima

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Karakterističnih oštrih pikova nema, što je i bilo za očekivanje, a prisutni široki pikovi su indeksirani kao ACP struktura, što je u saglasnosti sa JCPDS datotekom broj 01-080-3958. Široki XRD pik na difraktogramu sugerise postojanje uzorka amornog kalcijum-fosfata sa širokim maksimumom na približno $2\theta = 30^\circ$. Keramičari i poliamorfisti često koriste XRD odgovor materijala koji imaju difraktogram sličnog izgleda kao difraktogram ACP koji je prikazan na Slici 5.20 kako bi utvrdili amorfni udeo u materijalima koje ispituju. Supstanca koja nije u korelaciji sa „kristalnom“ fazom u odnosu na Ca/P difraktogram obično se smatra i zove „amorfnom“.

Slika 5.21 prikazuje rezultate XRD analize amornih kalcijum fosfatnih prevlaka na titanskom supstratu sa i bez hitozan oligolaktata dobijenih novom metodom *in situ* anodizacije/anaforetske elektrodepozicije na 60 V i 90 V.



Slika 5.21. Uvećani delovi XRD spektara ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka dobijenih pri različitim naponima izvođenja procesa sa identifikovanim karakterističnim pikovima

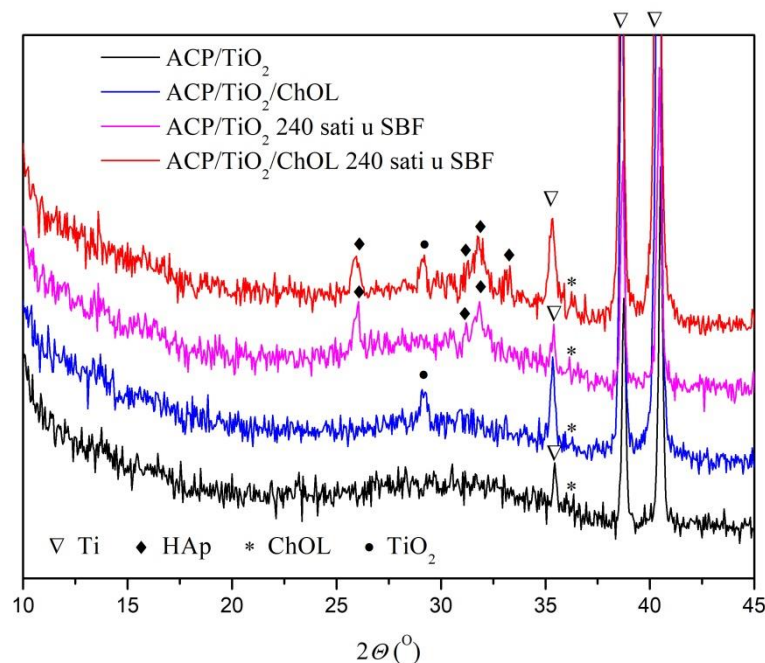
Kao što se može uočiti na Slici 5.21, XRD difrakcioni obrazac pokazuje difuzioni maksimum koji je tipičan za ACP na oko $2\theta = 30^\circ$. Međutim, difrakcioni pikovi na uzorcima na $2\theta = 25,8^\circ, 31,7^\circ$ i $32,2^\circ$ za uzorke ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL, dobijene izvođenjem procesa na 90 V, odgovaraju (002), (211) i (112) refleksiji kristalnih ravni HAp (JCPDS standardna XRD kartica br. 86 –1199).

Pojava pikova na ACP difraktogramu koji odgovaraju refleksiji HAp kristalnih ravni se može objasniti lokalnim povećanjem temperature tokom *in situ* procesa anodizacije/anaforetske elektrodepozicije, pri čemu je moguće da se određena količina ACP transformiše u delimično

5. REZULTATI I DISKUSIJA

kristalni HAp. U literaturi se može naći da postoji mogućnost transformacije ACP u delimično kristalni HAp pod uticajem temperature [90]. Na Slici 5.21 kod oba ACP/TiO₂/ChOL difraktograma (crvena i zelena linija) se može primetiti difrakcioni pik na $2\theta = 29,4^\circ$ koji se može pripisati hitozanu [378]. Dobijeni rezultati ukazuju da porast temperature izaziva termičku degradaciju hitozan oligolaktata na proizvode slične hitinu i hitozanu [379]. Difrakcioni pik na $2\theta = 37,3^\circ$ se pripisuje TiO₂ atanas fazi (očitanu upotrebom JCPDS standardne XRD kartice br. 21-1272). Nalazi neoborivo dokazuju da se odigrava *in situ* jednostepeno taloženje ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL, u zavisnosti od toga koja početna suspenzija se koristi za *in situ* sintezu kompozitne prevlake.

XRD rezultati ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka pre i posle potapanja u SBF tokom 10 dana na 37 °C predstavljeni su na Slici 5.22.



Slika 5.22. XRD spektri ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka pre i posle potapanja u SBF tokom 10 dana na 37 °C.

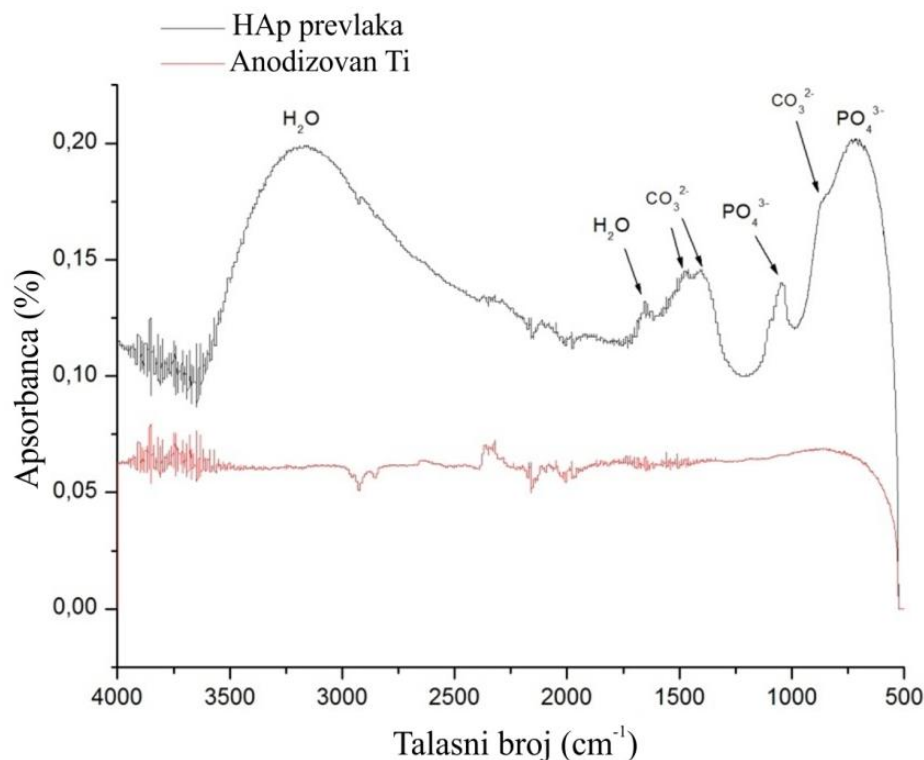
Kao što se može primetiti na Slici 5.22, difrakcioni spektri ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL pre i posle potapanja u SBF tokom 10 dana pokazuju tipični maksimum refleksije na oko 2θ od 30° , što ukazuje da je glavna komponenta prevlake ACP [261,380,381]. Na oba difrakciona spektra ACP/TiO₂/ChOL uzorka (pre i posle potapanja u SBF) može se primetiti difrakcioni pik na $29,4^\circ$ koji pripada hitozanu [261,262,378,382]. Takođe se uočavaju XRD difrakcioni kod ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzoraka nakon potapanja u SBF tokom 240 sati (ružičasti i crveni difraktogrami) na vrednostima 2θ od $25,8$, $31,3$ i $31,85^\circ$ koji se pripisuju (0 0 2), (2 1 1) i (1 1 2) refleksijama HAp kristalne rešetke. Kod ACP/TiO₂/ChOL uzorka nakon potapanja u SBF prisutan je još jedan

5. REZULTATI I DISKUSIJA

XRD difrakcioni pik na 2θ od $32,9^\circ$ što odgovara (3 0 0) refleksiji HAp kristalne rešetke. To dokazuje da se kristalni apatit (tačnije HAp) taloži na površinu oba uzorka nakon potapanja u SBF tokom 10 dana. Nejasan, ali prisutan, difrakcioni pik na vrednosti 2θ od $37,3^\circ$ pripada TiO_2 atanaznoj fazi [261,383]. Dakle, dolazi do *in situ* elektroforetskog taloženja nanoamornih kalcijum fosfat/hitosan oligosaharid laktat kompozitnih prevlaka sa simultanom dobijanjem i ugradnjom titan oksida. Ova multifunkcionalna kompozitna prevlaka poseduje bioaktivna i biokompatibilna svojstva.

5.5. FTIR ANALIZE UZORAKA

FTIR analize su rađene na HAp/ TiO_2 , ACP/ TiO_2 , ACP/ TiO_2 /ChOL i na čistom Ti supstratu u cilju dalje potvrde uspešnosti *in situ* procesa anodizacije/anforetske elektrodepozicije kalcijum fosfatnih prevlaka na titanu, kao i u cilju dokazivanja prisutnosti hitozan oligolaktata u ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaci. Dokazi o prisustvu HAp prevlake na titanu u vidu prisustva karakterističnih funkcionalnih grupa rađeni su ATR-FTIR spektroskopskom metodom [99,384]. Slika 5.23 prikazuje ATR-FTIR spektar anHAp/ TiO_2 prevlake i čistog Ti supstrata.



Slika 5.23. ATR-FTIR spektar anodizovanog titana (crvena linija) i anHAp/ TiO_2 prevlake (crna linija)

Posmatrajući anodizovani titan na Slici 5.23 (crvena linija) može se primetiti vrlo slaba i široka traka apsorpcije na oko 770 i 1500 cm^{-1} koja se pripisuje vibracijama Ti-O veza

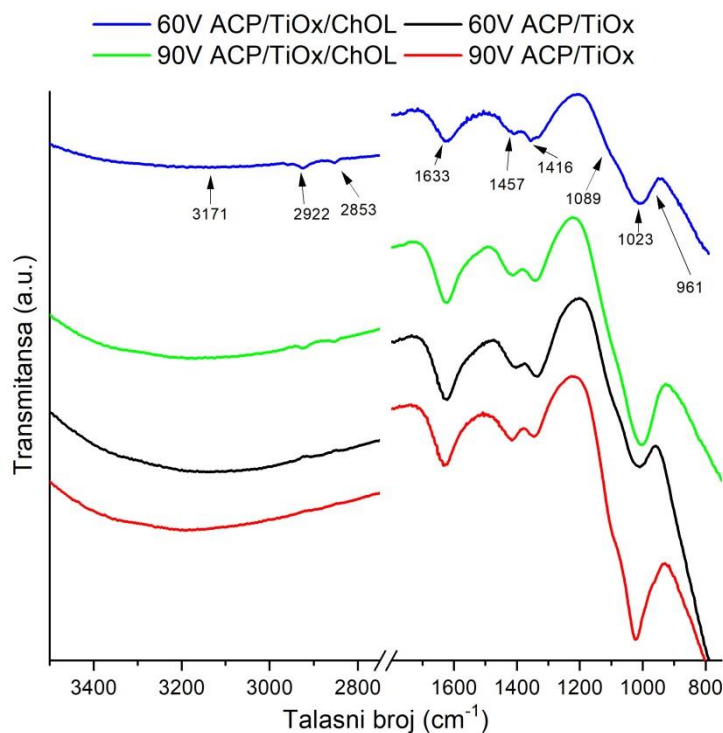
5. REZULTATI I DISKUSIJA

nanoporoznog anodizovanog TiO₂ sloja [385]. Na spektru anHAp/TiO₂ prevlake na Slici 5.23 (crna linija) mogu se videti karakteristične apsorpcione trake PO₄³⁻ grupa kod hidroksiapatita, čije se apsorpcione trake očitavaju na 950–1100 cm⁻¹ [311,386–388]. Dve apsorpcione trake se jasno mogu uočiti na talasnim brojevima od 1041 i 718 cm⁻¹ u ν₃ i ν₁ fosfatnoj oblasti [385,386,389]. Prisutne slabe trake na 872, 1402 i 1476 cm⁻¹ se pripisuju karbonatnim vrstama (CO₃²⁻) u apatitnoj rešetki [311,386,387,390]. Položaji karbonatnih traka ukazuju na delimičnu supstituciju hidroksiapatita, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, karbonatnim grupama, pri čemu preovlađuje tip B karbonatni hidroksiapatit. FTIR je izuzetno osetljiva tehnika kada su u pitanju ove karbonatne supstitucije, te se upotrebom ove tehnike može otkriti vrlo mala količina karbonata [386]. Ove apsorpcione trake u FTIR spektru najverovatnije potiču od rastvorenog CO₂ u elektrolitu koji potiče iz atmosfere [390]. Karbonatna supstitucija tipa B predstavlja preferencijalnu supstituciju u ljudskoj kosti, a poznato je da ovaj supstituisani hidroksiapatit ima bolju bioaktivnost i osteoinduktivnost [313,391,392]. Na FTIR spektru anHAp/TiO₂ prevlake (Slika 5.23), široka traka na 3170 cm⁻¹ odgovara vibracijama istezanja OH jona koji potiču iz molekula vode. Takođe i apsorpcione trake na oko 1650 cm⁻¹ odgovaraju vibracijama apsorbovane vode, pri čemu ova apsorpciona traka odgovara vibracionom modu savijanja molekula H₂O. Posmatrane funkcionalne grupe, njihove talasne dužine apsorbovanja i odgovarajući vibracioni modovi su prikazani u Tabeli 5.8.

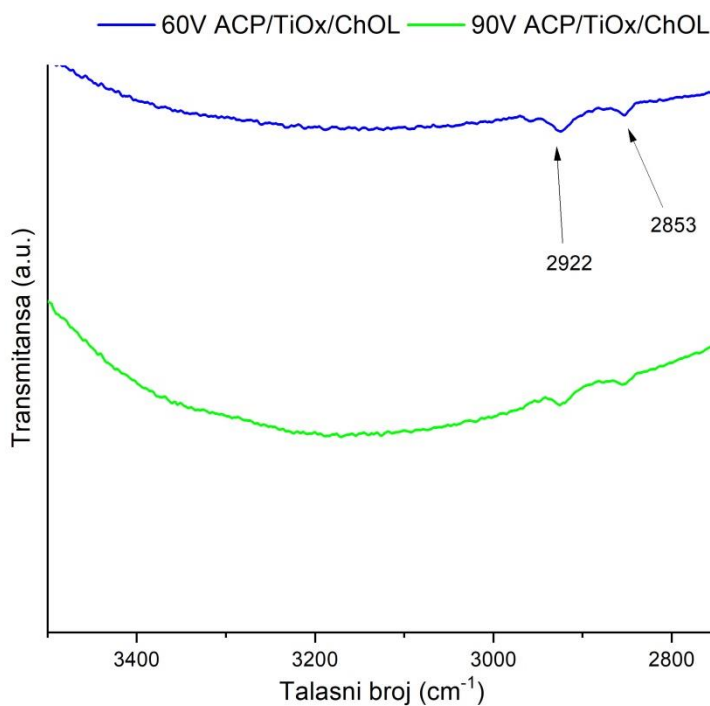
Tabela 5.8. Posmatrane funkcionalne grupe HAp prevlake

Talasni broj, cm ⁻¹	Vibracioni mod	Funkcionalna grupa
3170	Jonsko istezanje	H ₂ O/OH ⁻
1650	Savijanje izvan ravni	H ₂ O
1402, 1476	Asimetrično istezanje	CO ₃ ²⁻
1041	Asimetrično istezanje	PO ₄ ³⁻
872	Savijanje izvan ravni	CO ₃ ²⁻
718	Asimetrično savijanje	PO ₄ ³⁻

Slika 5.24 prikazuje FTIR spektre sintetisanih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na 60 V i 90 V. Kao što je i bilo za očekivati, s obzirom da je u pitanju amorfnu kalcijum fosfatnu prevlaku kao jedan vid kalcijum fosfatne keramike kojoj pripada i hidroksiapatit, ovi FTIR spektri su jako slični spektru hidroksiapatita (Slika 5.23) sa sličnim apsorpcionim trakama.



a)



b)

Slika 5.24. a) FTIR spektri ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka dobijenih na 60 V i 90 V b)

Uvećani region FTIR spektara ACP/TiO₂/ChOL prevlaka dobijenih na 60 V i 90 V

Svi prikazani spektri prikazuju tipične apsorpcijske trake karakteristične za PO₄³⁻ grupe kod amornog kalcijum fosfata u opsegu od 950–1100 cm⁻¹. Najizraženija adsorpcijska traka (Slika

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.24a) je predstavljena pikom na 1023 cm^{-1} koji pripada ν_3 fosfatnom regionu, sa dva primetna ramena na 1089 i 961 cm^{-1} , koja se pripisuju ν_3 i ν_1 fosfatnim modovima [378]. Prisustvo slabo izražene trake na 1416 cm^{-1} je posledica vibracija savijanja CO grupe, a ova traka je dodeljena karbonatnoj (CO_3^{2-}) grupi kod amornog kalcijum fosfata. Položaji karbonatnih traka ukazuju na delimičnu supstituciju karbonatnim grupama kod ACP. Široka traka na 3171 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja OH^- grupa adsorbiranih H_2O molekula, što ukazuje na intermolekularnu vodoničnu vezu. Takođe i adsorpciona traka na 1633 cm^{-1} odgovara apsorbovanoj vodi, i to vibracijama savijanja apsorbovane vode [378,379]. Dve slabije izražene, ali primetne trake koje se javljaju kod uzoraka ACP/ TiO_2 /ChOL sintetisanih na 60 V i 90 V (Slike 5.24a i 5.24b) na 2922 i 2853 cm^{-1} se pripisuju vibracijama istezanja CH grupa kod hitozan oligolaktata [383], što predstavlja konačnu potvrdu prisustva hitozan oligolaktata (ChOL) u kompozitnoj prevlaci. Prisustvo adsorpcionih traka na 2922 i 2853 cm^{-1} (Slike 5.24a i 5.24b) nesumnjivo dokazuje uspešnost *in situ* procesa anodizacije/anaforetske elektrodepozicije ACP/ TiO_2 /ChOL prevlake u baznoj sredini. Tabela 5.9 prikazuje funkcionalne grupe, njihove talasne dužine apsorbovanja i odgovarajuće vibracione modove kod ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaka.

Tabela 5.9. Posmatrane funkcionalne grupe ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaka

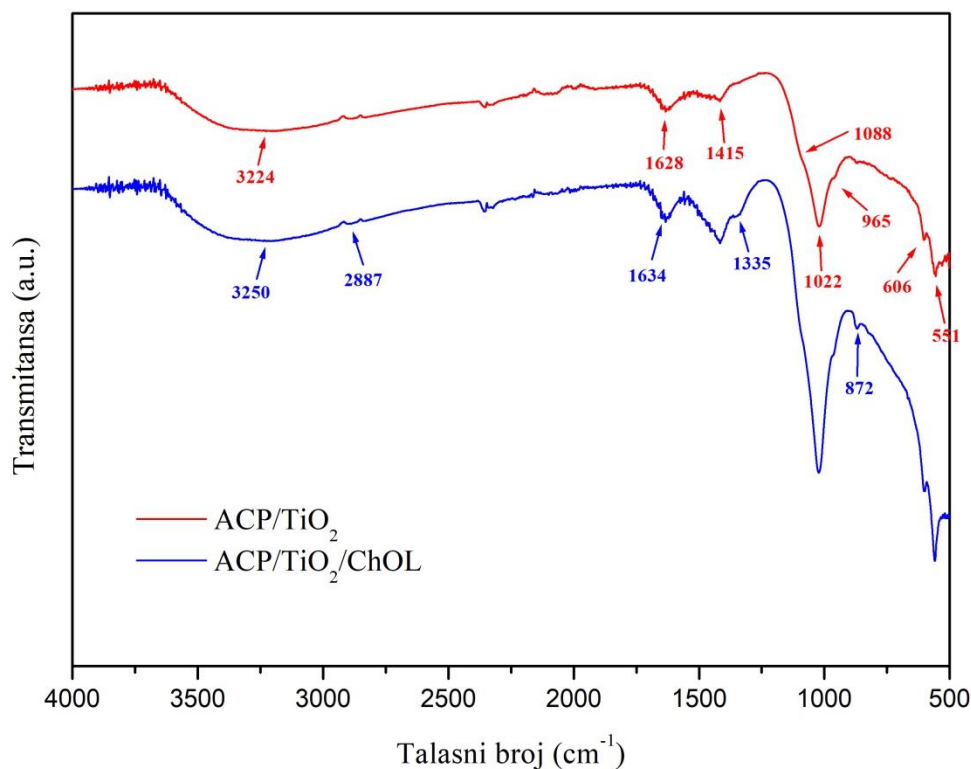
Talasni broj, cm^{-1}	Vibracioni mod	Funkcionalna grupa
3171	Jonsko istezanje	$\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$
2922	Asimetrično istezanje	Metoksi C-H
2853	Simetrično istezanje	Metoksi C-H
1633	Savijanje izvan ravni	H_2O
1416	Asimetrično istezanje	CO_3^{2-}
1089, 1023	Asimetrično istezanje	PO_4^{3-}
961	Asimetrično savijanje	PO_4^{3-}

Na Slici 5.25 prikazani su FTIR spektri sintetisanih ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaka na titanu, sa navedenim karakterističnim trakama apsorpcije pri odgovarajućim talasnim brojevima.

FTIR spektar ACP/ TiO_2 kompozitne prevlake prikazuje uobičajene PO_4^{3-} apsorpcione trake karakteristične za ACP. Karakteristične trake na 551 i 606 cm^{-1} pripisuju se P–O vezi unutar fosfatne grupe (ν_4 vibracioni režim) [393]. Najjasnija adsorpciona traka je vrh apsorpcije na 1022 cm^{-1} koja pripada ν_3 regionu fosfatnog režima, sa dva primetna ramena na 1088 i 965 cm^{-1} koja se vezuju za ν_1 i ν_3 fosfatne režime [394]. Prisustvo slabijeg pika na 1415 cm^{-1} se pripisuje C=O

5. REZULTATI I DISKUSIJA

grupi. Ovaj pik se javlja usled prisustva karbonatne (CO_3^{2-}) grupe u ACP i odgovara asimetričnom istežanju ν_3 vibracija CO_3^{2-} grupe [262,393,395].



Slika 5.25. FT-IR spektri ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanskom supstratu.

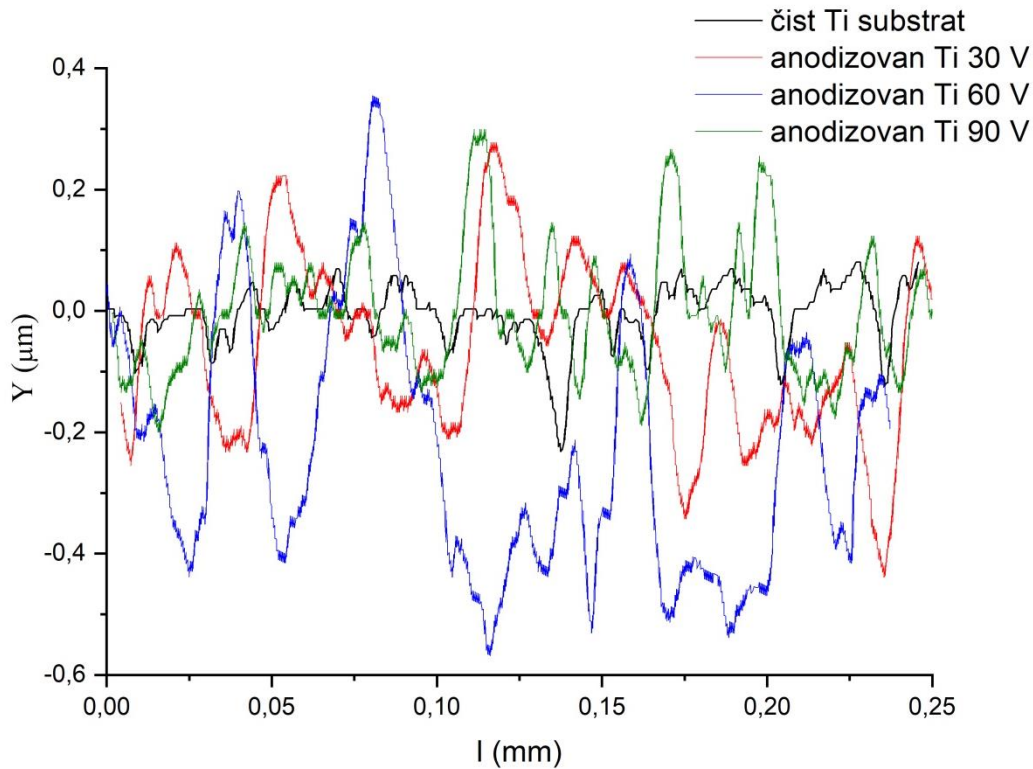
Položaji karbonatnih traka sugerišu delimičnu supstituciju hidroksilnih grupa karbonatnim grupama u ACP [261,394]. Široka traka apsorpcije na 3224 cm^{-1} pripisuje se OH vibracijama istežanja adsorbovanih molekula H_2O , što kao rezultat ima mogućnost intermolekularnog vezivanja vodonika [396]. Slaba apsorpciona traka na 1628 cm^{-1} pripada modu savijanja apsorbovane vode [261,394].

