

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

**ISPITIVANJE UTICAJA PARAMETARA PROCESIRANJA NA
SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI
KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA
DOBIJENIH RAZLIČITIM TEHNIKAMA SINTEROVANJA**

Doktorska disertacija

Mr Đorđe N. Veljović

Beograd, 2010

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

**ISPITIVANJE UTICAJA PARAMETARA PROCESIRANJA NA
SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI
KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA
DOBIJENIH RAZLIČITIM TEHNIKAMA SINTEROVANJA**

Doktorska disertacija

Mr Đorđe N. Veljović

Beograd, 2010

Mentor i članovi komisije za odbranu doktorske disertacije mr Đorđa Veljovića, pod nazivom “ISPITIVANJE UTICAJA PARAMETARA PROCESIRANJA NA SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA DOBIJENIH RAZLIČITIM TEHNIKAMA SINTEROVANJA“:

Mentor Dr Đorđe Janačković, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Članovi komisije
Dr Rada Petrović, vanredni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Petar Uskoković, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Zvezdana Kojić, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Beograd

Datum odbrane: _____

Beograd, 2010

Ova doktorska disertacija je urađena na katedri za Neorgansku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata 142070B i E!3303, pod mentorstvom Prof. dr Đorđa Janačkovića, kome se ovom prilikom zahvaljujem na idejama, strpljenju, korisnim sugestijama i savetima tokom celokupnog eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Prof. dr Radi Petrović se zahvaljujem na velikoj pomoći pri formulisanju i izradi disertacije, višegodišnjoj podršci, korisnim sugestijama i vremenu koje mi je posvetila.

Prof. dr Petru Uskokoviću se zahvaljujem na interesovanju za ovu problematiku, velikoj podršci, velikoj pomoći i savetima u oblasti mehanike i nanomehanike materijala.

Prof. dr Zvezdani Kojić se zahvaljujem na posvećenom vremenu, korisnim savetima, velikoj pomoći tokom ispitivanja biokompatibilnosti materijala.

Dr Eriksu Palcevskisu i kolegama sa Tehničkog univerziteta u Rigi se zahvaljujem na posvećenom vremenu, korisnim savetima i velikoj pomoći prilikom mikrotalasnog sinterovanja, spark plazma sinterovanja i XRD analiza. Prof. dr Chak-Yin Tangu i njegovom timu sa Politehničkog Univerziteta u Hong Kongu se zahvaljujem na pomoći prilikom određivanja nanomehaničkih svojstava materijala nanoindentacijom. Prof. dr Yuri Dekhtyaru sa Tehničkog univerziteta u Rigi i Prof. dr Rachel Sammons sa Univerziteta u Birmingemu se zahvaljujem na savetima i pomoći prilikom ispitivanja uticaja naelektrisanja površine na ateziju osteoblasta.

Akademiku Prof. dr Miodragu Čoliću sa Vojno-medicinske akademije, dr Gordani Bogdanović i mr Vesni Kojić sa Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici se zahvaljujem na pomoći i savetima tokom *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala. Dr Branku Matoviću naučnom savetniku i kolegama iz Laboratorije za materijale, Instituta "Vinča", hvala na pomoći prilikom pripreme uzoraka, toplog presovanja, ispitivanja mehaničkih svojstava i XRD analiza. Prof. dr Draganu Uskokoviću i svim članovima njegovog tima iz Instituta tehničkih nauka SANU se zahvaljujem na pomoći prilikom pripreme uzoraka i određivanja raspodele veličina čestica.

Mr Jugoslavu Krstiću sa IHTM-a se zahvaljujem na pomoći prilikom određivanja raspodele veličina pora i specifične površine, dr Ivani Smičiklas iz Instituta "Vinča" se zahvaljujem na pomoći prilikom sintetisanja praha HAP, docentu dr Igoru Balaću sa Mašinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na pomoći prilikom modelovanja metodom konačnih elemenata, dr Miodragu Mitriću iz Instituta "Vinča" hvala na pomoći prilikom XRD analiza, docentu dr Saši Drmaniću hvala na pomoći prilikom FTIR analiza, docentu dr Radmili Jančić-Hajneman se zahvaljujem na pomoći prilikom analize slika, mr Milošu Bokorovu sa Biološkog fakulteta u Novom Sadu hvala na pomoći prilikom SEM analiza.

Hvala svim kolegama sa Katedre za neorgansku hemijsku tehnologiju koji su na bilo koji način pomogli izradu moje doktorske disertacije.

Sve ovo bi bilo mnogo teže bez neizmerne podrške i razumevanja moje porodice i svih mojih prijatelja, kojima se od srca zahvaljujem na svemu!

IZVOD

ISPITIVANJE UTICAJA PARAMETARA PROCESIRANJA NA SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA DOBIJENIH RAZLIČITIM TEHNIKAMA SINTEROVANJA

Kalcijum-fosfatni biokeramički materiali na bazi kalcijum-hidroksiapatita (HAP) i trikalcijum-fosfata (TCP), zahvaljujući hemijskom sastavu, biokompatibilnosti, bioaktivnosti i osteokonduktivnosti imaju značajnu ulogu pri izradi koštanih implanta. Guste nanostrukturne i kontrolisano porozne forme biokeramičkih materijala na bazi hidroksiapatita i kalcijum-fosfata imaju veliku primenu u maksiofacialnoj, dentalnoj i ortopedskoj praksi. Pažljiva kontrola faznog sastava, veličine zrna, oblika i dimenzija pora, kao i mehaničkih svojstava sinterovanih biokeramičkih materijala jesu ključni faktori za dobijanje implanta optimalnih svojstava. Danas je ogroman broj istraživanja baziran upravo na definisanju optimalnih uslova procesiranja sa ciljem da se dobiju gusti i kontrolisano porozni biokeramički monofazni kalcijum-hidroksiapatitni i bifazni materijali na bazi HAP i TCP, pogodni za ugradnju u ljudski organizam.

Cilj ove doktorske disertacije bio je proučavanje procesa formiranja gustih nanostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata mikrotalasnim sinterovanjem, spark plazma sinterovanjem i toplim presovanjem, polazeći od stehiometrijskih i kalcijum deficitarnih nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita dobijenih modifikovanim precipitacionim sintezama. Ispitan je uticaj svojstava polaznih prahova HAP i parametara procesiranja na mikrostrukturne i fazne karakteristike, kao i na mehanička svojstva dobijenih gustih sinterovanih biokeramičkih materijala. Definisan je uticaj mikrostrukturnih parametara na žilavost i tvrdoću dobijenih monofaznih i bifaznih biokeramičkih materijala. Nanoindentacijom je utvrđen uticaj veličine zrna i faznog sastava na nanomehaničke karakteristike gustih mikro i nanostrukturnih materijala na bazi HAP i HAP/ β -TCP. Svojstva materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem, spark plazma sinterovanjem i toplim presovanjem upoređeni su sa svojstvima materijala dobijenih konvencionalnim sinterovanjem.

