

Poznań University  
of Medical  
Sciences  
Poland



Uniwersytet  
Medyczny im.  
Karola  
Marcinkowskiego w  
Poznaniu

*Karolina Jurczyk*

Badanie wybranych właściwości chemicznych,  
mechanicznych i biokompatybilności nanokompozytów  
typu tytan-ceramika w warunkach *in vitro*

Rozprawa doktorska

**Promotor:**

*prof. dr hab. n. med. Janina Stopa*

Klinika Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii  
Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii  
Kierownik Katedry - prof. dr hab. n. med. Janina Stopa

Poznań 2010

Praca doktorska wykonana w ramach projektu  
badawczego MNiSW (Nr N507 071 32/2092) pt.:  
„Bionanomateriały kompozytowe na bazie tytanu z  
udziałem bioceramiki wytwarzane metodą  
mechanicznej syntezy i konsolidacji proszków”  
(2007-2009)  
Politechnika Poznańska  
Instytut Inżynierii Materiałowej

Pani Prof. dr. hab. nauk med. Janinie Stopie  
dziękuję za pomoc i cenne wskazówki  
udzielone podczas realizacji rozprawy  
doktorskiej

## **SPIS TREŚCI**

Wykaz ważniejszych oznaczeń	5
<b>1. Wprowadzenie</b>	<b>6</b>
<b>2. Przegląd piśmiennictwa</b>	<b>7</b>
2.1. Osteointegracja	12
2.2. Modyfikacja powierzchni implantów	13
2.3. Osiągnięcia nanotechnologii	18
<b>3. Cel pracy</b>	<b>21</b>
<b>4. Materiał badawczy i metodyka badań</b>	<b>22</b>
4.1. Materiał badawczy	22
4.2. Metodyka badań	25
4.2.1. Badania strukturalne	25
4.2.2. Badania SEM i TEM	27
4.2.3. Badania właściwości fizycznych	28
4.2.4. Badania właściwości mechanicznych	
A. Mikrotwardość	29
B. Odporność na pękanie	30
C. Moduł Younga	31
4.2.5. Badania odporności korozyjnej	31
4.2.6. Modyfikacja warstwy wierzchniej poprzez trawienie elektrochemiczne	32
4.2.7. Hodowla ludzkich osteoblastów linii NHOst (LONZA)	33
A. Ocena cytotoksyczności w warunkach statycznych	34
B. Ocena cytotoksyczności w warunkach dynamicznych	35
<b>5. Wyniki badań i ich omówienie</b>	<b>37</b>
5.1. Badania strukturalne	
5.1.1. Nanokompozyty typu tytan-ceramika resorbowalna	37
5.1.2. Nanokompozyty typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością	41
5.2. Dobór warunków konsolidacji i konsolidacja wytworzonych materiałów	44
5.3. Właściwości fizyczne	45
5.4. Właściwości mechaniczne	47
5.5. Odporność korozyjna	49
5.6. Badania biogodności oraz ocena cytotoksyczności	
5.6.1. Ocena rozwoju komórek na powierzchni nanokompozytów	51
5.6.2. Test żywotności komórek w kondycjonowanym medium	55
<b>6. Dyskusja</b>	<b>58</b>

<b>7. Wnioski</b>	68
Streszczenie	69
Summary	79
<b>Piśmiennictwo</b>	<b>73</b>
Spis tabel	84
Spis rycin	86



## WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ

- a, c – stałe sieciowe
- V – objętość komórki elementarnej
- B – poszerzenie linii dyfrakcyjnej
- d – wielkość ziarna
- $D_{hkl}$  – średni wymiar krystalitów ukierunkowanych prostopadle do (hkl)
- ECAP - Kątowe kanałowe wyciskanie
- HA – hydroksyapatyt
- HV – twardość Vickersa
- A – wydłużenie
- Z – przewężenie
- E – Moduł Younga
- $R_a$  – chropowatość
- $K_{Ic}$  – współczynnik intensywności naprężeń
- MA – mechaniczna synteza
- nm – nanometr,  $10^{-9}$  m
- OCP – potencjał obwodu otwartego
- P – porowatość
- $R_e$  – granica plastyczności
- $R_g$  – wytrzymałość na zginanie
- $R_m$  – wytrzymałość na rozciąganie
- $R_z$  – wytrzymałość zmęczeniowa
- $R_{0.2}$  – umowna granica plastyczności
- NHOst – komórki ludzkich osteoblastów
- RVC – żywotność komórek
- SAED – obrazy dyfrakcji elektronowej
- SCE – nasyciona elektroda kalomelowa
- SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa
- $I_{kor}$  – gęstość prądu korozyjnego
- $E_{kor}$  – potencjał korozyjny
- $C_R$  – szybkość korozji
- TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa
- XPS – rentgenowska spektroskopia fotoelektronów
- XRD – dyfrakcja promieni X
- Å – angstrom,  $10^{-10}$  m
- $\rho$  – gęstość
- $\lambda$  – długość fali promieniowania rentgenowskiego
- $\theta$  – kąt między płaszczyzną a promieniem padającym.

# 1. Wprowadzenie

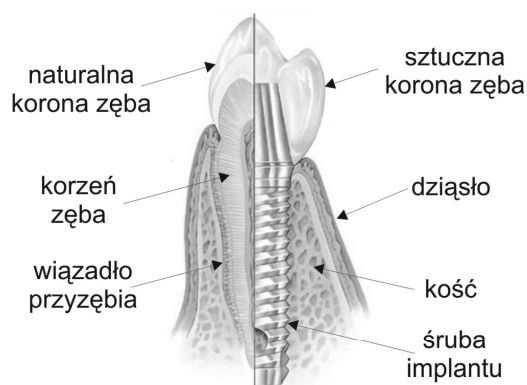
W ostatnich dwóch dekadach daje się zauważyć zwiększone zainteresowanie nowymi materiałami do implantacji. Związane jest to z nieustającym rozwojem technik badawczych i technologii zapewniających możliwość projektowania materiałów o określonej mikrostrukturze, a co za tym idzie, poprawionych parametrach określających fizykochemiczne, wytrzymałościowe oraz biologiczne właściwości materiałów. Poszukiwania niewątpliwie mają wpływ na rozwój nanotechnologii, czyli interdyscyplinarnej dziedziny nauki i techniki, która umożliwi uzyskanie materiałów o składach fazowych nieosiągalnych metodami tradycyjnymi [2, 11, 15, 23, 41, 49, 57, 127, 152].

Obecnie implanty długotrwałe (np. implanty stomatologiczne) są wykonywane głównie z metali i ich stopów, ze względu na ich bardzo dobre właściwości mechaniczne [71, 82, 84, 95, 96, 107]. Najbardziej popularną grupę materiałów metalicznych stosowanych w medycynie stanowią tytan i jego stopy. W porównaniu do innych biomateriałów, charakteryzują się one małą gęstością, stosunkowo niskim modułem Younga, dużą wytrzymałością zmęczeniową oraz korzystnym stosunkiem wytrzymałości na rozciąganie do granicy plastyczności. Wprawdzie tytan i niektóre stopy tytanu odznaczają się najwyższą spośród wszystkich stosowanych obecnie biomateriałów metalicznych biotolerancją i odpornością korozyjną, to jednak ich odporność na zużycie ścierne i korozję jest niewystarczająca. Materiały ceramiczne natomiast posiadają szereg właściwości biologicznych nieosiągalnych dla stosowanych w medycynie tworzyw metalicznych. Dlatego też, uzupełniające się właściwości biomateriałów ceramicznych i metalicznych stanowią dobrą bazę do konstruowania implantów kompozytowych o właściwościach bardziej dostosowanych do wymagań [17, 20, 60, 61, 62, 87].

## 2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

W ostatnich latach rośnie zastosowanie implantów w rehabilitacji układu stomatognatycznego. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez W. Wagnera, poprzez implantację rozumiemy śródkankowe wprowadzenie materiału w celu rekonstrukcji utraconych tkanek, zarówno pod względem funkcjonalnym jak i estetycznym [68]. W zależności od tkanek, do których są wprowadzane, implanty można podzielić na [9]: podokostnowe, śluzówkowe, endodontyczne i wewnątrzkości. Te ostatnie znalazły największą akceptację wśród wszystkich stosowanych implantów, co znajduje uzasadnienie w licznych wieloletnich obserwacjach [9, 10, 46-48, 68, 77].

Wszczep śródkostny najczęściej jest śrubą o kształcie cylindrycznym lub stożkowym, rzadziej stosowana jest forma żyłkowa (ryc.2.1.). Główną częścią implantu jest trzon, posiadający gwint o szorstkiej powierzchni. Gwint w implancie powiększa jego względną powierzchnię i poprawia zarazem stabilność pierwotną, a także przyczynia się do równomiernego rozkładu sił przekazywanych na kość [9].



Ryc. 2.1. Budowa zęba i implantu [9]

Typowy system implantologiczny składa się z wielu współpracujących ze sobą elementów: tkanki kostnej otaczającej implant, implantu, łącznika, śruby łącznika, protetycznego elementu koronowego, śruby mocującej konstrukcję protetyczną, szkieletu konstrukcji protetycznej, olicowania, powierzchni zwarcia [38, 39]. Dostępne w

handlu implanty różnią się: geometrią zewnętrzną, modyfikacją powierzchni, sposobem połączenia z nadkostną częścią filarówą (ryc.2.2.) [45].



Ryc. 2.2 Rodzina implantów stożkowych (a) i cylindrycznych (b) [36]

Implanty wykonane są głównie z tytanu lub jego stopów [63, 84, 104, 105, 137]. Pomimo prób stosowania innych metali, jak srebro i złoto, w latach 60 ubiegłego wieku przez Chercheve i innych lekarzy, okazało się, że ściśle połączenie kości z wszczepem występuje w przypadku zastosowania tytanu. Branemark udowodnił, że żywa kość zrastała się z powierzchnią metalową konstrukcji w takim stopniu, jaki do tej pory uważano za niemożliwy [10].

Przewaga tytanu nad innymi metalami związana jest z połączeniem bardzo korzystnych właściwości mechanicznych i biologicznych. Charakteryzuje się on niską gęstością  $4,54 \text{ g/cm}^3$ , wysoką wytrzymałością na rozciąganie i zmęczenie, korzystnym stosunkiem wytrzymałości na rozciąganie do granicy plastyczności oraz niskim modułem Younga w połączeniu z małym ciężarem właściwym. Handlowy tytan o czystości 99,2% ma wytrzymałość na rozciąganie 434 MPa, a wybrane stopy tytanu (np. fazy  $\beta$ ) ponad 1380 MPa [13, 71]. Właściwości mechaniczne tytanu zależą między innymi od jego mikrostruktury (tabela 2.1).

**Tabela 2.1**

Wybrane właściwości mechaniczne tytanu o zróżnicowanej mikrostrukturze i komercyjnej czystości w porównaniu ze stopem Ti-6Al-4V ELI [102]

Mikrostruktura	HV [MPa]	R <sub>m</sub> [MPa]	R <sub>e</sub> [MPa]	A [%]	Z [%]
Ti-duże ziarno	1800	460	380	26	60
Ti-drobne ziarno	2700	710	625	14	60
Ti-wydłużone ziarno	2821	960	725	10	45
Ti-6Al-4V ELI	–	965	875	10–15	25–47

Kolejnym czynnikiem wpływającym na jego właściwości jest obecność zanieczyszczeń azotem, węglem, wodorem, żelazem oraz tlenem (tabela 2.2) [102]. Przykładowo wzrost zawartości tlenu w Ti z 20 ppm do 800 ppm powoduje wzrost jego twardości o 100 HV [71, 102]. Natomiast zawartość tlenu, azotu lub węgla w ilości 0,02–0,03 % wag. zwiększa jego wytrzymałość na rozciąganie.

**Tabela 2.2**

Skład chemiczny wybranych gatunków tytanu [% wag.] [60, 84]  
Gatunki wg ISO 5832-2:1999

Pierwiastek	Gatunek 1				Gatunki 4A/4B
	ELI	Gatunek 1	Gatunek 2	Gatunek 3	
N	0,012	0,03	0,03	0,05	0,05
C	0,03	0,10	0,10	0,10	0,10
H	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Fe	0,10	0,20	0,30	0,30	0,50
O	0,10	0,18	0,25	0,35	0,40
Ti	reszta	reszta	reszta	reszta	reszta

Najbardziej znaną właściwością chemiczną tytanu jest jego doskonała, prawie taka sama jak platyny, odporność na korozję. Tytan jest także odporny na działanie środowiska kwaśnego, wilgotnego chloru oraz roztworów zasadowych [63]. Poza tym jest materiałem biogodnym, dzięki tworzeniu się warstw pasywnych o grubości 5 nm, które pełnią również funkcję ochronną przed środowiskiem korozyjnym [83]. Przeprowadzone ostatnio badania kliniczne wskazują, że obecność jonów tytanu może powodować alergie i reakcje okołowszczepowe w międzywarstwie implant-kość, a przez to przyczyniać się do destabilizacji implantów po dłuższym okresie użytkowania [84]. Jedną z głównych wad tytanu i jego stopów są słabe właściwości tribologiczne wynikające z ich małej twardości.

Jednakże nie znaleziono dotąd lepszego biomateriału metalicznego, który mógłby być stosowany jako materiał do wytwarzania implantów.

Inna grupa biomateriałów, bioceramika, również znalazła zastosowanie w implantologii. Wyróżnia się trzy typy materiałów bioceramicznych [7, 14, 60, 139, 156]:

- resorbowalne w tkankach
- z kontrolowaną reaktywnością
- obojętne.

Przykładem materiałów bioceramicznych resorbowalnych w tkankach są tworzywa hydroksyapatytowe zawierające ortofosforany wapnia. Podstawowym kryterium przydatności hydroksyapatytów jako materiałów implantacyjnych jest ich czystość chemiczna. Są one biologicznie aktywne i charakteryzują się największą biotolerancją. Na właściwości mechaniczne tworzyw hydroksyapatytowych oprócz wielkości ziaren wpływa także ich struktura chemiczna, gęstość i porowatość (tabela 2.3) [14].

**Tabela 2.3**

Właściwości mechaniczne tworzywa hydroksyapatytowego [14]				
$R_e$	$R_g$	$R_z$	E	$K_{Ic}$
[MPa]	[MPa]	[MPa]	[GPa]	[MPa·m <sup>1/2</sup> ]
509–917	113–195	38–48	88–100	0,69–1,16

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie warstwami hydroksyapatytowymi, które są nanoszone na powierzchnie implantów metodą napyłania plazmowego [151]. Powstała powłoka składa się z dwóch warstw: zewnętrznej amorficznej i wewnętrznej krystalicznej. O jakości powłoki decydują: mikrostruktura, stopień amorficzności, skład chemiczny i fazowy, siła adhezji oraz rozpuszczalność w roztworach fizjologicznych. Bioceramika hydroksyapatytowa łączy się z kośćmi przez strefę międzywarstwową z udziałem tkanki kostnej, a aktywność procesu jest zdeterminowana wielkością powierzchni porowatej ceramiki [14].

Drugim rodzajem materiałów bioceramicznych są tworzywa z kontrolowaną reaktywnością powierzchniową w tkankach. Przykładem tej klasy materiałów są związki występujące w diagramie fazowym SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O [6, 7, 84].

Połączenie tej klasy materiałów z tkanką następuje w wyniku [84]:

- dyfuzji jonów  $\text{Na}^+$  z bioszklą i reakcji z jonami  $\text{H}^+$  roztworu z tworzeniem powłoki powierzchniowej wzbogaconej Si,
- uaktywnienia powierzchni przez tworzenie mikroporów wielkości około 50 nm,
- utworzenia powłoki bogatej w wapń i fosfor,
- wzrostu powłoki powierzchniowej zawierającej fosforan wapnia na bazie jonów wapnia i fosforu z roztworu,
- krystalizacji powierzchniowej i utworzenia struktur apatytu w środowisku nieznacznie alkalicznym.

Inną grupą tej klasy materiałów są bioszklą i materiały ceramiczne nieporowate, bioszklą z porowatością powierzchniową, powłoki bioszklane wytworzone na tlenku glinu i stali kwasoodpornej, materiały kompozytowe zbudowane z bioszkieł i  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , polimery oraz włókna syntetyczne [18, 65, 84, 103, 101, 103].

O właściwościach mechanicznych bioszkieł czy też biomateriałów szklano-ceramicznych decydują ich skład chemiczny i fazowy. Właściwości te zmieniają się w miarę upływu czasu po implantacji [84].

Tlenek aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) i węgle pirolityczne zaliczane są do trzeciej grupy materiałów bioceramicznych, które są obojętne w kontakcie z tkankami lub roztworami fizjologicznymi [103]. Bioceramika oparta na azotku lub oksyazotku krzemu, węgliku krzemu i na tlenkach tytanu, cyrkonu, magnezu oraz spinelach  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$  i  $\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{O}_4$  ma gorsze charakterystyki pod względem biologicznym niż omówione dotąd materiały bioceramiczne [84].

Bioceramika obojętna stosowana jest w postaci gładkiej i porowatej. Ceramika gładka jest używana na elementy endoprotez, które współpracują suwliwie. Oprócz wysokiej wytrzymałości na ścieranie, zginanie, ściskanie powinny się charakteryzować [7, 84]: zawartością  $\text{Al}_2\text{O}_3 \geq 95,5\%$ , gęstością pozorną  $\geq 3,90 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , średnią wielkością ziaren spieku  $< 7 \mu\text{m}$ , modułem sprężystości 380 GPa, twardością 2300 HV, wytrzymałością na ściskanie 4000 MPa, wytrzymałością na zginanie  $\geq 400 \text{ MPa}$ , HV, odpornością na ścieranie  $\leq 0,01 \text{ mm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ , odpornością korozyjną w roztworze Ringera  $\leq 0,1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dzień}^{-1}$ .

Natomiast ceramika porowata jest stosowana na powierzchnie, w które będzie wrastać tkanka kostna.

Charakterystyczne właściwości bioceramiki porowatej to [12, 14, 118, 130, 133]:

- porowatość, która umożliwia trwałe połączenie implantu z tkanką,
- wysoka wytrzymałość na ściskanie oraz odporność na ścieranie,

– najwyższa ze wszystkich biomateriałów odporność korozyjna w środowisku tkanek i płynów ustrojowych,

– duża biotolerancja w środowisku tkankowym.

Jednakże materiały ceramiczne posiadają niskie właściwości wytrzymałościowe, w porównaniu z właściwościami kości, znacznie ograniczając ich samodzielne zastosowanie.

## 2.1. Osteointegracja

Dokładne mechanizmy biologiczne połączenia kość–implant, czyli osteointegracja, nie są do końca poznane [77]. Znane są za to czynniki, które wpływają na ten proces:

- biogodność implantu,
- konstrukcja mocowania implantu,
- właściwości fizykochemiczne powierzchni implantu,
- zastosowana technika chirurgiczna,
- stan pacjenta oraz biomechaniczne położenie implantu.

Badania wykazały, że w przypadku wszczepów wykonanych z tytanu technicznego następuje efektywniejsza regeneracja tkanki kostnej niż w przypadku stopów tytanu. Dodatkowo, badania powierzchni wszczepów w chirurgii kostnej udowodniły, że osteointegracja na powierzchniach rozwiniętych jest szybsza niż na powierzchniach gładkich [5, 77, 78]. Problemem jest niska odporność biomateriałów tytanowych stosowanych w chirurgii kostnej na zużycie przez tarcie.

Jak wykazano w badaniach *in vivo*, chropowatość powierzchni implantu ma bardzo duży wpływ na adhezję składników środowiska biologicznego [80], gdyż:

- większa jest mechaniczna przyczepność na powierzchniach porowatych,
- zmienia się podatność na zwilżanie powierzchni implantu po jego specjalnej obróbce powierzchniowej,
- komórki wnikają w porowatą strukturę powierzchni wszczepu,
- skraca czas gojenia.

Stosowane w praktyce systemy implatacyjne mogą się różnić [71]:

- rodzajem materiału (Ti – gatunek ELI, stopy na bazie Ti – gatunek ELI),
- rodzajem struktury (mikrokryształiczne, nanokryształiczne),
- rodzajem powierzchni (różne składy chemiczne, różna struktura).



Badania kultur komórkowych wykazały, że powierzchnie implantów wpływają na aktywność komórek kostnych – osteoblastów [73, 79, 106, 117, 145, 153]. Właściwie przygotowana powierzchnia stymuluje procesy komórkowe, co skraca czas gojenia i redukuje do minimum ryzyko odrzutu.

W części tytanowej implantu umieszczonego w kości zachodzą komórkowe i tkankowe reakcje gojenia. Proces ten oparty jest na przebudowie tkanki kostnej, a jej budowanie musi być szybsze niż procesy resorpcji wywołane ciałem obcym. Na poziomie komórkowym następuje tak zwana osteointegracja, czyli zrost żywej tkanki kostnej z tytanową powierzchnią implantu, w wyniku którego następuje zintegrowanie wszczepu z kością [80]. Wpływ na proces osteointegracji ma nie tylko właściwe przygotowanie powierzchni implantu, ale istnienie na niej bioaktywnej warstwy tlenku tytanu. Są to niestechiometryczne  $TiO_{2-x}$  oraz amorficzne  $TiO_2$ . Warstwę tą cechuje termodynamiczna stabilność i niska przewodność elektronowa. Jej grubość wynosi od 2 do 10 nm, co zapewnia wysoką odporność korozyjną [151].

W organizmie ludzkim w warstwie tlenkowej tytanu i jego stopów zachodzą procesy polegające na wbudowaniu pierwiastków pochodzących z płynów tkanek otaczających implant. Jony wapnia, fosforu i siarki tworzą silne połączenie między materiałem a otoczeniem, w którym się on znajduje [136].

Zewnętrzna warstwa tlenku tytanu również bardzo pozytywnie wpływa na gojenie się tkanki kostnej i wytwarzanie przyczepu nabłonkowego. Składniki skrzepów krwi, takie jak fibrocyty, proteiny, trombocyty, przyczepiają się zaraz po zabiegu do powierzchni implantu, tworząc rodzaj błony biologicznej. Kolejna faza gojenia to wystąpienie oznak zapalenia, a dopiero później dochodzi do uformowania i mineralizacji kości [80, 84].

## 2.2. Modyfikacja powierzchni implantów

Badania zjawisk zachodzących na granicy implant – środowisko biologiczne wykazały, iż znaczący wpływ na proces osteointegracji mają fizykochemiczne właściwości powierzchni implantu. Zmianę grubości warstwy tlenków, a tym samym właściwości powierzchni, można uzyskać w procesie utleniania anodowego (ich grubość zwiększa się nawet do kilkuset nanometrów) [52].

W zależności od grubości warstwy  $TiO_2$  implant może mieć barwę: złotą, fioletową, ciemnoniebieską, jasnoniebieską, żółtą, pomarańczową lub zieloną [151].

Największe znaczenie dla przyjęcia implantu przez organizm i dla procesu osteointegracji ma skład chemiczny jego warstwy powierzchniowej. Właściwości

biomateriałów na bazie tytanu można kształtować jedną z niżej wymienionych metod inżynierii powierzchni [60, 151]:

- obróbką jarzeniową,
- natryskiwaniem cieplnym,
- metodą zol–żel,
- metodą PVD,
- utleniania (chemiczne, elektrochemiczne przy stałej gęstości prądu lub przy zmiennej gęstości prądu, kombinacja utleniania chemicznego i elektrochemicznego, utlenianie w parze wodnej z wygrzewaniem w powietrzu),
- implantacji jonów (azotowanie, tlenowanie, wapniowanie).

Każda z wymienionych metod wpływa na strukturę, morfologię warstwy powierzchniowej, stan naprężeń własnych w warstwie i przyczepność. Warstwa tlenkowa może mieć także znaczący wpływ na właściwości mechaniczne, szczególnie na wytrzymałość zmęczeniową. Przypuszcza się, że utlenianie, prowadzące do powstania naprężeń ściskających, może mieć pozytywny wpływ na zahamowanie inicjacji i propagacji pęknięć zmęczeniowych [151].