Pored spomenutih apsorpcionih traka koje se odnose na ACP, ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaka pokazuje pik na 872 cm^{-1} koji potiče od deformacije β -glikozidne veze [396], a vezan je za vibraciju C-O-C grupe iz saharidne strukture [397,398]. Pik na 1335 cm^{-1} dodeljen je takozvanom amid III pojasu i uzrokovan je povezanim deformacijskim vibracijama C-H/N-H 54. Traka na 1634 cm^{-1} , koja se preklapa sa slabom apsorpcionom trakom na 1628 cm^{-1} iz apsorbovane vode, dodeljena je amid I pojasu (vibracije istežanja C=O grupe iz R-C(=O)NR'R''). Karakteristična slaba traka na oko 2887 cm^{-1} pripisuje se vibracijama CH lanca [261,374,396,397,399,400]. Traka na oko 3250 cm^{-1} odgovara vibracijama istežanja hidroksilnih grupa [396]. Sve ove identifikovane trake su karakteristične za hitosan oligosaharid laktat.

5.6. ISPITIVANJE HRAPAVOSTI UZORAKA

5.6.1. Hrapavost anodizovanih titanskih supstrata

Rezultati analize linearne hrapavosti (RMS) anodizovanih titanskih supstrata na 30 V, 60 V i 90 V, kao i polirane netretirane titanske površine su prikazani na Slici 5.26 i u Tabeli 5.10.



Slika 5.26. Linearni profili hrapavosti neanodizovanog titana i anodizovanih titanskih supstrata na različitim naponima. Y predstavlja odstupanje profila, a l mernu dužinu profila

Tabela 5.10. Rezultati merenja različitih parametara hrapavosti

Uzorak	Ra (μm)	Rq (μm)	Ry (μm)	Sm (mm)
Čist Ti supstrat	0,047	0,062	0,374	0,0328
Anodizovani Ti 30 V	0,140	0,177	0,778	0,0500
Anodizovani Ti 60 V	0,207	0,254	1,131	0,0378
Anodizovani Ti 90 V	0,168	0,213	0,640	0,0245

5. REZULTATI I DISKUSIJA

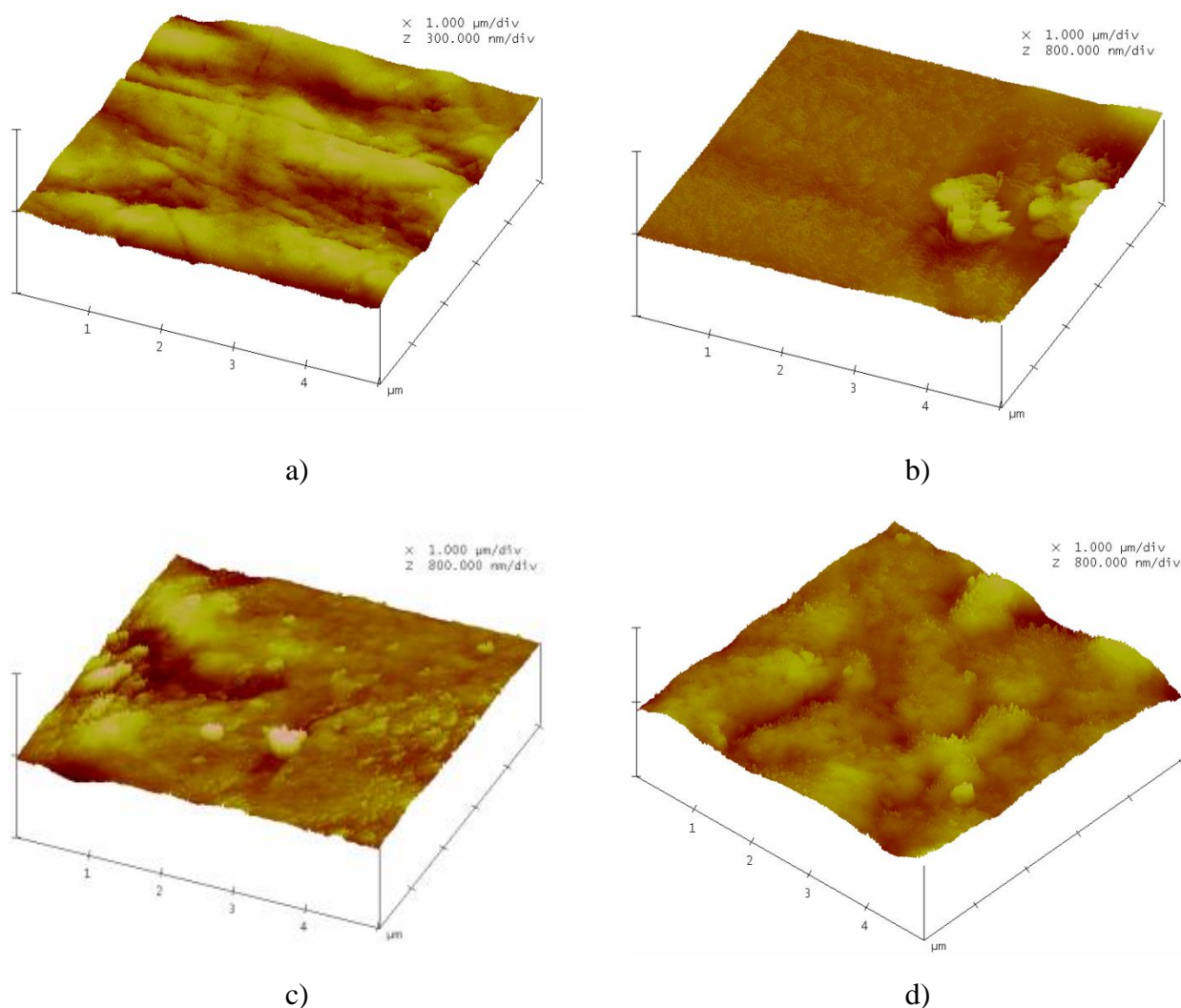
Skraćenice u Tabeli 5.10 imaju sledeća značenja, a kao što je objašnjeno u Poglavlju 4:

- Ra - aritmetička srednja vrednost apsolutnih vrednosti odstupanja profila od srednje vrednosti na ukupnoj dužini uzorkovanja
- Rq ili RMS - kvadratni koren aritmetičke srednje vrednosti kvadrata odstupanja profila od srednje vrednosti na ukupnoj dužini uzorkovanja
- Ry - zbir visine najvišeg pika profila od srednje linije i dubine najdublje profilne doline od srednje linije na ukupnoj dužini uzorkovanja
- Sm - srednji razmak između vrhova profila na srednjoj liniji na ukupnoj dužini uzorkovanja.

Sa Slike 5.26 se uočava povećanje linearne hrapavosti sa povećanjem primenjenih napona anodizacije do 60 V, a zatim se hrapavost smanjuje anodizovanjem titanskog supstrata na 90 V. Neanodizovani Ti supstrat (crna linija) ima male vrednosti Ra , Rq (RMS), kao i Ry , što se vidi iz vrednosti koje su date u Tabeli 5.10. Primena procesa anodizacije od 30 V na neanodizovani titanski supstrat dovodi do drastičnog povećanja vrednosti Ra i Rq , pri čemu površina supstrata, odnosno njen profil postaje hrapaviji. Na primarnom oksidnom sloju koji se stvara na površini supstrata počinju da se pojavljuju ispupčenja sekundarnog oksidnog sloja, što se može videti iz vrednosti Sm (srednji razmak između vrhova profila na srednjoj liniji na ukupnoj dužini uzorkovanja). Ovo merenje je u skladu sa opažanjima sa Slike 5.3b. Na 60 V ovi procesi su najvidljiviji. Ra i Rq vrednosti su skoro duplirane u odnosu na vrednosti koje su dobijene pri anodizaciji na 30 V. Pikovi postaju viši, a doline dublje (Ry). Sm vrednost opada, što je pokazatelj potpune pokrivenosti površine titana sekundarnim oksidnim slojem. Kada se anodizacija odvija na 90 V, pojavljuje se specifičnost koja se ogleda u tome da se vrednosti Ra i Rq smanjuju (što dovodi do zaključka da postoji neka vrsta ravnjanja površine), a Ry vrednost pokazuje da su se doline počele ispunjavati oksidnim slojem, a pikovi su se proširili. To se primećuje i na Slici 5.26 (zelena linija). Takođe, Sm vrednost za uzorak anodizovan na 90 V je najniža među uzorcima, što dovodi do zaključka da je površina talasastija i da oksidni sloj ne raste samo u visinu, već i u širinu.

Slika 5.27 prikazuje trodimenzionalne AFM slike neanodizovanog titanskog supstrata i anodizovanih Ti pločica na 30 V, 60 V i 90 V. Podaci mikroskopije obrađeni su softverom NanoScope Analysis i dobijene su informacije o površinskoj hrapavosti površine. Tabela 5.11 prikazuje vrednosti površinske RMS hrapavosti (Rq) dobijenih iz AFM analiza snimljenih površina (5×5) μm . Čista Ti pločica (Slika 5.27a) ima glatku, sjajnu površinu. U obzir treba uzeti podelu visine snimljenih profila. Za čistu Ti pločicu podela iznosi 300 nm/div, a za sve ostale uzorke (Slike 5.27b-d) ona iznosi 800 nm/div.

5. REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 5.27. Trodimenzionalne AFM slike a) netretirane Ti podloge i anodnih oksidnih filmova na titanu dobijenih anodizacijom na b) 30 V, c) 60 V i d) 90 V

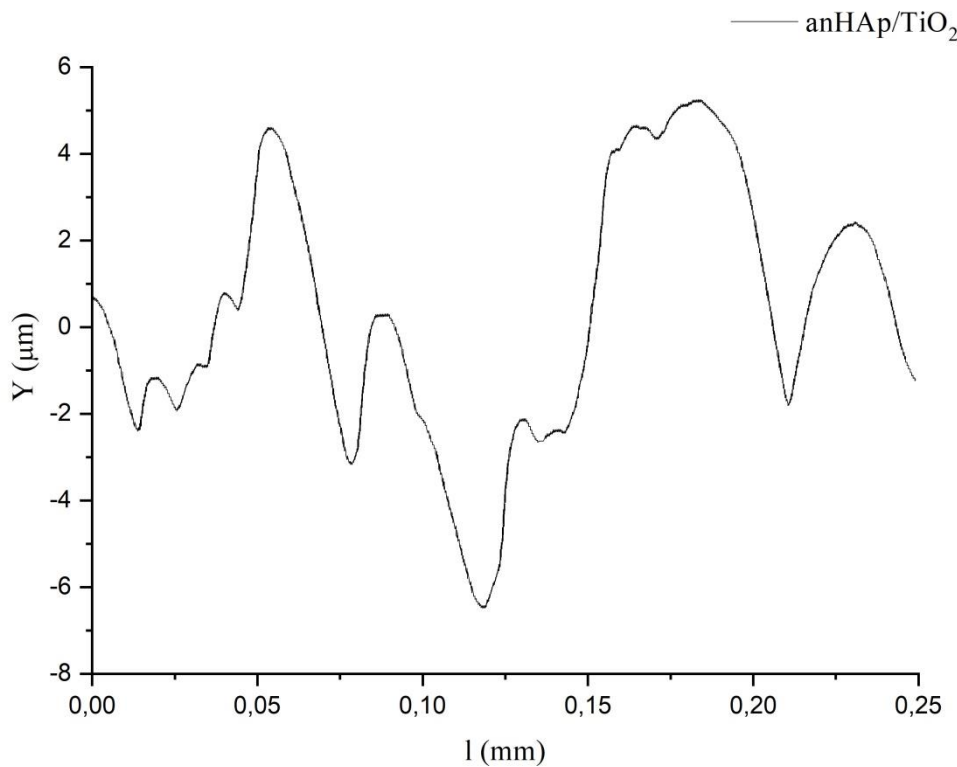
Kod anodizacije na 30 V (Slika 5.27b), anodni oksidni film je kompaktan sa malim ispupčenjima sekundarnog oksidnog sloja, a hrapavost površine je relativno niska. Kod anodizacije na 60 V (Slika 5.27c) površina je znatno hrapavija, a celokupna površina je prekrivena sekundarnim oksidnim slojem. Pojava neuniformne površine u oksidnom filmu uzrokuje povećanje hrapavosti površine. Kod anodizacije na 90 V sekundarni oksidni sloj nastavlja da raste (Slika 5.27d), ali pošto dolazi do planarnog rasta oksidnog sloja, hrapavost površine opada. Ovo zapažanje se pripisuje glatkom sekundarnom oksidnom sloju.

Tabela 5.11. R_q vrednosti dobijene AFM merenjima za različite uzorke

Hrapavost	Čist Ti	anTi 30 V	anTi 60 V	anTi 90 V
R_q /nm	9.80	13.76	39.43	31.95

5.6.2. Hrapavost kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu

Na isti način kao i za titanske supstrate rađeno je ispitivanje linearne hrapavosti HAp/TiO₂ prevlaka na titanskim supstratima dobijenih *in situ* procesom anodizacije/anaforetske elektrodepozicije u baznoj sredini na 60 V. Rezultati ispitivanja linearne hrapavosti su prikazani na Slici 5.28 i u Tabeli 5.12.



Slika 5.28. Profil linearne hrapavost profila kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake dobijene in situ procesom anodizacije/anaforetske elektrodepozicije u baznoj sredini na 60 V. Y predstavlja odstupanje profila, a l mernu dužinu profila

Merenja linearne hrapavosti površine potvrđuju zapažanja o morfologiji kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu, odnosno površina sa prevlakom je za red veličine hrapavija od površine anodizovanog titana. Kako je jedna od poželjnih karakteristika dobrog implantata hrapava površina, kompozitna anHAp/TiO₂ prevlaka na titanskom supstratu je dobar kandidat za medicinske implantate, koja pokazuje poželjnu osteointegraciju formiranjem direktnih veza sa ćelijama kostiju. *Kosta-Rodrigues i dr.* [401] su pokazali da se optimalne vrednosti

5. REZULTATI I DISKUSIJA

hrapavosti površine materijala koji se koriste kao implantati (RMS) kreću u rasponu od 0,20 do 2,87 μm , što obezbeđuje bolju osteointegraciju, a samim tim utiču na adheziju osteoblasta. Sve merene vrednosti hrapavosti, naime Ra , Rq , Ry i Sm , su kvantitativno mnogo veće u poređenju sa anodizovanim titanskim supstratom, a vrednosti su saglasne sa ranije objavljenim rezultatima [401]. Ove vrednosti su prikazane u Tabeli 5.12.

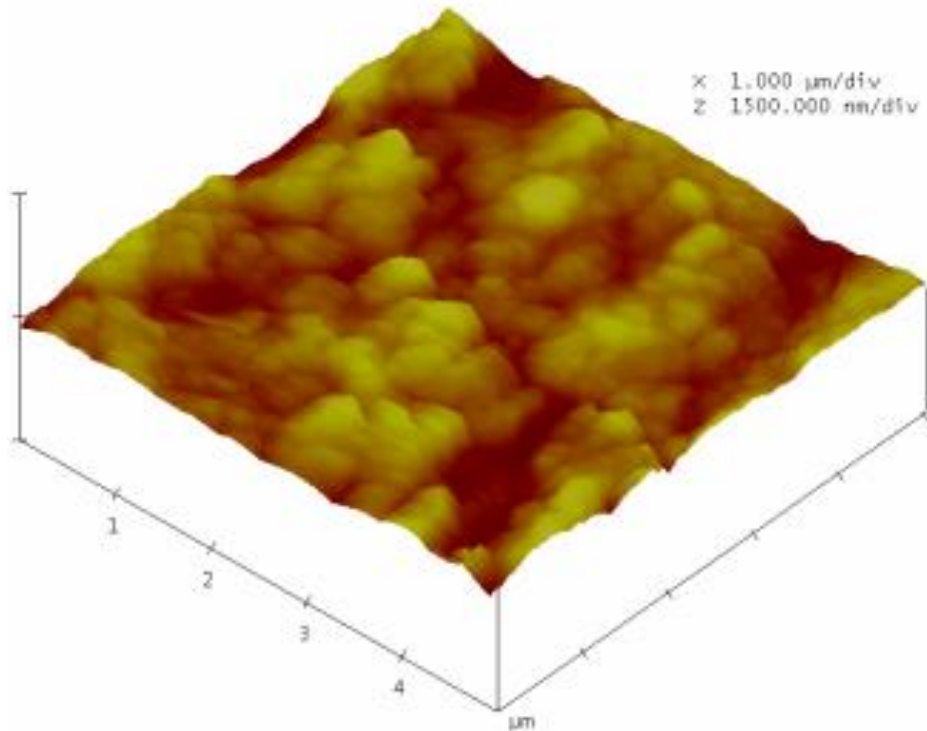
Tabela 5.12. Rezultati merenja različitih parametara hrapavosti

Parametar hrapavosti	anHAp/TiO ₂
$Ra/\mu\text{m}$	1,712
$Rq/\mu\text{m}$	2,141
$Ry/\mu\text{m}$	8,581
Sm/mm	0,0735

Iz vrednosti prikazanih u Tabeli 5.12 se može videti da su čestice HAp aglomerisane, aglomerati su reda veličine nekoliko desetina μm , pri čemu je vrednost Sm dobar pokazatelj veličine ovih aglomerata.

Slika 5.29 prikazuje trodimenzionalnu AFM sliku kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu dobijene novom *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije. Kao što je urađeno pri ispitivanju anodizovanih uzoraka, podaci površinske hrapavosti dobijeni AFM merenjima titanske površine prevučene kompozitnom anHAp/TiO₂ prevlakom su obrađeni NanoScope Analysis softverom, pri čemu su dobijene informacije o hrapavosti površine. Veličina ispitivane površine je bila ista kao i za anodizovane uzorke (5×5) μm . Podela visine snimljenog profila je 1500 nm/div.

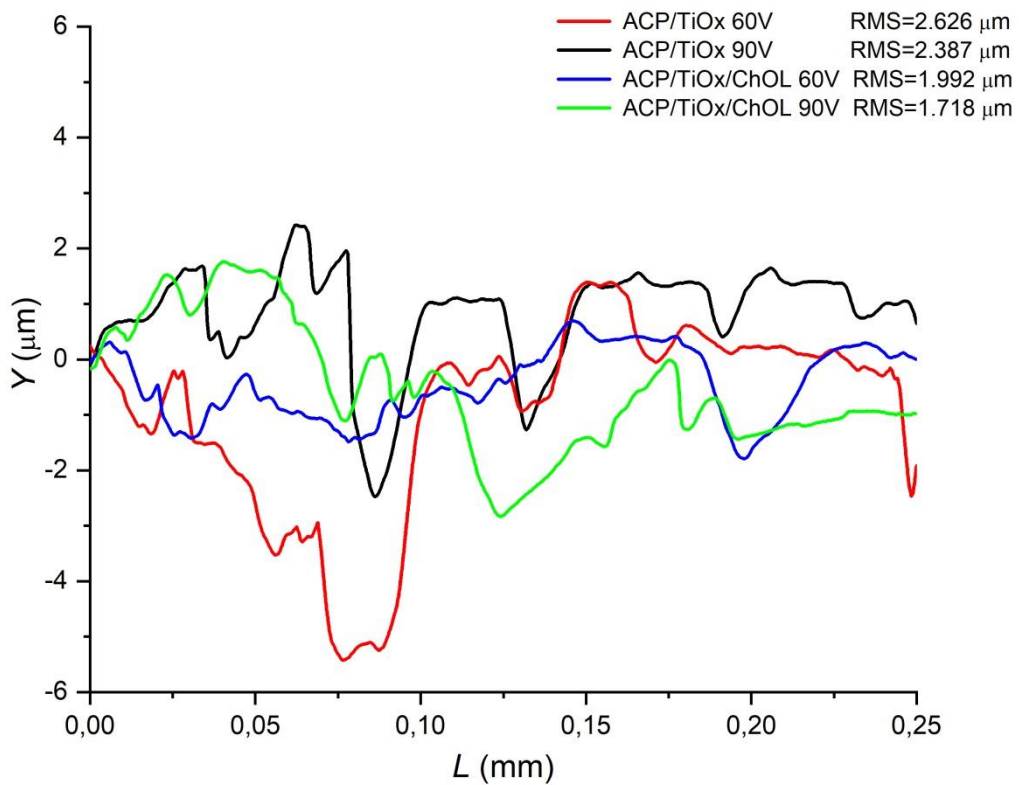
Rq vrednost površine je iznosila 74,437 nm. Zapaža se da površina sa kompozitnom anHAp/TiO₂ prevlakom na titanskom supstratu ima mnogo veću Rq vrednost od vrednosti anodizovanih Ti površina, što je već pokazano merenjima linearne hrapavosti.



Slika 5.29. Trodimenzionalni AFM prikaz kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake na titanskom supstratu dobijene na 60 V

5.6.3. Hrapavost kompozitnih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanskim supstratima

Ispitivanje linearne hrapavosti je rađeno na kompozitnim ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlakama na titanskim supstratima na isti način kao i kod anodizovanih titanskih uzoraka i kompozitnih anHAp/TiO₂ prevlaka na titanskom supstratu. Rezultati ispitivanja linearne hrapavosti su prikazani na Slici 5.30 i u Tabeli 5.13



Slika 5.30. Linearni profili hrapavosti ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanskim supstratima na različitim naponima. Y predstavlja odstupanje profila, a l mernu dužinu profila

Tabela 5.13. Rezultati merenja različitih parametara hrapavosti kompozitnih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka na titanskim supstratima

Uzorak	Ra (µm)	Rq (µm)	Ry (µm)	Sm (mm)
ACP/TiO ₂ 60 V	2,167	2,626	11,55	0,1388
ACP/TiO ₂ 90 V	2,153	2.387	10,10	0,1136
ACP/TiO ₂ /ChOL 60 V	2,078	1,992	9,285	0,1036
ACP/TiO ₂ /ChOL 90 V	1,271	1,718	7,967	0,0961

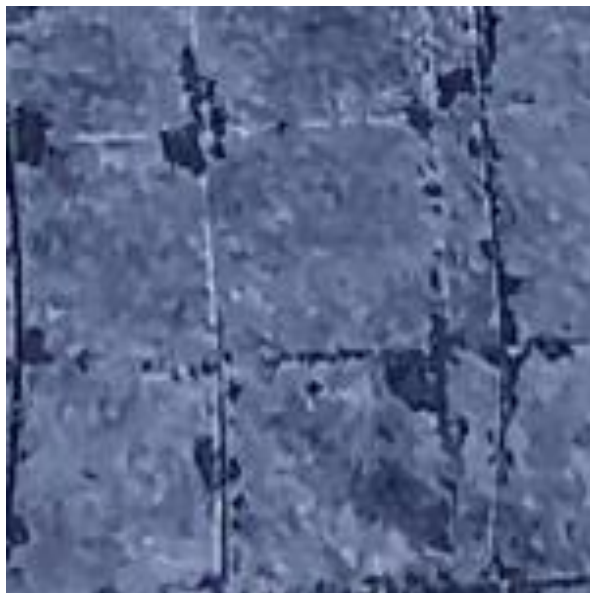
Sa Slike 5.30 se vidi neznatno povećanje linearne hrapavosti sa povećanjem primenjenih napona anodizacije za ACP/TiO₂ uzorke. Upoređujući linearnu hrapavost površine ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzoraka primećuje se da su svi mereni parametri hrapavosti manji kod ACP/TiO₂/ChOL prevlaka nego kod ACP/TiO₂ prevlaka, a i sami mereni parametri hrapavosti su niži kod prevlaka dobijenih na 90 V nego kod istih dobijenih na 60 V. Upoređivanjem Sm vrednosti

5. REZULTATI I DISKUSIJA

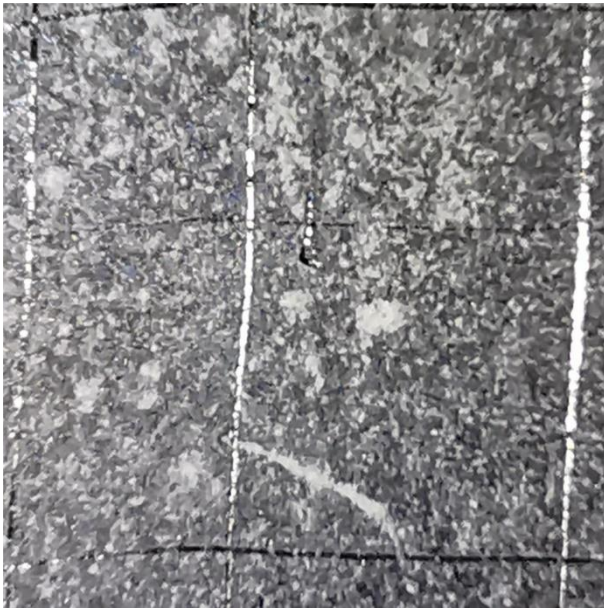
(srednji razmak između vrhova profila na srednjoj liniji na ukupnoj dužini uzorkovanja) svih uzoraka može se videti da su aglomerati manji kod ACP/TiO₂/ChOL prevlaka nego kod ACP/TiO₂ prevlaka, kao i da se povećanjem napona anodizacije smanjuju aglomerati kod prevlaka dobijenih na 90 V u poređenju sa 60 V. Stoga optimalni napon *in situ* anodizacije/anaforske depozicije prevlake na titanskim supstratima je 60 V, jer se dobija optimalna hrapavost prevlake za osteointegraciju. Ova merenja su u skladu sa ranijim opažanjima anodizacije čistog Ti supstrata, gde se vrednosti *Ra* i *Rq* smanjuju pri anodizaciji na 90 V, doline se ispunjavaju, a pikovi se šire.