Mikrotalasnim sinterovanjem, spark plazma sinterovanjem i toplim presovanjem stehiometrijskog i kalcijum deficitarnog nanočestičnog praha hidroksiapatita, dobijeni su monofazni i bifazni nanostrukturni biokeramički materijali velikih gustina. Monofazni materijali na bazi HAP, dobijeni mikrotalasnim sinterovanjem na 900 °C tokom 15 min, sa prosečnom veličinom zrna od 130 nm, imaju znatno veće gustine, uniformnije mikrostrukture i superiornije mehaničke karakteristike u odnosu na uzorake konvencionalno sinterovane na istoj temperaturi tokom 2 h. Uporednom analizom svojstava monofaznih biokeramičkih materijala na bazi HAP i bifaznih HAP/TCP materijala, zaključeno je da monofazni materijali imaju superiorna mehanička i nanomehanička svojstva. Smanjenje veličine zrna u slučaju mikrotalasno sinterovane monofazne biokeramike na bazi HAP sa mikro na nano nivo, preciznije sa 1,59 μm na 130 nm, rezultiralo je povećanjem žilavosti sa 0,85 MPa $\text{m}^{1/2}$ na 1,34 MPa $\text{m}^{1/2}$. Spark plazma sinterovanjem na 900 °C tokom 5 min dobijeni su monofazni HAP materijali sa prosečnom veličinom zrna od 100 nm i gustinom bliskoj teorijskoj. Toplim presovanjem stehiometrijskog praha kalcijum-hidroksiapatita dobijeni su translucetni monofazni biokeramički materijali na bazi HAP sa prosečnom veličinom zrna od 50 nm i žilavošću od 1.52 MPa $\text{m}^{1/2}$.

Cilj ove doktorske disertacije bio je i procesiranje materijala kontrolisane poroznosti na bazi HAP i TCP, polazeći od dva različita praha HAP sa sferičnim česticama dobijena hidrotermalnom dekompozicijom uree i EDTA kompleksa. Ispitan je uticaj parametara procesiranja, mikrostrukture i faznog sastava na mehanička svojstva biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti. Definisan je i uticaj oblika, sferičnosti i veličine pora na mehanička svojstva, pre svega na žilavost biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti.

Biokeramički materijali kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, dobijeni su mikrotalasnim sinterovanjem polazeći od dva hidrotermalno dobijena mikrosferična praha sa različitim stepenom kalcijum deficitarnosti. Mikrotalasno sinterovani uzorci kontrolisane poroznosti na 1200 °C tokom 15 min, u slučaju oba mikrosferična praha karakterišu se koeficijentom žilavosti od 1,25 MPa m^{1/2}. Pokazano je da fazni sastav, tj. udeo TCP u kalcijum-hidroksiapatitnom matriksu, u slučaju materijala kontrolisane poroznosti ima inferioran uticaj na žilavost u odnosu na njihovu specifičnu mikrostrukturu koja se odlikuje prisustvom sfernih intraaglomeratnih pora i uspostavljenih snažnih kontinualnih vratova između vrlo postojanih sfernih čestica. Primena izostatskog pritiska od 400 MPa pri presovanju mikrosferičnih prahova, uticala je povećanje žilavosti biokeramičkog materijala u kome je dominantna kristalna faza α -TCP do vrednosti 1,35 MPa m^{1/2}, što je izuzetno visoka vrednost za ovaj tip biokeramičkih materijala. Metodnom konačnih elemenata je pokazano da materijali kontrolisane poroznosti na bazi HAP, sa porama sfernog oblika imaju bolja mehanička svojstva u poređenju sa materijalima čije su pore nepravilnog oblika.

Uticaj mikrostrukturnih parametara sinterovanih biokeramičkih materijala na bioaktivnost i biokompatibilnost ispitan je u *in vitro* i *in vivo* uslovima. *In vitro* ispitivanja nano- i mikrostrukturnih gustih sinterovanih monofaznih materijala na bazi HAP u simuliranom telesnom fluidu potvrđena je njihova bioaktivnost. Na osnovu rezultata *in vitro* testova sa L929 fibroblastima i humanim fibroblastnim ćelijama zaključeno je da mikrotalasno sinterovani mikro- i nanostrukturnih monofazni hidroksiapatitni materijali ne pokazuju citotoksični efekat, već izazivaju stimulaciju metaboličke aktivnosti utičući na proliferacije fibroblastnih ćelija na ispitivanim materijalima. Ispitivanjem biokompatibilnosti mikrotalasno sinterovanog monofaznog hidroksiapatitnog materijala HAP1 *in vitro*, određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1, utvrđeno je da su ćelije sa površinom ispitivanog potencijalno implantnog materijala uspostavile čvrstu vezu. Prilikom *in vivo* ispitivanja biokompatibilnosti, testom primarne kutane iritacije, za oba ispitivana materijala (monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min i monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min) srednja vrednost indeksa primarne kutane iritacije je bila nula, tj. ni jedan od dva ispitivana materijala nije ispoljio iritirajuća svojstva.

Ključne reči: Biokeramika, hidroksiapatit, nanostruktura, sinterovanje, mehanička svojstva, biokompatibilnost.

ABSTRACT

THE INFLUENCE OF PROCESSING CONDITIONS ON THE PROPERTIES OF BICERAMICS MATERIALS BASED ON CALCIUM HYDROXYAPATITE AND CALCIUM PHOSPHATE OBTAINED BY DIFFERENT SINTERING METHODS

Calcium phosphate bioceramics materials based on hydroxyapatite (HAP) and tricalcium phosphate (TCP), due to their chemical composition, excellent biocompatibility, bioactivity and osteoconduction have received considerable attention as suitable bioceramics for the manufacture of osseous implants. Dense nanostructured and controlled porous forms of hydroxyapatite and calcium phosphate are often used as reparation material in maxillofacial, dental and orthopedic surgery. Careful control of phase composition, grain size and shape and size of pores of sintered bioceramic materials in accordance with good mechanical properties can be key issue for a successful implant. A large number of studies were focused on determining the optimal conditions required to obtain dense or controlled porous HAP and HAP/TCP form suitable for incorporation in living bone.