Związanie powierzchni metalowego implantu z tkanką kostną można zapewnić przez zastosowanie warstwy fosforanowej, której właściwości zależą od [151]:

- składu chemicznego fosforanu (hydroksyapatyt, apatyt, dwuwapniowy fosforan dwuhydratowy, ośmiowapnian fosforanu i inne różniące się stosunkiem Ca/P),
- stopnia krystaliczności fosforanu (krystaliczne, bezpostaciowe, struktury mieszane),
- składu chemicznego warstwy (fosforany, tlenki cyrkonu, tytanu, substancje zapobiegające stanom zapalnym) i jego jednorodności,
- budowy warstwy – struktura jednofazowa bądź wielofazowa (kompozyt).

Pierwsze implanty wewnątrzkości, wprowadzone w latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, miały gładką powierzchnię [10]. Posiadały one kształt walca i dla ich umieszczenia w kości konieczne było przygotowanie łoża o średnicy odpowiadającej średnicy wszczepu. Powodowało to słabszą stabilizację pierwotną. Z kolei badania *in vivo* wykazały, mniejszą osteointegrację dla tych implantów w porównaniu z implantami o rozwiniętych powierzchniach [36-38]. Aby uzyskać chropowatość powierzchni, implanty tytanowe poddawane są procesowi piaskowania z użyciem grubych ziaren (0,25–0,50 mm),

w wyniku czego uzyskuje się porowatą makrostrukturę tytanu. Czasami wytrawia się je kwasem (HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) w celu wytworzenia mikroporów.

Najnowszym osiągnięciem jest opracowanie aktywnej powierzchni CELLplus na implantach [35]. CELLplus aktywnie wspiera biologiczne procesy prowadzące do nawarstwiania się kości wokół implantu przez wchłanianie z otoczenia krwi i krążących w niej komórek kostnych. Prowadzi to do intensyfikacji wczesnych stadiów gojenia się kości na implancie. Niemiecka firma Friadent Dentsply wprowadziła na rynek implanty typu XiVe [38]. Nowością jest powiązanie makroształtu śruby i mikrostruktury powierzchni implantu. Mikrostrukturę implantu typu XiVe charakteryzują:

- powierzchnia CELLplus,
- chropowatość powierzchni  $R_a = 1-2 \mu\text{m}$ .

Interesującym wyrobem w systemach implatacyjnych jest implant paraboliczny Nobel PERFECT. Wynikiem badań i analizy budowy brzegu kości wokół naturalnego zęba jest panewkowy kształt powierzchni nośnej implantu. Paraboliczna powierzchnia nośna implantu ułatwia odtworzenie naturalnego konturu dziąsła wokół przyszłej korony oraz brodawek międzyzębowych [45].

W tabeli 2.4. zestawiono przykłady mikrostruktur otrzymanych po zastosowaniu różnych metod modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów stosowanych w implantach [73]. Modyfikacje mają wpływ na chropowatość powierzchni i kąt kontaktu (tabela 2.5).

**Tabela 2.4**

Metody modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów stosowanych na implanty [151]

Metoda	Przykład	Chropowatość
Mechaniczna	obróbka skrawaniem i polerowanie trawienie	niska
Erozyjna	obróbka strumieniowo-ścierna obróbka strumieniowo-ścierna i trawienie	średnia – duża
Nanoszenie powłok	natryskiwanie plazmowe nanoszenie powłok HA	duża

Tabela 2.5

Właściwości powierzchni tytanowych implantów otrzymanych różnymi technikami [73]

Modyfikacja powierzchni implantu	Chropowatość powierzchni [ $\mu\text{m}$ ]	Kąt kontaktu [ $^{\circ}$ ]
Ti czysty	$R_a = 0,22 \pm 0,01$ (a)	$55,5 \pm 4,1$
Ti-6Al-4V czysty	$R_a = 0,23 \pm 0,01$ (a)	$56,3 \pm 2,7$
Natryskiwanie plazmowe	$R_a = 7,01 \pm 2,09$	–
Piaskowanie (SLA)	$R_a = 1,15 \pm 0,05$	$138,3 \pm 4,2$
Modyfikowane SLA	$R_a = 1,16 \pm 0,04$	0
Ti z naniesioną warstwą HA	$R_a = 1,06 \pm 0,21$	$57,4 \pm 3,2$
Warstwy biomimetyczne CaP	$R_a = 1,83 \pm 0,64$	$13,4 \pm 0,17$

Oznaczenie: (a) powierzchnia po obróbce mechanicznej i polerowaniu.

Jak już wspomniano biozgodność tytanu i jego stopów wynika z obecności samorzutnie tworzącej się na powierzchni metalu pasywnej warstwy tlenkowej. W tabeli 2.6 podano skład chemiczny warstwy wierzchniej czystego Ti po mechanicznym polerowaniu w różnych warunkach [79]. Powstała na powierzchni tytanu warstwa tlenków charakteryzuje się niejednorodnym składem chemicznym. Część wewnętrzną stanowią niestechiometryczne tlenki typu  $\text{TiO}_{2-x}$ , a część zewnętrzna to amorficzna lub nanokrystaliczna postać  $\text{TiO}_2$  o grubości 3–7 nm.

Tabela 2.6

Skład chemiczny warstwy wierzchniej czystego Ti po mechanicznym polerowaniu wyznaczony metodą XPS [% at.] [79]

Pierwiastek	Mechaniczne polerowanie	Mechaniczne polerowanie w obecności organicznego rozpuszczalnika	Mechaniczne polerowanie i utlenianie w HNO <sub>3</sub>	Mechaniczne polerowanie i utlenianie w plazmie
Ti	14,8±1,6	21,5±1,1	26,1±0,9	27,8±0,8
O	46,8±1,9	51,5±2,0	54,4±2,0	58,8±1,5
C	30,9±2,1	25,1±2,2	19,0±0,9	12,8±1,8
N	0,6±0,2	0,3±0,1	0,5±0,1	0,6±0,2
Si	1,0±0,4	–	–	–
Ca	0,9±0,3	0,2±0,1	–	–
Pb	0,3±0,2	0,3±0,2	–	–
Zn	0,7±0,6	0,6±0,3	–	–
Cu	0,4±0,1	0,5±0,1	–	–
O/Ti	2,54±0,14	2,39±0,12	2,08±0,03	2,12±0,04
d [nm]	4,3±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	5,1±0,1

Oznaczenie: d – grubość warstwy tlenków.

Proces natryskiwania cieplnego znalazł zastosowanie w wytwarzaniu powłok hydroksyapatytu na biomateriałach [6, 31, 151, 158, 161]. Wytworzenie powłoki hydroksyapatytu na implancie zapewnia dużą biogodność z tkanką kostną. Obserwowane różnice właściwości tych powłok spowodowane są różnym składem fazowym, stopniem amorficzności i porowatości oraz wielkością porów (tabela 2.7).

Tabela 2.7

Grubość i wytrzymałość połączenia warstw HA [79]

Warstwa	Grubość [μm]	Wytrzymałość połączenia warstw [MPa]
Ti-HA	200	8,0
ZrO <sub>2</sub> -HA	210	32,49±4,24
HA	60–80	16,6
HA-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CaO	100	35
CaP	220	6,67
HA	200	5,97±0,78
Ti-HA	200	<20
HA	150	24,5±2,4

Badania wykazały, że implanty tytanowe z powłoką hydroksyapatytu o grubości w zakresie od 50 do 200  $\mu\text{m}$  charakteryzują się dobrą wytrzymałością mechaniczną i wykazują cechy bioaktywności. Jednakże w wyniku obróbki termicznej dochodzi do dekompozycji, powstania chemicznej niejednorodności powłoki i zmian składu chemicznego HA [81]. Zmiany te prowadzą do degradacji powłoki w ustroju oraz zmniejszają jej biokompatybilność. Obróbka termiczna może spowodować zmiany w mikrostrukturze tytanu [71]. Innym problemem jest także mała adhezja pomiędzy HA a tytanem, co może spowodować zniszczenie powłoki i w wyniku tego spowodować stan zapalny i zanik kości. Resorpcja tkanki kostnej wzrasta również wraz z kontaminacją odsłanianej, chropowatej powłoki HA [81].

### 2.3. Osiągnięcia nanotechnologii

Nowoczesne leczenie implantologiczne z zastosowaniem implantów tytanowych jest bezpieczne, efektywne i umożliwia osiągnięcie doskonałych efektów estetycznych i funkcjonalnych [7, 21, 32].

Synteza na całej powierzchni implantu struktury porowatej o nanometrycznej wielkości porów, której grubość determinowałaby jej właściwości mechaniczne i biologiczne, struktury stymulującej szybsze wrastanie tkanki kostnej i większą siłę adhezji z implantem jest przedmiotem intensywnych badań naukowych [1, 2, 16, 24, 26-28, 33, 50, 76, 111-115, 120, 122, 123, 136, 155]. Nowe nanopowierzchnie przyczyniają się do mocnego zakotwiczenia sztucznych korzeni zęba w szczęcie, przez co niezwykle wzrasta trwałość takich korzeni. Firma naukowo-badawcza Ximplant we współpracy z Wydziałem Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej prowadzi badania w zakresie implantów zębowych pokrytych nanowarstwami [39].

W Technicke University Ostrava opracowano Nanoimplant® [40, 104]. Materiał wyjściowy, czysty tytan, poddano silnym odkształceniom plastycznym (metoda wyciskania przez kanał kątowy - ECAP) [108-110]. Wykonany z nanokrystalicznego tytanu (nTi) implant ma bardzo dobre właściwości wytrzymałościowe w porównaniu z komercyjnymi implantami dentystycznymi (tabela 2.8) [44, 104]. Jest 2,25 i 1,35 razy bardziej wytrzymały niż czysty Ti (gatunek 4). Ponadto nie zawiera toksycznych pierwiastków.

W National Natural Science Foundation of China prowadzone są badania właściwości implantów zawierających warstwy bioaktywnej ceramiki, a Nobel Biocare

opracował nowy implant wykonany w 100% z ceramiki [120]. Od kilku lat prowadzone są badania kliniczne tych implantów celem oceny biogodności.

**Tabela 2.8**

Właściwości mechaniczne nTi ( gatunek 4) i mikrokrystalicznego tytanu (gat. 4) [104]

	Właściwości mechaniczne				
	R <sub>m</sub> [MPa]	R <sub>0,2</sub> [MPa]	A [%]	Z [%]	E [GPa]
nTi	1235	1085	12,5	47,4	100
Ti	550	485	15	25	104

Ward i Webster badali wpływ mikrostruktury, topografii powierzchni serii biomateriałów na procesy metabolizmu ludzkich osteoblastów (CRL-11372) [136]. Wykazali, że nanostruktura metali i ich stopów przyspiesza proces adhezji osteoblastów i stymuluje tym samym odbudowę podstawy kości. W porównaniu z mikrokrystalicznymi biomateriałami stwierdzili, że więcej fosforu i wapnia odkłada się podczas hodowli osteoblastów na próbkach z nanostrukturą.

Analiza piśmiennictwa [37, 52, 99, 159] wskazuje na duże znaczenie praktyczne implantów z naniesioną nanowarstwą hydroksyapatytu, która zapewnia większą biogodność i mocniejsze połączenie implantu z kością. Opisano NanoTite™ Implant, który ma krystaliczną powłokę fosforanu wapnia (CaP) nanometrycznej grubości. Badania kliniczne wykazały dużą stabilizację takiego implantu zakotwiczonego w kości [36, 43].

Obiecującym kierunkiem badań zmierzających do poprawy twardości biomateriałów jest synteza warstw kompozytowych węgla na tytanie [103, 120]. Biomateriały z biogodnymi warstwami powierzchniowymi, charakteryzującymi się dużą odpornością na zużycie przez tarcie, mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w medycynie.

Najnowszym kierunkiem badań biomateriałów na bazie tytanu są badania w zakresie struktur porowatych [79, 150]. Struktury takie umożliwiają szybkie i zarazem głębokie narastanie tkanki kostnej. Problemem jest słaba wytrzymałość mechaniczna takich implantów. Efektem prowadzonych badań będą w niedalekiej przyszłości implanty o kontrolowanej wielkości porów.

W ostatniej dekadzie uzyskano szereg dowodów eksperymentalnych i teoretycznych wskazujących na jakościowo nowe właściwości tworzyw z nanostrukturą [2, 11, 15, 23, 27, 34, 41, 49, 51, 57, 69, 116, 125, 126, 134, 135, 152].

W latach 2006-2009, będąc członkiem zespołu wykonawców, uczestniczyłam w realizacji projektu badawczego MNiSW Nr N507 071 32/2092 pt.: „Bionanomateriały kompozytowe na bazie tytanu z udziałem bioceramiki wytwarzane metodą mechanicznej syntezy i konsolidacji proszków”. Uzyskane wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej.



### **3. CEL PRACY**

- Określenie mikrostruktury bionanomateriałów typu tytan-ceramika przygotowanych metodą mechanicznej syntezy
- Ocena wybranych właściwości chemicznych i mechanicznych uzyskanych bionanokompozytów zmierzająca do wyselekcjonowania materiałów typu tytan-ceramika o najlepszych właściwościach
- Sprawdzenie biokompatybilności wybranych bionanomateriałów w warunkach *in vitro*.

## 4. MATERIAŁ BADAWCZY I METODYKA BADAŃ

### 4.1. Materiał badawczy

Nanomateriały kompozytowe typu tytan-ceramika, stanowiące materiał badawczy, otrzymano metodą mechanicznej syntezy (*Mechanical Alloying* – MA) [58, 124] i metalurgii proszków w Instytucie Inżynierii Materiałowej Politechniki Poznańskiej.

Wytworzono następujące nanokompozyty o różnym udziale wagowym fazy ceramicznej:

a) Ti-HA → 3% wag. hydroksyapatytu,

Ti-HA → 10% wag. hydroksyapatytu,

Ti-HA → 20% wag. hydroksyapatytu,

Ti-HA → 50% wag. hydroksyapatytu

b) Ti-SiO<sub>2</sub> oraz Ti-bioszkło 45S5 → 3% wag. SiO<sub>2</sub> i bioszkła 45S5 (SiO<sub>2</sub> - 45%, CaO - 24,5%, Na<sub>2</sub>O - 24,5%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 6%),

Ti-SiO<sub>2</sub> oraz Ti-bioszkło 45S5 → 10% wag. SiO<sub>2</sub> i bioszkła 45S5

Ti-SiO<sub>2</sub> oraz Ti-bioszkło 45S5 → 20% wag. SiO<sub>2</sub> i bioszkła 45S5

Przygotowano po 10 litych próbek o średnicy 10mm i wysokości 3mm z każdego rodzaju nanomateriału kompozytowego (rycina 4.1.) Próbki tytanu mikrokrystalicznego ELI (średnica 10mm i wysokość 3mm) stanowiły materiał kontrolny.

Surowcami wyjściowymi do uzyskania materiału badawczego, były wysokiej czystości proszki tytanu (Alfa Aesar, <45 μm), hydroksyapatytu (Sigma Aldrich), SiO<sub>2</sub> (Fluka) i bioszkła 45S5 (Fluka). Ze względu na możliwość utleniania się tytanu wszelkie procesy związane z załadunkiem i rozładunkiem młynka przeprowadzane były w atmosferze argonu w komorze rękawicowej Labmaster 130 firmy M.Braun, gdzie kontroluje się zawartość tlenu i pary wodnej na poziomie poniżej 1 ppm (rycina 4.2.)



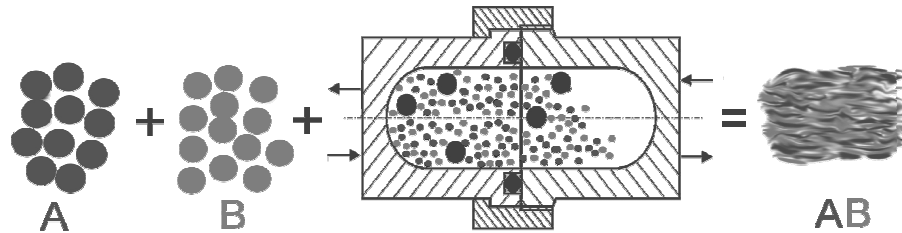
Ryc.4.1. Materiał badawczy- lita próbka o średnicy 10mm



Ryc. 4.2. Komora rękawicowa Labmaster 130 firmy M.Braun

Materiał wyjściowy został poddany procesowi mechanicznej syntezy, w którym doszło do rozdrobnienia mikrostruktury i powstania dużej liczby defektów (rycina 4.3.). W wyniku tego struktura wyjściowa materiału stała się niestabilna i otrzymano materiał amorficzny. Proces MA zachodził w stanie stałym, a podczas jego trwania podstawową rolę odgrywała

mechanicznie indukowana reakcja pomiędzy proszkowymi składnikami materiału końcowego. W wyniku tego podczas mielenia dochodzi do zmiany składu chemicznego i mikrostruktury materiału [119].



Ryc. 4.3. Idea procesu mechanicznej syntezy: A, B – cząstki materiału wsadowego, AB – powstanie nanomateriału

Kolejnym etapem technologicznym było formowanie, polegające na zagęszczeniu na zimno proszków w zamkniętej przestrzeni. Podczas formowania następowało zbliżenie cząstek proszku przez zwiększenie powierzchni styku. Wytrzymałość mechaniczna otrzymanych wyprasek była niewielka, ponieważ uzyskiwano ją głównie w wyniku oddziaływania sił adhezji oraz mechanicznego ząbienia się cząstek proszku w trakcie procesu formowania.



Ryc. 4.4. Schemat prasowania jednoosiowego: jednostronnego

Otrzymane wypraski miały wewnętrzny kształt matrycy (rycina 4.4.). W dalszym etapie procesu uzyskane wypraski poddano fizyczno-chemicznemu, aktywowanemu termicznie zabiegowi spiekania, w trakcie którego luźno związane cząstki proszku w wyniku dyfuzji zostały połączone w lity materiał [29]. Spiekanie wszystkich próbek prowadzono w atmosferze gazu obojętnego (argon) w identycznych warunkach ( $1150^{\circ}\text{C}/2\text{ h}$ ), które wyznaczono szczegółowo dla nanokompozytu Ti-10% wag. HA. Parametry procesu spiekania, takie jak temperatura i czas, mają wpływ na właściwości fizykochemiczne i mechaniczne produkowanych wyrobów [30, 59]. Podczas spiekania w fazie stałej cząstek proszku zachodzą następujące procesy: płynięcia lepkościowego, dyfuzji wzdłuż granicy międzyziarnowej, dyfuzji po swobodnych powierzchniach ziaren oraz dyfuzji przez objętość ziaren. Rezultatem wymienionych procesów jest transport materiału, polegający na przemieszczaniu poszczególnych atomów z obszarów o zwiększonej energii swobodnej do obszarów o mniejszej energii swobodnej. Wynikiem końcowym zachodzących zjawisk jest trwałe zespolenie cząstek proszku w lity materiał.

## 4.2. Metodyka badań

Próbki poszczególnych nanokompozytów zawierające bioceramikę resorbowalną oraz bioceramikę z kontrolowaną reaktywnością poddano badaniom strukturalnym. Oceniono także właściwości fizyczne, mechaniczne i odporność korozyjną. Wymienione badania wykonano w Instytucie Inżynierii Materiałowej Politechniki Poznańskiej.

### 4.2.1. Badania strukturalne

Badania strukturalne przeprowadzono przy użyciu metody dyfrakcji promieni rentgenowskich (ryc.4.5). W tym celu wykorzystano aparat rentgenowski wyposażony w goniometr HZG4 i lampę miedzianą emitującą promieniowanie  $\text{CuK}\alpha_1$ . Proszki zostały poddane badaniom na różnych etapach procesu mechanicznej syntezy oraz spiekania, w celu identyfikacji struktury materiału i związanych z nią parametrów, takich jak:

- układ krystalograficzny, w którym materiał krystalizuje,
- parametry sieciowe komórki elementarnej,
- wskaźniki (hkl),
- budowa fazowa,
- wielkość kryształitów.



Ryc. 4.5. Stanowisko do badań strukturalnych

Natężenie wiązki ugiętej na płaszczyznach krystalograficznych jest rejestrowane przy odpowiednim kącie dyfrakcji. Wzmocnienie impulsu następuje, gdy spełnione jest równanie Bragga:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (4.1)$$

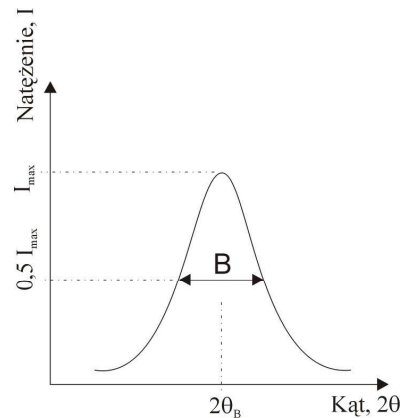
gdzie:  $n$  – rząd ugięcia,  
 $\lambda$  – długość fali promieniowania rentgenowskiego,  
 $d$  – odległość płaszczyzn sieciowych,  
 $\theta$  – kąt między płaszczyzną a promieniem padającym.

Stosując metodę Scherrera można określić wielkość krystalitów [33]. Znając szerokość połówkową linii dyfrakcyjnej (rycina 4.6.), wielkość krystalitów w tej metodzie określa się z zależności:

$$D = \frac{0,9\lambda}{B \cdot \cos\theta_B} \quad (4.2)$$

gdzie:  $D$  – średnica krystalitów (cząstki krystalicznej),  
 $B$  – szerokość linii dyfrakcyjnej mierzona w połowie jej maksymalnego natężenia (w radianach),

- $\lambda$  – długość fali promieniowania rentgenowskiego,  
 $\theta_B$  – kąt ugięcia wiązki promieniowania odpowiadający maksimum braggowskiemu.



Ryc. 4.6. Zasada określania wielkości kryształitów metodą Scherrera

#### 4.2.2. Badania SEM i TEM

Do śledzenia zmian wielkości i kształtu proszków podczas procesu mechanicznej syntezy jak i w późniejszych etapach otrzymywania materiału badawczego, wykorzystano technikę skaningowego mikroskopu elektronowego (ryc. 4.7). Obserwacje prowadzono przy pomocy mikroskopu skaningowego typu ISM – 50 firmy JEOL.

Elektronowy mikroskop skaningowy osiąga zdolność rozdzielczą rzędu 2 nm. Duża głębia ostrości powstałych obrazów umożliwia badanie bardzo rozwiniętych powierzchni.

W metodzie tej próbka jest bombardowana przez wiązkę elektronów. Powierzchnia jest skanowana linia po linii, a pod wpływem wiązki elektronów próbka emituje różne sygnały, które są następnie rejestrowane za pomocą detektorów i zamieniane na obraz próbki. Fotografie wykonano w powiększeniach 1000x i 5000x.



Ryc. 4.7. Stanowisko elektonowego mikroskopu skaningowego

W celu analizy mikrostruktury mielonych proszków wykorzystano elektronowy mikroskop transmisyjny CM 20 Philips o zdolności rozdzielczej 0,24 nm. Długość fali elektronów wynosiła 0,0025 nm. Elektrony silnie oddziałują z atomami próbki i nawet niewielkie krystality (o rozmiarach pojedynczych nanometrów) dają zauważalne i rejestrowalne efekty dyfrakcyjne. Wykonano zdjęcia TEM w jasnym polu jak również obrazy dyfrakcji elektronowej. Fotografie wykonano w powiększeniu do 470000x.