5.7. ISPITIVANJE ADHEZIJE KALCIJUM FOSFATNIH PREVLAKA

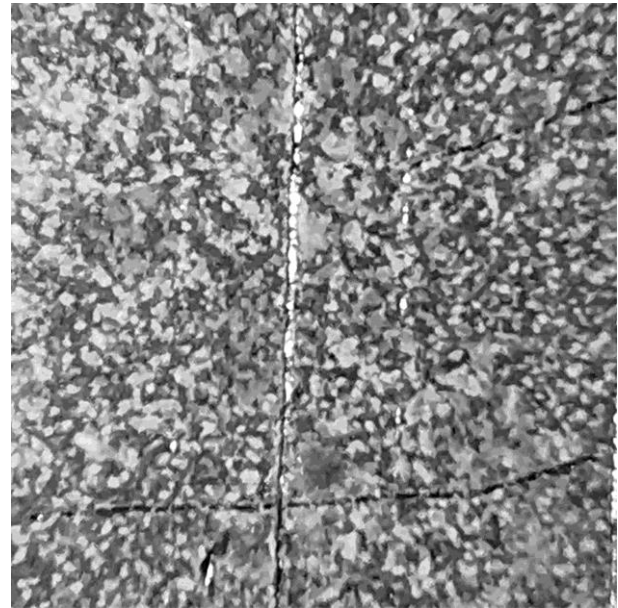
Kako adhezija prevlake predstavlja jednu od značajnih karakteristika prevlake za potencijalnu primenu materijala u medicini, adhezija je, pored kvalitativnog upoređivanja sa catHAp prevlakama, kvantitativno određena na anHAp/TiO₂, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlakama na titanskim supstratima kao što je opisano u Poglavlju 4. Na Slici 5.31 je prikazana fotografija kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake posle ispitivanja adhezije prema ASTM D3359-02 standardu. Slično i sa ostalim prevlakama, na Slici 5.32 su prikazane fotografije kompozitnih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka snimljenih optičkim mikroskopom posle ispitivanja adhezije prema ASTM D3359-02 standardu. Sve veličine fotografija na Slici 5.31 i Slici 5.32 su (5×5) mm.



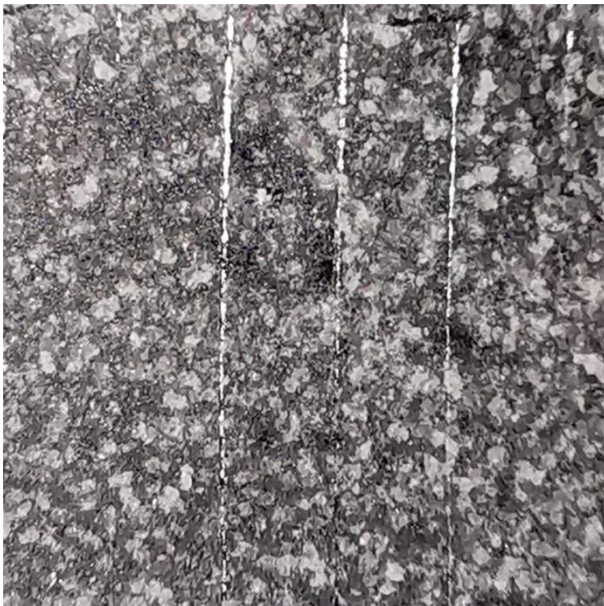
Slika 5.31. Optička fotografija kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake dobijene na 60 V nakon izvođenja testa adhezije prema standardu ASTM D 3359-02. Veličina slike je 5×5 mm



a)



b)



c)



d)

Slika 5.32. Optičke fotografije a) kompozitne ACP/TiO₂ prevlake dobijene na 60 V, b) kompozitne ACP/TiO₂ prevlake dobijene na 90 V, c) kompozitne ACP/TiO₂/ChOL prevlake dobijene na 60 V i d) kompozitne ACP/TiO₂/ChOL prevlake dobijene na 90 V nakon izvođenja testa adhezije prema standardu ASTM D 3359-02: standardna test metoda za merenje adhezije trakom; test unakrsnog zarezivanja (B). Veličina slika je 5×5 mm

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Evaluacijom, kvantifikovanjem i klasifikacijom adhezije kompozitne anHAp/TiO₂ prevlake prema ASTM D3359-02 standardu (Slika 5.31), može se zaključiti da je adhezija nivoa 4, gde nivo 5 predstavlja najbolju adheziju (bez odvajanja i bez delaminacije), a nivo 0 predstavlja najgoru adheziju (više od 65 % prevlake je uklonjeno). Ako se rezultati uporede sa standardnom kataforetskom metodom taloženja HAp (catHAp), koja ima adheziju nivoa 0 pre sinterovanja i nivo 1 ili 2 (zavisno od prethodne površinske obrade supstrata) posle sinterovanja, nova *in situ* metoda anodizacije/anaforetske depozicije prevlake predstavlja ogromno poboljšanje, imajući u vidu da metoda sinterovanja nije korišćena.

Upotrebom druge kalcijumfosfatne prevlake (nanočestičnog amorfnog kalcijum fosfata), Slika 5.32, adhezija je još više poboljšana. Sa Slike 5.32 se može videti da je, posle ispitivanja adhezije prema ASTM D3359-02 standardu, adhezija na najvišem petom nivou (što znači da nema delaminacije i ljušpanja) kod svih ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL prevlaka, što predstavlja samo poboljšanje procesa *in situ* anodizacije/anaforetske depozicije, a ovakva prevlaka se može, sa stanovišta adhezije, dalje koristiti u biomedicinske svrhe bez procesa sinterovanja.

5.8. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

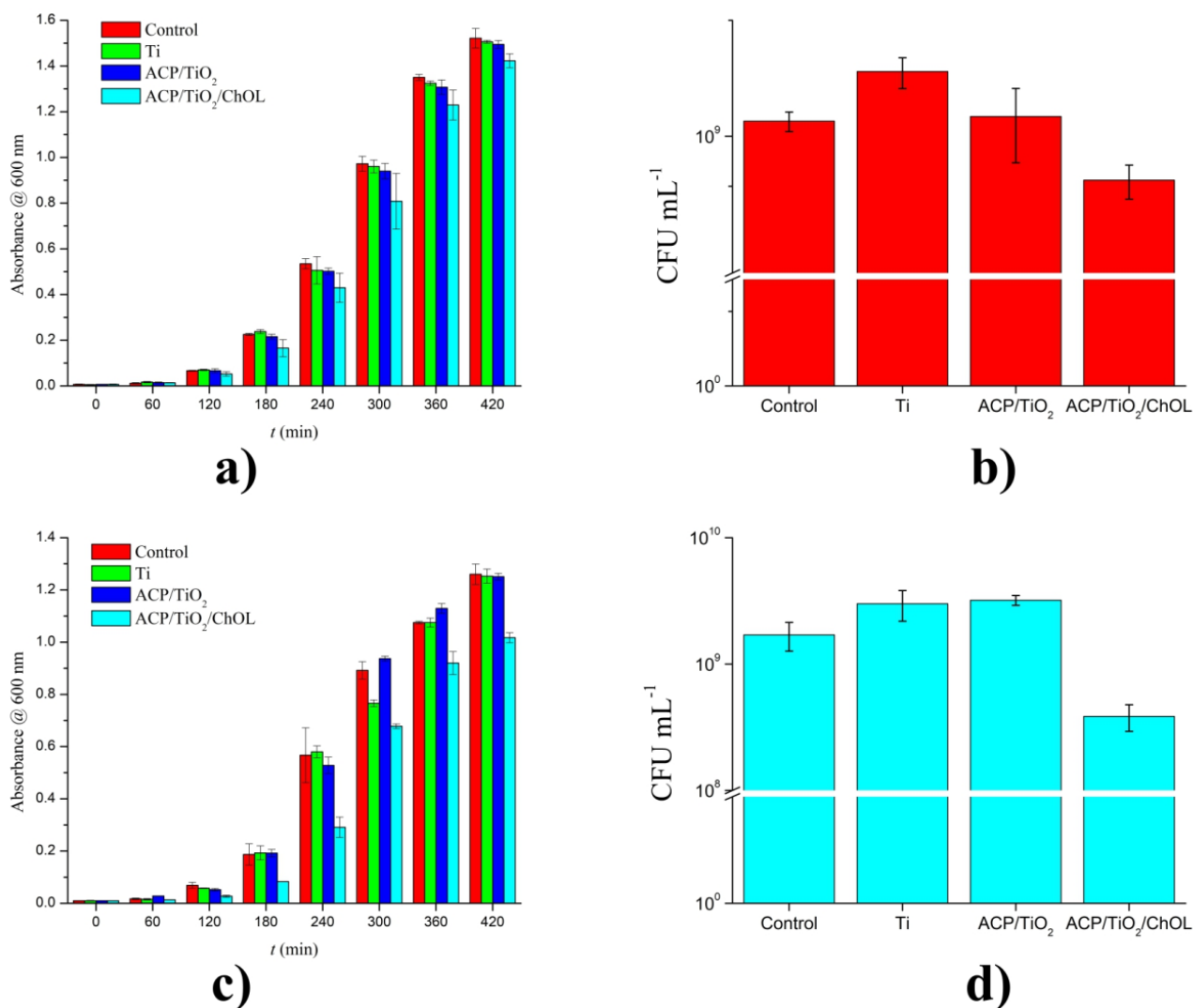
Osnovna hipoteza ove doktorske disertacije bila je da bi se dodavanjem ChOL ACP prevlaci dobila kompozitna prevlaka sa povećanom stabilnošću na koroziju, dobrom adhezijom i poboljšanim antimikrobnim svojstvima. Da bi se ispitala antimikrobna svojstva, ispitivana je efikasnost anti-biofilma dve bioaktivne multifunkcionalne kompozitne prevlake (ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL) procenom broja živih ćelija (*viable cell count* - VCC) i merenjima optičke gustine bakterijskih kultura. VCC merenja su izvedena na kraju eksperimenta, tj. nakon što je prošlo 420 minuta. Uzimajući u obzir strukturne razlike bakterijskog ćelijskog zida, ispitivane su *Staphilococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija) i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Gram-negativna bakterija) bakterijske kulture nakon 420 minuta.

Slike 5.33a i 5.33c ilustruju antibakterijsku aktivnost uzoraka čistog titana, ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnih kompozitnih uzoraka na sojeve *S. aureus* i *P. aeruginosa*, dok Slike 5.33b i 5.33d prikazuju rezultate merenja VCC posle 420 minuta za sojeve *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Antibakterijska aktivnost je procenjena odmah nakon inokulacije, što je praćeno alikvotiranjem nakon 60, 120, 180, 240, 300, 360 i 420 minuta inkubacije. Iz rezultata antimikrobne aktivnosti prikazanih na Slici 5.33, može se primetiti da je broj ćelija bio relativno zadržan čak i do 180 minuta nakon inkubacije za sve uzorke kada se upoređi sa početnim brojem ćelija u suspenziji.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ovaj efekat je nešto izraženiji za uzorke testirane na *P. aeruginosa* (Slika 5.33c). Posle 180 minuta dolazi do eksponencijalnog rasta bakterijskog filma. Uzorci ACP/TiO₂, kao i uzorci čistog cp-Ti pokazali su sličnu anti-biofilmsku aktivnost kao kontrolna grupa za oba soja bakterija. Međutim, kompozitni uzorci koji sadrže hitozan oligosaharid laktat (ACP/TiO₂/ChOL) pokazali su poboljšanu antimikrobnu aktivnost.



Slika 5.33. Rezultati antimikrobnih svojstava dobijeni merenjima optičke gustine za: a) *Staphylococcus aureus* i c) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Broj ćelija nakon 420 minuta za: b) *Staphylococcus aureus* i d) *Pseudomonas aeruginosa*.

Nakon 420 minuta inkubacije ACP/TiO₂/ChOL uzoraka sa *P. aeruginosa* PAO1 i *S. aureus* (Slika 5.33a i 5.33c), primećen je pad broja ćelija čak 4 puta za *P. aeruginosa* i 3 puta za *S. aureus* u odnosu na kontrolni uzorak. Vreme generacije (vreme za koje se stvori nova generacija bakterijskog soja) takođe je povećano za oko 15 minuta za *P. aeruginosa* i 9 minuta za *S. aureus*. Rezultati VCC merenja nakon 420 minuta dodatno potvrđuju nadmoć i smanjenje broja bakterija oba soja kod ACP/TiO₂/ChOL kompozitnih uzoraka u poređenju sa ACP/TiO₂ uzorcima i čistog cp-

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Ti. Primetno je smanjenje broja ćelija *S. aureus* i *P. aeruginosa*, što definitivno pokazuje da se antibakterijski potencijal ChOL javlja čak i sa tako niskom koncentracijom od 5 mas.% [262].

Hitozan oligosaharid laktat u svojoj strukturi poseduje primarne amino grupe. Pokazalo se da broj ovih amino grupa igra glavnu ulogu u antibakterijskoj aktivnosti [402]. Opšte poznati mehanizam objašnjava da ChOL ima sposobnost da menja osobine propusnosti mikrobne ćelijske membrane i dalje sprečava ulazak materijala. Ovo smanjenje propusnosti uzrokuje curenje ćelijskih sastojaka što kao konačan rezultat ima smrt bakterijske ćelije [125]. Autori sugerišu da je mesto delovanja ChOL najverovatnije bakterijski omotač, a ubijanje bakterijskog organizma moglo bi biti uzrokovano poremećajem membrane. Dodatni predloženi mehanizam za antibakterijsku aktivnost ChOL može biti blokada transkripcije RNK adsorpcijom prodrlog molekula ChOL u bakterijsku DNK [403].

Generalno, pozitivno naelektrisana priroda molekula ChOL olakšava njihovo vezivanje za bakterijski ćelijski zid i dodatno rezultira inhibicijom rasta bakterijskih ćelija. Ova pojava se javlja usled činjenice da pozitivno naelektrisana amino grupa na položaju C-2 monomera glukozamina deluje u interakciji sa negativno naelektrisanom grupom karboksilne kiseline makromolekula površine bakterijskih ćelija i formira polielektrolitne komplekse [403,404]. Ovi kompleksi funkcionišu kao nepropusni sloj oko ćelije i potiskuju metaboličku aktivnost bakterija blokirajući prodiranje hranljivih sastojaka kroz ćelijski zid.

Takođe je otkriveno da rastvorljivi ChOL, koji se koristio u eksperimentima, pokazuje baktericidno delovanje i na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije [125,262].

5.9. CITOTOKSIČNOST MULTIFUNKCIONALNIH KOMPOZITNIH PREVLAKA

Testovi citotoksičnosti smatraju se primarnim *in vitro* testovima za istraživanje biokompatibilnosti materijala koji se koriste u medicinske svrhe. Pružaju informacije o citotoksičnosti materijala i citotoksičnosti eventualnih otpuštanja jona ili molekula iz materijala na ćelijskoj kulturi. Oni su standardizovani i rezultati se lako mogu uporediti sa potrebnim nivoima sigurnosti [405]. Prema ISO 7405 standardu, preporučuju se test direktnog kontakta i test kontakt ćelija sa eluatima. Sa testovima direktnog kontakta, *in vivo* uslovi se bolje imitiraju, ali uključuju određeni rizik od mehaničkog oštećenja ćelija, a takođe povećavaju rizik od bakterijske kontaminacije ćelijske kulture [405].

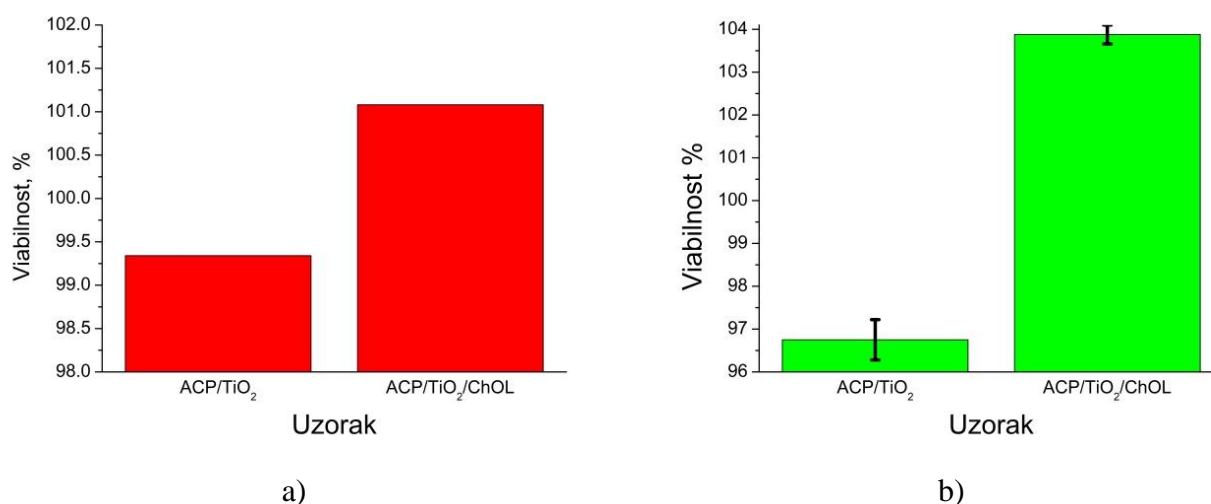
Vijabilnost biomaterijala koji su ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji u cilju moguće primene u biomedicini je eksperimentalno određena kao što je opisano u Odeljku 4.9. Uzorci koji su

5. REZULTATI I DISKUSIJA

ispitivani na citotoksičnost upotrebom MRC-5 ćelijske linije (fibroblasti pluća) su ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalne kompozitne prevlake na titanskom supstratu grade 2 titana dobijene pri naponu od 60V tokom vremena taloženja od 3 minuta na način opisan u Odeljku 4.5 [353].

Na Slici 5.34 su prikazani su rezultati DET i MTT testova vijabilnosti ćelija za ispitivane uzorke. Rezultati su prikazani kao frakcija preživelih ćelija, a ova frakcija se prikazuje i izražava kao procenat od kontrolne vrednosti, odnosno kontrolnog uzorka upotrebom Jednačine 4.10.

Upoređujući dobijene rezultate DET testa (Slika 5.34a) sa rezultatima MTT testa (Slika 5.34b) može se primetiti da su rezultati konzistentni i da nisu u međusobnoj koliziji. Oba testa su pokazala da ne dolazi do značajnog umanjenja preživljavanja zdravih MRC-5 ćelija kod ACP/TiO₂ kompozitnog uzorka. Prema klasifikaciji iz literature [95,353,405,406], može se uočiti da je ovaj uzorak necitotoksičan za MRC-5 liniju humanih fibroblasta pluća. Vijabilnost za ACP/TiO₂ kompozitni uzorak iznosi $96,75 \pm 0,47$ % kod MTT testa, odnosno $99,34$ % kod DET testa.



Slika 5.34. a) Rezultati DET testa vijabilnosti izraženi kao procenat od kontrolne vrednosti za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzorke i b) Rezultati MTT testa vijabilnosti nakon 48h + 48h oporavka izraženi kao procenat od kontrolne vrednosti za ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL uzorke

Kod uzorka koji sadrži ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnu kompozitnu prevlaku na titanskom supstratu procentualno dolazi do povećanja broja viabilnih ćelija. Procenat preživljavanja zdravih MRC-5 ćelija na kompozitu koji sadrži hitozan oligosaharid laktat u odnosu na kontrolne uzorke iznosi $101,08$ % kod DET testa, odnosno $103,88 \pm 0,22$ % kod MTT testa. Primećuje se veći oporavak MRC-5 ćelija humanih fibroblasta pluća u odnosu na kontrolni uzorak posle 48h od ubiranja. Iz ovih rezultata se može izvući zaključak da ne samo da ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalna kompozitna prevlaka nije citotoksična, već prisustvo ChOL u prevlaci poboljšava ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i viabilnost ćelija. Svi eksperimenti citotoksičnosti

5. REZULTATI I DISKUSIJA

su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta izvedena u kvadruplikatu, tako da je vijabilnost predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su oba kompozitna materijala korišćena u istraživanjima necitotoksična za korišćene ćelijske linije, kao i da 5 mas.% ChOL pozitivno utiče na netoksičnost materijala [353].

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji je prikazana inovativna metoda nanošenja biološki aktivnih prevlaka na bazi kalcijum fosfatne keramike novim procesom *in situ* anodizacije/anaforetske depozicije na titanske supstrate, pri čemu su kompozitne prevlake ACP/TiO₂ i ACP/TiO₂/ChOL na titanu dobijene po prvi put.

Proces je ostvaren korišćenjem modifikovane EPD metode, novom *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije. U prvom delu disertacije je prikazana optimizacija navedenog procesa koja je podrazumevala optimizaciju parametara, prevashodno napona i vremena izvođenja procesa za dobijanje kompozitnih i hibridnih biokompatibilnih prevlaka na bazi kalcijum fosfata sa ili bez hitozan oligosaharid laktata. Za optimizovanje procesa bilo je prvenstveno potrebno odrediti najpovoljniji napon za izvođenje istog, a potom i optimizovati suspenziju u kojoj se nalazio materijal za dobijanje prevlaka na titanskom supstratu. U drugom delu disertacije su ispitane fizičko-hemijske i biološke karakteristike ovih prevlaka. Ispitani su hemijski i kristalografski sastavi i morfologija prevlaka, adhezija, koroziona stabilnost, bioaktivnost, citotoksičnost i antimikrobna svojstva prevlaka.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analize linearne i površinske hrapavosti pokazale su da titan anodizovan na naponu od 60 V ima najveću hrapavost, a proces anodizovanja pri naponu od 90 V dovodi do ravnjanja površine, pri čemu se doline popunjavaju sekundarnim oksidnim slojem, a vrhovi se šire, što kao rezultat ima posledicu da proces anodizacije titana na 90 V čini površinu manje grubom, odnosno glađom. Kao najoptimalniji napon za izvođenje *in situ* procesa je izabran napon od 60 V.
- Optimizovana i dobro pripremljena suspenzija sa odgovarajućim izborom medijuma za suspenziju je sadržala 1,0028 g HAp praha u 100ml apsolutnog etanola, a rastvoru je dodat 10 mas.% rastvor NaOH dok se nije dobio rastvor HAp u etanolu pH vrednosti 10,00. ACP suspenzija je sadržala 1,0000 g ACP u 100 ml apsolutnog etanola, a rastvoru je dodat 10 mas.% NaOH dok se nije dobila suspenzija pH vrednosti 10,00. Suspenzija za dobijanje amorfnog kalcijum fosfatne prevlake sa hitozan oligolaktatom je sadržala 1,0000 g ACP i 0,0500 g hitozan oligolaktata i dodat je 10 mas.% rastvor NaOH.
- Nano-hidroksiapatitni sloj je uspešno sintetizovan novom *in situ* metodom anodizacije/anaforetskog taloženja na titanskoj podlozi sa istovremenom anodizacijom titanske površine. Formiranje hidroksiapatitnog sloja potvrđeno je skenirajućom elektronskom mikroskopijom, energetski disperzivnom spektroskopijom, difrakcijom X zraka (XRD) i atenuiranom totalnom refleksnom Furieovom transformacionom infracrvenom spektroskopijom (ATR-FTIR). Na difraktogramu se mogu videti karakteristični pikovi hidroksiapatita koji odgovaraju (002), (211), (112) i (300) kristalnim

ravnima na $2\theta = 25,85^\circ$, $31,60^\circ$, $32,25^\circ$ i 33° , redom. Na difraktogramu se takođe mogu očitati i specifične najintenzivnije XRD refleksije koje odgovaraju rutilnoj TiO_2 strukturi na $2\theta = 27,85^\circ$, $36,35^\circ$ i $54,80^\circ$. Na spektru anHAp/ TiO_2 prevlake mogu se videti karakteristične apsorpcione trake PO_4^{3-} grupa kod hidroksiapatita, čije se apsorpcione trake očitavaju na $950\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$. Dodatne slabe trake na 872 , 1402 i 1476 cm^{-1} se pripisuju karbonatnim vrstama (CO_3^{2-}) u apatitnoj rešetki. Položaji karbonatnih traka ukazuju na delimičnu supstituciju hidroksiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, karbonatnim grupama, pri čemu preovlađuje tip B karbonatni hidroksiapatit. Ove apsorpcione trake u FTIR spektru najverovatnije potiču od rastvorenog CO_2 u elektrolitu koji potiče iz atmosfere. Na FTIR spektru anHAp/ TiO_2 prevlake široka traka na 3170 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja OH jona koji potiču iz molekula vode, kao i apsorpcione trake na oko 1650 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama apsorbovane vode.