The aim of this PhD thesis was to investigate the processing of dense nanostructured pure hydroxyapatite and biphasic HAP/TCP bioceramics by microwave sintering, spark plasma sintering and hot pressing, starting from stoichiometric and calcium deficient nanosized HAP powders, obtained by two modified chemical precipitation syntheses. The effects of the processing conditions on the microstructure, phase composition and mechanical properties of the obtained materials based on HAP and TCP were investigated. The influence of microstructure and phase composition on the fracture toughness and hardness of sintered HAP and HAP/TCP bioceramics was also defined. The influence of the grain size and phase composition on the nanomechanical behaviour of dense nano and microstructured HAP and biphasic HAP/ β -TCP bioceramic materials by nanoindentation was also investigated. The results obtained by microwave sintering, spark plasma sintering and hot pressing were compared with those obtained by conventional sintering methods.

A nanostructured dense monophasic HAP and biphasic HAP/TCP biomaterials were processed starting from stoichiometric and calcium deficient nanosized HAP powders by microwave sintering, spark plasma sintering and hot pressing. The HAP samples microwave sintered for 15 min at 900 °C, with average grain size of 130 nm, showed better densification, higher density and certainly higher hardness and fracture toughness than samples conventionally sintered for 8 times longer time at the same temperature. By comparing sintered HAP and HAP/TCP samples, it was concluded that pure HAP ceramics have superior mechanical and nanomechanical properties. For monophasic MW sintered HAP samples, the decrease in the grain size from micro to nano level, precisely from 1.59 μm to 130 nm led to an increase in the fracture toughness from 0.85 $\text{MPa m}^{1/2}$ to 1.34 $\text{MPa m}^{1/2}$. The monophasic HAP materials with a grain size of 100 nm and density near theoretical were obtained by spark plasma sintering at 900 °C for 5 min. In the case of hot pressed monophasic HAP compacts, full dense, translucent nanostructured bioceramic materials were obtained having mean grain size of 50 nm and the fracture toughness of 1.52 $\text{MPa m}^{1/2}$.

The processing and characterization of controlled porous HAP/TCP bioceramics obtained by microwave sintering of two different spherical agglomerated nano-sized HAP powders synthesized by hydrothermal decomposition of urea and calcium-EDTA chelates was the next

aim of this thesis. The effects of microstructures parameters, processing conditions of the microwave sintering and phase composition on the mechanical properties of controlled porous biomaterials based on HAP and TCP were investigated. The influence of shape, roundness and size of pores on the mechanical properties, mainly fracture toughness, of porous bioceramics based on HAP was also investigated.

Starting from two microspherical agglomerated HAP powders, porous biphasic HAP/TCP bioceramics were obtained by microwave sintering. The fracture toughness of the controlled porous samples microwave sintered at 1200 °C for 15 min were 1.25 MPa m^{1/2}. The phase composition of the obtained bioceramics only had a minor effect on the indentation fracture toughness compared to a microstructure consisting of spherical intra-agglomerate pores with strong bonds between the spherical agglomerates. Cold isostatic pressing at 400 MPa before microwave sintering led to an increase in the fracture toughness of the biphasic HAP/TCP bioceramics to 1.35 MPa m^{1/2}. A three-dimensional, finite element unit cell model confirmed that porous HAP with sphere-like pores have better strength properties compared to non-spherical pore shapes.

The influence of microstructures parameters of the sintered bioceramic materials on the bioactivity and biocompatibility was investigated *in vitro* and *in vivo*. The bioactivity of nano- and microstructured monophasic materials based on HAP was confirmed by *in vitro* investigation in SBF. According to the results of *in vitro* tests with L929 fibroblasts and human fibroblast cells, it was concluded that microwave sintering of micro- and nanostructured monophasic hydroxyapatite materials do not show a cytotoxic effect, but initiated stimulation of metabolic activity, affecting cell proliferation of the fibroblast cells on the materials. Investigation of biocompatibility of microwave sintered HAP1 materials *in vitro*, by determination of adhesion of osteoblast cells MC3T3-E1, confirmed that the cells and investigated materials were constituted a good attachment. During the *in vivo* investigation of biocompatibility with primary cutaneous irritation test, for both investigated materials (monophasic HAP1 microwave sintered at 900 °C for 15 min and monophasic HAP1 microwave sintered at 900 °C for 15 min) the mean value of primary cutaneous irritation index was zero, i.e. neither of the two tested materials showed irritating properties.

Keywords: Bioceramics, hydroxyapatite, nanostructured, sintering, mechanical properties, biocompatibility.

SADRŽAJ

I. UVOD	1
II. TEORIJSKI DEO	3
1. BIOMATERIJALI	3
1.1. Podela i primena biomaterijala	3
1.2. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita	7
2. KALCIJUM-HIDROKSIAPATIT	11
2.1. Kalcijum-hidroksiapatit u prirodi	13
2.2. Kalcijum-hidroksiapatit u biologiji i medicini	14
2.3. Svojstva kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata	19
2.4. Sintetisanje prahova kalcijum-hidroksiapatita	22
3. PROCESIRANJE I SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA	25
3.1. Oblikovanje keramičkih materijala presovanjem prahova	25
3.2. Konvencionalno sinterovanje	27
3.3. Dobijanje i svojstva sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata	35
3.4. Dobijanje i svojstva mikrotalasno sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata	45
3.5. Metode sinterovanja uz pomoć pritiska	49
3.5.1. Dobijanje i svojstva toplo presovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata	50
3.5.2. Dobijanje i svojstva spark plazma sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata	53

III. EKSPERIMENTALNA PROCEDURA -MATERIJALI I METODE	58
4. Sinteza prahova kalcijum-hidroksiapatita	58
4.1. Sinteza stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita modifikovanom precipitacionom metodom	58
4.2. Sinteza kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita modifikovanom precipitacionom metodom	58
4.3. Sinteza kalcijum-hidroksiapatita hidrotermalnom metodom	59
5. Karakterizacija prahova kalcijum-hidroksiapatita	60
5.1. Određivanje raspodele veličina čestica prahova kalcijum-hidroksiapatita	60
5.2. Određivanje morfologije prahova kalcijum-hidroksiapatita skenirajućom elektronskom mikroskopijom	60
5.3. Određivanje morfologije primarnih čestica kalcijum-hidroksiapatita transmissionom elektronskom mikroskopijom	60
5.4. Rendgenska difrakciona analiza prahova kalcijum-hidroksiapatita	61
5.5. Infracrvena spektroskopska analiza prahova kalcijum-hidroksiapatita	61
5.6. Određivanje odnosa Ca/P prahova kalcijum-hidroksiapatita	61
5.7. Određivanje specifične površine prahova kalcijum-hidroksiapatita	61
6. Kompaktiranje prahova kalcijum-hidroksiapatita presovanjem	62
6.1. Uniaksijalno presovanje	62
6.2. Izostatsko presovanje	62
6.2.1. Ispitivanje uticaja veličine izostatskog pritiska na raspodelu pora i specifičnu površinu ispresovanog kompakta	62
6.2.2. Ispitivanje uticaja pritiska na sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita	62
6.3. Određivanje gustine ispresovanih kompakata	63
6.4. Uniaksijalno presovanje na ekstremno visokim pritiscima	63

7. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala mikrotalasnim sinterovanjem	63
8. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala spark plazma sinterovanjem	64
9. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala toplim presovanje	64
10. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala konvencionalnim postupkom sinterovanja	65
11. Dobijanje poroznih biokeramičkih materijala mikrotalasnim i konvencionalnim sinterovanjem	65
12. Karakterizacija mikrotalasno sinterovanih, spark plazma sinterovanih, toplo presovanih i konvencionalno sinterovanih biokeramičkih materijala	66
12.1. Određivanje gustine i relativnog linearnog skupljanja dobijenih biokeramičkih materijala	66
12.2. Analiza mikrostrukture biokeramičkih materijala skenirajućom elektronskom mikroskopijom	66
12.3. Određivanje prosečne veličine zrna gustih i prosečne veličine pora poroznih biokeramičkih materijala analizom SEM mikrografija	67
12.4. Rendgenska difrakciona analiza biokeramičkih materijala	67
13. Određivanje mehaničkih karakteristika dobijenih biokeramičkih materijala	67
13.1. Određivanje mikrotvrdoće	67
13.2. Određivanje žilavosti	68
13.3. Nanoindentacija nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala	68
14. 3D modelovanje materijala kontrolisane poroznosti metodom konačnih elemenata	69
15. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> ispitivanja bioaktivnosti i biokompatibilnosti nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala	71
15.1. <i>In vitro</i> ispitivanja bioaktivnosti materijala u simuliranom telesnom fluidu	71
15.2. <i>In vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi L929 fibroblasta	72

15.3. <i>In vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi humanih fibroblasta	74
15.4. <i>In vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala određivanjem adhezije osteoplastnih ćelija MC3T3-E1	77
15.5. SEM histološka analiza u okviru <i>in vitro</i> ispitivanja	78
15.6. <i>In vivo</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala metodom primarne kutane iritacije	78
IV. REZULTATI I DISKUSIJA	82
16. Rezultati karakterizacije polaznih prahova kalcijum-hidroksiapatita	82
16.1. Rezultati određivanja raspodele veličina čestica kalcijum-hidroksiapatita	82
16.2. Rezultati određivanja morfologije prahova kalcijum-hidroksiapatita skenirajućom elektronskom mikroskopijom	84
16.3. Rezultati određivanja morfologije primarnih čestica kalcijum-hidroksiapatita transmisijom elektronskom mikroskopijom	88
16.4. Rezultati rendgenske difrakcije analize prahova kalcijum-hidroksiapatita	89
16.5. Rezultati infracrvene spektroskopske analize prahova kalcijum-hidroksiapatita	91
16.6. Rezultati određivanja odnosa Ca/P i specifične površine prahova kalcijum-hidroksiapatita	92
17. Karakterizacija uniaksijalno i izostatski ispresovanih kompakata kalcijum-hidroksiapatita	94
17.1. Rezultati ispitivanja uticaja veličine izostatskog pritiska na raspodelu pora i specifičnu površinu ispresovanih kompakata	96
17.2. Rezultati ispitivanja uticaja pritiska na sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita	102
17.3. Rezultati uniaksijalnog presovanja i sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita na ekstremno visokim pritiscima	104
18. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem	105

18.1. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom	105
18.2. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom	107
18.3. Rezultati određivanja gustine i relativnog linearnog skupljanja	112
18.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem	114
18.5. Usporedna analiza karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem	118
18.6. Rezultati karakterizacije gustih biokeramičkih materijala izostatski ispresovanih i mikrotalasno sinterovanih	120
19. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem	123
19.1. Rezultati određivanja gustine i skupljanja	123
19.2. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom	126
19.3. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom	127
19.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem	132
20. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem	134
20.1. Rezultati određivanja faznog sastava i mikrostrukturnih karakteristika biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem	134
20.2. Rezultati određivanja faznog sastava i mikrostrukturnih karakteristika biokeramičkih materijala dobijenih konvencionalnim sinterovanjem	141
20.3. Rezultati ispitivanja uticaja veličine zrna na mehaničke karakteristike gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem mikroindentacijom	144
20.4. Rezultati ispitivanja nanomehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem nanoindentacijom	146

21. Procesiranje i svojstva poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem	150
21.1. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom	150
21.2. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom	152
21.3. Rezultati određivanja gustine i relativnog linearnog skupljanja	156
21.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem	158
21.5. Usporedna analiza karakteristika poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem	160
21.6. Rezultati ispitivanja uticaja oblika, veličine i broja pora na mehaničke karakteristike poroznih biokeramičkih materijala	164
21.7. Analiza rezultata 3D modeliranja metodom konačnih elemenata	173
22. Usporedna analiza svojstava biokeramičkih materijala dobijenih različitim tehnikama sinterovanja	175
23. Rezultati <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ispitivanja bioaktivnosti i biokompatibilnosti nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala	180
23.1. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja bioaktivnosti materijala u simuliranom telesnom fluidu	180
23.2. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi L929 fibroblasta	183
23.3. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi humanih fibroblasta	191
23.4. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1	199
23.5. Rezultati <i>in vivo</i> ispitivanja biokompatibilnosti materijala metodom primarne kutane iritacije	202
V. ZAKLJUČCI I DALJI PRAVCI	207
VI. LITERATURA	212

LISTA TABELA:

Tabela 1.1. Podela biomaterijala na osnovu interakcije živog tkiva i implantiranog materijala

Tabela 1.2. Podela biomaterijala prema poreklu

Tabela 2.1. Usporedni prikaz sastava, kristalografskih i mehaničkih karakteristika humane gleđi, kostiju i sintetisanog hidroksiapatita

Tabela 2.2. Usporedni prikaz sastava neorganskog dela zuba i kosti

Tabela 2.3. Fizičko-hemijske i strukturne karakteristike hidroksiapatita

Tabela 4.1. Parametri i količine reaktanata pri hirotermalnoj sintezi kalcijum-hidroksiapatita

Tabela 15.1. Sastav simuliranog telesnog fluida

Tabela 15.2. Kvalitativno morfološko stepenovanje citotoksičnosti

Tabela 15.3. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija eritema

Tabela 15.4. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija edema

Tabela 15.5. Ocena test materijala na osnovu indeksa primarne kutane iritacije (PII)