### 4.2.3. Badania właściwości fizycznych

Do pomiaru gęstości zastosowano metodę hydrostatyczną. Badanie wyznaczono na trzech losowo wybranych litych próbkach z każdej serii otrzymanych nanokompozytów. Gęstość pozorną próbki obliczono ze wzoru:



$$\rho = \frac{m_1}{m_1 - m_2} \rho_0 \left( \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) \quad (4.3)$$

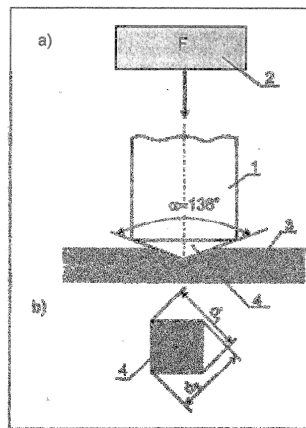
gdzie:  $m_1$  – masa próbki zważonej w powietrzu [g],  
 $m_2$  – masa próbki zważonej w cieczy [g],  
 $\rho_0$  – gęstość cieczy [ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ].

Wyznaczono również gęstość względną oraz porowatość spieków, którą oceniono przy użyciu mikroskopu optycznego. Badanie przeprowadzono dla próbek z nanokompozytu Ti – HA.

## 4.2.4. Badania właściwości mechanicznych

### A. Mikrotwardość

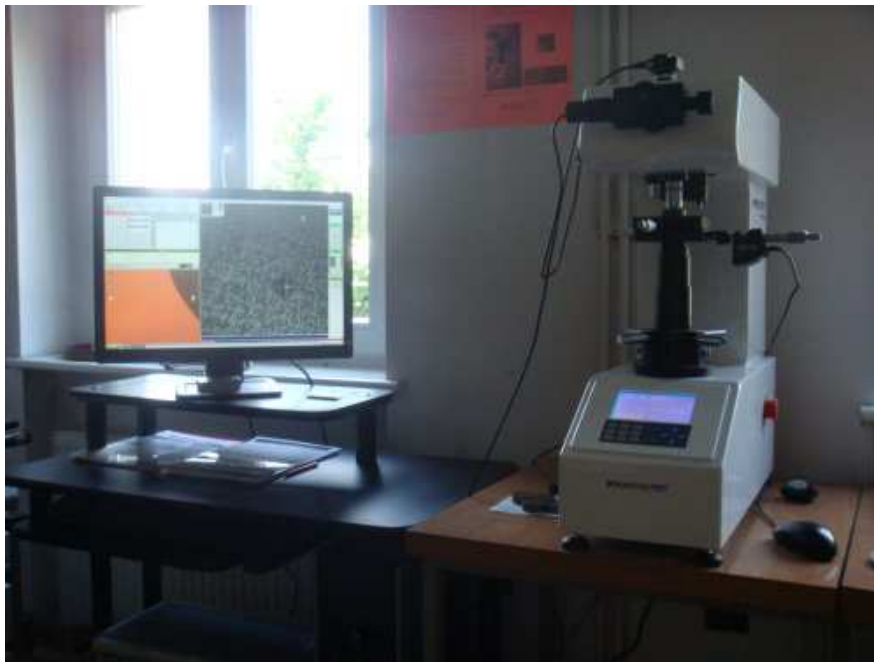
Mikrotwardość wszystkich otrzymanych materiałów zbadano metodą Vickers'a. W metodzie tej węglębnik mający kształt diamentowego ostrosłupa o podstawie kwadratu i kącie między przeciwległymi ścianami równym  $136^\circ$  (rys. 4.8.), wciska się w podłoże litej próbki. Na powierzchni badanego elementu powstaje odcisk ostrosłupa. W celu odczytania twardości zmierzono przekątne, obliczono wartość średnią. Korzystano z tabelarycznego zestawienia zależności twardości od siły i długości przekątnych.



Rys. 4.8. Schemat pomiaru twardości: a) metodą Vickersa oraz b) odcisk węglębnika; (1 – węglębnik, 2 – obciążenie, 3 – badany przedmiot, 4 – piramidka diamentowa, odcisk piramidki) [13]

Do badania wykorzystano mikrotwardościomierz z obrotowym stolikiem (ryc.4.9.). Próbkę ustawiano na stoliku i za pomocą mikroskopu wybierano losowo miejsce obserwacji,

zachowując zasadę, że odległość między środkami dwóch sąsiadujących odcisków powinna być równa minimum trzem średnicom odcisku, zaś odległość odcisku od krawędzi co najmniej 2,5 razy większa od średnicy odcisku. Następnie, stolik obracano o  $180^\circ$ , aby wybrane miejsce znalazło się dokładnie pod wgłębnikiem, którym jest ostrosłup Vickers'a. Obciążenie wgłębnika wynosiło 200 g, a czas wykonywania pojedynczego pomiaru 10s. Dla każdej próbki liczba pomiarów wynosiła 30. Pomiar mikrotwardości metodą Vickersa przeprowadzono zgodnie z normą PN-91/H-04360.



Ryc.4.9. Twardościomierz Vickersa

## B. Odporność na pękanie

Pomiar odporności materiału na pękanie wykonano na 3 próbkach o identycznym składzie chemicznym, które charakteryzowały się najlepszą odpornością korozyjną. Współczynnik intensywności naprężeń ( $K_{Ic}$ ) wyznaczono metodą bezpośredniego pomiaru długości pęknięć Palmqvista pojawiających się w narożach odcisku uzyskanego przy pomiarze twardości Vickersa, dla obciążeń wgłębnika 0,5 kg i 2 kg.

## C. Moduł Younga

Dodatkowo, przy użyciu nanoindentera dokonano pomiaru modułu Younga i mikrotwardości spieków. Pomiary wykonano przy zastosowaniu dwóch różnych obciążeń maksymalnych: 1 mN i 10 mN. Nanoindentacja jest stosunkowo nową techniką (po raz pierwszy zastosowano ją w połowie lat 70-tych) służącą do badania zachowania materiału w nanoskali. W metodzie tej wykorzystuje się bądź igłę mikroskopu sił atomowych, bądź tak jak w tradycyjnych metodach pomiaru twardości – wgłębnik. W badaniach posłużono się wgłębnikiem o znanej z dużą dokładnością geometrii – wgłębnikiem Berkovich'a, który jest piramidką trójkątną. Podczas wykonywania pomiaru, mierzono głębokość penetracji i obciążenie a następnie, znając geometrię wgłębniaka, określano powierzchnię wgłębienia. Wartości te przedstawiono na wykresie w postaci krzywej obciążenie – przemieszczenie. Z krzywej tej odczytano właściwości mechaniczne materiału badanego, takie jak twardość i moduł Young'a.

### 4.2.5. Badania odporności korozyjnej

Odporność korozyjna badanych materiałów została określona na stanowisku laboratoryjnym wyposażonym w potencjostat z komorą korozyjną Princeton Applied Research (rycina 4.10.). Badania były kontrolowane przez oprogramowanie CorrWare. Do oceny odporności korozyjnej zastosowano metodę potencjodynamiczną. Badania przeprowadzono w płynie Ringera ( $\text{NaCl} - 9 \text{ g/l}$ ,  $\text{KCl} - 0,42 \text{ g/l}$ ,  $\text{CaCl}_2 - 0,48 \text{ g/l}$ ,  $\text{NaHCO}_3 - 0,2 \text{ g/l}$ ). Próbki skanowano od potencjału około  $-1 \text{ V}$  do  $+ 2,5 \text{ V}$  (względem elektrody referencyjnej); szybkość wzrostu potencjału wynosiła  $0,5 \text{ mV/s}$ . Jako elektrodę referencyjną zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (SCE):  $\text{Hg} \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_{2(s)} \mid \text{Cl}^-$ , a elektrodą przeciwstawną był grafit. Elektrolit podczas badań przedmuchiowano azotem w celu ułatwienia usuwania pęcherzyków wodoru, wydzielających się na badanej próbce. Badanie prowadzono w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Zarejestrowana krzywa polaryzacji umożliwiła wyznaczenie takich parametrów jak: gęstość prądu korozyjnego ( $I_{\text{kor}}$ ), potencjał korozyjny ( $E_{\text{kor}}$ ), potencjał pasywacji ( $E_p$ ). Szybkość korozji ( $C_r$ ) obliczono korzystając z zależności:

$$C_r = \frac{I_{kor} \cdot EW}{F \cdot \rho_p} \text{ [mm/r]} \quad (4.4)$$

gdzie:  $I_{kor}$  – gęstość prądu korozyjnego,  $EW$  – ekwiwalent wagi,  $F$  – stała Faradaya,  $\rho_p$  – gęstość pozorna.



Ryc. 4.10. Stanowisko badawcze trawienia elektrochemicznego

#### 4.2.6. Modyfikacja warstwy wierzchniej poprzez trawienie elektrochemiczne

Dla najlepszych nanokompozytów, charakteryzujących się najkorzystniejszymi właściwościami mechanicznymi oraz najlepszą odpornością korozyjną, wykonano modyfikacje warstwy wierzchniej próbek poprzez trawienie elektrochemiczne. Polegało ono na umieszczeniu materiału w elektrolicie i przepuszczeniu przez układ materiał–elektrolit prądu o zadanych parametrach (rycina 4.10) [52, 59]. Materiał ulegający trawieniu znajduje się na dodatnim potencjale. Procesem steruje potencjostat, a elektrolit, tak jak w badaniu

odporności korozyjnej, przedmuchiwany jest gazem obojętnym (np. N<sub>2</sub>) usuwającym tlen z roztworu oraz powstające podczas trawienia pęcherze wodoru. Potencjał ustalany jest dzięki zastosowaniu elektrody referencyjnej, natomiast gęstość prądu dzięki elektrodzie przeciwstawnej.

W wyniku przekazywania ładunku na granicy materiał–elektrolit dochodzi do rozpuszczania podłoża i powstania porowatej powierzchni. Zakres potencjałów oraz gęstości prądu, przy którym powstają pory, ustala się na podstawie krzywych prądowo-napięciowych w badaniach potencjodynamicznych. Natomiast w zastosowaniach praktycznych pory wytwarza się, stosując stałą gęstość prądu lub stały potencjał.

W materiałach porowatych wytworzonych metodą trawienia elektrochemicznego osiągnięta porowatość (stosunek objętości porów do objętości całkowitej) mieści się pomiędzy 5 a 85%, a rozmiar porów wynosi od 1 nm do 10 μm. Można wytworzyć warstwy o większej porowatości, dochodzącej do 95%, ale ulegają one uszkodzeniu w czasie suszenia na skutek działania sił napięcia powierzchniowego podczas odparowywania cieczy.

Proces wzrostu porów można kontrolować, sterując gęstością prądu lub potencjałem. W praktyce operowanie stałą gęstością prądu pozwala łatwiej kontrolować porowatość i powtarzalność porowatej warstwy. Stężenie kwasów w elektrolicie z reguły wynosi 5–40% wag., a gęstość prądu 1–100 mA·cm<sup>-2</sup>.

Wybrane nanokompozyty na bazie Ti poddano procesowi trawienia w potencjale 10V względem potencjału obwodu otwartego (OCP) w elektrolicie będącym 1-molowym wodnym roztworem kwasu fosforowego z 2% objętościowymi 40-procentowego kwasu fluorowodorowego przez okres 10-20 minut w T=22°C.

#### **4.2.7. Hodowla ludzkich osteoblastów linii NHOst (LONZA)**

Hodowla komórek (Normal Human Osteoblasts- NHOst) na powierzchni próbek materiałowych miała na celu wykazanie biokompatybilności; zdolności do adhezji, wzrostu i podziałów komórkowych (prolifracji) osteoblastów na materiałach projektowanych docelowo jako implanty, a także reakcji tych materiałów na oddziaływanie komórek i mediów hodowlanych, czyli układu możliwie wiernie oddającego warunki panujące w organizmie.

Do oceny biogodności próbek nanokompozytów odznaczających się najlepszymi właściwościami mechanicznymi oraz odpornością korozyjną posłużyły testy cytotoksyczności przeprowadzone w warunkach statycznych i dynamicznych [157]. Oceniono również wpływ modyfikacji warstwy wierzchniej próbki na adhezję komórek. W celach porównawczych wykonano także badania biokompatybilności na próbkach wykonanych z żelaza armco. Wymienione badania wykonano w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Stanowisko do hodowli komórkowej przedstawia rycina 4.11.

### **A. Badania cytotoksyczności w warunkach statycznych**

Do badania cytotoksyczności w warunkach statycznych użyto ludzkich osteoblastów linii NHOst, medium hodowlanego i suplementów wyprodukowanych przez LONZA, Walkersville; USA. Z dostarczonego inoculum założono hodowlę w 25ml butelce hodowlanej PUNC#156357, po tygodniu hodowli z codobową wymianą medium uzyskano całkowite pokrycie dna naczynia warstwą komórek, które następnie przepasażowano po  $2 \times 10^5$  do kolejnych 5 butelek hodowlanych PUNC. Po kolejnym pasażu po 5000 komórek na próbce użyto do testu biokompatybilności.

Próbki, po dwie z każdego materiału, wysterylizowano w autoklawie (121°C, 1atm.), a następnie umieszczono je w 24 dołkowym naczyniu hodowlanym NUNC#144530 (PUNC, Roskilde) do dołków podano 5000 komórek NHOst. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C w inkubatorze przy 5 % zawartości CO<sub>2</sub> i wilgotności 95 % przez 1 i 5 dób, w objętości 1ml medium OGM (CC-3207; LONZA, Walkersville), które wymieniane było co 24h.

Po pierwszej i piątej dobie hodowli próbki wyjęto z naczyń, utrwalono w 2% roztworze aldehydu glutarowego w PBS i zabarwiono w 4% roztworze fioletu krystalicznego. Następnie próbki zostały odwodnione w szeregu rozcieńczeń alkoholu etylowego, poddano suszeniu w punkcie krytycznym i napyłone złotem. Tak przygotowane preparaty, w celu oceny stopnia adhezji i proliferacji, oglądano w SEM firmy Zeiss –EVO40. Fotografie powierzchni próbek wykonano w powiększeniu od 700 do 7000x.

## B. Ocena cytotoksyczności w warunkach dynamicznych

Dla oceny cytotoksyczności w warunkach dynamicznych, próbki materiałowe umieszczono w polistyrenowej butelce hodowlanej 25cm<sup>3</sup> wypełnionej wysterylizowanymi kulkami ZrO<sub>2</sub>, tworzącymi pojedynczą warstwę na dnie butelki. Podano 15 ml pożywki OBM (Lonza, Walkersville USA) suplementowanej 10% FBS, 0,1% kwasu askorbinowego, 0,1% preparatu antybiotykowego GA1000 (Lonza, Walkersville USA). Próbki zatopione w medium wytrząsano 14 dni na wytrząsarce rotacyjnej z prędkością 300 obr/min, w temp. 37°C. Równolegle, taką samą procedurę prowadzono dla 15 ml medium nie zawierającego próbki – kontrola. Po tym czasie zebrano media z poszczególnych inkubacji. Około 5 ml kondycjonowanego medium zabezpieczono do analizy składu chemicznego.

Test żywotności wzrostu komórek przeprowadzono z zastosowaniem linii ludzkich osteoblastów NHOst (Lonza, Walkersville USA), w 96 dołkowych płytkach hodowlanych (NUNC). Do 30 dołków wewnątrz płytki podano 3·10<sup>5</sup> komórek NHOst i 100 µl świeżej pożywki OBM. Tak przygotowaną hodowlę umieszczono na 4 godz. w inkubatorze: 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności. Po tym czasie do hodowli podano kondycjonowaną pożywkę, docelowo w rozcieńczeniach: 0,25; 0,125; 0,0625; 0, uzupełniając dołki hodowlane do pojemności 200 µl. Każde rozcieńczenie powtórzono 6–cio krotnie. Inkubacje prowadzono przez 9 dni, codziennie zmieniając pożywkę z zachowaniem odpowiednich rozcieńczeń. Następnie hodowle utrwalono w 25% aldehydzie glutarowym i wybarwiono w fiolecie krystalicznym. Wybarwione płytki poddano pomiarowi absorpcji światła przy  $\lambda = 590$  nm w czytniku do płytek ELISA. Na podstawie wyniku odczytów obliczono wskaźnik względnej żywotności komórek (*Relative Viability of Cells-RVC*) [126]:

$$RVC = [(a - b)/(c - b)] \cdot 100 [\%] \quad (4.5)$$

gdzie: a – absorpcja światła próby badanej, b – absorpcja tła, c – absorpcja światła próby kontrolnej (bez rozcieńczenia).

Dodatkowo, przy pomocy testu statystycznego ANOVA, w programie SigmaStat dokonano analizy statystycznej otrzymanych wskaźników RVC.

Do oznaczeń pierwiastków techniką optycznej emisyjnej spektrometrii z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES) zastosowano spektrometr emisyjny IRIS/AP (Thermo Jarrell Ash, USA). Spektrometr wyposażony jest w detektor półprzewodnikowy (CID; ang. *charge injection device*) i układ optyczny typu Echelle. W spektrometrze IRIS stosowany jest



poziomy system ustawienia palnika (kierunek przepływu próbki jest równoległy do osi optycznej).



Ryc. 4.11. Stanowisko do hodowli komórkowej

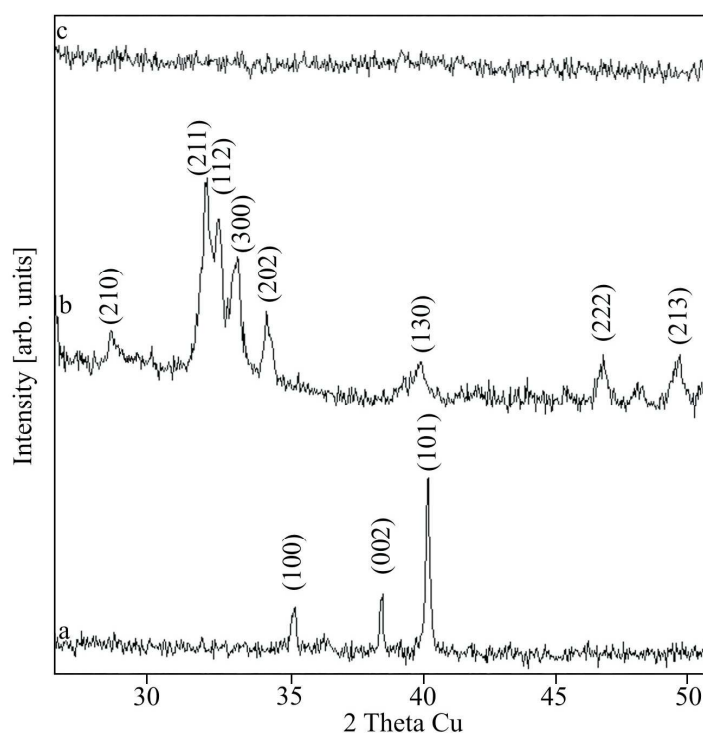


## 5. Wyniki badań i ich omówienie

### 5.1. Badania strukturalne

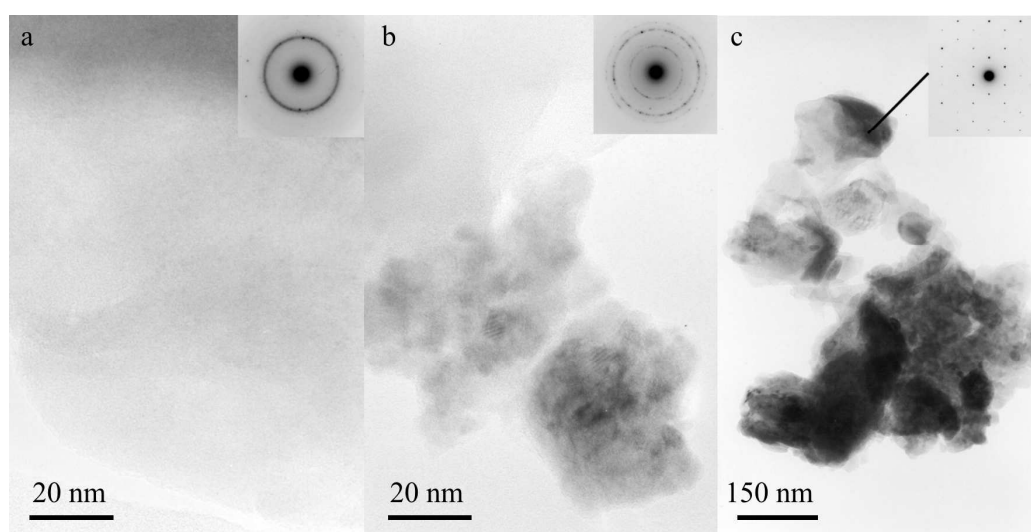
#### 5.1.1. Nanokompozyty typu tytan-ceramika resorbowalna

Na rycinie. 5.1 zestawiono wyniki badań rentgenowskich mieszaniny Ti–10% wag. HA na różnych etapach procesu MA. Krzywe 5.1a i 5.1b przedstawiają dyfraktogramy pochodzące z mikrokryształicznych składników wyjściowych, czyli odpowiednio tytanu i hydroksyapatytu. W miarę trwania procesu MA obserwuje się poszerzenie linii dyfrakcyjnych i zmniejszanie ich intensywności. Wiąże się to z pojawieniem się w badanym materiale znacznych naprężeń związanych z intensywnym odkształceniem plastycznym oraz z rozdrobnieniem materiału. Po 44 h procesu otrzymano materiał o strukturze amorficznej (rycina 5.1c). Dla pozostałych kompozytów również zaobserwowano występowanie fazy amorficznej. Materiał proszkowy po procesie MA badano przy użyciu TEM.

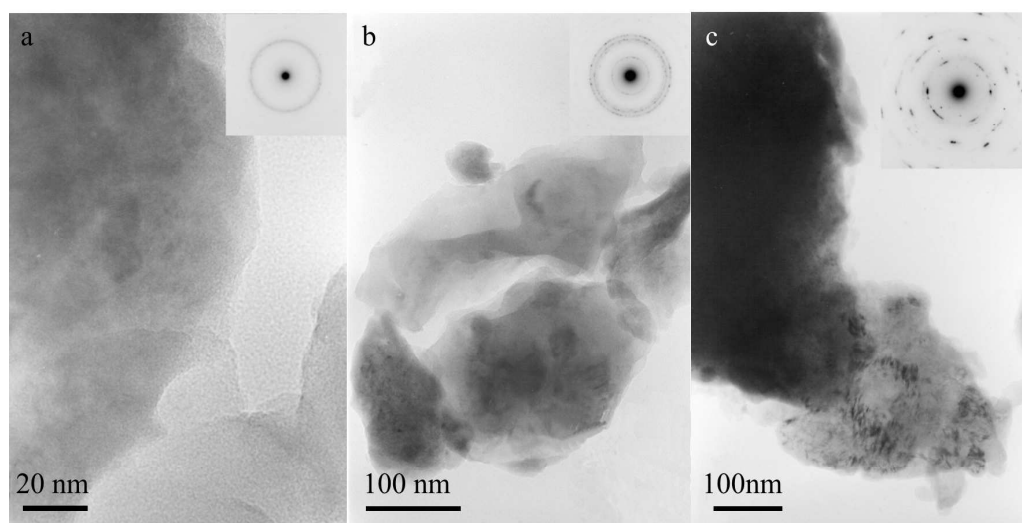


Ryc. 5.1. Dyfraktogramy rentgenowskie mielonych proszków Ti–10% wag. HA: (a) Ti przed MA, (b) HA przed MA, (c) po 44h MA

Mikrofotografie TEM oraz obrazy SAED (ang. *selected area electron diffraction* – obrazy dyfrakcji elektronowej) wykonane dla kompozytów zawierających 3 i 10% wag. HA przedstawiono na rycinach 5.2 i 5.3. Po 44 h procesu mechanicznej syntezy, mielony materiał proszkowy jest w większości amorficzny (rycina 5.2a i 5.3a). Badania TEM ujawniły, że poza fazą amorficzną mogą występować nanocząstki tytanu (rycina 5.2b i 5.3b) jak i większe kryształy Ti (rycina 5.2c i 5.3c). Ponieważ na dyfraktogramie XRD (rycina 5.1f) nie widać wyraźnych refleksów to zachodzi podejrzenie, że krystalizacja próbki mogła zajść na skutek działania wiązki elektronowej.