- Novi *in situ* proces sinteze kompozitnih anHAp/ TiO_2 prevlaka se sastoji od istovremenih procesa formiranja TiO_2 i taloženja HAp i ugradnje HAp u TiO_2 kristalnu rešetku. Površina titanskog supstrata je u potpunosti prekrivena HAp/ TiO_2 kompozitnom prevlakom. Nema vidljivih pukotina. Površina je za red veličine hrapavija u poređenju sa anodizovanim Ti dobijenim pri istom naponu. Novi predloženi postupak *in situ* sinteze daje mnogo bolje rezultate adhezije nego catHAp prevlaka. Nije potreban proces sinterovanja prevlake, a dolazi do istovremene oksidacije površine i taloženja HAp. Adhezija prevlake pokazuje veliko poboljšanje u poređenju sa istim prevlakama dobijenim kataforetskim procesom, čak i bez sinterovanja prevlake.
- Nano ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL kompozitne prevlake su po prvi put uspešno sintetisane novom, istovremenom *in situ* metodom anodizacije/anaforetske depozicije na titanskoj podlozi. Formiranje ovih kompozitnih prevlaka potvrđeno je skenirajućom elektronskom mikroskopijom, difrakcijom X zraka (XRD) i atenuiranom totalnom refleksnom Furieovom transformacionom infracrvenom spektroskopijom (ATR-FTIR). XRD difrakcioni obrazac pokazuje difuzioni maksimum koji je tipičan za ACP na oko $2\theta = 30^\circ$. Međutim, difrakcioni pikovi na uzorcima na $2\theta = 25,8^\circ$, $31,7^\circ$ i $32,2^\circ$ za uzorke ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL dobijene izvođenjem procesa na 90 V odgovaraju (002), (211) i (112) refleksiji kristalnih ravni HAp. Pojava pikova na ACP difraktogramu koji odgovaraju refleksiji HAp kristalnih ravni se može objasniti lokalnim povećanjem temperature tokom *in situ* procesa anodizacije/anaforetske elektrodepozicije, pri čemu je moguće da se određena količina ACP transformiše u delimično kristalni HAp. Na XRD difraktogramu se može primetiti difrakcioni pik na $2\theta = 29,4^\circ$ koji se može pripisati hitozanu. Dobijeni rezultati ukazuju da porast temperature izaziva termičku degradaciju hitozan oligolaktata na proizvode slične

6. ZAKLJUČCI

hitinu i hitozanu. Difrakcioni pik na $2\theta = 37,3^\circ$ se pripisuje TiO_2 atanas fazi. Nalazi neoborivo dokazuju da se odigrava *in situ* jednostepeno taloženje ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL. FTIR merenja prikazuju tipične apsorpcione trake karakteristične za PO_4^{3-} grupe, karbonatne (CO_3^{2-}) grupe koje potiču od delimične supstitucije kod ACP i adsorbirane H_2O molekule. Dve slabije izražene, ali primetne trake koje se javljaju kod uzoraka ACP/ TiO_2 /ChOL sintetisanih na 60 V i 90 V na 2922 i 2853 cm^{-1} se pripisuju vibracijama istezanja CH grupa kod hitozan oligolaktata, što predstavlja konačnu potvrdu prisustva hitozan oligolaktata (ChOL) u kompozitnoj prevlaci. Prisustvo adsorpcionih traka na 2922 i 2853 cm^{-1} nesumnjivo dokazuje uspešnost *in situ* procesa anodizacije/anaforetske elektrodepozicije ACP/ TiO_2 /ChOL prevlake u baznoj sredini.

- Pokrivenost površina prevlakama sa dobrim prijanjanjem je primetno. Može se zaključiti da je adhezija na najvišem petom nivou (prema ASTM D3359-02 standardu) kod svih ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL prevlaka, što predstavlja samo poboljšanje procesa *in situ* anodizacije/anaforetske depozicije, a ovakva prevlaka se može, sa stanovišta adhezije, dalje koristiti u biomedicinske svrhe bez naknadnog procesiranja.
- E_{OCP} merenja ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL multifunkcionalnih kompozitnih prevlaka na titanskim supstratima su pokazala da su potencijali obe analizirane prevlake plemenitiji od potencijala čistog cp-Ti. Ovaj rezultat ukazuje na bolju površinsku pasivaciju titanskog supstrata. ACP/ TiO_2 /ChOL multifunkcionalna kompozitna prevlaka je pokazala najnižu vrednost j_{corr} , koja je oko tri puta niža od vrednosti gustine struje korozije za čisti Ti. ACP/ TiO_2 kompozitna prevlaka takođe ima vrednost j_{corr} koja je niža od vrednosti čistog titana. Bolja koroziona stabilnost oba uzoraka podrazumeva da je na koroziono ponašanje i trajnost uzoraka u SBF medijumu uticalo stvaranje kako nehomogenih, tako i homogenih oksidnih, zatim keramičkih i na kraju kompozitnih multifunkcionalnih slojeva. Dodavanje ChOL u ACP uz istovremeno formiranje titan dioksida pomaže u formiranju dobro vezanih, ujednačenih, stabilnih prevlaka na Ti površini sa velikom otpornošću na koroziju. Plemenitije vrednosti E_{corr} i niže vrednosti j_{corr} ukazuju na sposobnost ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL kompozita da ostvare visoku otpornost na koroziju u *in vitro* uslovima. ACP/ TiO_2 /ChOL ima homogeniji unutrašnji pasivni sloj/film, sa dobrom adhezijom na Ti podlogu.
- Multifunkcionalni kompozitni ACP/ TiO_2 i ACP/ TiO_2 /ChOL uzorci poseduju izraženu bioaktivnost nakon potapanja u SBF, što je potvrđeno stvaranjem novog apatitnog sloja koji u potpunosti pokriva celu površinu oba uzorka. Međutim, površina ACP/ TiO_2 /ChOL je potpuno prekrivena novim slojem apatita nakon 3 dana, dok je za ACP/ TiO_2 bilo potrebno 7 dana.

6. ZAKLJUČCI

- Utvrđeno je smanjenje broja ćelija četiri puta za *P. aeruginosa* i tri puta za *S. aureus* za prevlaku ACP/TiO₂/ChOl u odnosu na ACP/TiO₂.
- Testovi citotoksičnosti su pokazali da ne dolazi do značajnog umanjenja preživljavanje zdravih MRC-5 ćelija kod ACP/TiO₂ kompozitnog uzorka, dok procentualno dolazi do povećanja broja viabilnih ćelija kod uzorka koji sadrži ACP/TiO₂/ChOL multifunkcionalnu kompozitnu prevlaku na titanskom supstratu, što pokazuje da dolazi do poboljšane ćelijske proliferacije, diferencijacije i viabilnosti ćelija.

Na osnovu svih priloženih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, analizom dobijenih fiziko-hemijskih, bioaktivnih, antimikrobnih i citotoksičnih svojstava, može se zaključiti da bi dalji razvoj u ovim istraživanjima kao i potencijalna predklinička istraživanja bila opravdana u velikoj meri.

LITERATURA

- [1] *Biomaterials Science*; Wagner, W. R., Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang, G., Yaszemski, M. J., Eds.; Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/c2017-0-02323-6>.
- [2] Zindani, D.; Kumar, K.; Paulo Davim, J. 4 - Metallic Biomaterials—A Review. In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*; Davim, J. P. B. T.-M. B. of B., Ed.; Woodhead Publishing, 2019; pp 83–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102174-3.00004-8>.
- [3] Ahmadi, S.; Mohammadi, I.; Sadrnezhad, S. K. Hydroxyapatite Based and Anodic Titania Nanotube Biocomposite Coatings: Fabrication, Characterization and Electrochemical Behavior. *Surf. Coatings Technol.* **2016**, *287*, 67–75. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.062>.
- [4] Ahmadi, S.; Sadrnezhad, S. K. A Novel Method for Production of Foamy Core@compact Shell Ti6Al4V Bone-like Composite. *J. Alloys Compd.* **2016**, *656*, 416–422. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.09.248>.
- [5] Geetha, M.; Singh, A. K.; Asokamani, R.; Gogia, A. K. Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants – A Review. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54* (3), 397–425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>.
- [6] Ratha, I.; Datta, P.; Balla, V. K.; Nandi, S. K.; Kundu, B. Effect of Doping in Hydroxyapatite as Coating Material on Biomedical Implants by Plasma Spraying Method: A Review. *Ceram. Int.* **2021**, *47* (4), 4426–4445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.10.112>.
- [7] Tomashov, N. D.; Altovsky, R. M.; Chernova, G. P. Passivity and Corrosion Resistance of Titanium and Its Alloys. *J. Electrochem. Soc.* **1961**, *108* (2), 113–119. <https://doi.org/10.1149/1.2428023>.
- [8] Schutz, R. W. F.N. Speller Award Lecture: Platinum Group Metal Additions to Titanium: A Highly Effective Strategy for Enhancing Corrosion Resistance. *CORROSION* **2003**, *59* (12), 1043–1057. <https://doi.org/10.5006/1.3277524>.
- [9] Han, C.; Wang, Q.; Song, B.; Li, W.; Wei, Q.; Wen, S.; Liu, J.; Shi, Y. Microstructure and Property Evolutions of Titanium/Nano-Hydroxyapatite Composites in-Situ Prepared by Selective Laser Melting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *71*, 85–94. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.02.021>.
- [10] Hamada, K.; Kon, M.; Hanawa, T.; Yokoyama, K.; Miyamoto, Y.; Asaoka, K. Hydrothermal Modification of Titanium Surface in Calcium Solutions. *Biomaterials* **2002**, *23* (10), 2265–2272. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00361-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00361-1).

- [11] Niespodziana, K.; Jurczyk, K.; Jakubowicz, J.; Jurczyk, M. Fabrication and Properties of Titanium–Hydroxyapatite Nanocomposites. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *123* (1), 160–165. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.03.076>.
- [12] Shen, S.; Cai, S.; Li, Y.; Ling, R.; Zhang, F.; Xu, G.; Wang, F. Microwave Aqueous Synthesis of Hydroxyapatite Bilayer Coating on Magnesium Alloy for Orthopedic Application. *Chem. Eng. J.* **2017**, *309*, 278–287. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.043>.
- [13] Abdal-hay, A.; Vanegas, P.; Hamdy, A. S.; Engel, F. B.; Lim, J. H. Preparation and Characterization of Vertically Arrayed Hydroxyapatite Nanoplates on Electrospun Nanofibers for Bone Tissue Engineering. *Chem. Eng. J.* **2014**, *254*, 612–622. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.118>.
- [14] Shadanbaz, S.; Dias, G. J. Calcium Phosphate Coatings on Magnesium Alloys for Biomedical Applications: A Review. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (1), 20–30. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.016>.
- [15] Williams, D. F. Tissue-Biomaterial Interactions. *J. Mater. Sci.* **1987**, *22* (10), 3421–3445. <https://doi.org/10.1007/bf01161439>.
- [16] Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, *27* (18), 3413–3431. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.
- [17] Muzzarelli, R. A. A. Chitosan Composites with Inorganics, Morphogenetic Proteins and Stem Cells, for Bone Regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (4), 1433–1445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.044>.
- [18] Albayrak, O.; El-Atwani, O.; Altintas, S. Hydroxyapatite Coating on Titanium Substrate by Electrophoretic Deposition Method: Effects of Titanium Dioxide Inner Layer on Adhesion Strength and Hydroxyapatite Decomposition. *Surf. Coatings Technol.* **2008**, *202* (11), 2482–2487. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.09.031>.
- [19] Van der Biest, O. O.; Vandeperre, L. J. ELECTROPHORETIC DEPOSITION OF MATERIALS. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1999**, *29* (1), 327–352. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.29.1.327>.
- [20] Ulasevich, S. A.; Kulak, A. I.; Poznyak, S. K.; Karpushenkov, S. A.; Lisenkov, A. D.; Skorb, E. V. Deposition of Hydroxyapatite-Incorporated TiO₂ Coating on Titanium Using Plasma Electrolytic Oxidation Coupled with Electrophoretic Deposition. *RSC Adv.* **2016**, *6* (67), 62540–62544. <https://doi.org/10.1039/C6RA10560B>.
- [21] Ristić, B.; Popović, Z.; Adamović, D.; Devedžić, G. Selection of Biomaterials in Orthopedic Surgery | Izbor Biomaterijala u Ortopedskoj Hirurgiji. *Vojnosanit. Pregl.* **2010**, *67* (10), 847–

855.

- [22] Rémi, E.; Khelil, N.; Centa, I. Di; Roques, C.; Ba, M.; Medjahed-Hamidi, F.; Chaubet, F.; Letourneur, D.; Lansac, E.; Meddahi-Pelle, A. *Biomaterials Science and Engineering*; 2011.
- [23] Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery BT - Tissue Engineering I*; Lee, K., Kaplan, D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 47–90. <https://doi.org/10.1007/b137240>.
- [24] Hench, L.; Jones, J. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*; Elsevier, 2005.
- [25] Leeuwenburgh, S. C. G.; Jansen, J. A.; Malda, J.; Dhert, W. A.; Rouwkema, J.; van Blitterswijk, C. A.; Kirkpatrick, C. J.; Williams, D. F. *Trends in Biomaterials Research: An Analysis of the Scientific Programme of the World Biomaterials Congress 2008. Biomaterials* **2008**, *29* (21), 3047–3052. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.032>.
- [26] Bonzani, I. C.; Adhikari, R.; Houshyar, S.; Mayadunne, R.; Gunatillake, P.; Stevens, M. M. *Synthesis of Two-Component Injectable Polyurethanes for Bone Tissue Engineering. Biomaterials* **2007**, *28* (3), 423–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.026>.
- [27] Balani, K.; Anderson, R.; Laha, T.; Andara, M.; Tercero, J.; Crumpler, E.; Agarwal, A. *Plasma-Sprayed Carbon Nanotube Reinforced Hydroxyapatite Coatings and Their Interaction with Human Osteoblasts in Vitro. Biomaterials* **2007**, *28* (4), 618–624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.013>.
- [28] Chu, T.-M. G.; Warden, S. J.; Turner, C. H.; Stewart, R. L. *Segmental Bone Regeneration Using a Load-Bearing Biodegradable Carrier of Bone Morphogenetic Protein-2. Biomaterials* **2007**, *28* (3), 459–467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.004>.
- [29] Eglin, D.; Maalheem, S.; Livage, J.; Coradin, T. *In Vitro Apatite Forming Ability of Type I Collagen Hydrogels Containing Bioactive Glass and Silica Sol-Gel Particles. J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17* (2), 161–167. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-6820-6>.
- [30] Sergi, R.; Bellucci, D.; Cannillo, V. *A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art. Materials* . 2020. <https://doi.org/10.3390/ma13235560>.
- [31] Montalbano, G.; Borciani, G.; Cerqueni, G.; Licini, C.; Banche-Niclot, F.; Janner, D.; Sola, S.; Fiorilli, S.; Mattioli-Belmonte, M.; Ciapetti, G.; Vitale-Brovarone, C. *Collagen Hybrid Formulations for the 3D Printing of Nanostructured Bone Scaffolds: An Optimized Genipin-Crosslinking Strategy. Nanomaterials* . 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10091681>.
- [32] Yazdani, I.; Movahedi, B.; Naeimi, M.; Sattary, M.; Rafienia, M. *Novel Electrospun Polyurethane Scaffolds Containing Bioactive Glass Nanoparticles. Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials* **2020**, *9* (3), 175–183. <https://doi.org/10.1680/jbibn.18.00004>.

- [33] Jaafar, A.; Hecker, C.; Árki, P.; Joseph, Y. Sol-Gel Derived Hydroxyapatite Coatings for Titanium Implants: A Review. *Bioengineering* . 2020. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040127>.
- [34] Niinomi, M. Titanium Alloys; Narayan, R. B. T.-E. of B. E., Ed.; Elsevier: Oxford, 2019; pp 213–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99864-7>.
- [35] Asri, R. I. M.; Harun, W. S. W.; Hassan, M. A.; Ghani, S. A. C.; Buyong, Z. A Review of Hydroxyapatite-Based Coating Techniques: Sol–Gel and Electrochemical Depositions on Biocompatible Metals. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *57*, 95–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.11.031>.
- [36] Niinomi, M.; Liu, Y.; Nakai, M.; Liu, H.; Li, H. Biomedical Titanium Alloys with Young’s Moduli Close to That of Cortical Bone. *Regen. Biomater.* **2016**, *3* (3), 173–185. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw016>.
- [37] Hieda, J.; Niinomi, M.; Nakai, M.; Cho, K.; Matsubara, A. Evaluation of Adhesion of Hydroxyapatite Films Fabricated on Biomedical β -Type Titanium Alloy after Immersion in Ringer’s Solution. *Mater. Trans.* **2015**, *56* (10), 1703–1710.
- [38] von Recum, A. F. *Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, Technical and Clinical Testing of Implant Materials*; CRC Press, 1998.
- [39] Park, J.; Lakes, R. S. *Biomaterials: An Introduction*; Springer Science & Business Media, 2007.
- [40] Nakano, T. 3 - Physical and Mechanical Properties of Metallic Biomaterials. In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*; Niinomi, M. B. T.-M. for B. D. (Second E., Ed.; Woodhead Publishing, 2019; pp 97–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102666-3.00003-1>.
- [41] Akpan, E. I.; Gbenebor, O. P.; Adeosun, S. O.; Cletus, O. Chapter 16 - Chitin and Chitosan Composites for Bone Tissue Regeneration; Gopi, S., Thomas, S., Pius, A. B. T.-H. of C. and C., Eds.; Elsevier, 2020; pp 499–553. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817966-6.00016-9>.
- [42] Hill, D. Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices. *Des. Eng. Biomater. Med. Devices*, by David Hill, pp. 480. ISBN 0-471-96708-4. Wiley-VCH, Oct. 1998. **1998**, 480.
- [43] Bauer, S.; Schmuki, P.; von der Mark, K.; Park, J. Engineering Biocompatible Implant Surfaces: Part I: Materials and Surfaces. *Prog. Mater. Sci.* **2013**, *58* (3), 261–326. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>.
- [44] Park, J. B. *Biomaterials Science and Engineering*; Springer Science & Business Media, 2012.
- [45] Ratner, B. D.; Bryant, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going.

Annu. Rev. Biomed. Eng. **2004**, *6*, 41–75.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>.

- [46] Eliaz, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2019**, *12* (3), 407. <https://doi.org/10.3390/ma12030407>.
- [47] Dehghanghadikolaie, A.; Fotovvati, B. Coating Techniques for Functional Enhancement of Metal Implants for Bone Replacement: A Review. *Materials* . 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12111795>.
- [48] Niinomi, M.; Nakai, M.; Hieda, J. Development of New Metallic Alloys for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (11), 3888–3903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.037>.
- [49] Chen, Q.; Thouas, G. A. Metallic Implant Biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2015**, *87*, 1–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>.
- [50] Paital, S. R.; Dahotre, N. B. Calcium Phosphate Coatings for Bio-Implant Applications: Materials, Performance Factors, and Methodologies. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2009**, *66* (1), 1–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mser.2009.05.001>.
- [51] Williams, D. F. Titanium: Epitome of Biocompatibility or Cause for Concern. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1994**, *76-B* (3), 348–349. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.76B3.8175831>.
- [52] Ibrahim, H.; Jahadakbar, A.; Dehghan, A.; Moghaddam, N. S.; Amerinatanzi, A.; Elahinia, M. In Vitro Corrosion Assessment of Additively Manufactured Porous NiTi Structures for Bone Fixation Applications. *Metals* . 2018. <https://doi.org/10.3390/met8030164>.
- [53] Yamamoto, A.; Honma, R.; Sumita, M. Cytotoxicity Evaluation of 43 Metal Salts Using Murine Fibroblasts and Osteoblastic Cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39* (2), 331–340. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199802\)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E).
- [54] Espallargas, N.; Torres, C.; Muñoz, A. I. A Metal Ion Release Study of CoCrMo Exposed to Corrosion and Tribocorrosion Conditions in Simulated Body Fluids. *Wear* **2015**, *332–333*, 669–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wear.2014.12.030>.
- [55] Balazic, M.; Kopac, J.; Jackson, M. J.; Ahmed, W. Titanium and Titanium Alloy Applications in Medicine. *Int. J. Nano Biomater.* **2007**, *1* (1), 3–34.
- [56] Liu, X.; Xu, S.; Zhang, C.; Su, J.; Yu, B. Application of a Shape-Memory Alloy Internal Fixator for Treatment of Acetabular Fractures with a Follow-up of Two to Nine Years in China. *Int. Orthop.* **2010**, *34* (7), 1033–1040. <https://doi.org/10.1007/s00264-009-0867-1>.
- [57] Li, Y.; Yang, C.; Zhao, H.; Qu, S.; Li, X.; Li, Y. New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2014**, *7* (3), 1709–1800. <https://doi.org/10.3390/ma7031709>.

- [58] Blau, P. J. Friction, Lubrication, and Wear Technology. *ASM Int.* **1992**, 175–235.
- [59] Williams, D. F. Titanium and Titanium Alloys. *Biocompat. Clin. Implant materials Vol.* **1981**, 10–44.
- [60] Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Academic Press: New York, 1996.
- [61] Black, J. Does Corrosion Matter? *J. Bone Joint Surg. Br.* **1988**, 70 (4), 517–520.
- [62] Freese, H. L.; Volas, M. G.; Wood, J. R. Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys BT - Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications; Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2001; pp 25–51. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56486-4_3.
- [63] Trevisan, F.; Calignano, F.; Aversa, A.; Marchese, G.; Lombardi, M.; Biamino, S.; Ugués, D.; Manfredi, D. Additive Manufacturing of Titanium Alloys in the Biomedical Field: Processes, Properties and Applications. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2017**, 16 (2), 57–67. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000371>.
- [64] Zuldesmi, M.; Waki, A.; Kuroda, K.; Okido, M. Hydrothermal Treatment of Titanium Alloys for the Enhancement of Osteoconductivity. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, 49, 430–435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.031>.
- [65] Yoshinari, M.; Oda, Y.; Inoue, T.; Shimono, M. Dry-Process Surface Modification for Titanium Dental Implants. *Metall. Mater. Trans. A* **2002**, 33 (3), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s11661-002-0113-6>.
- [66] Kokubo, T.; Kim, H. M.; Kawashita, M.; Nakamura, T. Bioactive Metals: Preparation and Properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, 15 (2), 99–107. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000011809.36275.0c>.
- [67] Zhao, J.; Liu, Y.; Sun, W. Bin; Zhang, H. Amorphous Calcium Phosphate and Its Application in Dentistry. *Chem. Cent. J.* **2011**, 5 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-40>.
- [68] Skrtic, D.; Antonucci, J. M. Polymeric Dental Composites Based on Remineralizing Amorphous Calcium Phosphate Fillers. *Curr. trends Polym. Sci.* **2016**, 17, 1–31.
- [69] Combes, C.; Rey, C. Amorphous Calcium Phosphates: Synthesis, Properties and Uses in Biomaterials. *Acta Biomater.* **2010**, 6 (9), 3362–3378. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017>.
- [70] Lowenstam, H. A. Minerals Formed by Organisms. *Science* **1981**, 211 (4487), 1126–1131. <https://doi.org/10.1126/science.7008198>.
- [71] Eanes, E. D. Amorphous Calcium Phosphate. *Monogr. Oral Sci.* **2001**, 18, 130–147.

- [72] Termine, J. D.; Posner, A. S. Amorphous/Crystalline Interrelationships in Bone Mineral. *Calcif. Tissue Res.* **1967**, *1* (1), 8–23. <https://doi.org/10.1007/BF02008070>.
- [73] Weiner, S.; Sagi, I.; Addadi, L. Choosing the Crystallization Path Less Traveled. *Science* (80-.). **2005**, *309* (5737), 1027–1028. <https://doi.org/10.1126/science.1114920>.
- [74] Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Glimcher, M. J. Bone Mineral: Update on Chemical Composition and Structure. *Osteoporos. Int.* **2009**, *20* (6), 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>.
- [75] Querido, W.; Shanas, N.; Bookbinder, S.; Oliveira-Nunes, M. C.; Krynska, B.; Pleshko, N. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Developing Bone Mineral: From Amorphous Precursor to Mature Crystal. *Analyst* **2020**, *145* (3), 764–776. <https://doi.org/10.1039/c9an01588d>.
- [76] Beniash, E.; Metzler, R. A.; Lam, R. S. K.; Gilbert, P. U. P. A. Transient Amorphous Calcium Phosphate in Forming Enamel. *J. Struct. Biol.* **2009**, *166* (2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>.
- [77] Mahamid, J.; Mahamid, J.; Addadi, L.; Weiner, S. Crystallization Pathways in Bone. *Cells Tissues Organs* **2011**, *194* (2–4), 92–97. <https://doi.org/10.1159/000324229>.
- [78] Haimov, H.; Shimoni, E.; Brumfeld, V.; Shemesh, M.; Varsano, N.; Addadi, L.; Weiner, S. Mineralization Pathways in the Active Murine Epiphyseal Growth Plate. *Bone* **2020**, *130*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115086>.
- [79] Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Grossin, D.; Bertrand, G.; Soulié, J. *Bioactive Calcium Phosphate Compounds: Physical Chemistry*; 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10171-7>.
- [80] Rodrigues, A.; Lebugle, A. Behavior in Wet Atmosphere of an Amorphous Calcium Phosphate with an Atomic Ca/P Ratio of 1.33. *J. Solid State Chem.* **1999**, *148* (2), 308–315. <https://doi.org/10.1006/jssc.1999.8452>.
- [81] V. Dorozhkin, S. Amorphous Calcium Orthophosphates: Nature, Chemistry and Biomedical Applications. *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, *2* (1), 19–46. <https://doi.org/10.5923/j.ijmc.20120201.04>.
- [82] Dorozhkin, S. V. *Hydroxyapatite and Other Calcium Orthophosphates: Nanodimensional, Multiphasic and Amorphous Formulations*; 2017.
- [83] Heughebaert, J. C.; Montel, G. Conversion of Amorphous Tricalcium Phosphate into Apatitic Tricalcium Phosphate. *Calcif. Tissue Int.* **1982**, *34* (Suppl. 2), S103–S108.
- [84] Betts, F.; Posner, A. S. An X-Ray Radial Distribution Study of Amorphous Calcium Phosphate. *Mater. Res. Bull.* **1974**, *9* (3), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(74\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0025-5408(74)90087-7).