Tabela 16.1. Vrednosti odnosa Ca/P prahova HAP1 i HAP2

Tabela 16.2. Vrednosti odnosa Ca/P u polaznom rastvoru prahova HAP3 i HAP4

Tabela 16.3. Vrednosti specifičnih površina prahova HAP1 – HAP4

Tabela 17.1. Vrednosti gustina uniaksijalno presovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 400Mpa

Tabela 17.2. Vrednosti gustina izostatski presovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 400 MPa

Tabela 17.3. Vrednosti gustina izostatski presovanih kompakata HAP1 na 100 - 400 Mpa

Tabela 18.1. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP1 na 900 - 1200 °C

Tabela 18.2. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP2 na 900 - 1200 °C

Tabela 18.3. Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem

Tabela 18.4. Uslovi procesiranja i mehanička svojstva monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem

Tabela 19.1. Vrednosti gustina spark plazma sinterovanih kompakata HAP1 na 900 - 1200 °C

Tabela 19.2. Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem

Tabela 20.1. Veličina zrna i gustina presovanih uzoraka HAP1 and HAP2

Tabela 21.1. Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike uzoraka HAP4 dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem

Tabela 21.2. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP3 na 1100 - 1250 °C

Tabela 23. 1. Skor eritema i edema posle primene HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C

Tabela 23. 2. Skor eritema i edema posle primene HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C

Tabela 23. 3. Skor eritema i edema posle primene mlečne kiseline 98% (pozitivna kontrola)

LISTA SLIKA:

Slika 1.1. Klinička upotreba biokeramičkih materijala

Slika 2.1. Kristalna struktura kalcijum-hidroksiapatita: 3D pozicija atoma,
(b) projekcija u pravcu c-ose

Slika 2.2. Primeri polikristalnog (levo) i monokristalnog (desno) prirodnog apatita

Slika 2.3. Mikro i makro struktura kosti

Slika 2.4. Struktura zuba

Slika 3.1. Šema aglomerisanog praha

Slika 3.2. Dijagram raspodele pora: a) neaglomerisanog praha, b) praha sa aglomeratima iste veličine i c) praha se aglomeratima različitih veličina

Slika 3.3. Promena gustine i strukture keramičkog kompakta sa vremenom sinterovanja
(TD-teorijska gustina)

Slika 3.4. Mehanizmi sinterovanja

Slika 3.6. Ravnotežni oblik zrna i pravac pomeranja granice zrna

Slika 3.7. Transgranularni i intergranularni mehanizam prostiranja pukotine

Slika 3.8. Šema uređaja za toplo uniaksijalno presovanje

Slika 3.9. Šema peći za spark plazma sinterovanje

Slika 14.1. Šematski prikaz idealizacije rasporeda i oblika pora prilikom modelovanja

Slika 14.2. Koordinatne mreže konačnih elemenata za sferne i nepravilne pore kod hidroksiapatitne keramike

Slika 16.1. Raspodela veličina čestica prahova HAP1 i HAP2

Slika 16.2. Raspodela veličina čestica prahova HAP3 i HAP4

Slika 16.3. SEM mikrografija praha HAP1

Slika 16.4. SEM mikrografija praha HAP1 nakon tretiranja ultrazvukom

Slika 16.5. SEM mikrografija praha HAP2

Slika 16.6. SEM mikrografija praha HAP2 nakon tretiranja ultrazvukom

Slika 16.7. SEM mikrografija praha HAP3

Slika 16.8. SEM mikrografija preseka sferne čestice praha HAP3

Slika 16.9. SEM mikrografija praha HAP4

Slika 16.10. TEM snimak primarnih čestica praha HAP1

Slika 16.11. TEM snimak primarnih čestica praha HAP2

Slika 16.12. Rendgenska difrakciona analiza prahaova HAP1 i HAP2

Slika 16.13. Rendgenska difrakciona analiza prahaova HAP3 i HAP4

Slika 16.14. Infracrvena spektroskopska analiza prahova HAP1 i HAP2

Slika 16.15. Infracrvena spektroskopska analiza prahova HAP3 i HAP4

- Slika 17.1.** SEM mikrografije izostatski ispresovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 400 MPa
- Slika 17.2.** Ukupna zapremina pora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska
- Slika 17.3.** Raspodela veličina mezopora praha HAP1
- Slika 17.4.** Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 100MPa
- Slika 17.5.** Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 200MPa
- Slika 17.6.** Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 300MPa
- Slika 17.7.** Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 400MPa
- Slika 17.8.** Zapremina mezopora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska
- Slika 17.9.** Zapremina mikropora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska
- Slika 17.10.** Specifična površina kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska
- Slika 17.11.** SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 100 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 17.12.** SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 200 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 17.13.** SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 300 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 17.14.** SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 17.15.** SEM mikrografija kompakta HAP1: a) uniaksijalno ispresovanog na 2.5 GPa, b) isostatski ispresovanog na 400MPa, a nakon toga sinterovanih na 900°C tokom 2h

- Slika 18.1.** Rendgenska difrakciona analiza uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP1 na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min
- Slika 18.2.** Rendgenska difrakciona analiza uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP2 na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min
- Slika 18.3.** SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min
- Slika 18.4.** SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min
- Slika 18.5.** SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min
- Slika 18.6.** SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 18.7.** SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min
- Slika 18.8.** SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min
- Slika 18.9.** SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min
- Slika 18.10.** SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 18.11.** Veličina zrna HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 18.12.** Relativno linearno skupljanje HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 18.13.** Tvrdća uzoraka HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 18.14.** Žilavost uzoraka HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 18.15.** Žilavost uzoraka HAP1 u funkciji veličine zrna
- Slika 18.16.** Mikrografije ispoliranih površina monofaznih HAP1 kompakata nakon Vickersovog testa, mikrotalasno sinterovanih na: a) 1200 °C b) 1100 °C i c) 900 °C
- Slika 18.17.** SEM mikrografije uzoraka HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovanih na 900 °C tokom 2 h
- Slika 18.18.** SEM mikrografije uzoraka HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovanih na 1000 °C tokom 2 h
- Slika 18.19.** SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i

mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

Slika 18.20. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

Slika 18.21. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 850 °C tokom 15 min

Slika 19.1. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plazma sinterovanja na 900 °C tokom 10 min

Slika 19.2. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plazma sinterovanja na 1000 °C tokom 10 min

Slika 19.3. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plazma sinterovanja na 1200 °C tokom 10 min

Slika 19.4. Rendgenska difrakciona analiza materijala dobijenih spark plazma simterovanjem HAP1 na 900 °C, 1000 °C i 1200 °C tokom 10 min

Slika 19.5. Rendgenska difrakciona analiza materijala dobijenog spark plazma simterovanjem HAP2 na 900 °C tokom 10 min