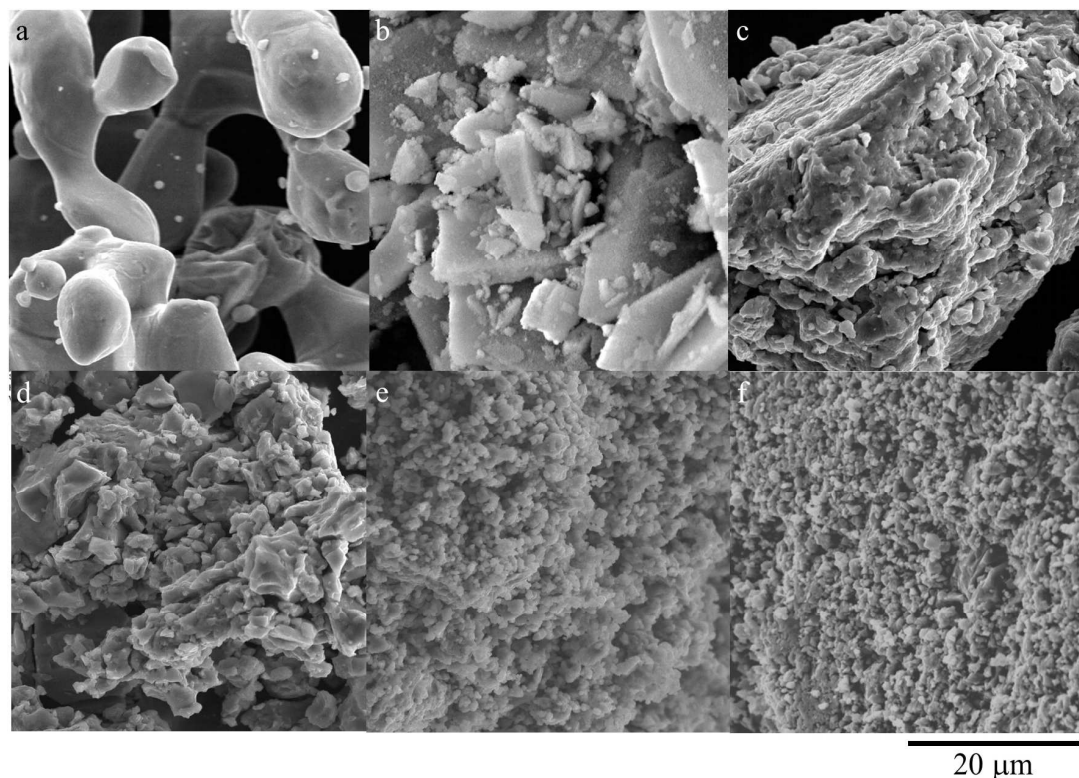


Ryc. 5.2. Mikrofotografie TEM i obrazy SEAD (prawy górny róg) kompozytu Ti–3% wag. HA po 44 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) fragment z drobnokrystalicznymi cząstkami Ti (c) duży kryształ Ti



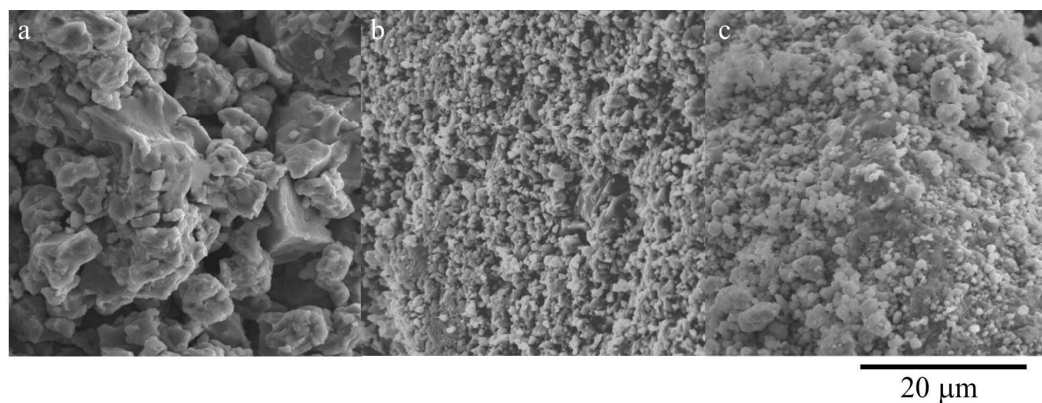
Ryc. 5.3. Mikrofotografie TEM i obrazy SEAD (prawy górny róg) kompozytu Ti–10% wag. HA po 44 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) fragment z drobnokrystalicznymi cząstkami Ti (c) duży kryształ Ti

W trakcie procesu mechanicznej syntezy zmianie ulegała mikrostruktura mielonego materiału proszkowego, co zobrazowano na rycinie 5.4. W początkowej fazie procesu MA proszki wyjściowych materiałów połączyły się ze sobą tworząc aglomeraty wielkości kilkudziesięciu  $\mu\text{m}$ . Po 20 h procesu MA materiał proszkowy został znacznie rozdrobniony, a powstałe aglomeraty były wielkości  $< 1\mu\text{m}$ .



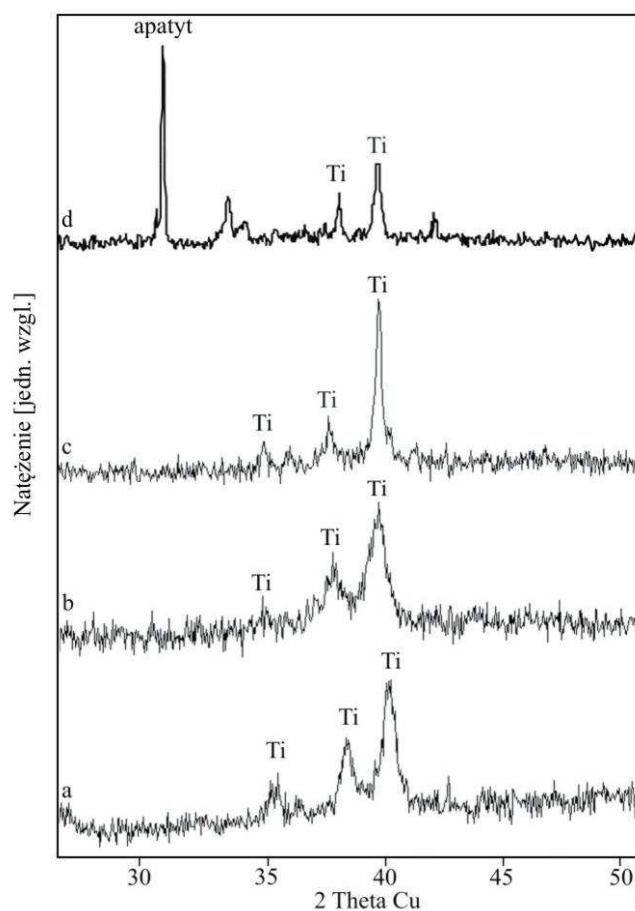
Ryc. 5.4. Obrazy SEM proszków kompozytu Ti–10% wag. HA na różnych etapach procesu MA: (a) Ti – 0 h, (b) HA – 0 h, (c) 3 h, (d) 10 h, (e) 20 h, (f) 44 h procesu MA

Rycina 5.5 przedstawia strukturę materiałów proszkowych o różnym udziale hydroksyapatytu, po procesie mechanicznej syntezy (44 h). Na podstawie zdjęć SEM można wywnioskować, że kompozyty zawierające 10 i 20% wag. HA charakteryzują się bardziej jednorodną strukturą w porównaniu do kompozytu zawierającego 3% wag. HA.



Ryc. 5.5. Obrazy SEM kompozytów Ti-HA, o różnym udziale wagowym HA, po 44 h procesu MA: (a) 3% wag. HA, (b) 10% wag. HA, (c) 20% wag. HA

Materiał proszkowy po procesie mechanicznej syntezy prasowano i poddano obróbce cieplnej celem rekrytalizacji. W wyniku tego otrzymano nanokrystaliczny materiał kompozytowy (rycina 5.6). Analiza XRD kompozytów Ti-HA wykazała, że nanokompozyty zawierające do 20% wag. HA to głównie tytan  $\alpha$  (struktura heksagonalna). W przypadku 50% wag. hydroksyapatytu otrzymany materiał zawiera oprócz tytanu apatyt.



Ryc. 5.6. Dyfraktogramy rentgenowskie nanokrystalicznego materiału kompozytowego Ti-HA: (a) 3% wag. HA, (b) 10% wag. HA, (c) 20% wag. HA, (d) 50% wag. HA

W tabeli 5.1 zestawiono stałe sieciowe  $a$ ,  $c$ , objętości komórek elementarnych oraz wielkości krystalitów otrzymanych nanokompozytów Ti–HA i mikrokystalicznego tytanu. Rentgenowska wielkość krystalitów została oszacowana z poszerzenia linii dyfrakcyjnych metodą Scherrera.

Tabela 5.1

Stałe sieciowe, objętości komórek elementarnych i wielkość krystalitów wyjściowego proszku Ti i nanokompozytów Ti–HA poddanych obróbce cieplnej w 1150°C w czasie 2 h

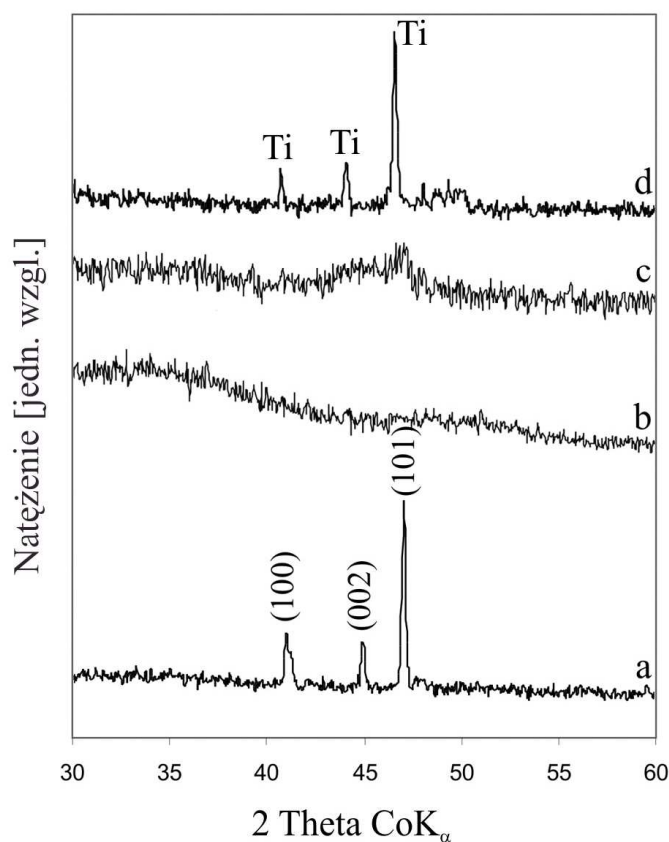
materiał		a [nm]	c [nm]	V [nm <sup>3</sup> ]	d <sub>hkl</sub>
mikrokystaliczny tytan		0,295	0,468	0,0353	45 μm
nano- kompozyty	Ti–3 % wag. HA	0,295	0,468	0,0352	30 nm
	Ti–10 % wag. HA	0,298	0,476	0,0366	40 nm
	Ti–20 % wag. HA	0,297	0,478	0,0365	25 nm
	Ti–50 % wag. HA	0,277	0,448	0,0305	25nm

Wytworzone nanokompozyty charakteryzują się ziarnem wielkości 25–40 nm. Objętość komórek elementarnych nanokompozytów Ti-10% wag. HA i Ti-20% wag. HA wzrasta w porównaniu z objętością komórek dla mikrokystalicznego tytanu. Podczas procesu MA może dojść do ścierania się materiału mielników i ścian reaktora, co wpływa na zanieczyszczenie próbek żelazem. Wcześniej przeprowadzone badania metodą XPS (ang. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy* – rentgenowska spektroskopia fotoelektronów) wykazały, że po 44 h procesu MA zawartość  $\alpha$ -Fe w syntetyzowanym materiale może wynieść około 2% at. [119]

### 5.1.2. Nanokompozyty typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością

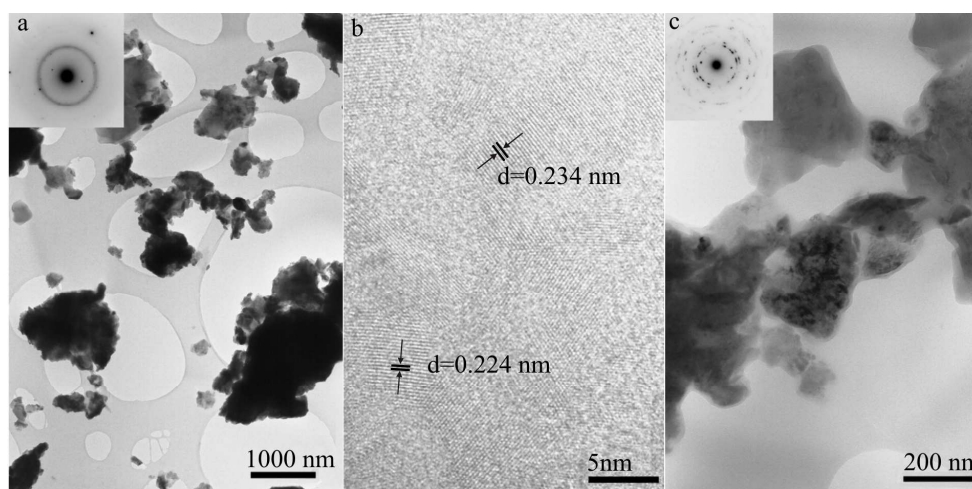
Na rycinie 5.7 przedstawiono widma rentgenowskie mieszaniny tytan-SiO<sub>2</sub>. Ryciny 5.7a i 5.7b pokazują widma XRD wyjściowych proszków czyli odpowiednio tytanu i amorficznej krzemionki. W miarę postępowania procesu MA, obserwowano poszerzenie linii dyfrakcyjnych Ti oraz zmniejszenie ich intensywności. Poszerzenie linii miało związek z obecnością w badanym materiale znacznych naprężeń związanych z intensywnym odkształceniem plastycznym jak również z

rozdrobieniem proszków. Po 20 godzinach trwania procesu MA, mielone proszki przekształcają się w fazę amorficzną (rycina 5.7c).



Ryc. 5.7. Dyfraktogramy rentgenowskie mielonych proszków Ti-10% wag. SiO<sub>2</sub>: (a) Ti (mikrokrystaliczny), (b) SiO<sub>2</sub>, (c) po 20 h MA i (d) po obróbce cieplnej 1150°C/2 h

Mikrofotografie TEM kompozytu Ti-10% wag. SiO<sub>2</sub> przedstawiono na rycinach 5.8. Po 20 h procesu mechanicznej syntezy, mielony materiał proszkowy jest w większości amorficzny (rycina 5.8a). Badania TEM ujawniły, że poza fazą amorficzną mogą występować nanocząstki tytanu (rycina. 5.8b) jak i większe kryształy Ti (rycina. 5.8c). Rycina 5.8b przedstawia wysokorozdzielczy obraz krystalitów Ti z widocznymi płaszczyznami atomowymi. Odległości międzypłaszczyznowe wynoszą odpowiednio 0,234 i 0,224 nm. Brak na dyfraktogramie XRD intensywnych linii pochodzących od tytanu (rycina 5.7c) świadczy o bardzo małej zawartości fazy krystalicznej tego metalu w próbce. Nie wyklucza się, że podczas badań TEM, w wyniku oddziaływania wiązki elektronowej na próbkę, nastąpiła jej rekrytalizacja. Podobną strukturę zaobserwowano dla Ti-3% wag. SiO<sub>2</sub>.



Rys. 5.8. Mikrofotografie TEM kompozytu Ti-10% wag.  $\text{SiO}_2$  po 20 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) krystalit Ti, (c) kryształy Ti

**Tabela 5.2**

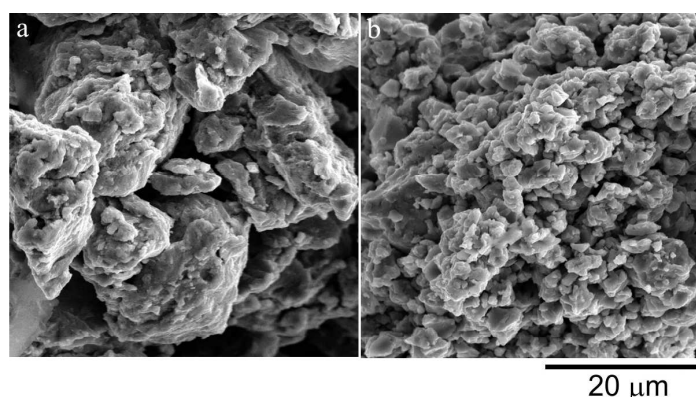
Stałe sieciowe, objętości komórek elementarnych i wielkość krystalitów wyjściowego proszku Ti, nanokompozytów Ti-10% wag.  $\text{SiO}_2$  i Ti-10% wag. 45S5 bioszkło poddanych obróbce cieplnej w  $1150^\circ\text{C}$  w czasie 2 h

materiał	a [ $\text{\AA}$ ]	c [ $\text{\AA}$ ]	V [ $\text{\AA}^3$ ]
Ti-10% wag. $\text{SiO}_2$	2.961	4.754	36.09
Ti-10% wag. 45S5 bioszkło	2.963	4.756	36.16
Ti mikrokystaliczny	2.948	4.684	35.25

Lite nanokompozyty otrzymano metodą formowania i spiekania amorficznych proszków uzyskanych metodą MA w temperaturze  $1150^\circ\text{C}/2$  h (rycina 5.7d). Badania strukturalne nanokompozytów Ti-10% wag.  $\text{SiO}_2$  i Ti-10% wag. 45S5 bioszkło potwierdziły powstanie struktur  $\alpha$ -Ti (tabela 5.2). Średnia wielkość ziaren obrabianych cieplnie proszków Ti- $\text{SiO}_2$  i Ti45S5 bioszkło, wyznaczona metoda Schererra, wynosi 40-50 nm.

Rycina 5.9 przedstawia strukturę materiałów proszkowych o różnym udziale wagowym  $\text{SiO}_2$ , po trwającym 20h procesie mechanicznej syntezy. Na podstawie zdjęć SEM można wywnioskować, że kompozyty zawierające 3% wag.  $\text{SiO}_2$  tworzą większe aglomeraty w porównaniu do kompozytu zawierającego 10% wag.  $\text{SiO}_2$ .

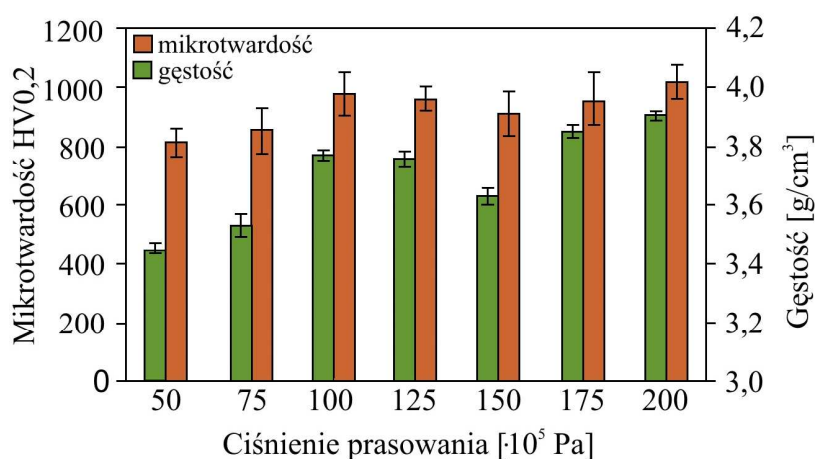




Ryc. 5.9. Obrazy SEM kompozytów Ti-SiO<sub>2</sub>, o (a) 3% i (b) 10% udziale wag. SiO<sub>2</sub>, po 20 h procesu MA

## 5.2. Dobór warunków konsolidacji i konsolidacja wytworzonych materiałów

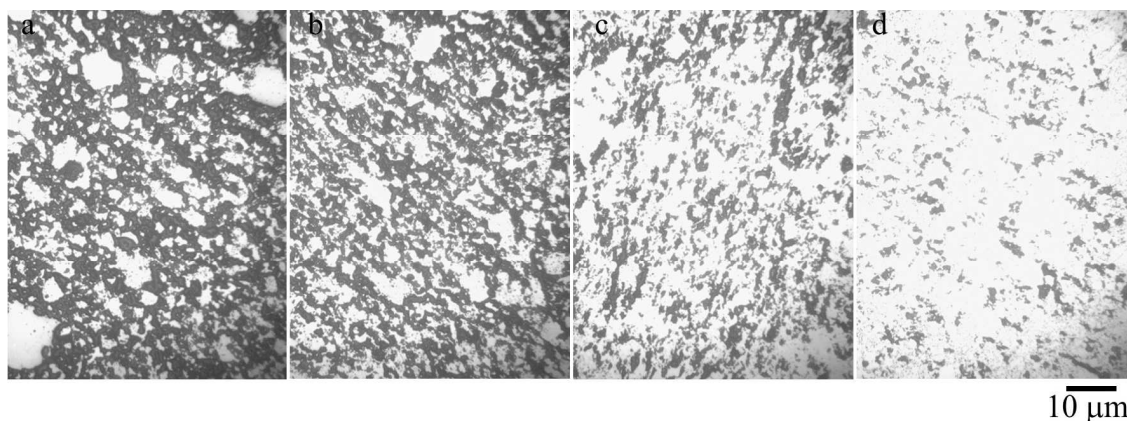
Zbadano wpływ ciśnienia prasowania na gęstość, mikrotwardość syntetyzowanych nanokompozytów typu Ti-10% wag. HA.



Ryc. 5.10. Wpływ ciśnienia prasowania na mikrotwardość i gęstość kompozytów Ti-10% wag. HA

Wyniki wpływu ciśnienia prasowania na mikrotwardość i gęstość nanokompozytów Ti-10 % wag. HA przedstawiono na rycinie 5.10. Z kolei na rycinie 5.11 przedstawiono zdjęcia powierzchni kompozytów wykonane przy użyciu mikroskopu optycznego. Próbkki były poddane prasowaniu przy ciśnieniach: 50, 75, 100, 125, 150, 175 i 200·10<sup>5</sup> Pa.





Ryc. 5.11. Zdjęcia powierzchni kompozytów Ti-10% wag. HA prasowanych pod ciśnieniem: (a)  $50 \cdot 10^5$  Pa, (b)  $100 \cdot 10^5$  Pa, (c)  $150 \cdot 10^5$  Pa, (d)  $200 \cdot 10^5$  Pa

Wraz ze wzrostem ciśnienia prasowania wzrasta gęstość a co za tym idzie mikrotwardość nanokompozytów. Wzrost gęstości wpływa także na zmniejszenie porowatości syntetyzowanych kompozytów. Próbkę prasowaną pod najniższym ciśnieniem ( $50 \cdot 10^5$  Pa), pomimo znacznie niższej gęstości ( $3,45 \text{ g/cm}^3$ ) od mikrokryształicznego tytanu ( $4,51 \text{ g/cm}^3$ ) charakteryzuje się przeszło trzykrotnie wyższą mikrotwardością (HV0,2 dla Ti – 250, a dla Ti– 20% wag. HA – 815).

Przeprowadzone badania pozwoliły na dobranie parametrów procesu technologicznego zapewniających najlepsze właściwości:

- ciśnienie prasowania –  $200 \cdot 10^5$  Pa
- temperatura obróbki cieplnej –  $1150^\circ\text{C}$ ,
- czas obróbki cieplnej – 2 h.