- [85] Treboux, G.; Layrolle, P.; Kanzaki, N.; Onuma, K.; Ito, A. Symmetry of Posner's Cluster [13]. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (34), 8323–8324. <https://doi.org/10.1021/ja994286n>.
- [86] Carino, A.; Ludwig, C.; Cervellino, A.; Müller, E.; Testino, A. Formation and Transformation of Calcium Phosphate Phases under Biologically Relevant Conditions: Experiments and Modelling. *Acta Biomater.* **2018**, *74*, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.027>.
- [87] Zhao, J.; Liu, Y.; Sun, W.; Yang, X. First Detection, Characterization, and Application of Amorphous Calcium Phosphate in Dentistry. *J. Dent. Sci.* **2012**, *7* (4), 316–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jds.2012.09.001>.
- [88] Boskey, A. L.; Posner, A. S. Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Microcrystalline Hydroxyapatite. A PH-Dependent, Solution-Mediated, Solid-Solid Conversion. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77* (19), 2313–2317. <https://doi.org/10.1021/j100638a011>.
- [89] Pickup, D. M.; Newport, R. J.; Barney, E. R.; Kim, J.-Y.; Valappil, S. P.; Knowles, J. C. Characterisation of Phosphate Coacervates for Potential Biomedical Applications. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28* (8), 1226–1234.
- [90] Uskoković, V.; Marković, S.; Veselinović, L.; Škapin, S.; Ignjatović, N.; Uskoković, D. P. Insights into the Kinetics of Thermally Induced Crystallization of Amorphous Calcium Phosphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (46), 29221–29235. <https://doi.org/10.1039/c8cp06460a>.
- [91] Lenton, S.; Nylander, T.; Holt, C.; Sawyer, L.; Härtlein, M.; Müller, H.; Teixeira, S. C. M. Structural Studies of Hydrated Samples of Amorphous Calcium Phosphate and Phosphoprotein Nanoclusters. *Eur. Biophys. J.* **2016**, *45* (5), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1109-7>.
- [92] Somrani, S.; Rey, C.; Jemal, M. Thermal Evolution of Amorphous Tricalcium Phosphate. *J. Mater. Chem.* **2003**, 888–892. <https://doi.org/10.1039/b210900j>.
- [93] Klein, C. P.; Driessen, A. A.; de Groot, K. Relationship between the Degradation Behaviour of Calcium Phosphate Ceramics and Their Physical-Chemical Characteristics and Ultrastructural Geometry. *Biomaterials* **1984**, *5* (3), 157–160. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(84\)90051-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(84)90051-6).
- [94] Qi, C.; Lin, J.; Fu, L. H.; Huang, P. Calcium-Based Biomaterials for Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (2), 357–403. <https://doi.org/10.1039/c6cs00746e>.
- [95] Ignjatović, N. L.; Sakač, M.; Kuzminac, I.; Kojić, V.; Marković, S.; Vasiljević-Radović, D.; Wu, V. M.; Uskoković, V.; Uskoković, D. P. Chitosan Oligosaccharide Lactate Coated Hydroxyapatite Nanoparticles as a Vehicle for the Delivery of Steroid Drugs and the

- Targeting of Breast Cancer Cells. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (43), 6957–6968. <https://doi.org/10.1039/c8tb01995a>.
- [96] Awasthi, S.; Pandey, S. K.; Arunan, E.; Srivastava, C. A Review on Hydroxyapatite Coatings for the Biomedical Applications: Experimental and Theoretical Perspectives. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (2), 228. <https://doi.org/10.1039/d0tb02407d>.
- [97] Pramanik, S.; Hanif, A.; Pinguan-Murphy, B.; Abu Osman, N. Morphological Change of Heat Treated Bovine Bone: A Comparative Study. *Materials (Basel)*. **2013**, *6* (1), 65.
- [98] Schmidt, R.; Hoffmann, V.; Helth, A.; Gostin, P. F.; Calin, M.; Eckert, J.; Gebert, A. Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite on Beta-Ti-40Nb. *Surf. Coatings Technol.* **2016**, *294*, 186–193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.03.063>.
- [99] Pantović Pavlović, M. R.; Eraković, S. G.; Pavlović, M. M.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V.; Ignjatović, N. L. Anaphoretical/Oxidative Approach to the in-Situ Synthesis of Adherent Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings on Titanium. *Surf. Coatings Technol.* **2019**, *358*, 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.12.003>.
- [100] Fihri, A.; Len, C.; Varma, R. S.; Solhy, A. Hydroxyapatite: A Review of Syntheses, Structure and Applications in Heterogeneous Catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V. September 15, 2017, pp 48–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.009>.
- [101] Domínguez-Trujillo, C.; Ternero, F.; Rodríguez-Ortiz, J. A.; Heise, S.; Boccaccini, A. R.; Lebrato, J.; Torres, Y. Bioactive Coatings on Porous Titanium for Biomedical Applications. *Surf. Coatings Technol.* **2018**, *349*, 584–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.037>.
- [102] Wu, S.; Liu, X.; Yeung, K. W. K.; Liu, C.; Yang, X. Biomimetic Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2014**, *80*, 1–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.04.001>.
- [103] Thian, E. S.; Huang, J.; Best, S. M.; Barber, Z. H.; Bonfield, W. Silicon-Substituted Hydroxyapatite: The next Generation of Bioactive Coatings. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27* (2), 251–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.016>.
- [104] Stipniece, L.; Salma-Ancane, K.; Borodajenko, N.; Sokolova, M.; Jakovlevs, D.; Berzina-Cimdina, L. Characterization of Mg-Substituted Hydroxyapatite Synthesized by Wet Chemical Method. *Ceram. Int.* **2014**, *40* (2), 3261–3267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.09.110>.
- [105] Kim, T.-W.; Lee, H.-S.; Kim, D.-H.; Jin, H.-H.; Hwang, K.-H.; Lee, J. K.; Park, H.-C.; Yoon, S.-Y. In Situ Synthesis of Magnesium-Substituted Biphasic Calcium Phosphate and in Vitro Biodegradation. *Mater. Res. Bull.* **2012**, *47* (9), 2506–2512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.05.011>.

- [106] Cacciotti, I.; Bianco, A.; Lombardi, M.; Montanaro, L. Mg-Substituted Hydroxyapatite Nanopowders: Synthesis, Thermal Stability and Sintering Behaviour. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2009**, *29* (14), 2969–2978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2009.04.038>.
- [107] Kolmas, J.; Jaklewicz, A.; Zima, A.; Bućko, M.; Paszkiewicz, Z.; Lis, J.; Ślósarczyk, A.; Kolodziejcki, W. Incorporation of Carbonate and Magnesium Ions into Synthetic Hydroxyapatite: The Effect on Physicochemical Properties. *J. Mol. Struct.* **2011**, *987* (1), 40–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.11.058>.
- [108] Landi, E.; Logroscino, G.; Proietti, L.; Tampieri, A.; Sandri, M.; Sprio, S. Biomimetic Mg-Substituted Hydroxyapatite: From Synthesis to in Vivo Behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (1), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-y>.
- [109] Khang, G. BIOMATERIALS AND MANUFACTURING METHODS FOR SCAFFOLD IN REGENERATIVE MEDICINE. *Handb. Intell. Scaffold Tissue Eng. Regen. Med.* **2012**, 1.
- [110] Arkan, E.; Azandaryani, A. H.; Moradipour, P.; Behbood, L. Biomacromolecular Based Fibers in Nanomedicine: A Combination of Drug Delivery and Tissue Engineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2017**, *18* (11), 909–924. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180112144759>.
- [111] Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 128–140. <https://doi.org/10.1002/bip.21334>.
- [112] Varlamov, V. P.; Il'ina, A. V.; Shagdarova, B. T.; Lunkov, A. P.; Mysyakina, I. S. Chitin/Chitosan and Its Derivatives: Fundamental Problems and Practical Approaches. *Biochem.* **2020**, *85* (1), 154–176. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>.
- [113] Usman, A.; Zia, K. M.; Zuber, M.; Tabasum, S.; Rehman, S.; Zia, F. Chitin and Chitosan Based Polyurethanes: A Review of Recent Advances and Prospective Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *86*, 630–645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.004>.
- [114] Khor, E.; Lim, L. Y. Implantable Applications of Chitin and Chitosan. *Biomaterials* **2003**, *24* (13), 2339–2349. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00026-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00026-7).
- [115] Wang, W.; Meng, Q.; Li, Q.; Liu, J.; Zhou, M.; Jin, Z.; Zhao, K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>.
- [116] Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling Cell Adhesion and Degradation of Chitosan Films by N-Acetylation. *Biomaterials* **2005**, *26* (29), 5872–5878. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.033>.
- [117] Sun, M. T.; O'Connor, A. J.; Milne, I.; Biswas, D.; Casson, R.; Wood, J.; Selva, D.

- Development of Macroporous Chitosan Scaffolds for Eyelid Tarsus Tissue Engineering. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *16* (6), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00201-2>.
- [118] Li, S.; Tian, X.; Fan, J.; Tong, H.; Ao, Q.; Wang, X. Chitosans for Tissue Repair and Organ Three-Dimensional (3D) Bioprinting. *Micromachines* **2019**, *10* (11). <https://doi.org/10.3390/mi10110765>.
- [119] Zhou, Z.; Wu, W.; Fang, J.; Yin, J. Polymer-Based Porous Microcarriers as Cell Delivery Systems for Applications in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Int. Mater. Rev.* **2020**, 1–37. <https://doi.org/10.1080/09506608.2020.1724705>.
- [120] Dai, C.; Li, Y.; Pan, W.; Wang, G.; Huang, R.; Bu, Y.; Liao, X.; Guo, K.; Gao, F. Three-Dimensional High-Porosity Chitosan/Honeycomb Porous Carbon/Hydroxyapatite Scaffold with Enhanced Osteoinductivity for Bone Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6* (1), 575–586. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b01381>.
- [121] Aimin, C.; Chunlin, H.; Juliang, B.; Tinyin, Z.; Zhichao, D. Antibiotic Loaded Chitosan Bar. An in Vitro, in Vivo Study of a Possible Treatment for Osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1999**, No. 366, 239–247.
- [122] Dai, T.; Tanaka, M.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Chitosan Preparations for Wounds and Burns: Antimicrobial and Wound-Healing Effects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9* (7), 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>.
- [123] Venkatesan, J.; Vinodhini, P. A.; Sudha, P. N.; Kim, S.-K. Chitin and Chitosan Composites for Bone Tissue Regeneration. *Adv. Food Nutr. Res.* **2014**, *73*, 59–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00005-6>.
- [124] Ong, S.-Y.; Wu, J.; Moochhala, S. M.; Tan, M.-H.; Lu, J. Development of a Chitosan-Based Wound Dressing with Improved Hemostatic and Antimicrobial Properties. *Biomaterials* **2008**, *29* (32), 4323–4332. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.034>.
- [125] Sudarshan, N. R.; Hoover, D. G.; Knorr, D. Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnol.* **1992**, *6* (3), 257–272. <https://doi.org/10.1080/08905439209549838>.
- [126] Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Panos, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*. pp 203–230.
- [127] Lehr, C.-M.; Bouwstra, J. A.; Schacht, E. H.; Junginger, H. E. In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers. *Int. J. Pharm.* **1992**, *78* (1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90353-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90353-4).
- [128] Yang, J.; Tian, F.; Wang, Z.; Wang, Q.; Zeng, Y.-J.; Chen, S.-Q. Effect of Chitosan Molecular Weight and Deacetylation Degree on Hemostasis. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2008**, *84* (1), 131–137. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30853>.

- [129] Swetha, M.; Sahithi, K.; Moorthi, A.; Srinivasan, N.; Ramasamy, K.; Selvamurugan, N. Biocomposites Containing Natural Polymers and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47* (1), 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015>.
- [130] Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (1), 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>.
- [131] Di Martino, A.; Sittinger, M.; Risbud, M. V. Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5983–5990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>.
- [132] VandeVord, P. J.; Matthew, H. W. T.; DeSilva, S. P.; Mayton, L.; Wu, B.; Wooley, P. H. Evaluation of the Biocompatibility of a Chitosan Scaffold in Mice. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59* (3), 585–590. <https://doi.org/10.1002/jbm.1270>.
- [133] Kim, I.-S.; Park, J. W.; Kwon, I. C.; Baik, B. S.; Cho, B. C. Role of BMP, Big-H3, and Chitosan in Early Bony Consolidation in Distraction Osteogenesis in a Dog Model. *Plast. Reconstr. Surg.* **2002**, *109* (6).
- [134] Oryan, A.; Alidadi, S.; Bigham-Sadegh, A.; Moshiri, A.; Kamali, A. Effectiveness of Tissue Engineered Chitosan-Gelatin Composite Scaffold Loaded with Human Platelet Gel in Regeneration of Critical Sized Radial Bone Defect in Rat. *J. Control. Release* **2017**, *254* (October 2016), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.040>.
- [135] Ammar, M. M.; Waly, G. H.; Saniour, S. H.; Moussa, T. A. Growth Factor Release and Enhanced Encapsulated Periodontal Stem Cells Viability by Freeze-Dried Platelet Concentrate Loaded Thermo-Sensitive Hydrogel for Periodontal Regeneration. *Saudi Dent. J.* **2018**, *30* (4), 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.06.002>.
- [136] Xue, Y.; Wu, M.; Liu, Z.; Song, J.; Luo, S.; Li, H.; Li, Y.; Jin, L.; Guan, B.; Lin, M.; Chen, F.; Jin, C.; Liu, D.; Li, Y.; Zhang, X. In Vitro and in Vivo Evaluation of Chitosan Scaffolds Combined with Simvastatin-Loaded Nanoparticles for Guided Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30* (4). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6249-3>.
- [137] Zhang, Y.; Cheng, X.; Wang, J.; Wang, Y.; Shi, B.; Huang, C.; Yang, X.; Liu, T. Novel Chitosan/Collagen Scaffold Containing Transforming Growth Factor-Beta1 DNA for Periodontal Tissue Engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344* (1), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.106>.
- [138] Fung, S. L.; Wu, X.; Maceren, J. P.; Mao, Y.; Kohn, J. In Vitro Evaluation of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 Bioactivity for Regenerative Medicine. *Tissue Eng. - Part C Methods* **2019**, *25* (9), 553–559. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0156>.

- [139] Akman, A. C.; Seda Tigli, R.; Gumusderelioglu, M.; Nohutcu, R. M. Bone Morphogenetic Protein-6-Loaded Chitosan Scaffolds Enhance the Osteoblastic Characteristics of MC3T3-E1 Cells. *Artif. Organs* **2010**, *34* (1), 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00798.x>.
- [140] Chen, H.; Yu, Y.; Wang, C.; Wang, J.; Liu, C. The Regulatory Role of Sulfated Polysaccharides in Facilitating RhBMP-2-Induced Osteogenesis. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4375–4387. <https://doi.org/10.1039/c9bm00529c>.
- [141] Engkagul, V.; Klaharn, I.; Sereemasapun, A.; Chirachanchai, S. Chitosan Whisker Grafted with Oligo(Lactic Acid) Nanoparticles via a Green Synthesis Pathway: Potential as a Transdermal Drug Delivery System. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2017**, *13* (8), 2523–2531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.07.001>.
- [142] Jenkins, D. W.; Hudson, S. M. Review of Vinyl Graft Copolymerization Featuring Recent Advances toward Controlled Radical-Based Reactions and Illustrated with Chitin/Chitosan Trunk Polymers. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (11), 3245–3274. <https://doi.org/10.1021/cr000257f>.
- [143] Yao, F.; Liu, C.; Chen, W.; Bai, Y.; Tang, Z.; Yao, K. Synthesis and Characterization of Chitosan Grafted Oligo(L-Lactic Acid). *Macromol. Biosci.* **2003**, *3* (11), 653–656. <https://doi.org/10.1002/mabi.200350035>.
- [144] Ciulik, C. B.; Bernardinelli, O. D.; de Azevedo, E. R.; Akcelrud, L. Chitosan and Oligo(DI-Lactic Acid) Networks: Correlations between Physical Properties and Macromolecular Configuration. *Polymer (Guildf)*. **2016**, *93*, 115–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.04.031>.
- [145] Ciulik, C. B.; Bernardinelli, O. D.; Balogh, D. T.; de Azevedo, E. R.; Akcelrud, L. Internal Plasticization of Chitosan with Oligo(DI-Lactic Acid) Branches. *Polymer (Guildf)*. **2014**, *55* (11), 2645–2651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.04.018>.
- [146] Yao, F.; Chen, W.; Liu, C.; De Yao, K. A Novel Amphoteric, PH-Sensitive, Biodegradable Poly[Chitosan-g-(L-Lactic-Co-Citric) Acid] Hydrogel. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *89* (14), 3850–3854. <https://doi.org/10.1002/app.12567>.
- [147] Qu, X.; Wirsén, A.; Albertsson, A.-C. Effect of Lactic/Glycolic Acid Side Chains on the Thermal Degradation Kinetics of Chitosan Derivatives. *Polymer (Guildf)*. **2000**, *41* (13), 4841–4847. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00704-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00704-1).
- [148] Cai, K.; Rechtenbach, A.; Hao, J.; Bossert, J.; Jandt, K. D. Polysaccharide-Protein Surface Modification of Titanium via a Layer-by-Layer Technique: Characterization and Cell Behaviour Aspects. *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5960–5971. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.020>.
- [149] Yao, F.; Chen, W.; Wang, H.; Liu, H.; Yao, K.; Sun, P.; Lin, H. A Study on Cytocompatible Poly(Chitosan-g-l-Lactic Acid). *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (21), 6435–6441.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00676-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00676-1).

- [150] Putić, S. *Mehanička Svojstva Polimernih Kompozitnih Materijala*; Grbavčić, Ž., Ed.; Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd, 2006.
- [151] Pavlović, M. M. *Sinteza i Karakterizacija Elektroprovodnih Kompozitnihmaterijala Na Bazi Biorazgradivih Polimera i Prahova Metala*, University of Belgrade, 2015.
- [152] Matthews, F. L.; Rawlings, R. D. *Composite Materials: Engineering and Science*; CRC press, 1999.
- [153] Chawla, K. K. *Composite Materials: Science and Engineering*; Springer Science & Business Media, 2012.
- [154] Pavlović, M. M.; Čosović, V.; Pavlović, M. G.; Talijan, N.; Bojanić, V. Electrical Conductivity of Lignocellulose Composites Loaded with Electrodeposited Copper Powders. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6* (9).
- [155] Yang, Y.; Boom, R.; Irion, B.; van Heerden, D.-J.; Kuiper, P.; de Wit, H. Recycling of Composite Materials. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2012**, *51*, 53–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.09.007>.
- [156] Ong, K. L.; Yun, B. M.; White, J. B. New Biomaterials for Orthopedic Implants. *Orthop. Res. Rev.* **2015**, *7*, 107–130. <https://doi.org/10.2147/ORR.S63437>.
- [157] Khan, A. F.; Saleem, M.; Afzal, A.; Ali, A.; Khan, A.; Khan, A. R. Bioactive Behavior of Silicon Substituted Calcium Phosphate Based Bioceramics for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *35* (1), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.013>.
- [158] Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent Advances in Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (10), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>.
- [159] Patel, N.; Best, S. M.; Bonfield, W.; Gibson, I. R.; Hing, K. A.; Damien, E.; Revell, P. A. A Comparative Study on the in Vivo Behavior of Hydroxyapatite and Silicon Substituted Hydroxyapatite Granules. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13* (12), 1199–1206. <https://doi.org/10.1023/A:1021114710076>.
- [160] Botelho, C. M.; Brooks, R. A.; Best, S. M.; Lopes, M. A.; Santos, J. D.; Rushton, N.; Bonfield, W. Human Osteoblast Response to Silicon-Substituted Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2006**, *79* (3), 723–730. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30806>.
- [161] Botelho, C. M.; Brooks, R. A.; Spence, G.; McFarlane, I.; Lopes, M. A.; Best, S. M.; Santos, J. D.; Rushton, N.; Bonfield, W. Differentiation of Mononuclear Precursors into Osteoclasts on the Surface of Si-Substituted Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2006**, *78* (4), 709–720. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30726>.
- [162] Honda, M.; Kikushima, K.; Kawanobe, Y.; Konishi, T.; Mizumoto, M.; Aizawa, M.

- Enhanced Early Osteogenic Differentiation by Silicon-Substituted Hydroxyapatite Ceramics Fabricated via Ultrasonic Spray Pyrolysis Route. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (12), 2923–2932. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4744-x>.
- [163] Hayakawa, S.; Kanaya, T.; Tsuru, K.; Shirosaki, Y.; Osaka, A.; Fujii, E.; Kawabata, K.; Gasqueres, G.; Bonhomme, C.; Babonneau, F.; Jäger, C.; Kleebe, H.-J. Heterogeneous Structure and in Vitro Degradation Behavior of Wet-Chemically Derived Nanocrystalline Silicon-Containing Hydroxyapatite Particles. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (1), 4856–4867. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.024>.
- [164] Lehmann, G.; Cacciotti, I.; Palmero, P.; Montanaro, L.; Bianco, A.; Campagnolo, L.; Camaioni, A. Differentiation of Osteoblast and Osteoclast Precursors on Pure and Silicon-Substituted Synthesized Hydroxyapatites. *Biomed. Mater.* **2012**, *7* (5). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/5/055001>.
- [165] Lerner, T.; Liljenqvist, U. Silicate-Substituted Calcium Phosphate as a Bone Graft Substitute in Surgery for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Eur. Spine J.* **2013**, *22* (SUPPL.2), S185–S194. <https://doi.org/10.1007/s00586-012-2485-7>.
- [166] Mostafa, N. Y.; Shaltout, A. A.; Radev, L.; Hassan, H. M. In Vitro Surface Biocompatibility of High-Content Silicon-Substituted Calcium Phosphate Ceramics. *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11* (2), 140–150. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0142-y>.
- [167] Nagineni, V. V.; James, A. R.; Alimi, M.; Hofstetter, C.; Shin, B. J.; Njoku, I.; Tsiouris, A. J.; Härtl, R. Silicate-Substituted Calcium Phosphate Ceramic Bone Graft Replacement for Spinal Fusion Procedures. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2012**, *37* (20), E1264–E1272. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318265e22e>.
- [168] Surmeneva, M. A.; Surmenev, R. A.; Pichugin, V. F.; Chernousova, S. S.; Epple, M. In-Vitro Investigation of Magnetron-Sputtered Coatings Based on Silicon-Substituted Hydroxyapatite. *J. Surf. Investig.* **2011**, *5* (6), 1202–1207. <https://doi.org/10.1134/S1027451011120135>.
- [169] Papadimitropoulos, A.; Mastrogiacomo, M.; Peyrin, F.; Molinari, E.; Komlev, V. S.; Rustichelli, F.; Cancedda, R. Kinetics of in Vivo Bone Deposition by Bone Marrow Stromal Cells within a Resorbable Porous Calcium Phosphate Scaffold: An X-Ray Computed Microtomography Study. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98* (1), 271–281. <https://doi.org/10.1002/bit.21418>.
- [170] Naito, H.; Dohi, Y.; Zimmermann, W.-H.; Tojo, T.; Takasawa, S.; Eschenhagen, T.; Taniguchi, S. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on the Mechanical Properties of Engineered Bone-like Tissue. *Tissue Eng. - Part A* **2011**, *17* (17–18), 2321–2329. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0099>.

- [171] Thein-Han, W.; Xu, H. H. K. Collagen-Calcium Phosphate Cement Scaffolds Seeded with Umbilical Cord Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. - Part A* **2011**, *17* (23–24), 2943–2954. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0674>.
- [172] Koob, S.; Torio-Padron, N.; Stark, G. B.; Hannig, C.; Stankovic, Z.; Finkenzeller, G. Bone Formation and Neovascularization Mediated by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells in Critical-Sized Calvarial Defects. *Tissue Eng. - Part A* **2011**, *17* (3–4), 311–321. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0338>.
- [173] Li, J.; Hong, J.; Zheng, Q.; Guo, X.; Lan, S.; Cui, F.; Pan, H.; Zou, Z.; Chen, C. Repair of Rat Cranial Bone Defects with NHAC/PLLA and BMP-2-Related Peptide or RhBMP-2. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29* (11), 1745–1752. <https://doi.org/10.1002/jor.21439>.
- [174] Wernike, E.; Montjovent, M.-O.; Liu, Y.; Wismeijer, D.; Hunziker, E. B.; Siebenrock, K.-A.; Hofstetter, W.; Klenke, F. M. Vegf Incorporated into Calcium Phosphate Ceramics Promotes Vascularisation and Bone Formation in Vivo. *Eur. Cells Mater.* **2010**, *19*, 30–40.
- [175] Kempen, D. H. R.; Lu, L.; Heijink, A.; Hefferan, T. E.; Creemers, L. B.; Maran, A.; Yaszemski, M. J.; Dhert, W. J. A. Effect of Local Sequential VEGF and BMP-2 Delivery on Ectopic and Orthotopic Bone Regeneration. *Biomaterials* **2009**, *30* (14), 2816–2825. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.031>.
- [176] Patel, Z. S.; Young, S.; Tabata, Y.; Jansen, J. A.; Wong, M. E. K.; Mikos, A. G. Dual Delivery of an Angiogenic and an Osteogenic Growth Factor for Bone Regeneration in a Critical Size Defect Model. *Bone* **2008**, *43* (5), 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.019>.
- [177] Egli, P. S.; Müller, W.; Schenk, R. K. Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Cylinders with Two Different Pore Size Ranges Implanted in the Cancellous Bone of Rabbits. A Comparative Histomorphometric and Histologic Study of Bony Ingrowth and Implant Substitution. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1988**, No. 232, 127–138.
- [178] Le Huec, J. C.; Schaefferbeke, T.; Clement, D.; Faber, J.; Le Rebeller, A. Influence of Porosity on the Mechanical Resistance of Hydroxyapatite Ceramics under Compressive Stress. *Biomaterials* **1995**, *16* (2), 113–118. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)98272-g](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)98272-g).
- [179] Wang, W.; Yeung, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co. December 1, 2017, pp 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
- [180] Wenisch, S.; Stahl, J.-P.; Horas, U.; Heiss, C.; Kilian, O.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Schnettler, R. In Vivo Mechanisms of Hydroxyapatite Ceramic Degradation by Osteoclasts: Fine Structural Microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2003**, *67* (3), 713–718. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10091>.