Slika 19.6. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1200 °C tokom 10 min

Slika 19.7. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1200 °C tokom 5 min

Slika 19.8. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1000 °C tokom 10 min

Slika 19.9. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 10 min

Slika 19.10. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 5 min

Slika 19.11. Veličina zrna HAP1 u funkciji temperature spark plazma sinterovanja

Slika 19.12. SEM mikrografija uzorka HAP2 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 10 min

Slika 20.1. XRD dijagram uzoraka HAP1 toplo presovanog 2 h na 1000 °C u struji argona

Slika 20.2. XRD dijagram uzoraka HAP2 toplo presovanog 2 h na 1000 °C u struji argona

Slika 20.3. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 2 h

Slika 20.4. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 1 h

Slika 20.5. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 950 °C tokom 2 h

Slika 20.6. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 1000 °C tokom 2 h

Slika 20.7. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 1000 °C tokom 1 h

Slika 20.8. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 950 °C tokom 2 h

Slika 20.9. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 2 h

Slika 20.10. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 1 h

Slika 20.11. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 950 °C tokom 2 h

Slika 20.12. XRD dijagram uzoraka HAP1 konvencionalno sinterovanog tokom 2h na 1200 °C

Slika 20.13. XRD dijagram uzoraka HAP2 konvencionalno sinterovanog tokom 2h na 1200 °C

Slika 20.14. SEM mikrografija uzorka HAP1 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2h (poliran i nagrižen uzorak)

- Slika 20.15.** SEM mikrografija uzorka HAP2 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2h (poliran i nagrižen uzorak)
- Slika 20.16.** Žilavost i tvrdoća nanostrukturnih toplo presovanih i mikrostrukturnih sinterovanih uzoraka HAP1 u funkciji veličine zrna
- Slika 20.17.** Tipična zavisnost sile- dubine utiskivanja indenta za uzorak S3
- Slika 20.18.** SPM slika sa površinskim otiskom uzorka S1, pri sili indenta od 2000 μ N, region hrapavosti od 23 nm i skeniranom veličinom površine 2 μ m
- Slika 20.19.** Redukovani moduli i tvrdoće uzoraka testiranih nanoindentacijom
-
- Slika 21.1.** Rendgenska difrakciona analiza HAP3 biokeramičkih materijala mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min
- Slika 21.2.** Rendgenska difrakciona analiza HAP4 biokeramičkih materijala mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min
- Slika 21.3.** SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min
- Slika 21.4.** SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min
- Slika 21.5.** SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min
- Slika 21.6.** SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 21.7.** SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min
- Slika 21.8.** SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min
- Slika 21.9.** SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min
- Slika 21.10.** SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 21.11.** Gustina HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 21.12.** Relativno linearno skupljanje HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 21.13.** Tvrdoća uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 21.14.** Žilavost uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja
- Slika 21.15.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min
- Slika 21.16.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 21.17.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h
- Slika 21.18.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 21.19.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h
- Slika 21.20.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h
- Slika 21.21.** SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1250 °C tokom 2 h
- Slika 21.22.** Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2h sa selektovanim porama
- Slika 21.23.** Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1200 °C tokom 2h sa selektovanim porama
- Slika 21.24.** Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1250 °C tokom 2h sa selektovanim porama

- Slika 21.25.** Promene minimalne i srednje vrednosti dimenzije pora sa promenom temperature sinterovanja HAP3
- Slika 21.26.** Promene sferičnosti pora sa promenom temperature sinterovanja HAP3
- Slika 21.27.** Promena broja pora na karakterističnoj površini i promena srednje površine poprečnog preseka pore sa promenom temperature sinterovanja HAP3
- Slika 21.28.** Srednja vrednost sferičnosti posmatranih klasa pora na temperaturama sinterovanja 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C
- Slika 21.29.** Prečnik pora u funkciji sferičnosti za posmatrane klase pora na temperaturama sinterovanja 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C
- Slika 21.30.** Fotografije ispoliranih površina kompakta HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od: a) 3 kg i b) 1 kg
- Slika 21.31.** Fotografije ispoliranih površina kompakta HAP3 nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od 3 kg sinterovanih na: a) 1200 °C i b) 1250 °C, tokom 2 h
- Slika 21.32.** SEM mikrografija izgleda pukotine pri određivanju žilavosti kompakta HAP3 sinterovanog na 1200 °C
- Slika 21.33.** Von Misova raspodela naprezanja u HAP keramici pri zapreminskom udelu pora od 0,155; (vrednosti naprezanja su u $\mu\text{N}/\mu\text{m}^2 = \text{MPa}$) sa izračunatim SCF
- Slika 23.1.** Mikrostrukture monofaznog konvencionalno sinterovanog uzorka HAP1 na 1200 °C tokom 2 h, nakon *in vitro* testa tokom 28 dana u simulanom telesnom fluidu
- Slika 23.2.** Mikrostrukture monofaznog spark plazma sinterovanog uzorka HAP1 na 900°C tokom 5 min, nakon *in vitro* testa tokom 28 dana u simulanom telesnom fluidu
- Slika 23.3.** Mikrostrukture monofaznog mikrotalasno sinterovanog uzorka HAP1 na 900°C tokom 15 min, nakon *in vitro* testa tokom 28 dana u simulanom telesnom fluidu
- Slika 23.4a.** Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na metaboličku aktivnost L929 ćelija (Ca-hidroksiaapatit (A) - mikrostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1, Ca-hidroksiapatit (B) nanostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1)
- Slika 23.4b.** Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na vijabilnost L929 ćelija
- Slika 23.4c.** Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na nekrozu L929 ćelija
- Slika 23.4d.** Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na proliferaciju L929 ćelija nakon 1 i 3 dana
- Slike 23.5.** Morfološke karakteristike L929 ćelija u kulturi: a) posebna kontrola- test bez materijala, b) negativna kontrola, plastika-cover slip, c) mikrostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1, d) nanostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1
- Slika 23.6.** SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini kontrolnog uzorka
- Slika 23.7.** SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 23.8.** SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min
- Slika 23.9.** Rezultati MTT-testa nakon inkubacije ćelijskih linija MRC-5 sa mikrotalasno sinterovanim materijalima (1-900 °C, 2-1200 °C) i oporavka tokom 48 h, 72 h i 96 h, izraženi kao procenat od kontrole