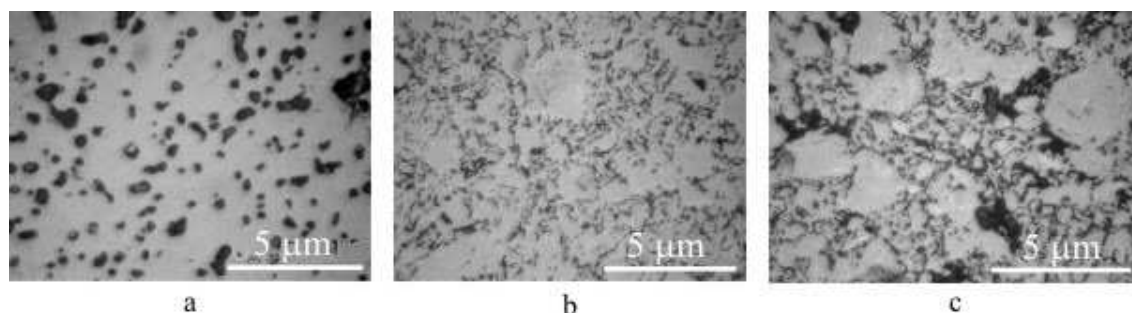
### 5.3. Właściwości fizyczne

Wyniki badań gęstości pozornej, gęstości względnej i porowatości wytworzonych nanokompozytów typu Ti-HA zestawiono w tabeli 5.3. Na rycinie 5.12 przedstawiono zdjęcia powierzchni nanokompozytów o różnym udziale wagowym HA, wykonane przy użyciu mikroskopu optycznego. Najwyższą porowatością charakteryzuje się nanokompozyt zawierający najmniejszy udział hydroksyapatytu.

Tabela 5.3

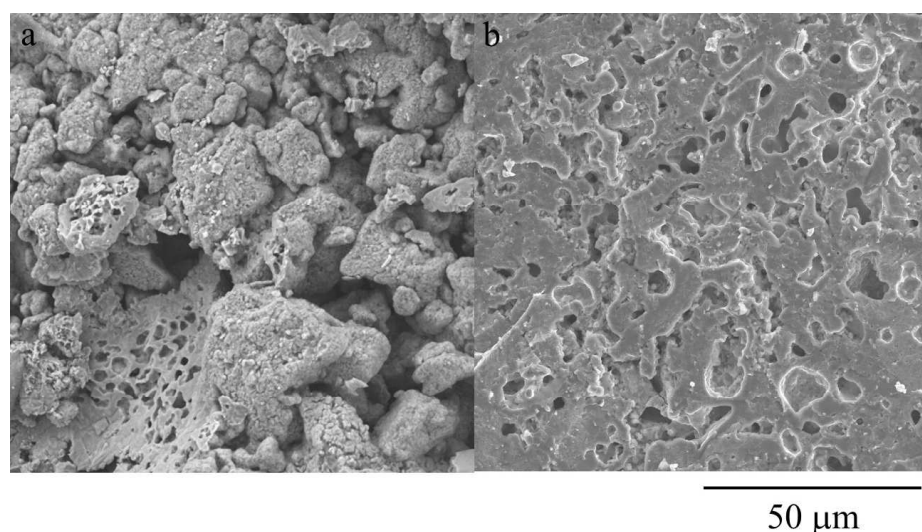
Właściwości fizyczne wytworzonych nanokompozytów Ti–HA i tytanu

materiał		$\rho_p$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\rho_{rel}$ (%)	P [%]
mikrokryształiczny tytan		4,51	–	–
nano- kompozyty	Ti–3% wag. HA	3,51	78,5	22
	Ti–10% wag. HA	4,03	91,9	8
	Ti–20% wag. HA	3,91	91,3	9



Ryc. 5.12. Zdjęcia powierzchni wytworzonych nanokompozytów: (a) Ti–3% wag. HA, (b) Ti–10% wag. HA, (c) Ti–20% wag. HA

Rycina 5.13 przedstawia zdjęcia SEM przełomów syntetyzowanych materiałów. Nanokompozyt zawierający 10% wag. HA charakteryzuje się znacznie mniej kruchym przełomem w porównaniu z nanokompozytem zawierającym 3% wag. HA. Wielkość por dla nanokompozytu Ti-10% wag. HA wynosi około 10–25 µm.



Ryc 5.13. Zdjęcia SEM przełomów nanokompozytów (a) Ti–3% wag. HA, (b) Ti–10% wag. HA

## 5.4. Właściwości mechaniczne

Wyniki badań właściwości mechanicznych zostały zestawione w tabeli 5.4. Test mikrotwardości pokazał, że wytworzone metodą mechanicznej syntezy nanokompozyty posiadają znacznie większą mikrotwardość w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem.

**Tabela 5.4**

Właściwości mechaniczne- mikrotwardość i moduł Younga wytworzonych nanokompozytów Ti-HA i tytanu mikrokrystalicznego

materiał		HV0,2	H (10 mN)	E [GPa]
mikrokrystaliczny tytan		250	–	153
nano- kompozyty	Ti-3% wag. HA	480	600	–
	Ti-10% wag. HA	1500	1500	127
	Ti-20% wag. HA	1030	1325	110

Mikrotwardość Vickersa znacznie wzrasta dla nanokompozytu zawierającego 10% wag. HA (1500 HV0,2) i jest sześciokrotnie większa od twardości mikrokrystalicznego tytanu (250 HV0,2). Najmniejszym wzrostem twardości (prawie dwukrotny wzrost w porównaniu do mikrokrystalicznego tytanu) odznacza się nanokompozyt zawierający 3% wag. HA (tabela 5.4). Mały wzrost twardości jest spowodowany znaczną porowatością tego materiału.

**Tabela 5.5**

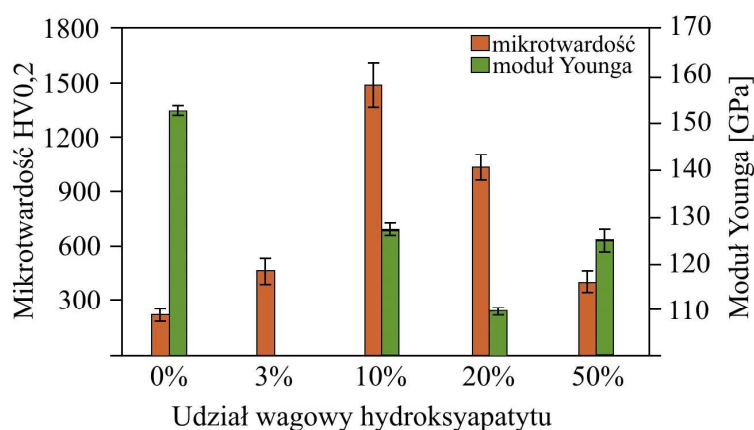
Wyniki mikrotwardości wytworzonych nanokompozytów typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością i mikrokrystalicznego tytanu

materiał		HV0,2
mikrokrystaliczny tytan		250
nano- kompozyty	Ti-3% wag. SiO <sub>2</sub>	550
	Ti-10% wag. SiO <sub>2</sub>	670
	Ti-3% wag. 45S5	500
	Ti-10% wag. 45S5	620

Wyniki badań mikrotwardości zsyntetyzowanych nanokompozytów typu Ti-SiO<sub>2</sub> i Ti-45S5 bioszkle przedstawiono w tabeli 5.5. Twardość nanokompozytów Ti-3%, 10%

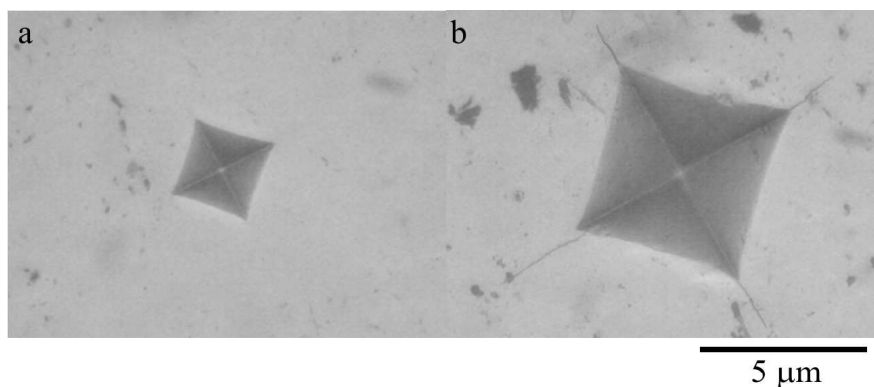
SiO<sub>2</sub> i Ti-10% bioszkło 45S5 wzrosła ponad 2-krotnie w porównaniu z litym mikrokrystalicznym tytanem.

Dla nanokompozytów Ti-HA wyznaczono również mikrotwardość przy użyciu nanoindentera, dla obciążenia maksymalnego 10 mN. Uzyskane tą metodą wyniki twardości materiałów nanokompozytowych, mają nieco większe wartości w porównaniu do wyników uzyskanych przy użyciu mikrotwardościomierza Vickersa. Jest to związane między innymi z zastosowaniem różnych obciążeń podczas badań (mikrotwardościomierz – obciążenie 1,9614 N (0,2 kg); nanoindenter – obciążenie 0,01 N). Przy użyciu nanoindentera wyznaczono również moduły sprężystości (E) wytworzonych nanokompozytów i porównano z mikrokrystalicznym tytanem (rycina 5.14). Zaobserwowano spadek modułu sprężystości w stosunku do modułu sprężystości uzyskanego dla mikrokrystalicznego tytanu, pomimo wzrostu twardości nanokompozytów.



Ryc. 5.14. Wpływ udziału wagowego HA na mikrotwardość i moduł Younga nanokompozytów typu Ti-HA

Dla nanokompozytu zawierającego 10% wag. HA wyznaczono współczynnik intensywności naprężeń metodą bezpośredniego pomiaru długości pęknięć Palmqvista wywołanych wciskaniem wgłębnika Vickersa. Przy obciążeniu wgłębnika 0,5 kg pęknięcia nie pojawiły się (rycina 5.15a). Zastosowanie większego obciążenia – 2 kg, spowodowało pękanie materiału w narożach odcisku (rycina 5.15b). Obliczony współczynnik intensywności naprężeń dla nanokompozytu Ti–10 % wag. HA wyniósł 1,64 MPa·m<sup>0,5</sup>. Wyznaczona wartość  $K_{Ic}$  dla nanokompozytu jest większa od  $K_{Ic}$  hydroksyapatytu, który dla gęstego HA wynosi 0,6–1,2 MPa·m<sup>0,5</sup>.



Rys. 5.15. Zdjęcia odcisku Vickersa na powierzchni nanokompozytu Ti-10% wag. HA (a) obciążenie wglębnika 0,5 kg, (b) obciążenie wglębnika 2 kg – widoczne pęknięcia Palmqvista

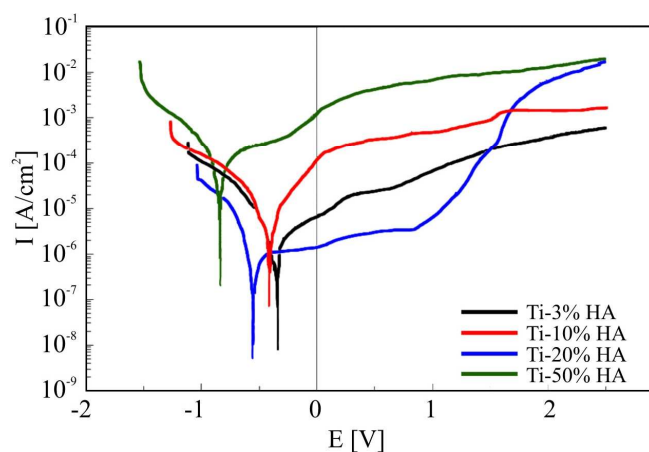
## 5.5. Odporność korozyjna

Badania odporności korozyjnej pozwoliły na wytypowanie grupy nanokompozytów Ti-ceramika, które mogą znaleźć zastosowanie praktyczne. Wyniki badań dla nanokompozytów Ti-HA zestawiono w tabeli 5.6 i przedstawiono na rycinie 5.16.

Tabela 5.6

Średnia wartość gęstości prądów i potencjałów korozyjnych oraz szybkości korozji nanomateriałów typu Ti-HA i mikrokrystalicznego tytanu w płynie Ringera (37°C)

materiał		$I_{kor}$ [ $A/cm^2$ ]	$E_{kor}$ [V]	$C_R$ [mm/r]
mikrokrystaliczny tytan		$1,31 \cdot 10^{-5}$	-0,36	0,000363
nano- kompozyty	Ti-3% wag. HA	$9,06 \cdot 10^{-8}$	-0,34	0,000003
	Ti-10% wag. HA	$1,19 \cdot 10^{-7}$	-0,41	0,000004
	Ti-20% wag. HA	$8,5 \cdot 10^{-8}$	-0,55	0,000003
	Ti-50% wag. HA	$1,46 \cdot 10^{-6}$	-0,84	0,000048



Ryc. 5.16. Potencjodynamiczne krzywe polaryzacji wyznaczone dla nanokompozytów Ti-HA w płynie Ringera (37°C)

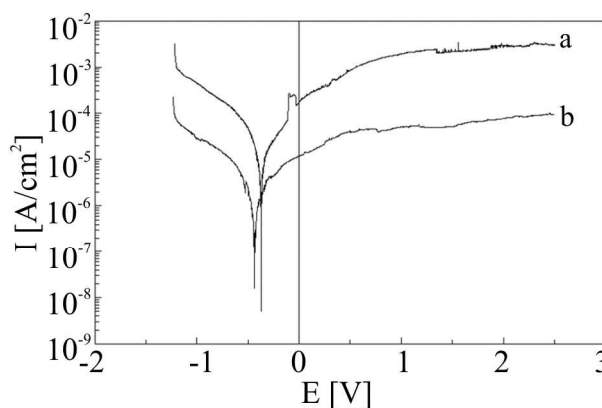
Charakter krzywych korozyjnych jest zbliżony, jedynie nanokompozyt Ti–20% wag. HA ma węższy zakres pasywny w porównaniu z pozostałymi nanokompozytami (rycina 5.16). Na szybkość korozji ma wpływ między innymi gęstość materiału. Pomimo tego, że otrzymane nanokompozyty charakteryzują się pewną porowatością, szybkość korozji, w stosunku do szybkości korozji mikrokrystalicznego tytanu, maleje.

**Tabela 5.7**

Średnia wartość gęstości prądów i potencjałów korozyjnych oraz szybkości korozji nanomateriałów typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością i mikrokrystalicznego tytanu w płynie Ringera (37°C)

materiał		$I_{kor}$ [ $A/cm^2$ ]	$E_{kor}$ [V]	$C_R$ [mm/r]
mikrokrystaliczny tytan		$1,31 \cdot 10^{-5}$	-0,36	0,000363
nano- kompozyty	Ti–3% wag. $SiO_2$	$1,91 \cdot 10^{-6}$	-0,37	0,000055
	Ti–10% wag. $SiO_2$	$3,74 \cdot 10^{-8}$	-0,44	0,000001
	Ti–3% wag. 45S5	$8,12 \cdot 10^{-7}$	-0,31	-
	Ti–10% wag. 45S5	$1,20 \cdot 10^{-7}$	-0,42	0,000004

Również nanokompozyty zawierające w swoim składzie ceramikę z kontrolowaną reaktywnością,  $SiO_2$  i bioszkło 45S5, charakteryzują się lepszą odpornością korozyjną w porównaniu do mikrokrystalicznego tytanu (rycina 5.17, tabela 5.7).



Ryc. 5.17. Potencjodynamiczne krzywe polaryzacji wyznaczone dla nanokompozytów Ti– $SiO_2$  (a) 3% wag.  $SiO_2$ , (b) 10% wag.  $SiO_2$  w płynie Ringera (37°C)

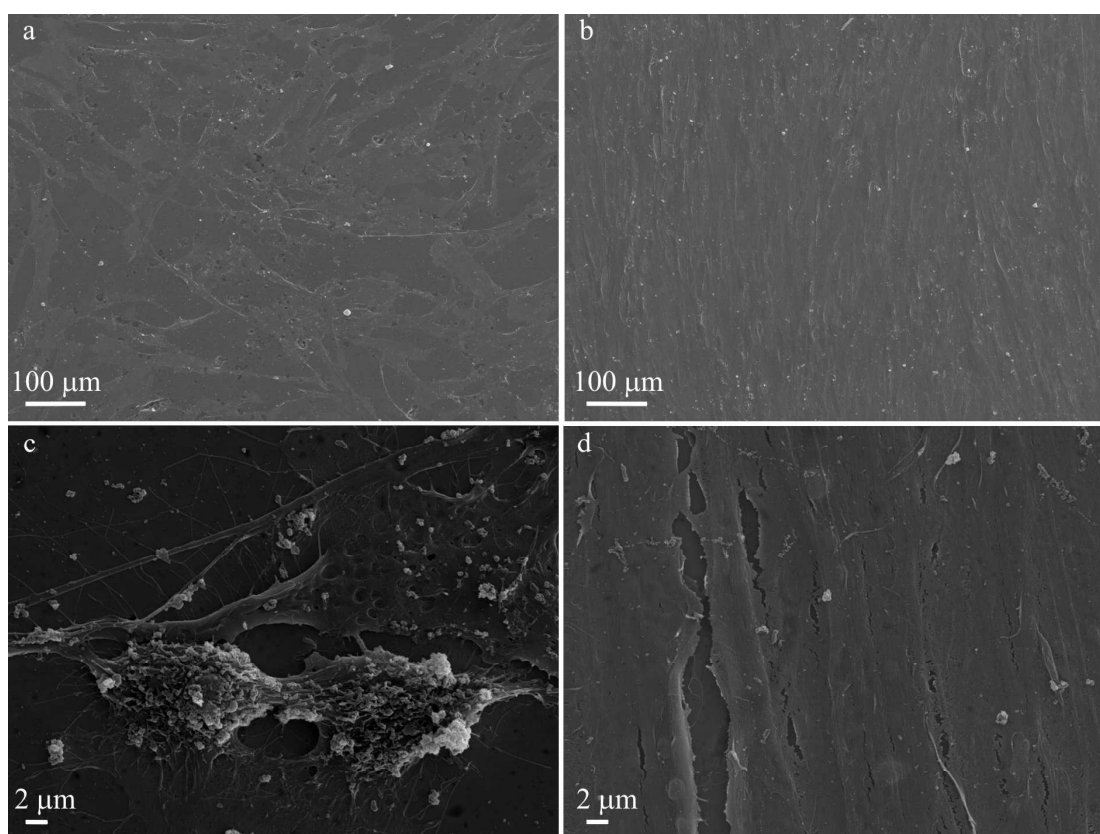
## 5.6. Badania biogodności oraz ocena cytotoksyczności

Do badań wykorzystano wyselekcjonowane bionanomateriały charakteryzujące się najlepszymi właściwościami mechanicznymi oraz odpornością korozyjną. Hodowla komórek NHOst na powierzchni próbek wykonanych z badanych materiałów

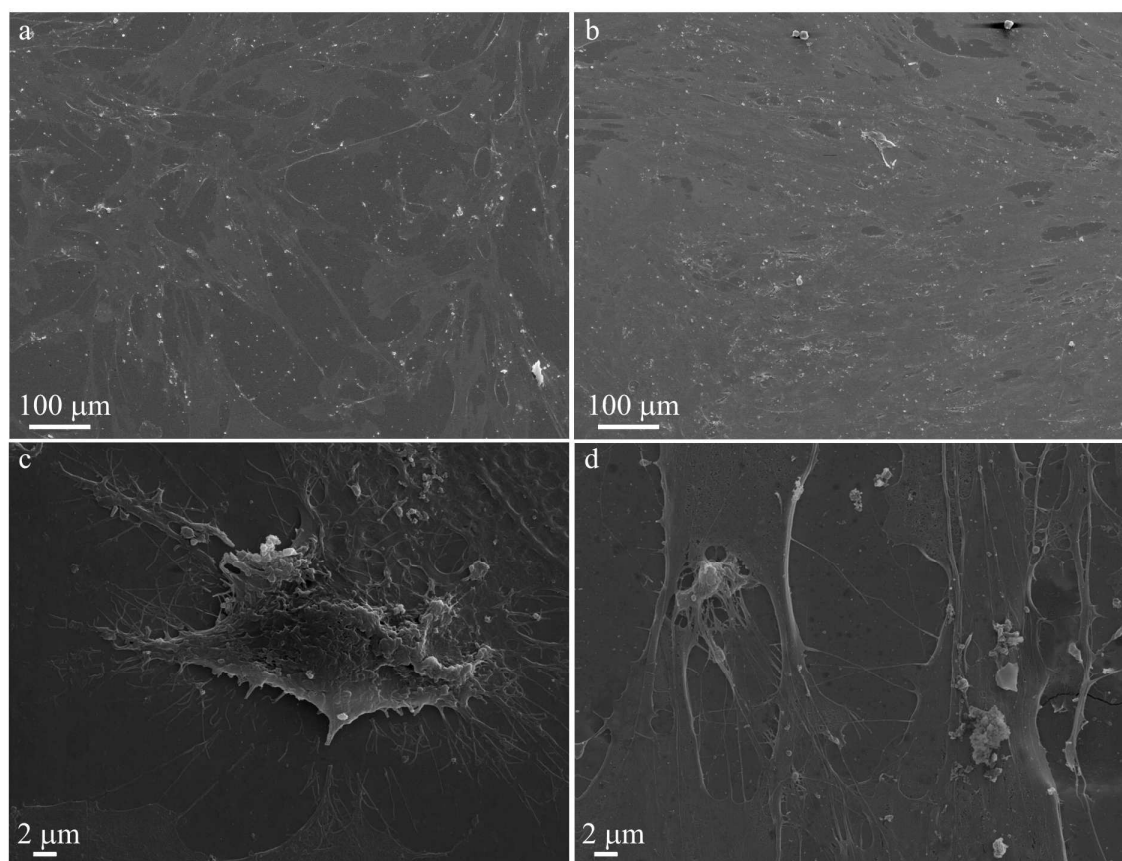
(nanokompozyty: Ti-10% wag. HA, Ti-10% Bioszkło 45S5, mikrokrystaliczny tytan) miała na celu wykazanie biokompatybilności, zdolności do adhezji, wzrostu i podziałów komórkowych (prolifracji) osteoblastów na nanokompozytach projektowanych docelowo jako implanty, a także reakcji tych materiałów na oddziaływanie komórek i mediów hodowlanych, czyli układu możliwie wiernie oddającego warunki panujące w organizmie.

### 5.6.1. Ocena rozwoju komórek na powierzchni nanokompozytów

Po pierwszej dobie komórki osteoblastów wykazywały cechy adhezji do materiałów doświadczalnych wszystkich badanych materiałów w postaci licznych filopodiów (rycina 5.18.a,c i rycina 5.19.a,c ). Po pięciu dobach komórki pokrywały prawie całą powierzchnię próbki co świadczy o intensywnym rozroście komórek (rycina 5.18.b,d i rycina 5.19.b,d).