- [181] Carson, J. S.; Bostrom, M. P. G. Synthetic Bone Scaffolds and Fracture Repair. *Injury* **2007**, 38 (1, Supplement), S33–S37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.008>.
- [182] Bhatt, R. A.; Rozental, T. D. Bone Graft Substitutes. *Hand Clin.* **2012**, 28 (4), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2012.08.001>.
- [183] Tonino, A. J.; Van Der Wal, B. C. H.; Heyligers, I. C.; Grimm, B. Bone Remodeling and Hydroxyapatite Resorption in Coated Primary Hip Prostheses. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2009**, 467 (2), 478–484. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0559-y>.
- [184] Kattimani, V. S.; Kondaka, S.; Lingamaneni, K. P. Hydroxyapatite-Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regen. Insights* **2016**, 7, 9–19.
- [185] Dubok, V. A. Bioceramics - Yesterday, Today, Tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*. Kluwer Academic/Plenum Publishers 2000, pp 381–394. <https://doi.org/10.1023/a:1026617607548>.
- [186] Li, H.; Zhao, Q.; Li, B.; Kang, J.; Yu, Z.; Li, Y.; Song, X.; Liang, C.; Wang, H. Fabrication and Properties of Carbon Nanotube-Reinforced Hydroxyapatite Composites by a Double in Situ Synthesis Process. *Carbon N. Y.* **2016**, 101, 159–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.01.086>.
- [187] Dey, A.; Nandi, S. K.; Kundu, B.; Kumar, C.; Mukherjee, P.; Roy, S.; Mukhopadhyay, A. K.; Sinha, M. K.; Basu, D. Evaluation of Hydroxyapatite and β -Tri Calcium Phosphate Microplasma Spray Coated Pin Intra-Medullary for Bone Repair in a Rabbit Model. *Ceram. Int.* **2011**, 37 (4), 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.01.005>.
- [188] Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J. M. Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues. *Progress in Solid State Chemistry*. 2004, pp 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001>.
- [189] Ignjatovic, N.; Ninkov, P.; Ajdukovic, Z.; Vasiljevic-Radovic, D.; Uskokovic, D. Biphasic Calcium Phosphate Coated with Poly-d,l-Lactide-Co-Glycolide Biomaterial as a Bone Substitute. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2007**, 27 (2–3), 1589–1594. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2006.04.104>.
- [190] Ignjatović, N.; Uskoković, V.; Ajduković, Z.; Uskoković, D. Multifunctional Hydroxyapatite and Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles for the Local Delivery of Cholecalciferol. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, 33 (2), 943–950. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.026>.
- [191] Ignjatović, N.; Wu, V.; Ajduković, Z.; Mihajilov-Krstev, T.; Uskoković, V.; Uskoković, D. Chitosan-PLGA Polymer Blends as Coatings for Hydroxyapatite Nanoparticles and Their Effect on Antimicrobial Properties, Osteoconductivity and Regeneration of Osseous Tissues. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 60, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.061>.
- [192] Samavedi, S.; Whittington, A. R.; Goldstein, A. S. Calcium Phosphate Ceramics in Bone

- Tissue Engineering: A Review of Properties and Their Influence on Cell Behavior. *Acta Biomaterialia*. September 2013, pp 8037–8045. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.
- [193] Parsons, A. J.; Ahmed, I.; Han, N.; Felfel, R.; Rudd, C. D. Mimicking Bone Structure and Function with Structural Composite Materials. *J. Bionic Eng.* **2010**, 7 (SUPPL.), S1–S10. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(09\)60211-0](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(09)60211-0).
- [194] Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*. 2009, pp 399–498. <https://doi.org/10.3390/ma2020399>.
- [195] Ignjatovic, N.; Ajdukovic, Z.; Rajkovic, J.; Najman, S.; Mihailovic, D.; Uskokovic, D. Enhanced Osteogenesis of Nanosized Cobalt-Substituted Hydroxyapatite. *J. Bionic Eng.* **2015**, 12 (4), 604–612. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60150-5](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60150-5).
- [196] Lin, K.; Wu, C.; Chang, J. Advances in Synthesis of Calcium Phosphate Crystals with Controlled Size and Shape. *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd October 1, 2014, pp 4071–4102. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017>.
- [197] Uskoković, V.; Uskoković, D. P. Nanosized Hydroxyapatite and Other Calcium Phosphates: Chemistry of Formation and Application as Drug and Gene Delivery Agents. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. January 2011, pp 152–191. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31746>.
- [198] Dorozhkin, S. V. Nanosized and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. March 2010, pp 715–734. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.031>.
- [199] E Thian, T. K. Y. K. P. L. C. C. B. H. M. A. Zinc-Substituted Hydroxyapatite: A Biomaterial with Enhanced Bioactivity and Antibacterial Properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, 24, 437–445.
- [200] Seo, S. A.; Choi, H. S.; Khang, G.; Rhee, J. M.; Lee, H. B. A Local Delivery System for Fentanyl Based on Biodegradable Poly(L-Lactide-Co-Glycolide) Oligomer. *Int. J. Pharm.* **2002**, 239 (1–2), 93–101. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00074-1).
- [201] Middleton, J. C.; Tipton, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. *Biomaterials* **2000**, 21 (23), 2335–2346. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00101-0).
- [202] Tosi, G.; Rivasi, F.; Gandolfi, F.; Costantino, L.; Vandelli, M. A.; Forni, F. Conjugated Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) for the Preparation of in Vivo Detectable Nanoparticles. *Biomaterials* **2005**, 26 (19), 4189–4195. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.025>.
- [203] Ravi Kumar, M. N. V.; Bakowsky, U.; Lehr, C. M. Preparation and Characterization of Cationic PLGA Nanospheres as DNA Carriers. *Biomaterials* **2004**, 25 (10), 1771–1777. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.069>.
- [204] Ignjatović, N.; Tomić, S.; Dakić, M.; Miljković, M.; Plavšić, M.; Uskoković, D. Synthesis and Properties of Hydroxyapatite/Poly-L-Lactide Composite Biomaterials. *Biomaterials*

- 1999**, 20 (9), 809–816. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00234-8).
- [205] Kikuchi, M.; Ikoma, T.; Itoh, S.; Matsumoto, H. N.; Koyama, Y.; Takakuda, K.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Biomimetic Synthesis of Bone-like Nanocomposites Using the Self-Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen. *Composites Science and Technology*. Elsevier BV 2004, pp 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2003.09.002>.
- [206] Ignjatovic, N. L.; Plavsic, M.; Miljkovic, M. S.; Zivkovic, L. M.; Uskokovic, D. P. Microstructural Characteristics of Calcium Hydroxyapatite/Poly-L-Lactide Based Composites. *J. Microsc.* **1999**, 196 (2), 243–248. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1999.00623.x>.
- [207] Oliveira, J. M.; Miyazaki, T.; Lopes, M. A.; Ohtsuki, C.; Santos, J. D. Bonelike®/PLGA Hybrid Materials for Bone Regeneration: Preparation Route and Physicochemical Characterisation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, 16 (3), 253–259. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-6687-y>.
- [208] Liu, Q.; De Wijn, J. R.; Van Blitterswijk, C. A. Nano-Apatite/Polymer Composites: Mechanical and Physicochemical Characteristics. *Biomaterials* **1997**, 18 (19), 1263–1270. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00069-0).
- [209] Shikinami, Y.; Okuno, M. Bioresorbable Devices Made of Forged Composites of Hydroxyapatite (HA) Particles and Poly-L-Lactide (PLLA): Part I. Basic Characteristics. *Biomaterials* **1999**, 20 (9), 859–877. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00241-5).
- [210] Neamat, A.; Gawish, A.; Gamal-Eldeen, A. M. Beta-Tricalcium Phosphate Promotes Cell Proliferation, Osteogenesis and Bone Regeneration in Intrabony Defects in Dogs. *Arch. Oral Biol.* **2009**, 54 (12), 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.003>.
- [211] Ignjatovic, N.; Ajdukovic, Z.; Uskokovic, D. New Biocomposite [Biphasic Calcium Phosphate/Poly-DL-Lactide-Co-Glycolide/ Biostimulative Agent] Filler for Reconstruction of Bone Tissue Changed by Osteoporosis. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, 16 (7), 621–626. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-2532-6>.
- [212] Zhang, P.; Hong, Z.; Yu, T.; Chen, X.; Jing, X. In Vivo Mineralization and Osteogenesis of Nanocomposite Scaffold of Poly(Lactide-Co-Glycolide) and Hydroxyapatite Surface-Grafted with Poly(L-Lactide). *Biomaterials* **2009**, 30 (1), 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.08.041>.
- [213] Durucan, C.; Brown, P. W. Calcium-Deficient Hydroxyapatite-PLGA Composites: Mechanical and Microstructural Investigation. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 51 (4), 726–734. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000915\)51:4<726::AID-JBM22>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000915)51:4<726::AID-JBM22>3.0.CO;2-L).
- [214] Ignjatović, N. L.; Liu, C. Z.; Czernuszka, J. T.; Uskoković, D. P. Micro- and Nano-Injectable

- Composite Biomaterials Containing Calcium Phosphate Coated with Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide). *Acta Biomater.* **2007**, *3* (6), 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.001>.
- [215] Ignjatovic, N. L.; Ajdukovic, Z. R.; Savic, V. P.; Uskokovic, D. P. Size Effect of Calcium Phosphate Coated with Poly-DL-Lactideco-Glycolide on Healing Processes in Bone Reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2010**, *94* (1), 108–117. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31630>.
- [216] Kolishetti, N.; Dhar, S.; Valencia, P. M.; Lin, L. Q.; Karnik, R.; Lippard, S. J.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Engineering of Self-Assembled Nanoparticle Platform for Precisely Controlled Combination Drug Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (42), 17939–17944. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011368107>.
- [217] Bose, S.; Tarafder, S. Calcium Phosphate Ceramic Systems in Growth Factor and Drug Delivery for Bone Tissue Engineering: A Review. *Acta Biomaterialia*. April 2012, pp 1401–1421. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.017>.
- [218] Ignjatović, N. L.; Ninkov, P.; Sabetrasekh, R.; Uskoković, D. P. A Novel Nano Drug Delivery System Based on Tigecycline-Loaded Calciumphosphate Coated with Poly-DL-Lactide-Co-Glycolide. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21* (1), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3854-6>.
- [219] Habraken, W.; Habibovic, P.; Epple, M.; Bohner, M. Calcium Phosphates in Biomedical Applications: Materials for the Future? *Mater. Today* **2016**, *19* (2), 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
- [220] Liu, C.; Tian, A.; Yang, H.; Xu, Q.; Xue, X. Electrodeposited Hydroxyapatite Coatings on the TiO₂ Nanotube Instatic Magnetic Field. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *287*, 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.09.131>.
- [221] Nelea, V.; Pelletier, H.; Iliescu, M.; Werckmann, J.; Craciun, V.; Mihailescu, I. N.; Ristoscu, C.; Ghica, C. Calcium Phosphate Thin Film Processing by Pulsed Laser Deposition and in Situ Assisted Ultraviolet Pulsed Laser Deposition. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13* (12), 1167–1173. <https://doi.org/10.1023/A:1021150207350>.
- [222] Xiong, X.-B.; Zeng, X.-R.; Zou, J.-Z.; Xie, S.-H. Preparation of Improved Hydroxyapatite Coating on HT-C/C by Modified Induction Heating Deposition/Hydrothermal Treatment Technologies. *Surf. Eng.* **2011**, *27* (8), 591–594. <https://doi.org/10.1179/026708410X12687356948599>.
- [223] Zhao, X.; Li, H.; Chen, M.; Li, K.; Lu, J.; Zhang, L.; Cao, S. Nano/Micro-Sized Calcium Phosphate Coating on Carbon/Carbon Composites by Ultrasonic Assisted Electrochemical Deposition. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1002/sia.3764>.

- [224] Varadavenkatesan, T.; Vinayagam, R.; Pai, S.; Kathirvel, B.; Pugazhendhi, A.; Selvaraj, R. Synthesis, Biological and Environmental Applications of Hydroxyapatite and Its Composites with Organic and Inorganic Coatings. *Prog. Org. Coatings* **2021**, *151*, 106056. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106056>.
- [225] Zhang, B.; Li, J.; He, L.; Huang, H.; Weng, J. Bio-Surface Coated Titanium Scaffolds with Cancellous Bone-like Biomimetic Structure for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2020**, *114*, 431–448. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.024>.
- [226] Caicedo, J. C.; Caicedo, H. H.; Ramirez-Malule, H. Structural and Chemical Study of β -Tricalcium Phosphate-Chitosan Coatings. *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *240*. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122251>.
- [227] Sivaraaj, D.; Vijayalakshmi, K. Enhanced Antibacterial and Corrosion Resistance Properties of Ag Substituted Hydroxyapatite/Functionalized Multiwall Carbon Nanotube Nanocomposite Coating on 316L Stainless Steel for Biomedical Application. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, *59*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104730>.
- [228] Visentin, F.; El Habra, N.; Fabrizio, M.; Brianese, N.; Gerbasi, R.; Nodari, L.; Zin, V.; Galenda, A. TiO₂-HA Bi-Layer Coatings for Improving the Bioactivity and Service-Life of Ti Dental Implants. *Surf. Coatings Technol.* **2019**, *378*. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125049>.
- [229] Chakraborty, R.; Manna, J. S.; Saha, P. Development and Relative Comparison of Polypyrrole-Calcium Phosphate Composite Coatings with Differential Concentration of Chlorophyll Functionalized Polymer Particle Achieved through Pulsed Electro Deposition. *Surf. Coatings Technol.* **2019**, *363*, 221–235. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.02.025>.
- [230] Mihailescu, I. N.; Lamolle, S.; Socol, G.; Miroiu, F.; Roenold, H. J.; Bigi, A.; Mayer, I.; Cuisinier, F.; Lyngstadaas, S. P. In Vivo Tensile Tests of Biomimetic Titanium Implants Pulsed Laser Coated with Nanostructured Calcium Phosphate Thin Films. *Optoelectron. Adv. Mater. Rapid Commun.* **2008**, *2* (6), 337–341.
- [231] Bunker, B. C.; Rieke, P. C.; Tarasevich, B. J.; Campbell, A. A.; Fryxell, G. E.; Graff, G. L.; Song, L.; Liu, J.; Virden, J. W.; McVay, G. L. Ceramic Thin-Film Formation on Functionalized Interfaces through Biomimetic Processing. *Science* (80-.). **1994**, *264* (5155), 48–55. <https://doi.org/10.1126/science.264.5155.48>.
- [232] Eliaz, N.; Ritman-Hertz, O.; Aronov, D.; Weinberg, E.; Shenhar, Y.; Rosenman, G.; Weinreb, M.; Ron, E. The Effect of Surface Treatments on the Adhesion of Electrochemically Deposited Hydroxyapatite Coating to Titanium and on Its Interaction with Cells and Bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22* (7), 1741–1752. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4355-y>.

- [233] Pattanayak, D. K.; Yamaguchi, S.; Matsushita, T.; Nakamura, T.; Kokubo, T. Apatite-Forming Ability of Titanium in Terms of PH of the Exposed Solution. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (74), 2145–2155. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0107>.
- [234] Tanahashi, M.; Yao, T.; Kokubo, T.; Minoda, M.; Miyamoto, T.; Nakamura, T.; Yamamura, T. Apatite Coated on Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by Glow-discharge Treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29* (3), 349–357. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290310>.
- [235] Baker, K. C.; Drelich, J.; Miskioglu, I.; Israel, R.; Herkowitz, H. N. Effect of Polyethylene Pretreatments on the Biomimetic Deposition and Adhesion of Calcium Phosphate Films. *Acta Biomater.* **2007**, *3* (3 SPEC. ISS.), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.08.008>.
- [236] Leonor, I. B.; Reis, R. L. An Innovative Auto-Catalytic Deposition Route to Produce Calcium-Phosphate Coatings on Polymeric Biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2003**, *14* (5), 435–441. <https://doi.org/10.1023/A:1023214918592>.
- [237] Liu, G. J.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Takadama, H.; Nakamura, T.; Murakami, A. Apatite-Organic Polymer Composites Prepared by a Biomimetic Process: Improvement in Adhesion of the Apatite Layer to the Substrate by Ultraviolet Irradiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1998**, *9* (5), 285–290. <https://doi.org/10.1023/A:1008860812637>.
- [238] Gopi, D.; Sherif, E.-S. M.; Rajeswari, D.; Kavitha, L.; Pramod, R.; Dwivedi, J.; Polaki, S. R. Evaluation of the Mechanical and Corrosion Protection Performance of Electrodeposited Hydroxyapatite on the High Energy Electron Beam Treated Titanium Alloy. *J. Alloys Compd.* **2014**, *616*, 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.160>.
- [239] Duta, L.; Serban, N.; Oktar, F. N.; Mihailescu, I. N. Biological Hydroxyapatite Thin Films Synthesized by Pulsed Laser Deposition. *Optoelectron. Adv. Mater. Rapid Commun.* **2013**, *7* (11–12), 1040–1044.
- [240] Mutsuzaki, H.; Yokoyama, Y.; Ito, A.; Oyane, A. Formation of Apatite Coatings on an Artificial Ligament Using a Plasma- and Precursor-Assisted Biomimetic Process. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (9), 19155–19168. <https://doi.org/10.3390/ijms140919155>.
- [241] Hofstetter, W.; Sehr, H.; Wild, M. de; Portenier, J.; Gobrecht, J.; Hunziker, E. B. Modulation of Human Osteoblasts by Metal Surface Chemistry. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101A* (8), 2355–2364. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34541>.
- [242] Eisenbarth, E.; Linez, P.; Biehl, V.; Velten, D.; Breme, J.; Hildebrand, H. F. Cell Orientation and Cytoskeleton Organisation on Ground Titanium Surfaces. *Biomol. Eng.* **2002**, *19* (2–6), 233–237. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(02\)00028-x](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(02)00028-x).
- [243] Sansone, V.; Pagani, D.; Melato, M. The Effects on Bone Cells of Metal Ions Released from

- Orthopaedic Implants. A Review. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2013**, *10* (1), 34–40. <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2013.10.1.034>.
- [244] Senkutvan, R. S.; Jacob, S.; Charles, A.; Vadgaonkar, V.; Jatol-Tekade, S.; Gangurde, P. Evaluation of Nickel Ion Release from Various Orthodontic Arch Wires: An in Vitro Study. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2014**, *4* (1), 12–16. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.130921>.
- [245] Sousa, S. R.; Barbosa, M. A. Effect of Hydroxyapatite Thickness on Metal Ion Release from Ti6Al4V Substrates. *Biomaterials* **1996**, *17* (4), 397–404. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89655-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89655-4).
- [246] Ducheyne, P.; Healy, K. E. The Effect of Plasma-Sprayed Calcium Phosphate Ceramic Coatings on the Metal Ion Release from Porous Titanium and Cobalt-Chromium Alloys. *J. Biomed. Mater. Res.* **1988**, *22* (12), 1137–1163. <https://doi.org/10.1002/jbm.820221207>.
- [247] Gritsch, L.; Maqbool, M.; Mouriño, V.; Ciraldo, F. E.; Cresswell, M.; Jackson, P. R.; Lovell, C.; Boccaccini, A. R. Chitosan/Hydroxyapatite Composite Bone Tissue Engineering Scaffolds with Dual and Decoupled Therapeutic Ion Delivery: Copper and Strontium. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (40), 6109–6124. <https://doi.org/10.1039/C9TB00897G>.
- [248] Browne, M.; Gregson, P. J. Effect of Mechanical Surface Pretreatment on Metal Ion Release. *Biomaterials* **2000**, *21* (4), 385–392. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00200-8).
- [249] Damiani, L.; Eales, M. G.; Nobbs, A. H.; Su, B.; Tsimbouri, P. M.; Salmeron-Sanchez, M.; Dalby, M. J. Impact of Surface Topography and Coating on Osteogenesis and Bacterial Attachment on Titanium Implants. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, 2041731418790694. <https://doi.org/10.1177/2041731418790694>.
- [250] Saini, M.; Singh, Y.; Arora, P.; Arora, V.; Jain, K. Implant Biomaterials: A Comprehensive Review. *World J. Clin. cases* **2015**, *3* (1), 52–57. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.52>.
- [251] Rosa, A. L.; Beloti, M. M. Effect of CpTi Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation. *Braz. Dent. J.* **2003**, *14* (1), 16–21. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402003000100003>.
- [252] Qu, C.; Kaitainen, S.; Kroger, H.; Lappalainen, R.; Lammi, M. J. Behavior of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Various Titanium-Based Coatings. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2016**, *9* (10). <https://doi.org/10.3390/ma9100827>.
- [253] Anselme, K.; Linez, P.; Bigerelle, M.; Le Maguer, D.; Le Maguer, A.; Hardouin, P.; Hildebrand, H. F.; Iost, A.; Leroy, J. M. The Relative Influence of the Topography and Chemistry of TiAl6V4 Surfaces on Osteoblastic Cell Behaviour. *Biomaterials* **2000**, *21* (15), 1567–1577. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00042-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00042-9).
- [254] Radtke, A.; Topolski, A.; Jedrzejewski, T.; Kozak, W.; Sadowska, B.; Wieckowska-Szakiel,

- M.; Piszczek, P. Bioactivity Studies on Titania Coatings and the Estimation of Their Usefulness in the Modification of Implant Surfaces. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **2017**, *7* (4). <https://doi.org/10.3390/nano7040090>.
- [255] Silva, T. S. N.; Machado, D. C.; Viezzer, C.; Silva Júnior, A. N.; Oliveira, M. G. de. Effect of Titanium Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Proliferation and Differentiation: An Experimental Study . *Acta Cirurgica Brasileira* . scielo 2009, pp 200–205.
- [256] Wang, Y.; Yu, Z.; Guo, X.; Hu, J. Surface Morphology of Modified Titanium Alloy Affects Proliferation Stability of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Surf. Coatings Technol.* **2019**, *366*, 156–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.02.087>.
- [257] Kim, S.-Y.; Oh, N.; Lee, M.-H.; Kim, S.-E.; Leesungbok, R.; Lee, S.-W. Surface Microgrooves and Acid Etching on Titanium Substrata Alter Various Cell Behaviors of Cultured Human Gingival Fibroblasts. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20* (3), 262–272. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01652.x>.
- [258] Echeverry-Rendón, M.; Galvis, O.; Aguirre, R.; Robledo, S.; Castaño, J. G.; Echeverría, F. Modification of Titanium Alloys Surface Properties by Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) and Influence on Biological Response. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28* (11), 169. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5972-x>.
- [259] Prando, D.; Brenna, A.; Diamanti, M. V.; Beretta, S.; Bolzoni, F.; Ormellese, M.; Pedferri, M. Corrosion of Titanium: Part 2: Effects of Surface Treatments. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2017**, *16* (1), 3–13. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000396>.
- [260] Zwilling, V.; Aucouturier, M.; Darque-Ceretti, E. Anodic Oxidation of Titanium and TA6V Alloy in Chromic Media. An Electrochemical Approach. *Electrochim. Acta* **1999**, *45* (6), 921–929. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00283-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00283-2).
- [261] Pantović Pavlović, M. R.; Pavlović, M. M.; Eraković, S.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V; Ignjatović, N. Simultaneous Anodization/Anaphoretic Electrodeposition Synthesis of Nano Calcium Phosphate/Titanium Oxide Composite Coatings Assisted with Chitosan Oligosaccharide Lactate. *Mater. Lett.* **2020**, *261*, 127121. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127121>.
- [262] Pantović Pavlović, M. R.; Stanojević, B. P.; Pavlović, M. M.; Mihailović, M. D.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V; Ignjatović, N. L. Anodizing/Anaphoretic Electrodeposition of Nano-Calcium Phosphate/Chitosan Lactate Multifunctional Coatings on Titanium with Advanced Corrosion Resistance, Bioactivity, and Antibacterial Properties. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*(7), 3088-3102. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00035>.
- [263] Pantović-Pavlović, M.; Pavlović, M.; Eraković, S.; Barudžija, T.; Stevanović, J.; Ignjatović,

- N.; Panić, V. Relationship between the Properties of an Interlayer Formed by in Situ Ti Anodization and Anaphoretically Deposited Hydroxyapatite. *J. Serbian Chem. Soc.* **2019**, *84(11)*, 1305–1318. <https://doi.org/10.2298/jsc190730105p>.
- [264] Kuromoto, N. K.; Simão, R. A.; Soares, G. A. Titanium Oxide Films Produced on Commercially Pure Titanium by Anodic Oxidation with Different Voltages. *Mater. Charact.* **2007**, *58* (2), 114–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchar.2006.03.020>.
- [265] Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphate Deposits: Preparation, Properties and Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 272–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.033>.
- [266] Mostaghimi, J.; Pasandideh-Fard, M.; Chandra, S. Dynamics of Splat Formation in Plasma Spray Coating Process. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2002**, *22* (1), 59–84. <https://doi.org/10.1023/A:1012940515065>.
- [267] Victoria Cabañas, M. Bioceramic Coatings for Medical Implants. In *Bio-Ceramics with Clinical Applications*; 2014; Vol. 9781118406, pp 249–289. <https://doi.org/10.1002/9781118406748.ch9>.
- [268] Rautray, T. R.; Narayanan, R.; Kwon, T.-Y.; Kim, K.-H. Accelerator Based Synthesis of Hydroxyapatite by MeV Ion Implantation. *Thin Solid Films* **2010**, *518* (12), 3160–3163. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.08.044>.
- [269] Sobolev, V. V.; Guilemany, J. M. Dynamic Processes during High Velocity Oxyfuel Spraying. *Int. Mater. Rev.* **1996**, *41* (1), 13–32. <https://doi.org/10.1179/imr.1996.41.1.13>.
- [270] Haman, J. D.; Chittur, K. K.; Crawmer, D. E.; Lucas, L. C. Analytical and Mechanical Testing of High Velocity Oxy-Fuel Thermal Sprayed and Plasma Sprayed Calcium Phosphate Coatings. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *48* (6), 856–860. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:6<856::AID-JBM14>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:6<856::AID-JBM14>3.0.CO;2-I).
- [271] Barthell, H. L.; Archuleta, T. A.; Kossowsky, R. Ion Beam Deposition of Calcium Hydroxyapatite. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1989**, *110*.
- [272] Cooley, D. R.; Van Dellen, A. F.; Burgess, J. O.; Windeler, A. S. The Advantages of Coated Titanium Implants Prepared by Radiofrequency Sputtering from Hydroxyapatite. *J. Prosthet. Dent.* **1992**, *67* (1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(92\)90057-H](https://doi.org/10.1016/0022-3913(92)90057-H).
- [273] Van Dijk, K.; Schaeken, H. G.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A. Influence of Annealing Temperature on RF Magnetron Sputtered Calcium Phosphate Coatings. *Biomaterials* **1996**, *17* (4), 405–410. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89656-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89656-6).
- [274] Nelea, V.; Morosanu, C.; Iliescu, M.; Mihailescu, I. N. Hydroxyapatite Thin Films Grown by Pulsed Laser Deposition and Radio-Frequency Magnetron Sputtering: Comparative Study. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *228* (1–4), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.01.029>.