- Slika 23.10.** Rezultati DET-testa prikazani kao rast ćelija MRC-5 izloženih dejstvu mikrotalasno sinterovanih materijala (1-900 °C, 2-1200 °C) tokom 48 h, 72 h i 96 h, izraženi kao procenat od kontrole
- Slika 23.11.** Ćelijska linija fibroblasta MRC-5, kontrolni uzorak: a)osvetljen uzorak, b)uzorak slikan sa faznim kontrastom
- Slika 23.12.** Ćelijska linija fibroblasta MRC-5, zasejana na podlozi “ uzorak HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min“
- Slika 23.13.** SEM mikrografije humanih fibroblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 23.14.** SEM mikrografije humanih fibroblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min
- Slika 23.15.** SEM mikrografije osteoblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min
- Slika 23.16.** Ukupan broj osteoblastnih ćelija vezanih za površinu mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min (N - nemodifikovan, M - modifikovan)
- Slika 23.17.** Stadijumi athezije osteoblastnih ćelija
- Slika 23.18.** Broj ćelija u svakom stadijumu athezije na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini materijala
- Slika 23.19.** Procenat ćelija u četvrtom stadijumu athezije na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini materijala
- Slika 23.20.** Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije nakon postavljanja test uzoraka
- Slika 23.21.** Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije 4 h nakon postavljanja test uzoraka
- Slika 23.22.** Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije 72 h nakon postavljanja uzoraka

I. UVOD

Biokeramički materiali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, zbog hemijske i strukturne sličnosti sa mineralima kostiju i zuba, kao i zbog izuzetne bioaktivnosti i biokompatibilnosti, imaju danas veoma važnu ulogu u medicinskoj praksi, gde se kao implantni materijali koriste za reparaciju ili zamenu oštećenih delova humanog skeletnog sistema. Zahvaljujući velikom potencijalu u ovom domenu, materiali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata u vidu gustih i kontrolisano poroznih formi, našli su veliku primenu u maksiofacialnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji, stomatologiji i ortopediji.

Komercijalno dostupni biokeramički materijali u gustoj sinterovanoj formi uglavnom su dobijeni postupkom konvencionalnog sinterovanja, a primenjuju se kao samostalni implantni materijali (npr. prilikom zamene korena zuba, pri povećavanju alveolarnih grebena, kao materijal za ispunu zubne pulpe, kao materijal za maksiofacijalne rekonstrukcije gde se zahtevaju precizno izrađeni oblici za zamenu određenih delova koštanog tkiva itd.) ili kao delovi kompleksnijih sistema. Materijali kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata ojačavaju vezu između tkiva i implantiranog materijala, a imaju pozitivan uticaj i na osteokonduktivnost. Dok makroporoznost kontroliše proliferaciju tkiva i transport bioloških fluida u implantiranom materijalu, mikroporoznost utiče na ateziju tkiva i implanta, kao i na brzinu resorpcije kalcijum-fosfata.

Sinterabilnost prahova kalcijum-hidroksiapatita i svojstva hidroksiapatitne biokeramike zavise kako od uslova procesiranja tako i od karakteristika polaznog praha, kao što su veličina čestica, stepena aglomerisanosti, odnos Ca/P, specifične površina itd. Relativno loša mehanička svojstva hidroksiapatitne biokeramike, posebno u fiziološkim uslovima, u mnogim slučajevima ograničavaju njenu primenu.

Konvencionalne metode sinterovanja su dugo korišćene u cilju konsolidacije metastabilnih nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita, od kojih je najčešće korišćeno sinterovanje kompakata dobijenih presovanjem na visokim pritiscima u atmosferi različitih gasova. Termička nestabilnost kalcijum-hidroksiapatita, kao i rapidno povećanje veličine zrna na visokim temperaturama predstavljaju glavne nedostatke konvencionalnog načina sinterovanja, a u velikoj meri utiču i na loša mehanička svojstva dobijenih biomaterijala. Korišćenjem tehnika kao što su mikrotalasno sinterovanje, spark plazma sinterovanje i toplo presovanje ima se za cilj dobijanje kako gustih tako i poroznih nanostrukturnih materijala, sa što je moguće manjom prosečnom veličinom zrna i optimalnom poroznošću, što je veoma bitno za mehanička svojstva, odnosno bioaktivnost i biokompatibilnost biokeramičkih materijala. Danas je u svetu ogroman broj istraživanja baziran na pronalaženju optimalnih parametara procesiranja, koristeći konvencionalne i savremene tehnike sinterovanja, koje bi omogućile prevođenje metastabilnih nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita u guste ili

kontrolisano porozne nanostrukturne biokeramičke materijale na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata poboljšanih mehaničkih svojstava i odgovarajuće bioaktivnosti i biokompatibilnosti.

Naučni ciljevi ove doktorske disertacije su proučavanje procesa formiranja gustih sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata koristeći metode mikrotalasnog sinterovanja, spark plazma sinterovanja, toplog presovanja i konvencionalnog sinterovanja polazeći od nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita. Ispitivan je uticaj odnosa Ca/P u polaznom prahu, oblika i veličine čestica polaznih prahova, stepena aglomerisanosti prahova, raspodele i veličine pora, kao i parametara procesiranja na mikrostrukturne i fazne karakteristike dobijenih gustih i materijala kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata. Izvršena je uporedna analiza mikrostrukturnih i faznih karakteristika sinterovanih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita, dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem, spark plazma sinterovanjem, toplim presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem. Uticaj mikrostrukturnih i faznih karakteristika dobijenih gustih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata na žilavost i tvrdoću, kao i uticaj veličine zrna i faznog sastava na nanomehaničke karakteristike gustih mikro i nanostrukturnih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata metodom nanoindentacije takođe su ispitani u ovoj disertaciji. Jedan od ciljeva bio je i ispitivanje uticaja parametara procesiranja na mikrostrukturu kalcijum-hidroksiapatitnih materijala kontrolisane poroznosti. Ispitivan je uticaj oblika i veličine pora, kao i faznog sastava na mehanička svojstva biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata. Uticaj mikrostrukturnih parametara sinterovanih biokeramičkih materijala na bioaktivnost i biokompatibilnost ispitan je u *in vitro* uslovima, u simuliranom telesnom fluidu, u kulturama L929 fibroblastnih ćelija, humanih fibroblastnih ćelija i osteoblastnih ćelija tipa MC3T3-E1, kao i *in vivo* testom primarne kutane iritacije.

II. TEORIJSKI DEO

1. BIOMATERIJALI

Biomaterijali se najčešće definišu kao materijali dizajnirani tako da nakon implantacije u ljudske organizame zamene delove živog sistema ili ispune odgovarajuću funkciju kroz određeni vremenski period u intimnom kontaktu sa živim tkivom [1]. Prema drugoj definiciji, biomaterijali su svi neživi materijali koji se koriste u medicinske svrhe sa ciljem da reaguju sa biološkim sistemima. Pod biomaterijalima se, prema pojedinim autorima podrazumeva "bilo koja supstanca ili kombinacija sintetičkih ili prirodnih supstanci (osim lekova), koja može biti korišćena u nekom vremenskom periodu, kao celina ili deo sistema koji se tretira, sa ciljem da povećava ili menja određeno tkivo, organ ili funkciju tela" [1]. Ma kako bili definisani, biomaterijali su poslednjih decenija postali neotuđivi deo kliničke prakse, a danas milioni pacijenata širom zemaljske kugle poboljšavaju kvalitet svog života uz pomoć neke vrste biomaterijala.