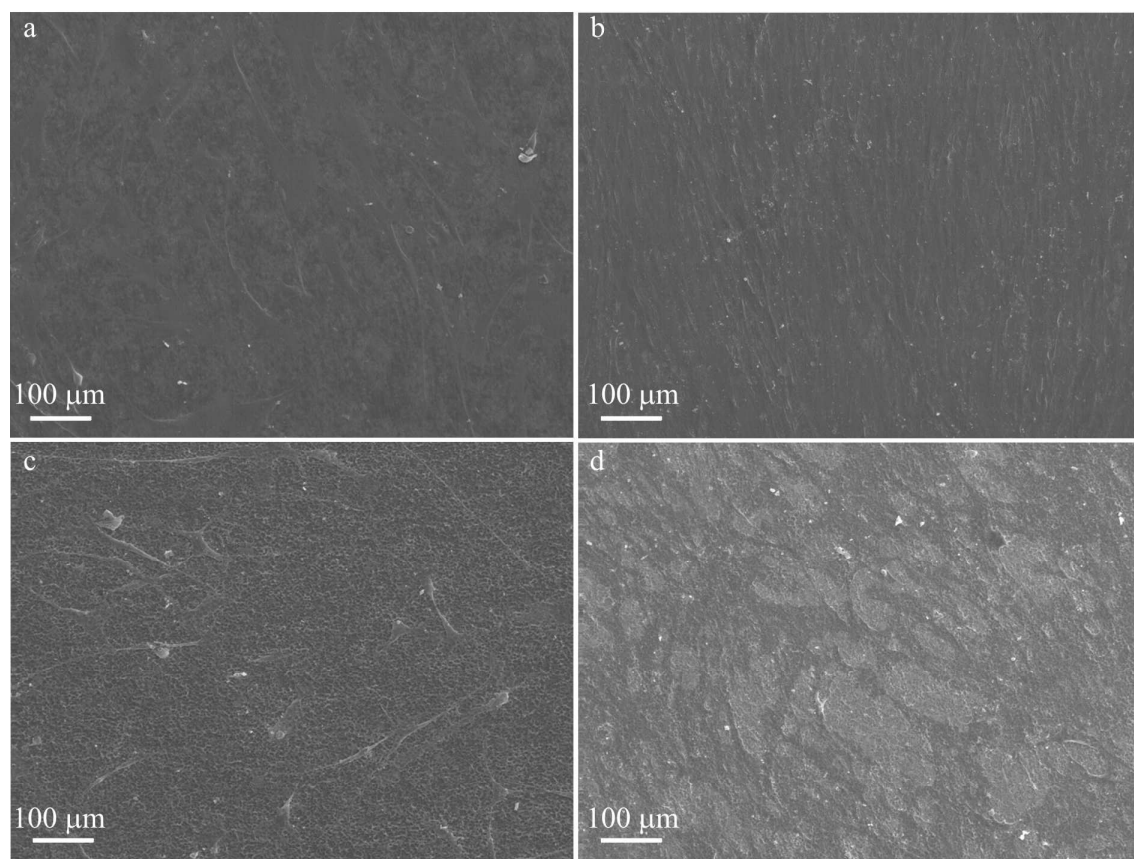
Ryc. 5.18. Zdjęcia SEM powierzchni nanokompozytu Ti-10% wag. HA po (a, c) jednym dniu i (b,d) pięciu dniach hodowli



Ryc. 5.19. Zdjęcia SEM powierzchni nanokompozytu Ti–10% wag. 45S5 bioszko po (a, c) jednym dniu i (b,d) pięciu dniach hodowli.

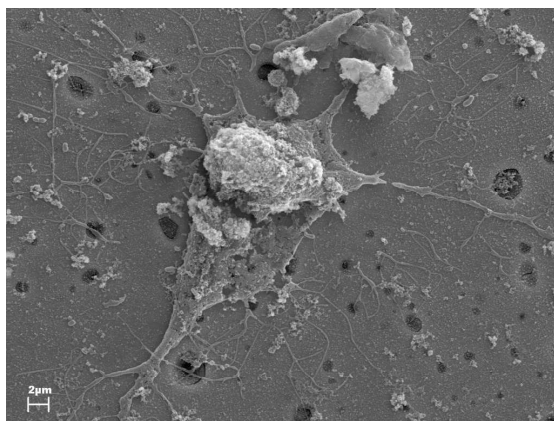
Zaobserwowano również wzrost komórek i ich ekspansję na powierzchni próbki z mikrokrystalicznego tytanu. Na rycinie 5.20a,c, przedstawiającej końcowy etap podziału komórkowego w pierwszej dobie po podaniu komórek do hodowli, widoczne są liczne filopodia wytworzone w celu adhezji do podłoża. Na rycinie 5.20b,d przedstawiającej komórki, po 5 dobach hodowli przybierają one formę tzw. *monolayer*, która jest typowa dla hodowli *in vitro* na płaskim podłożu.



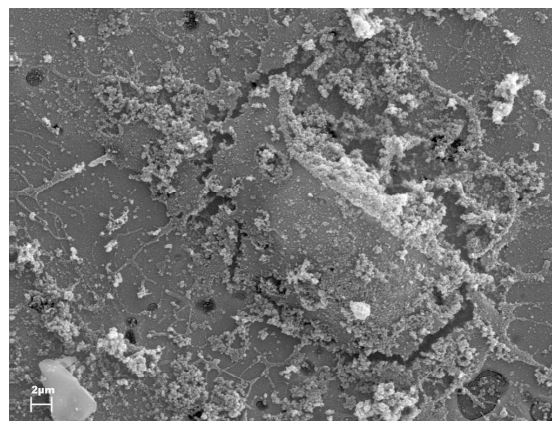


Ryc. 5.20. Zdjęcia SEM powierzchni mikrokrystalicznego tytanu po jednym dniu (a) i po 5 dniach (b) oraz powierzchni mikrokrystalicznego tytanu po trawieniu elektrochemicznym po jednym dniu (c) i 5 dniach (d).

W celach porównawczych wykonano także badania biokompatybilności na próbkach wykonanych z żelaza armco. Na powierzchni tego metalu komórki nie wykazywały cech wzrostu. Prawie wszystkie komórki były mocno uszkodzone, zarówno po 1 jak i po 5 dobach, co może świadczyć o ich obumarciu już w początkowej fazie hodowli (rycina 5.21 a, b).

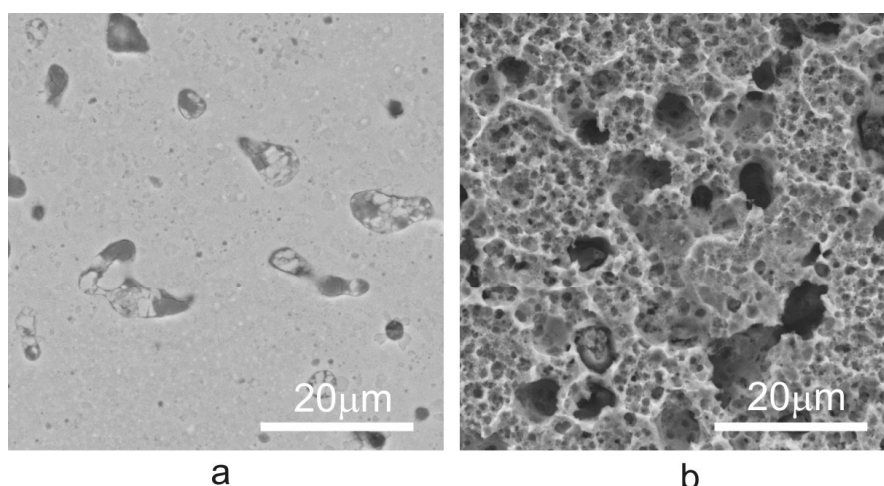


Ryc. 5.21a. Osteoblasty w pierwszej dobie hodowli na próbkach wykonanych z żelaza armco

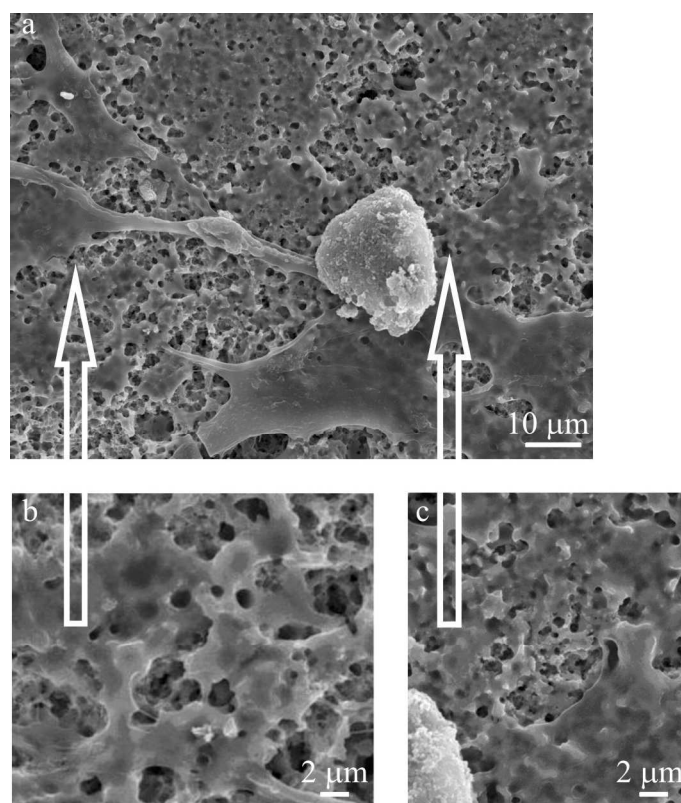


Ryc. 5.21b. Osteoblasty po piątej dobie hodowli na próbkach wykonanych z żelaza armco

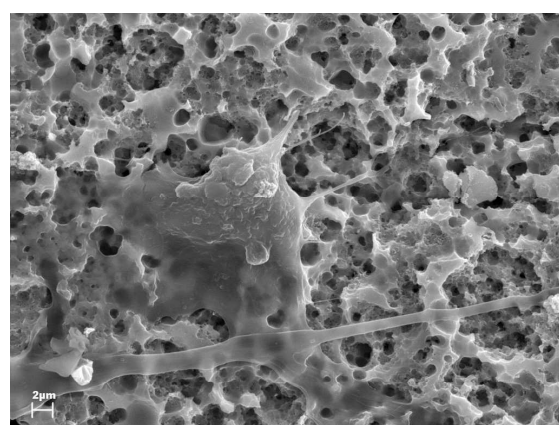
Badania biokompatybilności w warunkach statycznych przeprowadzono również dla badanych materiałów po modyfikacji warstwy wierzchniej metodą trawienia elektrochemicznego (rycina 5.22). Już po pierwszej dobie hodowli spostrzegano adhezję komórek do porowatej próbki Ti-10% wag. 45S5 bioszklą (rycina 5.23). Komórki nie wytwarzały filopodiów, bądź wytwarzały je w mniejszym stopniu niż te, które rosły w hodowli na polerowanej powierzchni. Najprawdopodobniej porowatość materiału sprzyja adhezji komórek (rycina 5.23 i rycina 5.24). Analizując powierzchnię materiału po 5 dobach od założenia hodowli wykazano, że komórki pokrywały mniejszą część pola obrazu w stosunku do analogicznych próbek niezmodyfikowanych (rycina 5.19).



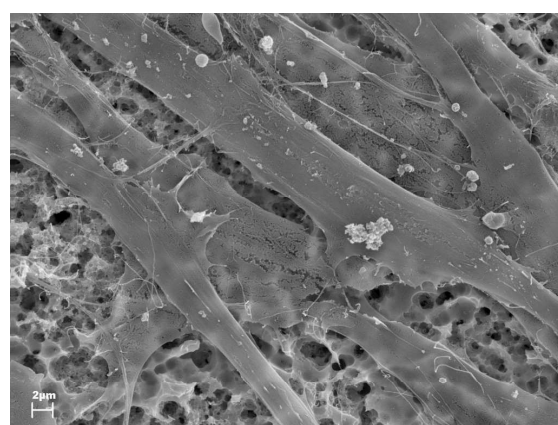
Ryc. 5.22. Obraz SEM powierzchni nanokompozytu Ti-10 % wag. 45S5 bioszklą przed (a) i po (b) trawieniu w 1M  $H_3PO_4$  + 2% HF (10V/ 15min)



Ryc. 5.23. Morfologia osteoblastów po pierwszej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10 wag% 45S5 bioszkło (a).



Ryc. 5.24a. Morfologia osteoblastów po pierwszej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10% wag. 45S5 bioszkło

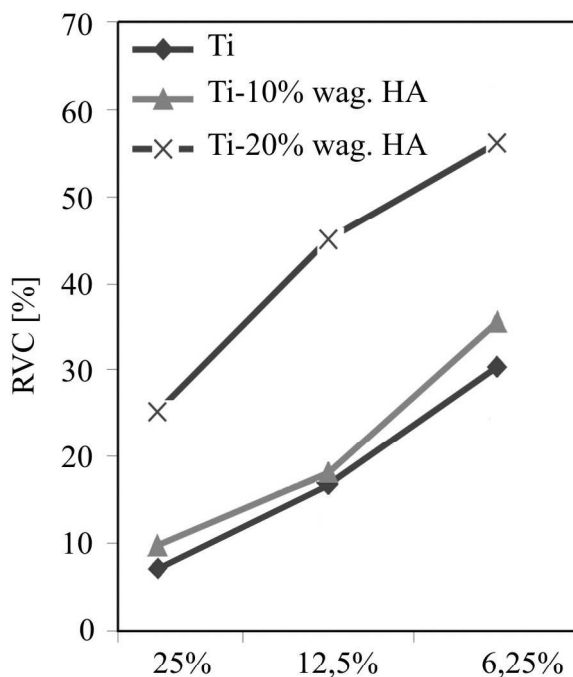


Rys. 5.24b. Morfologia osteoblastów po piątej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10% wag. 45S5 bioszkło

### 5.6.2. Test żywotności komórek w kondycjonowanym medium

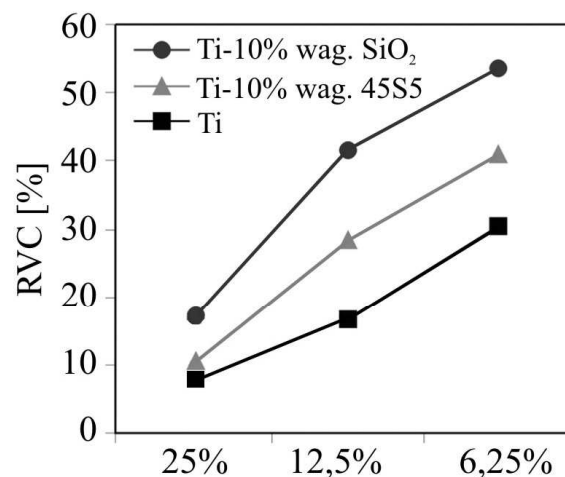
Na podstawie badań do oceny cytotoksyczności, przeprowadzonych w warunkach dynamicznych, wyznaczono względne wartości żywotności komórek (RVC) wyrażone w procentach wobec wartości kontroli dodatniej (rycina 5.25). Dynamika wzrostu komórek jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia stężenia kondycjonowanego medium. Żywotność komórek na powierzchni nanokompozytu Ti-20% wag. HA jest

znacznie większa niż na powierzchni nanokompozytu Ti-10% wag. HA i mikrokrystalicznego tytanu.



Ryc. 5.25. Żywotności komórek (RVC) dla nanokompozytów Ti-HA i mikrokrystalicznego Ti w warunkach dynamicznych

Nanokompozyt zawierający 10% wag.  $\text{SiO}_2$  (jak i 10% wag. 45S5 bioszkło) również charakteryzuje się większą żywotnością komórek w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem (rycina. 5.26). Wyniki badań hodowli w kondycjonowanym medium obejmowały także pomiar stężenia metali w próbkach medium (tabela 5.8). Stwierdzono obecność znacznej ilości jonów wapnia ułatwiających tworzenie tkanki kostnej. Ich zawartość jest większa w serii rozcieńczeń medium nanokompozytu Ti-10% wag. HA w porównaniu z medium mikrokrystalicznego tytanu.



Ryc. 5.26. Żywotności komórek (RVC) dla nanokompozytów Ti-10% wag. SiO<sub>2</sub>, Ti-10 % wag. 45S5 Bioszkło i mikrokrystalicznego Ti w warunkach dynamicznych

**Tabela 5.8**

Zawartości pierwiastków we frakcjach dla nanokompozytu Ti-10% bioceramika i mikrokrystalicznego tytanu

pierwiastek	materiał			
	Ti [mg/l]	Ti-10% wag. HA [mg/l]	Ti-10% wag. SiO <sub>2</sub> [mg/l]	Ti-10% wag. 45S5 bioszkło [mg/l]
Ca	64±8	82±11	73±10	81±8
P	0	0	0	0
Ti	<DL	<DL	<DL	<DL

< DL – stężenie poniżej granicy wykrywalności

## 6. DYSKUSJA

Tytan i jego stopy są szeroko stosowane w aplikacjach medycznych. Stopy tytanu o przeciętnej gęstości  $4.5 \text{ g/cm}^3$  i wytrzymałości na rozciąganie 1300 MPa uzyskują wytrzymałość właściwą tj. wytrzymałość odniesioną do ciężaru właściwego i wyrażoną w jednostkach długości na poziomie 30 000 m [71]. Wynik ten sytuuje stopy tytanu nieco poniżej kompozytów Kevlar/żywica epoksydowa z wartościami około 35 000 m a powyżej stali stopowych, które uzyskują wartości 30 000 m.

Inną cechą, która wyróżnia tytan i jego stopy jest odporność korozyjna. W zastosowaniach medycznych dodatkowo eksponuje się również moduł sprężystości. Jest on bliższy modułom sprężystości kości,  $0.27 \cdot 10^5 \text{ MPa}$ , aniżeli stali,  $2 \cdot 10^5 \text{ MPa}$  [72]. Pomimo, że wytrzymałość tytanu w gatunku Grade 1 na rozciąganie wynosi tylko 500 MPa, to ma zastosowanie jako materiał na implanty, ponieważ wykorzystuje się jego najlepszą odporność korozyjną. Ważnym problemem jest jeszcze za duży moduł sprężystości, który dla tytanu i jego stopów osiąga wartości na poziomie  $1 \cdot 10^5 \text{ MPa}$ . Są one zatem wyższe od modułów tkanki kostnej i dlatego w implantologii stosuje się tytan porowaty [71].

Jednym z głównych wyzwań w dziedzinie implantologii jest uzyskanie biomateriałów o polepszonych właściwościach, umożliwiających prawidłową i długotrwałą współpracę implantu z kością i otaczającymi tkankami.

Sposobem pozwalającym na zmianę właściwości biologicznych stopów tytanu jest wykorzystanie materiałów bioceramicznych [4, 14, 66, 97, 100]. Nanoszenie tworzyw ceramicznych na powierzchnie implantów metalicznych stanowi uznane już rozwiązanie w implantologii. Często jednak powłoki są niejednorodne pod względem grubości, składu chemicznego i fazowego, a siła adhezji do metalicznego podłoża jest niewystarczająca. Dlatego lepszym pomysłem wydaje się wykorzystanie nowej koncepcji zmierzającej do uzyskania kompozytów metalowo-bioceramicznych. Materiał łączyłby korzystne właściwości wytrzymałościowe tytanu z doskonałą biokompatybilnością i bioaktywnością bioceramiki, charakteryzując się jednorodnością oraz zamkniętymi i otwartymi porami w całej objętości.

Duże nadzieje na poprawę właściwości materiałów wiąże się z kształtowaniem ich mikrostruktury w skali nanometrycznej. Celem licznych prac badawczych z zakresu nanonauka, nanotechnologia jest opracowanie, wytworzenie i komercjalizacja nowych

materiałów/kompozytów metalicznych i ceramicznych o strukturze nanometrycznej [42, 53-56]. Odpowiedni skład i struktura wpływają na poprawę właściwości, szczególnie wytrzymałościowych i umożliwiają uzyskanie nowych produktów o lepszych parametrach funkcjonalnych.

Nanomateriały charakteryzują się strukturą, której elementy, w szczególności ziarna, mają rozmiar przynajmniej w jednym kierunku mniejszy niż 100 nm [132]. W opinii wielu naukowców atrakcyjność nanomateriałów wynika z ich unikatowych właściwości niemożliwych do osiągnięcia w przypadku zastosowania konwencjonalnych procesów technologicznych. Z tego powodu, należy oczekiwać, że nano-metale, nanokompozyty metalowo-bioceramiczne staną się wyznacznikiem innowacyjności. Upowszechnienie nanobiokompozytów w medycynie uwarunkowane jest jednak postępem technologicznym w zakresie metod ich otrzymywania.

Problem syntezy biomateriału o nanometrycznej wielkości porów na całej powierzchni tj., strukturze stymulującej szybsze wrastanie tkanki kostnej i większą siłę adhezji z implantem, jest przedmiotem intensywnych badań naukowych [1, 24, 28, 114, 120, 136].

W ostatniej dekadzie uzyskano szereg dowodów eksperymentalnych i teoretycznych wskazujących na jakościowo nowe właściwości tworzyw z nanostrukturą [2, 15, 23, 49, 69, 74, 75, 121, 149, 152]. Zastosowanie niekonwencjonalnych metod wytwarzania nanomateriałów pozwala uzyskać materiały o składach fazowych nieosiągalnych metodami tradycyjnymi. Z kolei połączenie wysokiej zgodności biologicznej materiałów ceramicznych i szklano-ceramicznych (np. hydroksyapatyt (HA), krzemionka ( $\text{SiO}_2$ ), bioszkło (np. 45S5)) z bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi metali wydaje się dobrym rozwiązaniem, umożliwiającym wytworzenie biomateriałów o porowatej strukturze (rozwinętej powierzchni) w całej objętości.

Powyższe rozważania skłoniły do podjęcia badań w tym kierunku [53, 54, 55, 56, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94]. Opracowanie podstaw technologii otrzymywania nanomateriałów kompozytowych na bazie tytanu i bioceramiki pozwoliło stworzyć materiały, które mogą w przyszłości zostać wykorzystane do produkcji implantów stomatologicznych.

Optymalizacja składu chemicznego i fazowego nanokompozytów wpływa znacząco na właściwości syntetyzowanych materiałów. Obiektami badań były nanokompozyty na bazie tytanu z różnym udziałem wagowym bioceramiki resorbowalnej i z kontrolowaną

reaktywnością.

Przeprowadzono zarówno badania struktury otrzymanych materiałów jak i badania fizykochemiczne, wytrzymałościowe, korozyjne i biologiczne.

Otrzymano lite nanokompozyty o różnym składzie chemicznym. Wszystkie materiały zostały wytworzone metodą mechanicznej syntezy. Materiałem wyjściowym były mikrokrystaliczne proszki metalu i bioceramiki o czystości większej niż 99,8%.

Przeprowadzona na różnych etapach procesu wytwarzania kompozytów analiza rentgenowska wykazała, że proces mechanicznej syntezy pozwala na amorfizację materiału. W wyniku obróbki cieplnej, otrzymano strukturę heksagonalną. Na tym etapie wielkość ziarna obliczona ze wzoru Scherrer'a, w zależności od składu chemicznego stopu, wynosiła od 25 do 50 nm.

Zdjęcia z mikroskopu SEM pokazują, że podczas trwania mechanicznej syntezy tworzyły się struktury warstwowe, które ulegały rozdrobnieniu. Otrzymany materiał zbudowany jest z aglomeratów mniejszych cząstek. Przy większym powiększeniu widać, że badane nanokompozyty posiadają pory, powstałe w wyniku prasowania na zimno materiału proszkowego. Udział procentowy porów oszacowany na podstawie zdjęć z mikroskopu optycznego, w zależności od składu chemicznego, wynosił od 8 do 22%.

Niezależne badania składu fazowego kompozytów typu Ti (30-70 obj. %)-HA(60-20 obj. %)-45S5 bioszkło(10 obj. %) otrzymanych metodą metalurgii proszków, przeprowadzili Ning i Zhou [97]. W kompozycie z najmniejszą zawartością tytanu (Ti30HA60bioszkło10) występowały następujące fazy:  $\text{CaTiO}_3$ ,  $\text{CaO}$  i  $\text{Ti}_x\text{P}_y$ . Wzrost zawartości tytanu w kompozycie do 50 obj. % skutkuje pojawieniem się  $\text{Ti}_2\text{O}$  i  $\alpha\text{-Ti}$ . Dla zawartości tytanu 70 obj.% podstawową fazą występującą w kompozycie Ti (70)-HA(20)-Bioszkło(10) był tylko  $\alpha\text{-Ti}$ . Przedstawione wyniki moich badań są zgodne z danymi zawartymi w pracy Ning i Zhou.