- [275] Akazawa, H.; Ueno, Y. Control of Composition and Crystallinity in Hydroxyapatite Films Deposited by Electron Cyclotron Resonance Plasma Sputtering. *J. Phys. Chem. Solids* **2014**, *75* (1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2013.08.014>.
- [276] Nijhuis, A. W. G.; Leeuwenburgh, S. C. G.; Jansen, J. A. Wet-Chemical Deposition of Functional Coatings for Bone Implantology. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10* (11), 1316–1329. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000142>.
- [277] Dorozhkin, S. V. *Calcium Orthophosphates: Applications in Nature, Biology, and Medicine*; 2012. <https://doi.org/10.4032/9789814364171>.
- [278] Liu, D.-M.; Troczynski, T.; Hakimi, D. Effect of Hydrolysis on the Phase Evolution of Water-Based Sol-Gel Hydroxyapatite and Its Application to Bioactive Coatings. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13* (7), 657–665. <https://doi.org/10.1023/A:1015733624638>.
- [279] Kim, H.-W.; Knowles, J. C.; Salih, V.; Kim, H.-E. Hydroxyapatite and Fluor-Hydroxyapatite Layered Film on Titanium Processed by a Sol-Gel Route for Hard-Tissue Implants. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2004**, *71* (1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30064>.
- [280] Aksakal, B.; Gavgali, M.; Dikici, B. The Effect of Coating Thickness on Corrosion Resistance of Hydroxyapatite Coated Ti6Al4V and 316L SS Implants. *J. Mater. Eng. Perform.* **2010**, *19* (6), 894–899. <https://doi.org/10.1007/s11665-009-9559-7>.
- [281] Oliveira, A. L.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Nature-Inspired Calcium Phosphate Coatings: Present Status and Novel Advances in the Science of Mimicry. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2003**, *7* (4–5), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2003.10.009>.
- [282] Ballo, A. M.; Xia, W.; Palmquist, A.; Lindahl, C.; Emanuelsson, L.; Lausmaa, J.; Engqvist, H.; Thomsen, P. Bone Tissue Reactions to Biomimetic Ion-Substituted Apatite Surfaces on Titanium Implants. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (72), 1615–1624. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0808>.
- [283] Gu, Y. W.; Tay, B. Y.; Lim, C. S.; Yong, M. S. Biomimetic Deposition of Apatite Coating on Surface-Modified NiTi Alloy. *Biomaterials* **2005**, *26* (34), 6916–6923. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.051>.
- [284] Čolović, B.; Jakanović, V.; Jakanović, B.; Jović, N. Biomimetic Deposition of Hydroxyapatite on the Surface of Silica Thin Film Covered Steel Tape. *Ceram. Int.* **2014**, *40* (5), 6949–6955. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.12.018>.
- [285] You, C.; Yeo, I.-S.; Kim, M.-D.; Eom, T.-K.; Lee, J.-Y.; Kim, S. Characterization and in Vivo Evaluation of Calcium Phosphate Coated Cp-Titanium by Dip-Spin Method. *Curr. Appl. Phys.* **2005**, *5* (5), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2005.01.020>.
- [286] Yuan, Q.; Sahu, L. K.; D'Souza, N. A.; Golden, T. D. Synthesis of Hydroxyapatite Coatings

- on Metal Substrates Using a Spincasting Technique. *Mater. Chem. Phys.* **2009**, *116* (2–3), 523–526. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.04.027>.
- [287] Malakauskaite-Petruleviciene, M.; Stankeviciute, Z.; Beganskiene, A.; Kareiva, A. Sol-Gel Synthesis of Calcium Hydroxyapatite Thin Films on Quartz Substrate Using Dip-Coating and Spin-Coating Techniques. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *71* (3), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s10971-014-3394-5>.
- [288] Carradò, A.; Viart, N. Nanocrystalline Spin Coated Sol-Gel Hydroxyapatite Thin Films on Ti Substrate: Towards Potential Applications for Implants. *Solid State Sci.* **2010**, *12* (7), 1047–1050. <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2010.04.014>.
- [289] Zhou, H.; Goel, V. K.; Bhaduri, S. B. A Fast Route to Modify Biopolymer Surface: A Study on Polyetheretherketone (PEEK). *Mater. Lett.* **2014**, *125*, 96–98. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.03.130>.
- [290] Chen, X. B.; Birbilis, N.; Abbott, T. B. Effect of [Ca²⁺] and [PO₄³⁻] Levels on the Formation of Calcium Phosphate Conversion Coatings on Die-Cast Magnesium Alloy AZ91D. *Corros. Sci.* **2012**, *55*, 226–232. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2011.10.022>.
- [291] Zhou, H.; Nabiyouni, M.; Bhaduri, S. B. Microwave Assisted Apatite Coating Deposition on Ti6Al4V Implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (7), 4435–4443. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.06.043>.
- [292] Ren, Y.; Zhou, H.; Nabiyouni, M.; Bhaduri, S. B. Rapid Coating of AZ31 Magnesium Alloy with Calcium Deficient Hydroxyapatite Using Microwave Energy. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *49*, 364–372. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.046>.
- [293] Gray-Munro, J. E.; Strong, M. The Mechanism of Deposition of Calcium Phosphate Coatings from Solution onto Magnesium Alloy AZ31. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2009**, *90* (2), 339–350. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32107>.
- [294] Haque, E.; Khan, N. A.; Kim, C. M.; Jung, S. H. Syntheses of Metal-Organic Frameworks and Aluminophosphates under Microwave Heating: Quantitative Analysis of Accelerations. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (10), 4413–4421. <https://doi.org/10.1021/cg200594e>.
- [295] Yamada, S.; Takasu, A.; Kawamura, K. The Effect of Microwave Irradiation on the Kinetics and Activation Thermodynamics of Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2013**, *51* (17), 3732–3739. <https://doi.org/10.1002/pola.26776>.
- [296] Vani, R.; Subramaniya Bharathi, R.; Sridevi, T. S.; Savithri, K.; Devaraj, S. N.; Girija, E. K.; Thamizhavel, A.; Kalkura, S. N. Surfactant Free Rapid Synthesis of Hydroxyapatite Nanorods by a Microwave Irradiation Method for the Treatment of Bone Infection.

Nanotechnology **2011**, 22 (28), 285701.

- [297] Zhou, H.; Yang, M.; Hou, S.; Deng, L. Mesoporous Hydroxyapatite Nanoparticles Hydrothermally Synthesized in Aqueous Solution with Hexametaphosphate and Tea Polyphenols. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 71, 439–445. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.040>.
- [298] Zuo, G.; Wei, X.; Sun, H.; Liu, S.; Zong, P.; Zeng, X.; Shen, Y. Morphology Controlled Synthesis of Nano-Hydroxyapatite Using Polyethylene Glycol as a Template. *J. Alloys Compd.* **2017**, 692, 693–697. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.117>.
- [299] Surmenev, R. A. A Review of Plasma-Assisted Methods for Calcium Phosphate-Based Coatings Fabrication. *Surf. Coatings Technol.* **2012**, 206 (8), 2035–2056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.11.002>.
- [300] Gadow, R.; Killinger, A.; Stiegler, N. Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications Deposited by Different Thermal Spray Techniques. *Surf. Coatings Technol.* **2010**, 205 (4), 1157–1164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.03.059>.
- [301] Levingstone, T. J.; Ardhaoui, M.; Benyounis, K.; Looney, L.; Stokes, J. T. Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings: Understanding Process Relationships Using Design of Experiment Analysis. *Surf. Coatings Technol.* **2015**, 283, 29–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.10.044>.
- [302] Roy, M.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. Induction Plasma Sprayed Nano Hydroxyapatite Coatings on Titanium for Orthopaedic and Dental Implants. *Surf. Coatings Technol.* **2011**, 205 (8), 2785–2792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.10.042>.
- [303] Singh, G.; Singh, S.; Prakash, S. Surface Characterization of Plasma Sprayed Pure and Reinforced Hydroxyapatite Coating on Ti6Al4V Alloy. *Surf. Coatings Technol.* **2011**, 205 (20), 4814–4820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.04.064>.
- [304] Heimann, R. B. Thermal Spraying of Biomaterials. *Surf. Coatings Technol.* **2006**, 201 (5), 2012–2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.04.052>.
- [305] Bolelli, G.; Bellucci, D.; Cannillo, V.; Lusvarghi, L.; Sola, A.; Stiegler, N.; Müller, P.; Killinger, A.; Gadow, R.; Altomare, L.; De Nardo, L. Suspension Thermal Spraying of Hydroxyapatite: Microstructure and in Vitro Behaviour. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, 34, 287–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.017>.
- [306] Steeper, T. J.; Varacalle, D. J.; Wilson, G. C.; Riggs, W. L.; Rotolico, A. J.; Nerz, J. A Design of Experiment Study of Plasma-Sprayed Alumina-Titania Coatings. *J. Therm. Spray Technol.* **1993**, 2 (3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/BF02650473>.
- [307] Cao, N.; Dong, J.; Wang, Q.; Ma, Q.; Wang, F.; Chen, H.; Xue, C.; Li, M. Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating on Carbon/Carbon Composite Scaffolds for Bone Tissue

- Engineering and Related Tests in Vivo. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *92A* (3), 1019–1027. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32424>.
- [308] Furkó, M.; Balázs, K.; Balázs, C. Comparative Study on Preparation and Characterization of Bioactive Coatings for Biomedical Applications—a Review on Recent Patents and Literature. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2017**, *48* (1), 25–51.
- [309] Jiang, T.; Zhang, Z.; Zhou, Y.; Liu, Y.; Wang, Z.; Tong, H.; Shen, X.; Wang, Y. Surface Functionalization of Titanium with Chitosan/Gelatin via Electrophoretic Deposition: Characterization and Cell Behavior. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (5), 1254–1260. <https://doi.org/10.1021/bm100050d>.
- [310] Farrokhi-Rad, M. Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite Fiber Reinforced Hydroxyapatite Matrix Nanocomposite Coatings. *Surf. Coatings Technol.* **2017**, *329*, 155–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.09.051>.
- [311] Eraković, S.; Janković, A.; Veljović, D.; Palcevskis, E.; Mitrić, M.; Stevanović, T.; Janačković, D.; Mišković-Stanković, V. Corrosion Stability and Bioactivity in Simulated Body Fluid of Silver/Hydroxyapatite and Silver/Hydroxyapatite/Lignin Coatings on Titanium Obtained by Electrophoretic Deposition. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (6), 1633–1643. <https://doi.org/10.1021/jp305252a>.
- [312] Erakovic, S.; Jankovic, A.; Tsui, G.; Tang, C.-Y.; Miskovic-Stankovic, V.; Stevanovic, T. Novel Bioactive Antimicrobial Lignin Containing Coatings on Titanium Obtained by Electrophoretic Deposition. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (7), 12294.
- [313] Eraković, S.; Janković, A.; Matić, I. Z.; Juranić, Z. D.; Vukašinović-Sekulić, M.; Stevanović, T.; Mišković-Stanković, V. Investigation of Silver Impact on Hydroxyapatite/Lignin Coatings Electrodeposited on Titanium. *Mater. Chem. Phys.* **2013**, *142* (2), 521–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.07.047>.
- [314] Kalyoncuoglu, U. T.; Yilmaz, B.; Koc, S. G.; Evis, Z.; Arpacı, P. U.; Kansu, G. Investigation of Surface Structure and Biocompatibility of Chitosan-Coated Zirconia and Alumina Dental Abutments. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2018**, *20* (6), 1022–1029. <https://doi.org/10.1111/cid.12665>.
- [315] Riaz Rajoka, M. S.; Zhao, L.; Mehwish, H. M.; Wu, Y.; Mahmood, S. Chitosan and Its Derivatives: Synthesis, Biotechnological Applications, and Future Challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (4), 1557–1571. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9550-z>.
- [316] Abarrategi, A.; Civantos, A.; Ramos, V.; Sanz Casado, J. V.; López-Lacomba, J. L. Chitosan Film as RhBMP2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (2), 711–718. <https://doi.org/10.1021/bm701049g>.

- [317] Civantos, A.; Martínez-Campos, E.; Ramos, V.; Elvira, C.; Gallardo, A.; Abarregati, A. Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (7), 1245–1261. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00604>.
- [318] Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grondahl, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2533–2541. <https://doi.org/10.1021/bm070014y>.
- [319] Cado, G.; Kerdjoudj, H.; Chassepot, A.; Lefort, M.; Benmlih, K.; Hemmerlé, J.; Voegel, J. C.; Jierry, L.; Schaaf, P.; Frère, Y.; Boulmedais, F. Polysaccharide Films Built by Simultaneous or Alternate Spray: A Rapid Way to Engineer Biomaterial Surfaces. *Langmuir* **2012**, *28* (22), 8470–8478. <https://doi.org/10.1021/la300563s>.
- [320] Saurer, E. M.; Jewell, C. M.; Roenneburg, D. A.; Bechler, S. L.; Torrealba, J. R.; Hacker, T. A.; Lynn, D. M. Polyelectrolyte Multilayers Promote Stent-Mediated Delivery of DNA to Vascular Tissue. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (5), 1696–1704. <https://doi.org/10.1021/bm4005222>.
- [321] Martins, G. V.; Mano, J. F.; Alves, N. M. Nanostructured Self-Assembled Films Containing Chitosan Fabricated at Neutral PH. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80* (2), 570–573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.030>.
- [322] Bumgardner, J. D.; Wiser, R.; Gerard, P. D.; Bergin, P.; Chestnutt, B.; Marin, M.; Ramsey, V.; Elder, S. H.; Gilbert, J. A. Chitosan: Potential Use as a Bioactive Coating for Orthopaedic and Craniofacial/Dental Implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2003**, *14* (5), 423–438. <https://doi.org/10.1163/156856203766652048>.
- [323] Chng, E. J.; Watson, A. B.; Suresh, V.; Fujiwara, T.; Bumgardner, J. D.; Gopalakrishnan, R. Adhesion of Electrospayed Chitosan Coatings Using Silane Surface Chemistry. *Thin Solid Films* **2019**, *692* (August), 137454. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2019.137454>.
- [324] Qasim, S. B.; Najeeb, S.; Delaine-Smith, R. M.; Rawlinson, A.; Ur Rehman, I. Potential of Electrospun Chitosan Fibers as a Surface Layer in Functionally Graded GTR Membrane for Periodontal Regeneration. *Dent. Mater.* **2017**, *33* (1), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.10.003>.
- [325] Besra, L.; Liu, M. A Review on Fundamentals and Applications of Electrophoretic Deposition (EPD). *Prog. Mater. Sci.* **2007**, *52* (1), 1–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2006.07.001>.
- [326] Biest, O. O. Van der; Vandeperre, L. J. Electrophoretic Deposition of Materials. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1999**, *29* (1), 327–352. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.29.1.327>.
- [327] Hamaker, H. C. Formation of a Deposit by Electrophoresis. *Trans. Faraday Soc.* **1940**, *35*

- (0), 279–287. <https://doi.org/10.1039/TF9403500279>.
- [328] Sarkar, P.; Nicholson, P. S. Electrophoretic Deposition (EPD): Mechanisms, Kinetics, and Application to Ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **1996**, *79* (8), 1987–2002. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1996.tb08929.x>.
- [329] Biesheuvel, P. M.; Verweij, H. Theory of Cast Formation in Electrophoretic Deposition. *J. Am. Ceram. Soc.* **1999**, *82* (6), 1451–1455. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1999.tb01939.x>.
- [330] Ferrari, B.; Moreno, R. EPD Kinetics: A Review. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2010**, *30* (5), 1069–1078.
- [331] *Electrophoretic Deposition of Nanomaterials*; Dickerson, J. H., Boccaccini, A. R., Eds.; Nanostructure Science and Technology; Springer New York: New York, NY, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9730-2>.
- [332] Luo, Q. W.; Li, Y. N.; Li, F. H.; Fan, Z. G. Fabrication of YBa₂Cu₃O_{7-δ} Superconducting Film on NiW Alloy Using Electrophoretic Deposition. *Adv. Mater. Res.* **2013**, *652–654*, 1892–1896. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.652-654.1892>.
- [333] Cabanas-Polo, S.; Boccaccini, A. R. Electrophoretic Deposition of Nanoscale TiO₂: Technology and Applications. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, *36* (2), 265–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.05.030>.
- [334] Aznam, I.; Mah, J. C. W.; Muchtar, A.; Somalu, M. R.; Ghazali, M. J. A Review of Key Parameters for Effective Electrophoretic Deposition in the Fabrication of Solid Oxide Fuel Cells. *J. ZHEJIANG Univ. A* **2018**, *19* (11), 811–823. <https://doi.org/10.1631/jzus.A1700604>.
- [335] Hu, S.; Li, W.; Finklea, H.; Liu, X. A Review of Electrophoretic Deposition of Metal Oxides and Its Application in Solid Oxide Fuel Cells. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *276*, 102102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102102>.
- [336] Pishbin, F. Development and Characterisation of Bioactive Coatings Based on Biopolymer and Bioactive Glass Obtained by Electrochemical Means. *PQDT - UK Irel.* **2013**.
- [337] Fukada, Y.; Nagarajan, N.; Mekky, W.; Bao, Y.; Kim, H. S.; Nicholson, P. S. Electrophoretic Deposition - Mechanisms, Myths and Materials. In *Journal of Materials Science*; Springer, 2004; Vol. 39, pp 787–801. <https://doi.org/10.1023/B:JMISC.0000012906.70457.df>.
- [338] Kitsugi, T.; Nakamura, T.; Yamamura, T.; Kokubu, 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* (10), 1255–1271. <https://doi.org/10.1002/jbm.820211008>.
- [339] Ohtsuki, C.; Kushitani, H.; Kokubo, T.; Kotani, S.; Yamamuro, T. Apatite Formation on the Surface of Ceravital-Type Glass-Ceramic in the Body. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25* (11),

- 1363–1370. <https://doi.org/10.1002/jbm.820251105>.
- [340] Oyane, A.; Kim, H.-M.; Furuya, T.; Kokubo, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, T. Preparation and Assessment of Revised Simulated Body Fluids. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *65A* (2), 188–195. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10482>.
- [341] Hench, L. L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **1998**, *81* (7), 1705–1728. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x>.
- [342] Miyazaki, T.; Kim, H. M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Kato, H.; Nakamura, T. Bioactive Tantalum Metal Prepared by NaOH Treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (1), 35–42. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(200004\)50:1<35::aid-jbm6>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(200004)50:1<35::aid-jbm6>3.0.co;2-8).
- [343] Tanahashi, M.; Yao, T.; Kokubo, T.; Minoda, M.; Miyamoto, T.; Nakamura, T.; Yamamuro, T. Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process. *J. Am. Ceram. Soc.* **1994**, *77* (11), 2805–2808. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1994.tb04508.x>.
- [344] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Ohtsuki, C.; Sakka, S.; Yamamuro, T. Chemical Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with a Simulated Body Fluid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1992**, *3* (2), 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF00705272>.
- [345] Cullity, B. D. *Elements of X-Ray Diffraction*; Addison-Wesley: New York, 1978.
- [346] Bunjes, H.; Unruh, T. Characterization of Lipid Nanoparticles by Differential Scanning Calorimetry, X-Ray and Neutron Scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (6), 379–402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.013>.
- [347] Pavlović, M. M.; Pavlović, M. G.; Cosović, V.; Bojanić, V.; Nikolić, N. D.; Aleksić, R. Influence of Electrolytic Copper Powder Particle Morphology on Electrical Conductivity of Lignocellulose Composites and Formation of Conductive Pathways. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9* (12), 8355–8366.
- [348] Pavlovic, M. M.; Pavlovic, M. G.; Panic, V.; Talijan, N.; Vasiljevic, L.; Tomic, M. V. Electrical Conductivity of Lignocellulose Composites Loaded with Electrodeposited Copper Powders. Part III. Influence of Particle Morphology on Appearance of Electrical Conductive Layers. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7* (9).
- [349] Choudhury, S. K.; Chinchankar, S. 1.3 Finish Machining of Hardened Steel; Hashmi, M. S. J. B. T.-C. M. F., Ed.; Elsevier: Oxford, 2017; pp 47–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09149-9>.
- [350] Freyman, C.; Zhao, B.; Chung, Y.-W. 18 - Suppression of Moisture Sensitivity of Friction in Carbon-Based Coatings; Erdemir, A., Martin, J.-M. B. T.-S., Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2007; pp 295–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044452772-1/50049-4>.
- [351] Kolarević, S.; Milovanović, D.; Avdović, M.; Oalde, M.; Kostić, J.; Sunjog, K.; Nikolić, B.;

- Knežević-Vukcević, J.; Vuković-Gaćić, B. Optimisation of the Microdilution Method for Detection of Minimum Inhibitory Concentration Values in Selected Bacteria. *Bot. Serbica* **2016**, *40* (1), 29–36. <https://doi.org/10.5281/zenodo.48751>.
- [352] Phillips, H. J. CHAPTER 3 - Dye Exclusion Tests for Cell Viability; KRUSE, P. F., PATTERSON, M. K. B. T.-T. C., Eds.; Academic Press, 1973; pp 406–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7>.
- [353] Pantović Pavlović, M.; Pavlović, M. M.; Kovačina, J.; Stanojević, B.; Stevanović, J.; Panić, V.; Ignjatović, N. Cytotoxicity of Amorphous Calcium Phosphate Multifunctional Composite Coatings on Titanium Obtained by in Situ Anodization/Anaphoretic Deposition: Note. *J. Serbian Chem. Soc.* **2021**, *86*(6), 555–559. <https://doi.org/10.2298/JSC210211024P>.
- [354] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [355] Pantović Pavlović, M. R.; Pavlović, M. M.; Eraković, S. G.; Stevanović, J. S.; Ignjatović, N. L.; Panić, V. V. Influence of Process Parameters of Simultaneous Anodization / Anaphoretic Electrodeposition Synthesis of Hydroxyapatite / Titanium Oxide Composite Coatings on Adhesion. In *GEI 2019 - Giornate dell'elettrochimica Italiana*; Padova, Italy, 2019; p 124.
- [356] Pantović Pavlović, M. R.; Eraković, S. G.; Pavlović, M. M.; Panić, V. V.; Pavlović, M. G. In Situ Synthesis of Biocompatible Composite Layer of Hydroxyapatite/Passive Oxide Surfaces on the Modified Titanium. *Zaštita Mater. i životne Sred.* **2017**, *6* (1), 26–34.
- [357] Wu, L.; Liu, J.; Yu, M.; Li, S.; Liang, H.; Zhu, M. Effect of Anodization Time on Morphology and Electrochemical Impedance of Andic Oxide Films on Titanium Alloy in Tartrate Solution. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9* (9), 5012–5024.
- [358] Yan, Z. M.; Guo, T. W.; Pan, H. B.; Yu, J. J. Influences of Electrolyzing Voltage on Chromatics of Anodized Titanium Dentures. *Mater. Trans.* **2002**, *43* (12), 3142–3145. <https://doi.org/10.2320/matertrans.43.3142>.
- [359] Popov, K. I.; Živković, P. M.; Nikolić, N. D. A Mathematical Model of the Current Density Distribution in Electrochemical Cells. *J. Serbian Chem. Soc.* **2011**, *76* (6), 805–822. <https://doi.org/10.2298/JSC100312079P>.
- [360] Pantović Pavlović, M. R.; Eraković, S. G.; Pavlović, M. M.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V. Morphological Characteristics of Anaphoretically Obtained Hydroxyapatite/Titanium Dioxide Coatings. In *20. YUCORR – Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection*; Tara, Serbia, 2018; p 142.
- [361] Pantović Pavlović, M. R.; Pavlović, M. M.; Eraković, S. G.; Barudžija, T.; Stevanović, J. S.; Ignjatović, N. L.; Panić, V. V. In Situ Synthesis and Characterization of

- Hydroxyapatite/Titanium Oxide Coatings Derived by Anodization and Anaphoretic Deposition. In *13th. Conference for Young Scientists in Ceramics, CYSC-2019*; Novi Sad, Serbia, 2019; p 131.
- [362] Pantović Pavlović, M. R.; Eraković, S. G.; Pavlović, M. M.; Veselinović, L.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V.; Ignjatović, N. L. Surface Modification of Titanium Implants by Adherent Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings Using Novel in-Situ Synthesis. In *7th Regional Symposium on Electrochemistry – South East Europe & 8th Kurt Schwabe Symposium - RSE-SEE 7*; Split, Croatia, 2019; p 120. <https://doi.org/10.1039/C6RA10560B.J>.
- [363] Pantović Pavlović, M. R.; Pavlovic, M. M.; Eraković, S. G.; Veselinović, L.; Stevanović, J. S.; Panić, V. V.; Ignjatović, N. L. Novel In-Situ Synthesis of Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings on Titanium by Simultaneous Anodization/Anaphoretic Electrodeposition. In *VI International Congress “Engineering, Environment and Materials in Processing Industry”*; Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, 2019; pp 630–635. <https://doi.org/10.7251/EEMEN1901630P>.
- [364] Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [365] Kumar, A. M.; Suresh, B.; Das, S.; Obot, I. B.; Adesina, A. Y.; Ramakrishna, S. Promising Bio-Composites of Polypyrrole and Chitosan: Surface Protective and in Vitro Biocompatibility Performance on 316L SS Implants. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *173*, 121–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.083>.
- [366] Barjaktarević, D. R.; Djokić, V. R.; Bajat, J. B.; Dimić, I. D.; Cvijović-Alagić, I. L.; Rakin, M. P. The Influence of the Surface Nanostructured Modification on the Corrosion Resistance of the Ultrafine-Grained Ti–13Nb–13Zr Alloy in Artificial Saliva. *Theor. Appl. Fract. Mech.* **2019**, *103*, 102307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tafmec.2019.102307>.
- [367] Oliveira, N. T. C.; Ferreira, E. A.; Duarte, L. T.; Biaggio, S. R.; Rocha-Filho, R. C.; Bocchi, N. Corrosion Resistance of Anodic Oxides on the Ti–50Zr and Ti–13Nb–13Zr Alloys. *Electrochim. Acta* **2006**, *51* (10), 2068–2075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.07.015>.
- [368] Ren, S.; Du, C.; Liu, Z.; Li, X.; Xiong, J.; Li, S. Effect of Fluoride Ions on Corrosion Behaviour of Commercial Pure Titanium in Artificial Seawater Environment. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *506*, 144759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144759>.
- [369] Yu, S. Y.; Brodrick, C. W.; Ryan, M. P.; Scully, J. R. Effects of Nb and Zr Alloying Additions on the Activation Behavior of Ti in Hydrochloric Acid. *J. Electrochem. Soc.* **1999**,

- 146 (12), 4429–4438. <https://doi.org/10.1149/1.1392655>.
- [370] Fekry, A. M. The Influence of Chloride and Sulphate Ions on the Corrosion Behavior of Ti and Ti-6Al-4V Alloy in Oxalic Acid. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (12), 3480–3489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.12.060>.
- [371] Rikhari, B.; Pugal Mani, S.; Rajendran, N. Electrochemical Behavior of Polypyrrole/Chitosan Composite Coating on Ti Metal for Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *189*, 126–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.042>.
- [372] Elangovan, N.; Srinivasan, A.; Pugalmani, S.; Rajendiran, N.; Rajendran, N. Development of Poly(Vinylcarbazole)/Alumina Nanocomposite Coatings for Corrosion Protection of 316L Stainless Steel in 3.5% NaCl Medium. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (27), 44937. <https://doi.org/10.1002/app.44937>.
- [373] Vathsala, K.; Venkatesha, T. V; Praveen, B. M.; Nayana, K. O. Electrochemical Generation of Zn-Chitosan Composite Coating on Mild Steel and Its Corrosion Studies. *Engineering* **2010**, *2* (8), 580–584.
- [374] Gebhardt, F.; Seuss, S.; Turhan, M. C.; Hornberger, H.; Virtanen, S.; Boccaccini, A. R. Characterization of Electrophoretic Chitosan Coatings on Stainless Steel. *Mater. Lett.* **2012**, *66* (1), 302–304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.08.088>.
- [375] Turelli, F.; Strigin, A. T.; Belinkii, A. L.; Adugina, N. A.; Dmitriev, M. A.; Krutikov, A. N. Simultaneous Determination of Instantaneous Corrosion Rates and Tafel Slopes from Polarization Resistance Measurements. *J. Electrochem. Soc.* **1972**, *120* (4), 6–9.
- [376] Saji, V. S.; Choe, H. C.; Brantley, W. A. An Electrochemical Study on Self-Ordered Nanoporous and Nanotubular Oxide on Ti–35Nb–5Ta–7Zr Alloy for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (6), 2303–2310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.02.017>.
- [377] Dimić, I.; Cvijović-Alagić, I.; Hohenwarter, A.; Pippan, R.; Kojić, V.; Bajat, J.; Rakin, M. Electrochemical and Biocompatibility Examinations of High-Pressure Torsion Processed Titanium and Ti–13Nb–13Zr Alloy. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2018**, *106* (3), 1097–1107. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33919>.
- [378] Lai, C.; Chen, Y.; Zhang, S. Study on Chitosan-Lactate Sponges with Oriented Pores as Potential Wound Dressing. *Mater. Sci. Appl.* **2013**, *04* (08), 458–470. <https://doi.org/10.4236/msa.2013.48056>.
- [379] Pal, A. K.; Katiyar, V. Thermal Degradation Behaviour of Nanoamphiphilic Chitosan Dispersed Poly (Lactic Acid) Bionanocomposite Films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 1267–1279. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.024>.

- [380] Du, L. W.; Bian, S.; Gou, B. Di; Jiang, Y.; Huang, J.; Gao, Y. X.; Zhao, Y. D.; Wen, W.; Zhang, T. L.; Wang, K. Structure of Clusters and Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Hydroxyapatite: From the Perspective of Coordination Chemistry. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13* (7), 3103–3109. <https://doi.org/10.1021/cg400498j>.
- [381] Pakravanan, K.; Rezaee Roknabadi, M.; Farzanegan, F.; Hashemzadeh, A.; Darroudi, M. Amorphous Calcium Phosphate Nanoparticles-Based Mouthwash: Preparation, Characterization, and Anti-Bacterial Effects. *Green Chem. Lett. Rev.* **2019**, *12* (3), 278–285. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1643412>.
- [382] Zhou, W.; Wang, Y.; Jian, J.; Song, S. Self-Aggregated Nanoparticles Based on Amphiphilic Poly(Lactic Acid)-Grafted-Chitosan Copolymer for Ocular Delivery of Amphotericin B. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 3715–3728. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51186>.
- [383] Li, W.; Liang, R.; Hu, A.; Huang, Z.; Zhou, Y. N. Generation of Oxygen Vacancies in Visible Light Activated One-Dimensional Iodine TiO₂ Photocatalysts. *RSC Adv.* **2014**, *4* (70), 36959–36966. <https://doi.org/10.1039/c4ra04768k>.
- [384] Pantovic Pavlovic, M. R.; Erakovic, S.; Pavlovic, M. M.; Pantovic Spajic, K.; Panic, V.; Pavlovic, M. G. In Situ Synthesis of Biocompatible Composite Layer of Hydroxyapatite/Passive Oxide Surfaces on the Modified Titanium. In *XXV International conference " ECOLOGICAL TRUTH " ECO-IST ' 17*; Vrnjačka Banja, Serbia, 2017; pp 301–306.
- [385] Govindaraj, D.; Rajan, M.; Munusamy, M. A.; Higuchi, A. Mineral Substituted Hydroxyapatite Coatings Deposited on Nanoporous TiO₂ Modulate the Directional Growth and Activity of Osteoblastic Cells. *RSC Adv.* **2015**, *5* (73), 58980–58988. <https://doi.org/10.1039/C5RA11037H>.
- [386] Roguska, A.; Pisarek, M.; Andrzejczuk, M.; Dolata, M.; Lewandowska, M.; Janik-Czachor, M. Characterization of a Calcium Phosphate–TiO₂ Nanotube Composite Layer for Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31* (5), 906–914. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.02.009>.
- [387] Mirzaee, M.; Vaezi, M.; Palizdar, Y. Synthesis and Characterization of Silver Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Coatings and Evaluation of Their Antibacterial and Corrosion Resistance Properties in Simulated Body Fluid. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *69*, 675–684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.057>.
- [388] Huang, Y.; Wang, W.; Zhang, X.; Liu, X.; Xu, Z.; Han, S.; Su, Z.; Liu, H.; Gao, Y.; Yang, H. A Prospective Material for Orthopedic Applications: Ti Substrates Coated with a Composite Coating of a Titania-Nanotubes Layer and a Silver-Manganese-Doped Hydroxyapatite Layer. *Ceram. Int.* **2018**, *44* (5), 5528–5542.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.197>.
- [389] Goudarzi, M.; Batmanghelich, F.; Afshar, A.; Dolati, A.; Mortazavi, G. Development of Electrophoretically Deposited Hydroxyapatite Coatings on Anodized Nanotubular TiO₂ Structures: Corrosion and Sintering Temperature. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *301*, 250–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.055>.
- [390] Fathyunes, L.; Khalil-Allafi, J. Effect of Employing Ultrasonic Waves during Pulse Electrochemical Deposition on the Characteristics and Biocompatibility of Calcium Phosphate Coatings. *Ultrason. Sonochem.* **2018**, *42*, 293–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.041>.
- [391] Janković, A.; Eraković, S.; Mitrić, M.; Matić, I. Z.; Juranić, Z. D.; Tsui, G. C. P.; Tang, C.; Mišković-Stanković, V.; Rhee, K. Y.; Park, S. J. Bioactive Hydroxyapatite/Graphene Composite Coating and Its Corrosion Stability in Simulated Body Fluid. *J. Alloys Compd.* **2015**, *624*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.11.078>.
- [392] Wu, C.-C.; Huang, S.-T.; Tseng, T.-W.; Rao, Q.-L.; Lin, H.-C. FT-IR and XRD Investigations on Sintered Fluoridated Hydroxyapatite Composites. *J. Mol. Struct.* **2010**, *979* (1), 72–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.06.003>.
- [393] REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of Hydroxyapatite and Carbonated Apatite by Photo Acoustic FTIR Spectroscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1023/A:1018570213546>.
- [394] Kong, W.; Zhao, K.; Gao, C.; Zhu, P. Synthesis and Characterization of Carbonated Hydroxyapatite with Layered Structure. *Mater. Lett.* **2019**, *255*, 126552. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126552>.
- [395] Reyes-Gasga, J.; Martínez-Piñeiro, E. L.; Rodríguez-Álvarez, G.; Tiznado-Orozco, G. E.; García-García, R.; Brès, E. F. XRD and FTIR Crystallinity Indices in Sound Human Tooth Enamel and Synthetic Hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (8), 4568–4574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>.
- [396] Koutsopoulos, S. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on the Analytical Methods. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62* (4), 600–612. <https://doi.org/10.1002/jbm.10280>.
- [397] López, F. A.; Mercê, A. L. R.; Alguacil, F. J.; López-Delgado, A. A Kinetic Study on the Thermal Behaviour of Chitosan. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2008**, *91* (2), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s10973-007-8321-3>.
- [398] Wanjun, T.; Cunxin, W.; Donghua, C. Kinetic Studies on the Pyrolysis of Chitin and Chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *87* (3), 389–394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.08.006>.

- [399] Geetha, V.; Gomathi, T.; Sudha, P. N. Preparation and Characterization of Graphene-Grafted-Chitosan/Hydroxyapatite Composite. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7* (5), 871–876.
- [400] Tang, S.; Tian, B.; Guo, Y.-J.; Zhu, Z.-A.; Guo, Y.-P. Chitosan/Carbonated Hydroxyapatite Composite Coatings: Fabrication, Structure and Biocompatibility. *Surf. Coatings Technol.* **2014**, *251*, 210–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.04.028>.
- [401] Costa-Rodrigues, J.; Fernandes, A.; Lopes, M. A.; Fernandes, M. H. Hydroxyapatite Surface Roughness: Complex Modulation of the Osteoclastogenesis of Human Precursor Cells. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (3), 1137–1145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.032>.
- [402] Kim, S.-K.; Rajapakse, N. Enzymatic Production and Biological Activities of Chitosan Oligosaccharides (COS): A Review. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62* (4), 357–368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.012>.
- [403] Kim, J. Y.; Lee, J. K.; Lee, T. S.; Park, W. H. Synthesis of Chitooligosaccharide Derivative with Quaternary Ammonium Group and Its Antimicrobial Activity against Streptococcus Mutans. *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, *32* (1), 23–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00021-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00021-7).
- [404] Choi, B.-K.; Kim, K.-Y.; Yoo, Y.-J.; Oh, S.-J.; Choi, J.-H.; Kim, C.-Y. In Vitro Antimicrobial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture against Actinobacillus Actinomycetemcomitans and Streptococcus Mutans. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *18* (6), 553–557. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00434-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00434-4).
- [405] Puškar, T.; Trifković, B.; Koprivica, D. D.; Kojić, V.; Jevremović, A.; Mirković, S.; Eggbeer, D. In Vitro Cytotoxicity Assessment of the 3D Printed Polymer Based Epoxy Resin Intended for Use in Dentistry. *Vojnosanit. Pregl.* **2019**, *76* (5), 502–509. <https://doi.org/10.2298/VSP170721127P>.
- [406] Sjögren, G.; Sletten, G.; Dahl, J. E. Cytotoxicity of Dental Alloys, Metals, and Ceramics Assessed by Millipore Filter, Agar Overlay, and MTT Tests. *J. Prosthet. Dent.* **2000**, *84* (2), 229–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1067/mpr.2000.107227>.

BIOGRAFIJA

Marijana Pantović Pavlović je rođena 5.09.1987. godine. Diplomski rad „Periodični signali i Furijeov red“ je odbranila 2013. godine na Elektrotehničkom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Nenada Cakića. Master rad „Uticaj razvoja širokopoljnih komunikacija na zaštitu životne sredine“ je odbranila 2014. godine na istom fakultetu pod mentorstvom prof. dr Miroslava Dukića. Od školske 2015/2016 godine je doktorand multidisciplinarnih doktorskih studija Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biomedicinsko inženjerstvo i tehnologije.

Zaposlena je na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju od 2015. godine i radi kao deo tima na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Nov pristup dizajniranju materijala za konverziju i skladištenje energije“ OI 172060, u zvanju istraživača saradnika. Učestvovala je na bilateralnom projektu Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu „Superkondenzatori visoke snage zasnovani na grafen/pseudokapacitivnim materijalima“. Član je tima na projektu dokaza koncepta: „Integrisani zeleni koncept za uklanjanje neprijatnih mirisa i dezinfekciju u radnoj sredini – GREENCEPT“, projekat broj 5769, finansiran od strane Fonda za inovacionu delatnost, kao i na DAAD projektu između Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i Instituta za procesnu metalurgiju i reciklažu metala RWTH Univerziteta u Ahenu, Nemačka pod nazivom: „Recikliranje retkih zemalja, Nd+Pr, iz NdFeB magnetnog otpada: Novi pristup“.

Tokom 2016. godine Marijana je bila polaznik letnje škole za Kvantitativnu biologiju na Institutu za molekularnu onkologiju Italijanske fondacije za istraživanje kancera (IFOM-FIRC) u Milanu, Italija.

Član je Međunarodnog društva za elektrohemiju, Srpskog hemijskog društva i Udruženja inženjera Srbije za koroziju i zaštitu materijala.

Na međunarodnoj konferenciji 18. YUCORR – Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection 2016. godine dobila je nagradu za najbolju poster prezentaciju.

Marijana je do sada publikovala devet radova u međunarodnim časopisima koji su na SCI listi i preko trideset saopštenja prezentovala na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima.

Sledeće bibliografske jedinice, kategorisane po kriterijuma Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, su proistekle iz ove doktorske disertacije:

M21 - Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **Marijana R. Pantović Pavlović**, Sanja G. Eraković, Miroslav M. Pavlović, Jasmina S. Stevanović, Vladimir V. Panić, Nenad L. Ignjatović, „Anaphoretical/oxidative approach to the in-situ synthesis of adherent hydroxyapatite/titanium oxide composite coatings on titanium”, *Surf. Coat. Technol.*, 358, 688-694, **2019**, DOI: 10.1016/j.surfcoat.2018.12.003. **ISSN: 0257-8972**
[IF: 3.784 u 2019. godini; **Kategorija:** Nauka o materijalima, prevlake i filmovi (3/21)]
2. **M.R. Pantović Pavlović**, M.M. Pavlović, S. Eraković, J.S. Stevanović, V.V. Panić, N.Ignjatović, „Simultaneous anodization/anaphoretic electrodeposition synthesis of nano calcium phosphate/titaniumoxide composite coatings assisted with chitosan oligosaccharide lactate”, *Mat. Lett.* (2020), 261, 127121, **2020**, DOI: 10.1016/j.matlet.2019.127121. **ISSN: 0167-577X**
[IF: 3.204 u 2019. godini; **Kategorija:** Fizika, primenjena (43/155)]
3. **Marijana R. Pantović Pavlović**, Boris P. Stanojević, Miroslav M. Pavlović, Marija D. Mihailović, Jasmina S. Stevanović, Vladimir V. Panić, Nenad L. Ignjatović, „Anodizing/anaphoretic electrodeposition of nano calcium phosphate/chitosan lactate multifunctional coatings on titanium with advanced corrosionresistance, bioactivity and antibacterial properties“, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2021**, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.1c00035, **ISSN: 2373-9878**
[IF: 4.619 u 2019. godini; **Kategorija:** Nauka o materijalima, Biomaterijali (10/38)]

M23 - Rad u međunarodnom časopisu

1. **Marijana R. Pantović Pavlović**, Miroslav M. Pavlović, Sanja Eraković, Tanja Barudžija, Jasmina S. Stevanović, Nenad Ignjatović, Vladimir V. Panić, “Relationship between the properties of an interlayer formed by in situ Ti anodization and anaphoretically deposited hydroxyapatite”, *J. Serb. Chem. Soc.* 84(11), 1305-1318, **2019**, DOI: 10.2298/JSC190730105P, **ISSN: 1820-7421**
[IF: 1.097 u 2019. godini; **Kategorija:** Hemija, multidisciplinarna (138/177)]
2. **M. Pantović Pavlović**, M.M. Pavlović, J. Kovačina, B. Stanojević, J. Stevanović, V. Panić, N. Ignjatović, “Cytotoxicity of amorphous calcium phosphate multifunctional composite coatings on titanium obtained by in situ anodization/anaphoretic deposition: Note”, *J. Serb. Chem. Soc.* **2021**, DOI: 10.2298/JSC210211024P, **ISSN: 1820-7421**
[IF: 1.097 u 2019. godini; **Kategorija:** Hemija, multidisciplinarna (138/177)]

M33 - Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

1. **M. R. Pantovic Pavlovic**, S. Erakovic, M. M. Pavlovic, K. Pantovic Spajic, V. Panic, M. G. Pavlovic, *In Situ* Synthesis of Biocompatible Composite Layer of Hydroxyapatite/Passive Oxide Surfaces on the Modified Titanium, 25. International Conference „Ecological Truth“ – Eko-Ist '17, Proceedings, pp. 301-306, ISBN 978-86-6305-062-4, June 12-15, 2017., Vrnjačka Banja, Serbia
2. Z. Janković, **M. R. Pantović Pavlović**, A. Gajić, V. Marić, J. Stevanović, S. Eraković, M. M. Pavlović, Novel method for synthesis of biocompatible hydroxyapatite/passive oxide layer on modified titanium surface, 19. YUCORR – Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, International Conference, Proceedings, CD, pp. 265-270, ISBN 978-86-82343-25-7, September 12-15, 2017., Tara, Serbia.
3. **Marijana R. Pantović Pavlović**, Miroslav M. Pavlović, Sanja G. Eraković, Ljiljana Veselinović, Jasmina S. Stevanović, Vladimir V. Panić, Nenad L. Ignjatović, „Novel *in-Situ* Synthesis of Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings on Titanium by Simultaneous Anodization/Anaphoretic Electrodeposition”, VI International Congress “Engineering, Environment and Materials in Processing Industry”, Proceedings, CD, pp. 630-635, ISBN 978-99955-81-28-2, March 2019, Jahorina, Bosnia & Herzegovina, DOI: 10.7251/EEMEN1901630P

M34 - Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. **Marijana Pantović Pavlović**, Sanja Eraković, Miroslav M. Pavlović, Jasmina Stevanović, Vladimir Panić, „Morphological characteristics of anaphoretically obtained hydroxyapatite/titanium dioxide coatings“, 20. YUCORR – Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, International Conference, Proceedings, CD, p. 142, ISBN 978-86-82343-26-4, May 21-24, 2018., Tara, Serbia.
2. **Marijana Pantović Pavlović**, Sanja Eraković, Miroslav Pavlović, Ljiljana Veselinović, Jasmina Stevanović, Vladimir Panić, Nenad Ignjatović, „Surface modification of titanium implants by adherent hydroxyapatite/titanium oxide composite coatings using novel *in-situ* synthesis“, 7th Regional Symposium on Electrochemistry – South East Europe & 8th Kurt

- Schwabe Symposium, International Conference, Book of Abstracts, On-Line version only, p. 120, ISBN 978-953-56942-7-4, May 27-30, 2019., Split, Croatia
3. **Marijana R. Pantović Pavlović**, Miroslav M. Pavlović, Sanja G. Eraković, Jasmina S. Stevanović, Nenad L. Ignjatović, Vladimir V. Panić, „Influence of Process Parameters of Simultaneous Anodization/Anaphoretic Electrodeposition Synthesis of Hydroxyapatite/Titanium Oxide Composite Coatings on Adhesion“, *Giornate dell'Elettrochimica Italiana - GEI 2019 Electrochemistry: from Theory to Industrial Applications*, p. 124, September 8-12, 2019., Padova, Italy.
 4. **Marijana Pantović Pavlović**, Miroslav Pavlović, Sanja Eraković, Tanja Barudžija, Jasmina Stevanović, Nenad Ignjatović, Vladimir Panić, „*In Situ* Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/Titanium Oxide Coatings Derived by Anodization and Anaphoretic Deposition“, 13th Conference for Young Scientists in Ceramics (CYSC-2019), p. 131, ISBN 978-86-6253-104-9, October 16-19, 2019., Novi Sad, Serbia.

M52 - Rad u istaknutom nacionalnom časopisu

1. **M. R. Pantović Pavlović**, S. Eraković, M. M. Pavlović, V. Panić, M. G. Pavlović, *In situ* synthesis of biocompatible composite layer of hydroxyapatite/passive oxide surfaces on the modified titanium, *Zaštita materijala i životne sredine*, 6(1), 26-34, 2017, ISSN 1800-9573.

PRILOG 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписана Маријана Р. Пантовић Павловић

број индекса 23/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

In situ синтеза и карактеризација танких биокомпатибилних композитних

превлака хидроксиапатит/пасивни оксид за потенцијалну употребу у медицини

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2021.

Маријана Пантовић Павловић

PRILOG 2

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И
ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДАИме и презиме аутора Маријана Р. Пантовић ПавловићБрој индекса 23/2015Студијски програм *докторске академске студије при Универзитету у Београду*
– *Биомедицинско инжењерство и технологије*Наслов рада ***In situ* синтеза и карактеризација танких биокомпатибилних
композитних превлака хидроксиапатит/пасивни оксид за потенцијалну
употребу у медицини**Ментори 1. Проф. др Ненад Игњатовић, научни саветник, професор по позиву
2. Др Сања Ераковић Пантовић, виши научни сарадникПотписана Маријана Р. Пантовић Павловић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2021.

PRILOG 3

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

***In situ* синтеза и карактеризација танких биокомпатибилних композитних превлака хидроксиапатит/пасивни оксид за потенцијалну употребу у медицини**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

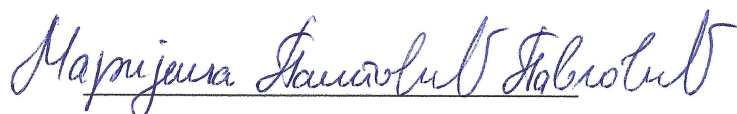
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2021.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.