Modyfikacja mikrostruktury kompozytów tytan-ceramika przez zastosowanie niekonwencjonalnej metody jaką jest proces mechanicznej syntezy, umożliwiła zmniejszenie wielkości ziarna do rozmiarów nanometrycznych. Zsyntetyzowane materiały składały się z matrycy tytanowej, w której znajdowały się równomiernie rozmieszczone nanocząstki ceramiczne. Zapewniło to znaczne wzmocnienie materiału i uzyskanie znacznie wyższej twardości w porównaniu z czystym mikrokrystalicznym tytanem. Największym wzrostem mikrotwardości Vickersa odznaczał się nanokompozyt zawierający 10% wag. HA (1500 HV0.2). Uzyskana wartość była sześciokrotnie większa od twardości mikrokrystalicznego



tytanu (250 HV0.2). Najmniejszy wzrost twardości, prawie tylko dwukrotny w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem, uzyskano w badaniu nanokompozytu Ti-3% wag. HA, najprawdopodobniej z powodu znacznej porowatości tego materiału. Podobne wyniki mikrotwardości osiągnięto również dla nanokompozytów Ti-3%, 10% wag. SiO<sub>2</sub> i Ti-10% wag. bioszkło 45S5, dla których mikrotwardość wzrosła ponad 2-krotnie w porównaniu z litym mikrokrystalicznym tytanem. Rozdrobnienie ziarna do skali nanometrycznej wpływa na wzrost mikrotwardości. Niezależne badania bezniklowych austenitycznych stali nierdzewnych z nanostrukturą o składzie Fe<sub>54</sub>Cr<sub>24</sub>Mn<sub>21</sub>Mo<sub>1</sub>N wykazały, że materiał charakteryzował się mikrotwardością 520 HV0.2 [128, 129]. Porównując tę wartość do mikrotwardości uzyskiwanych przez stale 316L (248 HV0.2), można zauważyć znaczącą różnicę. Niewątpliwie znaczny wzrost twardości syntetyzowanych materiałów nanokompozytowych jest bezpośrednio związany z uzyskaną nanostrukturą. Z dotychczas opublikowanych badań wynika, że dla mikrokrystalicznych kompozytów, o podobnym składzie chemicznym, wytwarzanych metodą metalurgii proszków, tak znaczny wzrost twardości nie był obserwowany [97, 98].

Mając na uwadze przyszłe zastosowania tego typu nanokompozytów, powinny one charakteryzować się modułem sprężystości jak najbardziej zbliżonym do modułu sprężystości kości. Spadek wartości modułu sprężystości wszystkich badanych biomateriałów przeznaczonych do produkcji implantów w porównaniu z metalicznym tytanem jest bardzo korzystny.

Wprawdzie omówione dotąd właściwości mechaniczne, takie jak mikrotwardość i moduł Younga wszystkich przygotowanych metodą mechanicznej syntezy nanomateriałów, wskazują na poprawę tych właściwości, to jednak przeznaczenie materiałów jako produktu wyjściowego do wytwarzania implantów, wymaga sprawdzenia właściwości ważnych z biologicznego punktu widzenia. Jednym z istotnych parametrów wymaganych w zastosowaniach medycznych jest jak najwyższa odporność korozyjna. W przypadku badanych materiałów testy korozyjne przeprowadzono w płynie Ringera. Wartości gęstości prądu korozyjnego zmieniały się nieznacznie w zależności od składu chemicznego, jednakże zaobserwowano ogólną tendencję do spadku tych wartości, nawet o 2 rzędy wielkości w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem. Obliczone wartości szybkości korozji dla nanokompozytów Ti-10% wag. SiO<sub>2</sub> i Ti-10% wag. HA to odpowiednio 0,000001 i 0,000004 mm/rok, co oznacza znaczny spadek w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem (0,000363 mm/rok). Polepszenie odporności korozyjnej tłumaczyć można obecnością fazy

ceramicznej. Wyższa odporność korozyjna przekłada się na dużo lepsze zachowanie materiału w środowisku tkankowym, a co za tym idzie wyższą biogodność. W próbie statycznej, biogodność kompozytów Ti-bioceramika z nanostrukturą jest porównywalna do powszechnie stosowanego w medycynie mikrokrystalicznego tytanu, natomiast w przypadku badań dynamicznych, względna żywotność komórek (RVC) jest większa.

Przeprowadzone analizy wykazały także, że właściwości mechaniczne i korozyjne nanomateriałów na bazie tytanu i ceramiki w dużym stopniu zależą od parametrów procesu technologicznego jak i udziału wagowego fazy ceramicznej.

Badania wpływu udziału ceramiki na właściwości kompozytów udowodniły, że zarówno zbyt mały (<3% wag.) jak i zbyt duży udział fazy ceramicznej (>50% wag.) nie wpłynął znacząco na właściwości nanokompozytów. Analizując łącznie badane parametry, najlepszymi właściwościami mechanicznymi i korozyjnymi cechowały się kompozyty zawierające 10 lub 20% wag. fazy ceramicznej. Te spostrzeżenia odnoszą się zarówno do kompozytu zawierającego ceramikę resorbowalną jak i posiadającego w swym składzie ceramikę z kontrolowaną reaktywnością.

Wytworzone bionanokompozyty Ti–ceramika, w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem, cechują się znaczną twardością, stosunkowo małym modułem Younga, dobrą odpornością korozyjną [53, 54, 56, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94]. Bardziej porowata struktura, zgodnie z badaniami prowadzonymi w wielu ośrodkach naukowych, najprawdopodobniej sprzyja silniejszemu połączeniu z tkanką kostną [139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148]. Umożliwia aktywny rozwój tkanki kostnej i sieci naczyń krwionośnych. Pomimo polepszonych właściwości mechanicznych i odporności korozyjnej, o przydatności w praktycznym zastosowaniu badanych nanokompozytów, decydować powinny wyniki testów biologicznych.

Do testów biokompatybilności użyto próbek nanokompozytów Ti- 10% wag. bioceramika ze względu na najlepsze właściwości mechaniczne i odporność korozyjną. Ocena rozwoju osteoblastów na powierzchni kompozytów polerowanych jak i po modyfikacji wierzchniej w wyniku trawienia elektrochemicznego, została wykonana po upływie pierwszej i w piątej dobie.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że osteoblasty rosnące na próbkach wykonanych z nanokompozytów Ti-bioceramika zarówno resorbowalna jak i z kontrolowaną reaktywnością, po pierwszej dobie wykazywały cechy adhezji do powierzchni materiału, a po pięciu dobach zwiększone pokrycie powierzchni. Zebrany materiał ujawniał

różnice w obrazie morfologicznym komórek. Po pierwszej dobie, obserwowano komórki o kształtach sferycznych, o mniejszej powierzchni przylegania, lecz z bardziej rozwiniętymi filopodiami. Zdolność do adhezji i wzrostu na materiale porowatym jest cechą osteoblastów. Potwierdzają to Webster i współpracownicy. Autorzy zbadali wpływ mikrostruktury, topografii powierzchni serii biomateriałów na procesy metabolizmu ludzkich osteoblastów (CRL-11372) [136, 138, 139, 140]. Wykazali, że nanostruktura metali i stopów przyspiesza proces adhezji osteoblastów i stymuluje tym samym odbudowę podstawy kości. W porównaniu z mikrokystalicznymi biomateriałami wykazali, że więcej fosforu i wapnia odkłada się podczas hodowli osteoblastów na próbkach z nanostrukturą.

Na podstawie analizowanych obrazów widać, że po pięciodobowej hodowli komórki rosnące na polerowanych próbkach pokrywały większą powierzchnię w polu obrazowym w stosunku do osteoblastów proliferujących na strukturach porowatych. Bez zobrazowania jąder komórkowych nie było możliwe stwierdzenie czy jest to efekt różnic morfologicznych czy też relatywnie mniejszej powierzchni przylegania, dostępnej na polerowanych próbkach. Inaczej mówiąc, na podstawie zebranych obrazów można zakładać, że komórki rosnące na materiale porowatym wykorzystywały trójwymiarowe rozwinięcie powierzchni, dzięki czemu w rzucie prostopadłym do płaszczyzny materiału miały mniejszą powierzchnię.

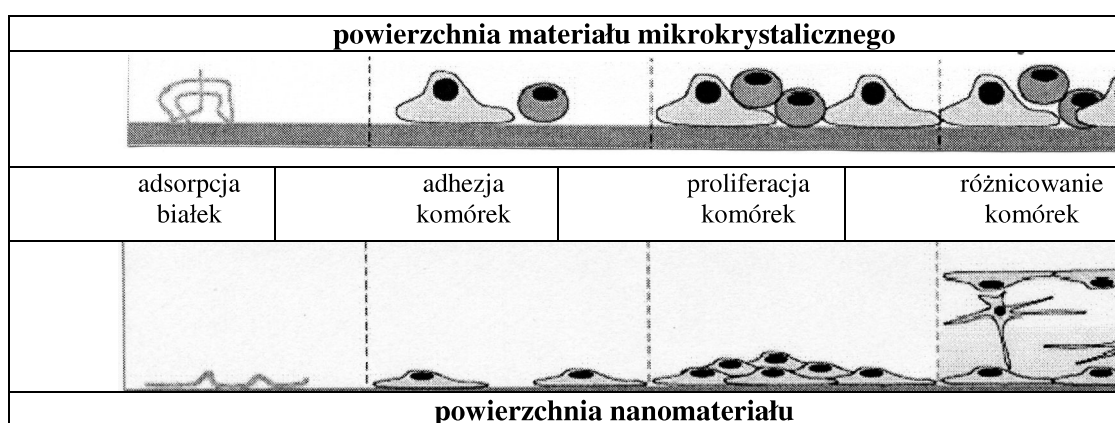
Odnosząc uzyskane wyniki do warunków naturalnych można przyjąć zgodnie z sugestią Webstera i współpracowników [147, 160], że kość jest pewnego rodzaju nanokompozytem, składającym się z miękkiej hydrożelowej matrycy na bazie białek (kolagen, laminina, fibronektyna, vitronektyna oraz woda) oraz z twardego nieorganicznego komponentu (hydroksyapatytu). Aż 70% matrycy kości stanowi nanokystaliczny hydroksyapatyt [146].

Poza podobieństwem struktury między kością a nanokompozytem, nanomateriały wykazują, podobnie jak kość, wyjątkowe właściwości takie jak topografia powierzchni, jej skład chemiczny, zwilżalność i energia powierzchni [160]. Nanokompozyty charakteryzują się bowiem znacznie zwiększoną powierzchnią i chropowatością w porównaniu z konwencjonalnymi materiałami [160]. Wiadomo również, iż właściwości powierzchni materiału mają wpływ na adsorpcję specyficznych protein jak i na zachowanie komórek prowadząc w konsekwencji do regeneracji tkanek w pierwszej fazie kontaktu bionanomateriału z tkankami gospodarza [64]. Dostateczna osteointegracja pomiędzy syntetycznym materiałem oraz tkanką kostną jest ważnym kryterium w projektowaniu biomateriału.

Biokompatybilność biomateriałów jest ściśle związana z zachowaniem komórkowym w kontakcie z nimi oraz w szczególności z adhezją komórkową do ich powierzchni [3]. Pojęcie ‘adhezji’ w aspekcie biomateriałów obejmuje wiele zjawisk [77]: fazę łączenia, która następuje gwałtownie i związana jest z fizykochemicznymi wiązaniami pomiędzy komórkami i materiałem oraz fazę adhezji, która związana jest z licznymi molekułami biologicznymi.

Badania licznych autorów wykazały, że materiały z nanostrukturą, czyli z powierzchnią sprzyjającą adhezji komórek, promują liczne interakcje specyficznych białek, tym samym efektywniej stymulują tworzenie nowej kości w porównaniu z konwencjonalnymi materiałami [25, 143, 147].

Obecnie, w leczeniu implantologicznym dostrzega się tendencje wykorzystania implantów z powierzchnią nanostrukturalną. Istnieją przekonujące dowody, że charakter powierzchni implantu jest czynnikiem wpływającym na tempo i zakres osteointegracji [8, 19, 85, 86]. Według Mendonca i jego współpracowników, powierzchnia z nanostrukturą posiada unikatowe właściwości, które wpływają na adhezję komórkową poprzez bezpośrednie (interakcja komórka-powierzchnia) i pośrednie (interakcje białko-powierzchnia) mechanizmy [5, 67, 85, 154]. Wymienieni autorzy przeanalizowali wpływ nanotopografii na zachowanie różnych rodzajów komórek, w tym komórek nabłonka, fibroblastów, miocytów i osteoblastów.



Rys. 6.1. Porównanie wpływu struktury powierzchni na adsorpcję białek i zachowanie komórek [85]

Mendonca i współpracownicy, zmierzając do poprawy osteointegracji, przeprowadzili badania wpływu nanotopograficznej modyfikacji powierzchni tytanu na to zjawisko [85]. Liczne zmiany w adsorpcji białek komórkowych, wynikające z zastosowanej

modyfikacji przedstawiono na rys. 6.1. Panuje przekonanie, że zmiany interakcji białko-powierzchnia, warunkują adhezję osteoblastów [4]. Gdy implanty kontaktują się ze środowiskiem biologicznym, adsorpcja białek (np. fibronektyna z osocza) następująca natychmiastowo, doprowadza konsekwentnie do przyłączenia komórek a dalej ich proliferacji. Zmiana energii powierzchni lub zwilżalności biomateriału, również prowadzą do zmiany oddziaływania komórek z powierzchnią [4].

Webster wraz ze współpracownikami [143, 145, 147] zaobserwowali wzmożoną adhezję osteoblastów do biomateriałów z nanostrukturą: Ti, Ti6Al4V i CoCrMo, w porównaniu z konwencjonalnymi materiałami. Badane materiały posiadały podobny skład chemiczny, różniły się tylko stopniem nanometrycznej szorstkości. Stwierdzono, iż osteoblasty przyłączały się w szczególności na granicy cząstek. Dużą liczbą granic cząstek na powierzchni nanomateriałów, w porównaniu do powierzchni konwencjonalnych materiałów, tłumaczyć można zwiększoną liczbę przyłączonych osteoblastów do nanometrycznej powierzchni.

Przeprowadzone badania biokompatybilności nanokompozytów tytan-bioceramika, obejmujące ocenę adhezji osteoblastów, wymagają dalszych etapów. Do weryfikacji potencjałów proliferacyjnych osteoblastów na polerowanej oraz modyfikowanej powierzchni badanych nanokompozytów typu Ti-ceramika, przydatne byłyby także badania parametrów biochemicznych np.: test aktywności alkalicznej fosfatazy, ekspresja molekuł adhezyjnych na powierzchni osteoblastów (integryny), zdolność do mineralizacji. Wyniki przeprowadzonego równoległe z badaniem biokompatybilności testu cytotoksyczności kondycjonowanego medium pokazują, że intensywność proliferacji osteoblastów w rozcieńczonym medium, kondycjonowanym próbkami mikrokrystalicznego tytanu i nanokompozytów Ti-bioceramika nie różnią się istotnie. Z drugiej strony, wyniki badań wskazują na stymulujący proliferację osteoblastów wpływ nanostrukturalnego rozwinięcia powierzchni próbki. Widoczne jest to w szczególności przy porównaniu próbki tego samego kompozytu polerowanego i po trawieniu elektrochemicznym. Obie próbki miały identyczny skład, natomiast różniły się stanem powierzchni. Porowatość struktury materiału Ti-bioceramika, miała wyraźnie korzystny wpływ. Z kolei osteoblasty na próbce polerowanej w niewielkim stopniu wykształciły filopodia i w większości zachowały sferyczny kształt. Na powierzchni próbek wykonanych z żelaza armco ujawniły się strąty krystaliczne a materiał wykazywał cechy korozji.

Podsumowując, uzyskane w niniejszej pracy wyniki testów biologicznych wskazują,

że nanokompozyty Ti-bioceramika mają porównywalne parametry biokompatybilności (adhezję, proliferację na powierzchni inseratu oraz dynamikę wzrostu w kondycjonowanym medium) do mikrokystalicznego tytanu. Charakterystyka adhezji i proliferacji na porowatej powierzchni świadczy o tym, że przygotowanie w ten sposób materiału korzystnie wpływa na adhezję osteoblastów. Ocena ich proliferacji (na podstawie oceny pokrycia powierzchni), w porównaniu z proliferacją na materiałach polerowanych wskazuje na mniejsze jej tempo. Należy tutaj jednak uwzględnić różnice w morfologii komórek na obu typach powierzchni.

Właściwości powierzchni biomateriału mają wpływ na adhezję komórkową i kolejne reakcje komórek, takie jak proliferacja, migracja, ułożenie cytoszkieletu, różnicowanie i apoptoza [77, 100]. W szczególności, duża liczba badań skupia się na ocenie adhezji komórkowej na różnych powierzchniach. Wynika z nich, że zarówno adhezja jak i zachowanie komórek zależą od właściwości materiału, między innymi od składu chemicznego materiału, ładunku powierzchni, zwilżalności, szorstkości oraz rozmiaru powierzchni cytolubnej [66, 97]. Zrozumienie mechanizmów odpowiedzi komórek na sygnały chemiczne, fizyczne oraz biologiczne z powierzchni materiału, ułatwi tworzenie nowych biomateriałów o kontrolowanym zachowaniu komórek [66].

Przeprowadzone badania miały na celu uzyskanie kompozytów na osnowie tytanu z dodatkiem bioceramiki (hydroksyapatyt, krzemionka, 45S5 bioszkle) o znacznym rozdrobnieniu krystalitów do zakresu nanokystalicznego. W doborze materiałów do badań uwzględniono biokompatybilność obydwu składników. Koncepcja uzyskania odpowiedniej wytrzymałości mogła zostać zrealizowana dzięki nanokystalicznej osnowie tytanowej a lepszej biozgodności dzięki zawartości bioceramiki. Ze względu na różnice właściwości chemicznych i mechanicznych bioceramiki i tytanu połączenie obydwu materiałów nie jest jednak sprawą łatwą. Metoda mechanicznej syntezy zastosowana w przedstawionych badaniach do połączenia obydwu materiałów i rozdrobnienia krystalitów, jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, nie była dotychczas stosowana.

Proponowana technologia otrzymywania nanomateriałów kompozytowych na bazie tytanu i bioceramiki pozwoliła na syntetyzowanie materiałów, które mogą być w przyszłości wykorzystane do produkcji implantów stomatologicznych. Właściwości mechaniczne, odporność korozyjna i zgodność biologiczna opracowanych nowych biomateriałów, wskazują na możliwość wykorzystania w praktyce, po poddaniu ich kolejnym etapom badań biologicznych.

Biomateriały o strukturze nanokystalicznej, tytan-bioceramika, stal bezniklowa/HA

są obecnie przedmiotem dalszych badań, zmierzających do opracowania nanokompozytów porowatych. Daje się zauważyć zainteresowanie tego typu materiałami ośrodków naukowych krajowych i zagranicznych.

## 7. WNIOSKI

Niekonwencjonalna metoda wytwarzania materiałów, mechaniczna synteza, jest technologią umożliwiającą produkcję materiałów o składach fazowych nieosiągalnych metodami tradycyjnymi. Wynikiem zrealizowanych w ramach pracy zadań są sformułowane poniżej wnioski:

- proces mechanicznej syntezy umożliwia otrzymanie biomateriałów kompozytowych o nanokrystalicznej strukturze,
- w trakcie procesu mechanicznej syntezy mikrostruktura mielonego materiału ulega znacznemu rozdrobieniu, wynikiem czego jest otrzymanie amorficznych materiałów proszkowych; obróbka cieplna powoduje ich krystalizację a wielkość ziarna po procesie spiekania jest mniejsza od 50 nm,
- sterując parametrami procesu technologicznego (między innymi czasem trwania procesu, ciśnieniem prasowania, temperaturą i czasem obróbki cieplnej) można modelować właściwości syntetyzowanych nanokompozytów,
- otrzymane nanokompozyty zbudowane są z osnowy tytanowej, w której rozmieszczone są nanocząstki fazy ceramicznej,
- nanokompozyt Ti-10% wag. HA charakteryzuje się najwyższym wzrostem twardości w porównaniu do mikrokrystalicznego tytanu,
  - nanokompozyty Ti-HA wykazują spadek wartości modułu sprężystości, co jest cechą korzystną,
  - nanokompozyty charakteryzują się wysoką odpornością korozyjną; prąd korozyjny jest o dwa, trzy rzędy wartości mniejszy w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem,
  - badania biotolerancji w warunkach statycznych nie wykazały istotnych różnic w morfologii komórek na powierzchniach nanokompozytów Ti-bioceramika i mikrokrystalicznego tytanu, natomiast struktury porowate zapewnią lepszą osteointegrację,
  - struktury porowate zapewniają lepszą osteointegrację,
  - żywotność komórek na powierzchni nanokompozytu zawierającego 10-20% wag. HA lub 10% wag. SiO<sub>2</sub> czy 10% wag. 45S5 bioszklą jest większa w porównaniu z mikrokrystalicznym tytanem.



## Streszczenie

Obecnie, tytan i stopy tytanu są bardzo popularnymi materiałami stosowanymi w aplikacjach medycznych. Materiały te posiadają wiele zalet, między innymi małą gęstość i zadowalające właściwości mechaniczne. Charakteryzują się także znaczną odpornością korozyjną i dobrą biokompatybilnością. Ostatnie badania kliniczne wykazują jednak, że obecność jonów tytanu może powodować alergię i reakcje okołowszczepowe w międzywarstwie implant–kość, a przez to przyczyniać się do destabilizacji endoprotez po dłuższym okresie użytkowania. Inną wadą tytanu i jego stopów są słabe właściwości tribologiczne wynikające z małej twardości materiału. Jednym ze sposobów, pozwalających na zmianę właściwości biologicznych stopów tytanu jest wytwarzanie kompozytów, które będą łączyć korzystne właściwości wytrzymałościowe tytanu z doskonałą biokompatybilnością i bioaktywnością ceramiki. Na szczególną uwagę zasługuje ceramika hydroksyapatytowa ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), która posiada, spośród wszystkich rodzajów bioceramiki, największą biotolerancję. Wynika to między innymi z faktu, że skład chemiczny i fazowy HA jest podobny do składu substancji nieorganicznej kości i zębów. Poza tym, hydroksyapatyt ma porowatą strukturę, która ułatwia wrastanie tkanki kostnej w implant. Niestety, niskie właściwości wytrzymałościowe HA, w porównaniu z właściwościami kości, znacznie ograniczają jego samodzielne zastosowanie.

Z tych też powodów, wydaje się, że uzupełniające się właściwości biomateriałów ceramicznych i metalicznych stanowią dobrą bazę do konstruowania implantów kompozytowych o właściwościach bardziej dostosowanych do wymagań eksploatacyjnych.

W pracy zastosowano technologię mechanicznej syntezy i konsolidacji proszków do wytworzenia nanokompozytów typu Ti–bioceramiki (hydroksyapatyt,  $\text{SiO}_2$ , Bioszkło 45S5) o różnym udziale wagowym (3, 10, 20 i 50%). Zbadano właściwości strukturalne, mechaniczne, korozyjne, biologiczne nanokompozytów i porównano je z właściwościami mikrokrystalicznego tytanu. Skład chemiczny i fazowy oraz mikrostrukturę badano przy użyciu dyfrakcji promieni rentgenowskich, transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz skaningowego mikroskopu elektronowego wyposażonego w mikroanalizator rentgenowski. Ponadto, zbadano biokompatybilność kompozytów w hodowli komórek ludzkich osteoblastów.

Badania wykazały, że nanokompozyty typu Ti–HA zbudowane są głównie z cząstek bioceramik rozłożonych w osnowie tytanowej. Przykładowo, mikrotwardość Vickersa dla nanokompozytu Ti–10% wag. HA wynosi 1500 HV<sub>0,2</sub> (dla tytanu – 250 HV<sub>0,2</sub>), moduł sprężystości 127 GPa (dla tytanu – 153 GPa) a gęstość prądu korozyjnego i potencjału korozyjnego badane w płynie Ringera w 37°C i charakteryzujące odporność korozyjną materiału, wynoszą odpowiednio  $I_{kor} = 1,19 \cdot 10^{-7} \text{ A/cm}^2$ ,  $E_{kor} = -0,41 \text{ V}$  ( dla tytanu  $I_{kor} = 1,31 \cdot 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ ,  $E_{kor} = -0,36 \text{ V}$ ).

Przeprowadzone badania wykazały, że właściwości mechaniczne i korozyjne nanomateriałów na bazie tytanu i bioceramiki w dużym stopniu zależą od warunków procesu technologicznego jak i udziału wagowego fazy ceramicznej.

Opracowana technologia prowadzi do otrzymania kompozytów typu Ti–bioceramika o nanometrycznej wielkości ziarna. Uzyskane bionanokompozyty Ti–bioceramika cechują się znaczną twardością, stosunkowo małym modułem Younga, dobrą odpornością korozyjną i biotolerancją. Charakteryzują się podobną biokompatybilnością do mikrokryształicznego tytanu, a modyfikacja powierzchni nanokompozytów sprzyja adhezji osteoblastów. Z uwagi na swoje właściwości mogłyby stanowić materiał do produkcji implantów stomatologicznych lub elementów endoprotez stawowych po przeprowadzeniu kolejnych etapów badań biologicznych

## Summary

At present, titanium and titanium alloys are attractive materials for biological applications. Ti and its alloys present clear advantages, such as low density and satisfactory mechanical properties. Titanium materials are resistant to corrosion because of the stable passivity of the surface oxide film. Apart from that, titanium and titanium alloys are generally regarded to have good biocompatibility, although they can degrade upon interaction with body fluids. In addition, metal implants may loose and even separate from surrounding tissues during implantation. Titanium and titanium based alloys have relatively poor tribological properties because of their low hardness. One of the methods that allows the change of biological properties of Ti alloys is to produce a composite, which will exhibit the favorable mechanical properties of titanium and excellent biocompatibility and bioactivity of ceramic. From the point of view of biocompatibility hydroxyapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) seem to be the most suitable ceramic for hard tissue replacement. Chemical and crystallographic structure of HA is similar to that of living bone. Additionally, HA has porous nature and the ability to bond to bone directly. Unfortunately, the HA cannot presently be used for load bearing applications, because of its poor mechanical properties regarding to natural bone.

For this reason, nanocomposite materials containing titanium and ceramic as a reinforced phase are promising alternatives to conventional materials because they can be potentially designed to match the properties of bone tissue in order to enhance patients' quality of life.

In this work, titanium matrix nanocomposites with different content of bioceramic (hydroxyapatite,  $\text{SiO}_2$ , Bioglass 45S5; 3, 10, 20 and 50 wt%) were fabricated by mechanical alloying and powder metallurgical process. The structure, mechanical, corrosion properties and biocompatibility of the composites were investigated and compared with properties of microcrystalline titanium. X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscope (SEM) and energy dispersive spectrometry (EDS) techniques were used to study the microstructure and the chemical composition of the produced samples. Additionally, the biocompatibility of the nanocomposites was investigated studying the behaviour of Normal Human Osteoblast (NHObst) cells.

The studies showed, that Ti–bioceramic nanocomposites mainly consist of ceramic particles reinforced with titanium matrix. Different phase constitutions have significant influence on the mechanical and corrosion properties of sintered materials. For example: Vickers microhardness of Ti–10 wt% HA nanocomposite is 1500 HV0.2 (pure Ti metal – 250 HV0.2), Young's modulus is 127 GPa (pure Ti metal – 153 GPa) and corrosion resistance in Ringer solution at 37°C is  $I_{\text{cor}} = 1.19 \cdot 10^{-7} \text{ A/cm}^2$ ,  $E_{\text{cor}} = -0.41 \text{ V}$  for Ti-10 vol% HA and  $I_{\text{cor}} = 1.31 \cdot 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ ,  $E_{\text{cor}} = -0.36 \text{ V}$  for Ti.

The carried out research has shown that the mechanical and corrosive characteristics of nanomaterials based on titanium and bioceramics largely depend on conditions of the technological process and weight ratio of ceramic phase.

Technology has been developed for obtaining Ti-bioceramic composites of nanometric grain size. The produced Ti-bioceramic bionanocomposites, compared with microcrystalline titanium, are characterised by high hardness, relatively small Young modulus, good corrosion resistance and biotolerance. Results showed, that Ti–bioceramic nanocomposites possess comparable biocompatibility with microcrystalline titanium and electrochemically modified surface favours osteoblast adhesion. Due to their characteristics, the bionanocomposites could be used as the biomaterial in the production of dental implants or elements for endoprosthetic joints after further biological tests.

93. Niespodziana K., Jurczyk K., Jurczyk M., The synthesis of titanium alloys for biomedical applications, *Reviews on Advanced Materials Science* 2008, 18, 236.
94. Niespodziana K., Jurczyk K., Jurczyk M., Mechanical and corrosion properties of titanium hydroxyapatite nanocomposites, *Solid State Phenomena* 2009, 151, 217.
95. Niinomii M, Mechanical properties of biomedical titanium alloys, *Materials Science and Engineering A* 1998, 243, 231.
96. Niinomi M., Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Science and Technology of Advanced Materials* 2003, 4, 445.
97. Ning C.Q. , Zhou Y., On the microstructure of biocomposites sintered from Ti,HA and bioactive glass, *Biomaterials* 2004, 25, 3379.
98. Ning C.Q. , Zhou Y, Wang H. L., Lei D. C. T. C, Apatite formation on the surface of a Ti/HA composite in a simulated body fluid, *J. Mater. Sci. Lett.* 2000, 19,1243.
99. Ning C.Q., Zhou Y., In vivo bioactivity of a biocomposite fabricated from HA and Ti powders by powder metallurgy method. *Biomaterials* 2002, 23, 2909.
100. Okada S., Ito H., Nagai A., Komotori J., Imai H., Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia* 2010, 6, 591–597
101. Oliva A., Salerno A., Locardi B., Riccio V., Ragione F.D., Iardino P., Zappia V., Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings, *Biomaterials* 1998, 19, 1019.
102. Ouchi C., Iizumi H., Mitao S., Effect of ultra-high purification and addition of interstitial elements on properties of pure titanium and titanium alloy, *Materials Science and Engineering A* 1998, 243, 186.
103. Peigney A., Laureat Ch., Flahaut E., Rousset A., Carbon nanotubes in novel ceramic matrix nanocomposites, *Ceramics International* 2000, 26, 677.
104. Petruzelka J., Dluhos L., Prusak D., Sochova J., Nanostructured titanium. Application in dental implants, *Sbornik vedeckych praci Vysoke skoly banske – Technicke university Ostrava* 2006, 1, 177.
105. Pohler O.E.M, Unalloyed titanium for implants in bone surgery, *Injury, Int. J. Care Injured* 2000, 31, S-D7.
106. Prado da Silva M.H., Soares G.A., Elias C.N., Lima J.H.C., Schechtman H., Gibson I.R., Best S.M., Surface Analysis of Titanium Dental Implants with Different Topographies *Materials Research, Materials Research* 2000, 3, 3.

107. Rack H.J., Qazi J.I., Titanium alloys for biomedical applications, *Materials Science and Engineering C* 2006, 26, 1269.
108. Richert J., Richert M., Zasadziński J., Korbel A., Mode of plastic deformation of metals and alloys and the equipment for plastic deformation of metals and alloys, Patent PL 1979, nr 181, 693 s.
109. Richert M., Inżynieria nanomateriałów i struktur ultradrobnoziarnistych, Uczelniane Wydawnictwo Naukowo Dydaktyczne AGH, Kraków 2006.
110. Richert M., Nanomaterials produced by the methods of severe plastic deformations, *Archives of Materials Science* 2005, 4, 235.
111. Roco M.C., Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine, *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14, 337.
112. Sahoo S.K., Labhasetwar V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discov Today*, 2003, 8, 1112.
113. Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J., The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007, 3, 20.
114. Sato K.F., Carrasco A., Powell T.G., Murr L.E., Garza K.M., Biological effects of nanoparticulate materials. *Materials Science & Engineering* 2006, C 26, 1421.
115. Sato M., Webster T.J., Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications, *Expert Rev Med Devices*, 2004, 1, 105.
116. Shaffer C., Nanomedicine transforms drug delivery, *Drug Discov Today*, 2005, 10, 1581.
117. Shishkovsky I., Morozov Yu., Smurov I., Nanofractal surface structure under laser sintering of titanium and nitinol for bone tissue engineering, *Applied Surface Science* 2007, 254, 1145.
118. Slavkin H.C., Entering the era of molecular dentistry, *J Am Dent Assoc*, 1999, 130, 413.
119. Smardz L., Smardz K., Jurczyk M., Jakubowicz J., Surface analysis of polycrystalline and nanocrystalline LaNi<sub>5</sub> type alloys, *J. Alloys Comp.* 2000, 313, 192.
120. Smock D., Nano Ceramic Coating Boosts Titanium Implants, *Design News*, October 22, 2007.

121. Sówka E., Leonowicz M., Andrzejewski B., Pomogailo A.D., Dzhardimalieva G.I., Processing and properties of composite magnetic powders containing Co nanoparticles in polymeric matrix, *J. Alloys Compd.* 423 ( 2006) 123-127
122. Stylios G.K., Giannoudis P., Wan T., Applications of nanotechnologies in medical practice. *Injury* 2005, 36S, S6.
123. Stylios G., Wan T., Giannoudis P., Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury* 2007, 38S, S63.
124. Suryanarayna C., Mechanical alloying, *Progr. Mater. Science* 2001, 46, 1.
125. Tulinski M., Jurczyk K., Jurczyk M., Nanoscale nickel-free austenitic stainless steel, *Solid State Phenomena* 2008, 140, 179.
126. Tulinski M., Jurczyk K., Jurczyk M., Nickel-free nanocrystalline austenitic stainless steels, *Materials Science-Poland* 2008, 26, 381
127. Tulinski M., Jurczyk M., Mechanical and corrosion properties of Ni-free austenitic stainless steel/hydroxyapatite nanocomposites, *Solid State Phenomena* 2009, 151, 213.
128. Tuliński M., Jurczyk M., Mechanical and corrosion properties of Ni-free austenitic stainless steels, *Archives of Metallurgy and Materials* 2008, 53, 955.
129. Tulinski M, Jurczyk M., Corrosion resistance of nickel-free austenitic stainless steels/hydroxyapatite composites, *Phys. Status Solidi C* 7, 2010, 7, 1359.
130. Tian T., Jiang D.G., Zhang J.X., Lin Q.L., Fabrication of bioactive composite by developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold, *Materials Science Engineering C* 2008, 28, 51.
131. Unger R.E., Sartoris A., Peters K., Motta A., Migliaresi C., Kundel M., Bulnheim U., Rychly J., Kirkpatrick C.J. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials, *Biomaterials* 2007, 28, 3965.
132. Ure D., Harris J., Nanotechnology in dentistry: reduction to practice, *Dent Update*, 2003, 30, 10.
133. US Patent: 6.993.406. Method for making a bio-compatible scaffold. Issued: January 31, 2006.
134. Vasir J.K., Reddy M.K., Labhassetwar V., Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges, *Curr Nanosci*, 2005, 1, 47.
135. Vassen R., Stöver K., Processing and properties of nanophase ceramics, *J. Materials Processing Technology* 1999, 92-93, 77.

136. Ward B.C., Webster T.J., Increased functions of osteoblasts on nanophase metals. *Materials Science & Engineering C* 2007, 27, 575.
137. Wang K., The use of titanium for medical applications in the USA, *Materials Science and Engineering A* 1996, 213, 134.
138. Webster T.J., Control of osteoblast alignment on nano patterned titanium, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2007, 3, 347.
139. Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R., Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 1999, 20, 1221.
140. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 2000, 21, 1803.
141. Webster T.J., Waid M.C., McKenzie J.L., Price R.L., Ejiogor J.U., *Nanobiotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopedic implants*, *Nanotechnology*, 2004, 15, 48.
142. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R., Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 2000, 21, 1803.
143. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R., Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *J Biomed Mater Res*, 2000, 51, 475.
144. Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R., Enhanced surface and mechanical properties of nanophase ceramics to achieve orthopaedic/dental implant efficacy, *Key Eng Mater*, 2001, 192–195, 321.
145. Webster T.J., Ejiogor J.U., Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo, *Biomaterials*, 2004, 25, 4731.
146. Webster T.J., *Nanophase ceramics: the future orthopedic and dental implant material*, Ying J.Y., (Ed.) *Advances in chemical engineering volume 27: nanostructured materials*, (2001), Academic Press, San Diego, CA. pp. 126
147. Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng* 2001,7,291.
148. Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblast functions on theta delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 2005, 26, 953.
149. Wei J., Chen Q.Z., Stevens M.M., Roether J.A., Boccaccini A.R., Biocompatibility and bioactivity of PDLLA/TiO<sub>2</sub> and PDLLA/TiO<sub>2</sub>/Bioglass nanocomposites, *Materials Science Engineering C* 2008, 28, 1.
150. Wei G., Ma P.X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2004, 25, 4749.



151. Wierzchom T., Czarnowska E., Krupa D., Inżynieria powierzchni w wytworzeniu biomateriałów tytanowych, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
152. Wilkinson J.M., Nanotechnology applications in medicine, *Med Device Technol*, 2003, 14, 29.
153. Woodard J.R., Hildore A.J., Lan S.K., Park C.J., Morgan A.W., Eurell J.A.C., Clark S.G., Wheeler M.B., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J., The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 2007, 28, 45.
154. Wu SJ, DeJong LC, Rahaman MN. Sintering of nanophase  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder. *J Am Ceram Soc* 1996, 79, 2207.
155. Xu H.H.K, Quinn J.B., Giuseppetti A.A., Wear and mechanical properties of nano-silica-fused whisker composites, *J. Dental Research* 2004, 83, 930.
156. Xu H.H.K., Smith D.T., Simon C.G., Strong and bioactive composites containing nano-silica-fused whiskers for bone repair, *Biomaterials* 2004, 25, 4615.
157. Yamamoto A., Kohyama Y., Kuroda D., Hanawa T.: Cytocompatibility evaluation of Ni-free stainless steel manufacturing by nitrogen adsorption treatment. *Materials Science & Engineering C* 2004, 24, 737.
158. Zhang H., Krajewski J., Zhang Z., Xiao T.D., Reisner D., Nano-hydroxyapatite coated acetabular cup implant by electrophoretic deposition, w: NSTI Nanotech, The Nanotechnology Conference and Trade Show, Boston, 7–11 May 2008, USA.
159. Zhang H., Krajeński J., Zhang Z., Xiao T.D., Reisner D., Nano-hydroxyapatite coated acetabular cup implant by electrophoretic deposition, w: Tech. Proc. of the 2007 NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show 2007, 2, – CD.
160. Zhang L. , Webster T.J, Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration – review, *Nano Today* 2009, 4, 66.
161. Zhang S., Gonsalves K.E., Preparation and characterization of thermally stable nanohydroxyapatite, *J. Materials Science: Mater. Med.* 1997, 8, 25.

## Spis tabel

		str.
Tabela 2.1	Wybrane właściwości mechaniczne tytanu o zróżnicowanej mikrostrukturze i komercyjnej czystości w porównaniu ze stopem Ti-6Al-4V ELI	9
Tabela 2.2	Skład chemiczny wybranych gatunków tytanu [% wag.] Gatunki wg ISO 5832-2:1999	9
Tabela 2.3	Właściwości mechaniczne tworzywa hydroksyapatytowego	10
Tabela 2.4	Metody modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów stosowanych na implanty	15
Tabela 2.5	Właściwości powierzchni tytanowych implantów otrzymanych różnymi technikami	16
Tabela 2.6	Skład chemiczny warstwy wierzchniej czystego Ti po mechanicznym polerowaniu wyznaczony metodą XPS [% at.]	17
Tabela 2.7	Grubość i wytrzymałość połączenia warstw HA	17
Tabela 2.8	Właściwości mechaniczne nTi ( gatunek 4) i mikrokrystalicznego tytanu (gat. 4)	19
Tabela 5.1	Stałe sieciowe, objętości komórek elementarnych i wielkość kryształitów wyjściowego proszku Ti i nanokompozytów Ti-HA poddanych obróbce cieplnej w 1150°C w czasie 2 h	41
Tabela 5.2	Stałe sieciowe, objętości komórek elementarnych i wielkość kryształitów wyjściowego proszku Ti, nanokompozytów Ti-10% wag. SiO <sub>2</sub> i Ti-10% wag. 45S5 bioszko poddanych obróbce cieplnej w 1150°C w czasie 2 h	43
Tabela 5.3	Właściwości fizyczne wytworzonych nanokompozytów Ti-HA i tytanu	46
Tabela 5.4	Właściwości mechaniczne- mikrotwardość i moduł Younga wytworzonych nanokompozytów Ti-HA i tytanu mikrokrystalicznego	47
Tabela 5.5	Wyniki mikrotwardości wytworzonych nanokompozytów typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością i mikrokrystalicznego tytanu	47
Tabela 5.6	Średnia wartość gęstości prądów i potencjałów korozyjnych oraz szybkości korozji nanomateriałów typu Ti-HA i mikrokrystalicznego tytanu w płynie Ringera (37°C)	49

---

Tabela 5.7	Średnia wartość gęstości prądów i potencjałów korozyjnych oraz szybkości korozji nanomateriałów typu tytan-ceramika z kontrolowaną reaktywnością i mikrokrystalicznego tytanu w płynie Ringera (37°C)	50
Tabela 5.8	Zawartości pierwiastków we frakcjach dla nanokompozytu Ti-10% bioceramika i mikrokrystalicznego tytanu	57

---

**Spis rycin**

	str.
Rycina 2.1. Budowa zęba i implantu	7
Rycina 2.2. Rodzina implantów stożkowych (a) i cylindrycznych (b)	8
Rycina 4.1. Materiał badawczy- lita próbka o średnicy 10mm	23
Rycina 4.2. Komora rękawicowa Labmaster 130 firmy M.Braun	23
Rycina 4.3. Schemat procesu mechanicznej syntezy	24
Rycina 4.4. Schemat prasowania jednoosiowego: jednostronnego	24
Rycina 4.5. Stanowisko do badań strukturalnych	26
Rycina 4.6. Zasada określania wielkości krystalitów metodą Scherrera	27
Rycina 4.7. Stanowisko elektonowego mikroskopu skaningowego	28
Rycina 4.8. Schemat pomiaru twardości	29
Rycina 4.9. Twardościomierz Vickersa	30
Rycina 4.10. Stanowisko badawcze trawienia elektrochemicznego	32
Rycina 4.11. Stanowisko do hodowli komórkowej	36
Rycina 5.1. Dyfraktogramy rentgenowskie mielonych proszków Ti–10% wag. HA: (a) Ti przed MA, (b) HA przed MA, (c) po 44h MA	37
Rycina 5.2. Mikrofotografie TEM i obrazy SEAD (prawy górny róg) kompozytu Ti–3% wag. HA po 44 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) fragment z drobnokrystalicznymi cząstkami Ti (c) duży kryształ Ti	38
Rycina 5.3. Mikrofotografie TEM i obrazy SEAD (prawy górny róg) kompozytu Ti–10% wag. HA po 44 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) fragment z drobnokrystalicznymi cząstkami Ti (c) duży kryształ Ti	38
Rycina 5.4. Obrazy SEM proszków kompozytu Ti–10% wag. HA na różnych etapach procesu MA: (a) Ti – 0 h, (b) HA – 0 h, (c) 3 h, (d) 10 h, (e) 20 h, (f) 44 h procesu MA	39

---

Rycina 5.5.	Obrazy SEM kompozytów Ti–HA, o różnym udziale wagowym HA, po 44 h procesu MA: (a) 3% HA, (b) 10% HA, (c) 20% HA	40
Rycina 5.6.	Dyfraktogramy rentgenowskie nanokrystalicznego materiału kompozytowego Ti–HA: (a) 3% wag. HA, (b) 10% wag. HA, (c) 20% wag. HA, (d) 50% wag. HA	40
Rycina 5.7.	Dyfraktogramy rentgenowskie mielonych proszków Ti-10% SiO <sub>2</sub> : (a) Ti (mikrokrystaliczny), (b) SiO <sub>2</sub> , (c) po 20 h MA i (d) po obróbce cieplnej 1150°C/2 h	42
Rycina 5.8.	Mikrofotografie TEM kompozytu Ti-10% wag. SiO <sub>2</sub> po 20 h procesu MA: (a) amorficzny fragment próbki, (b) krystalit Ti, (c) kryształy Ti	43
Rycina 5.9.	Obrazy SEM kompozytów Ti–SiO <sub>2</sub> , o (a) 3% i (b) 10% udziale wagowym SiO <sub>2</sub> , po 20 h procesu MA	44
Rycina 5.10.	Wpływ ciśnienia prasowania na mikrotwardość i gęstość kompozytów Ti–10% wag. HA	44
Rycina 5.11.	Zdjęcia powierzchni kompozytów Ti–10% wag. HA prasowanych pod ciśnieniem: (a) 50·10 <sup>5</sup> Pa, (b) 100·10 <sup>5</sup> Pa, (c) 150·10 <sup>5</sup> Pa, (d) 200·10 <sup>5</sup> Pa	45
Rycina 5.12.	Zdjęcia powierzchni wytworzonych nanokompozytów: (a) Ti–3% wag. HA, (b) Ti–10% wag. HA, (c) Ti–20% wag. HA	46
Rycina 5.13.	Zdjęcia SEM przełomów nanokompozytów (a) Ti–3% wag. HA, (b) Ti–10% wag. HA	46
Rycina 5.14.	Wpływ udziału wagowego HA na mikrotwardość i moduł Younga nanokompozytów typu Ti–HA	48
Rycina 5.15.	Zdjęcia odcisku Vickersa na powierzchni nanokompozytu Ti–10% wag. HA (a) obciążenie wgłębnika 0,5 kg, (b) obciążenie wgłębnika 2 kg – widoczne pęknięcia Palmqvista	49
Rycina 5.16.	Potencjodynamiczne krzywe polaryzacji wyznaczone dla nanokompozytów Ti–HA w płynie Ringera (37°C)	49
Rycina 5.17.	Potencjodynamiczne krzywe polaryzacji wyznaczone dla nanokompozytów Ti–SiO <sub>2</sub> (a) 3% wag. SiO <sub>2</sub> , (b) 10% wag. SiO <sub>2</sub> w płynie Ringera (37°C)	50

---

Rycina 5.18.	Zdjęcia SEM powierzchni nanokompozytu Ti–10% wag. HA po (a, c) jednym dniem i (b,d) pięciu dniach hodowli	51
Rycina 5.19.	Zdjęcia SEM powierzchni nanokompozytu Ti–10% wag. 45S5 bioszkło po (a, c) jednym dniem i (b,d) pięciu dniach hodowli.	52
Rycina 5.20.	Zdjęcia SEM powierzchni mikrokrystalicznego tytanu po jednym dniem (a) i po 5 dniach (b) oraz powierzchni mikrokrystalicznego tytanu po trawieniu elektrochemicznym po jednym dniem (c) i 5 dniach (d).	53
Rycina 5.21.	a.Osteoblasty w pierwszej dobie hodowli na insertach wykonanych z żelaza armco b. Osteoblasty po piątej dobie hodowli na insertach wykonanych z żelaza armio	54
Rycina 5.22.	Obraz SEM powierzchni nanokompozytu Ti-10 % wag. 45S5 bioszkło przed (a) i po (b) trawieniu w 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 2% HF (10V/ 15min)	54
Rycina 5.23.	Morfologia osteoblastów po pierwszej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10% wag. 45S5 bioszkło (a).	55
Rycina 5.24.	a. Morfologia osteoblastów po pierwszej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10% wag. 45S5 bioszkło b. Morfologia osteoblastów po piątej dobie hodowli na porowatym nanokompozycie Ti-10% wag. 45S5 bioszkło	55
Rycina 5.25.	Żywotności komórek (RVC) dla nanokompozytów Ti–HA i mikrokrystalicznego Ti w warunkach dynamicznych	56
Rycina 5.26.	Żywotności komórek (RVC) dla nanokompozytów Ti–10% wag. SiO <sub>2</sub> , Ti–10 % wag. 45S5 Bioszkło i mikrokrystalicznego Ti w warunkach dynamicznych	57
Rycina 6.1.	Porównanie wpływu struktury powierzchni na adsorpcję białek i zachowanie komórek	64