Istraživanja ogromnog broja naučnih timova širom sveta usmerena su ka pronalaženju načina da se dobiju novi biomaterijali optimalnih svojstava [2]. Da bi mogao da se koristi pri lečenju pacijenata, novodobijeni biomaterijal mora da zadovolji određene zahteve po pitanju fizičko-hemijskih i mehaničkih svojstava (žilavosti, tvrdoće, Jungovog modula, čvrstoće itd.), u pogledu bioaktivnosti, biokompatibilnosti, sterizibilnosti, podsticanja formiranja tkiva itd. [3]. Fizičke i mehaničke karakteristike imaju uticaj na aktivnu funkcionalnu karakteristiku biomaterijala, dok hemijske i biološke karakteristike kontrolišu sposobnost implanta da održava svoju funkcionalnost tokom i nakon implantacije.

1.1. Podela i primena biomaterijala

U toku proteklih decenija, istraživanja biomedicinskih materijala kretala su se najpre u pravcu razvoja bioinertnih, a zatim u pravcu dobijanja novih bioaktivnih materijala, koji se integrišu i aktivno reaguju sa biološkim okruženjem. Biomaterijali se mogu podeliti na osnovu nekoliko kriterijuma: prema interakciji živog tkiva i stranog materijala, prema poreklu, prema mestu primene itd.

Biomaterijali se na osnovu interakcije živog tkiva i implantiranog materijala, tj. biokompatibilnosti dele na: biotolerantne, bioinertne i bioaktivne. U tabeli 1.1. prikazani su neki od primera za za sve tri vrste biomaterijala.

Tabela 1.1. Podela biomaterijala na osnovu interakcije živog tkiva i implantiranog materijala

BIOTOLERANTNI	BIOINERTNI	BIOAKTIVNI
Nerđajući čelik	Titan i legure titana	Biostakla
Co-Cr-Mo legure	Tantal	Biokeramika
Legure zlata	Niobijum	
Polimeri	Plazmirani titan	

Prema poreklu, biomaterijali se dele na: autologe, homologe, heterologe i aloplastične. Objašnjenje porekla i potencijalna primena navedenih vrsta biomaterijala su prikazani u tabeli 1.2. Aloplastični materijali se dalje mogu podeliti u dve velike grupe: metalne i nemetalne biomaterijale, dok se nemetalni sintetički biomaterijali mogu svrstati u tri vrste: biokeramičke, polimerne i kompozitne materijale [4].

Tabela 1.2. Podela biomaterijala prema poreklu

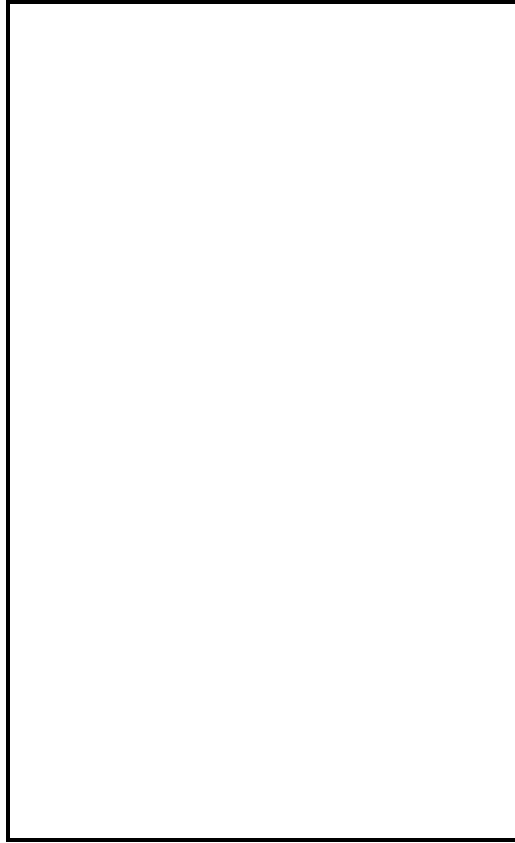
VRSTA	POREKLO	PRIMENA
AUTOLOGI	Autoplastični biološki materijali iz istog organizma	Transplantacija impaktiranih zuba, replantacija zuba i transplantacija kosti
HOMOLOGI	Homoplastični biološki materijali iz drugog organizma iste vrste	Implantacija liofilizovane kosti iz koštanih banaka
HETEROLOGI	Heteroplastični biološki materijali iz organizma druge vrste	Devitalizovana, deproteinizovana kost, kolagen, želatin
ALOPLASTIČNI	Sintetizovani materijali neživog porekla	Metali, keramika, biokeramika, biostakla, polimeri...

Prema mestu primene implanti se dele na: transedentalne, endoosalne, subperiostalne, transosealne, intramukozne i one koji se koriste za zamenu izgubljene kosti [5].

U zavisnosti od osteogenetskog potencijala materijala, živog tkiva za koji se materijal vezuje, kao i od vrste biomaterijala postoji nekoliko tipova mogućih interakcija. Prvi vid interakcije je distantna osteogeneza. U ovom slučaju dolazi do tolerancije koštanog tkiva

prema materijalu ili se prema njemu ponaša kao prema stranom tkivu. Drugi način interakcije je kontaktna osteogeneza, drugim rečima osteointegracija, koja podrazumeva interakciju tkiva sa bioinertnom grupom implanata. Koštano tkivo ovu vrstu implantata ne prepoznaje kao strano telo, već se prema njima ponaša kao da je deo kosti. Uz to, proces stvaranja kalusa kod koštanih defekata nije narušen, već se neometano obavlja uz prisnu integraciju kosti i implanta. Sledeća vrsta interakcije nastaje u slučaju ugradnje bioaktivnih materijala i predstavlja pravu vezivnom osteogenezu. Ovde se radi o bioaktivnim materijalima koji ostvaruju vezu na nivou kristalne i molekularne veze između implantata i tkiva. Ovako uspostavljene veze se odlikuju dobrim mehaničkim svojstvima, jer su otporne na sile koje deluju u pravcu njihovog raskidanja. Poslednju grupu čine vezivne osteogeneze, koje karakteriše bioinertnost implanta sa osteoinduktivnim efektom. To ukazuje na mogućnost penetracije lamelarne kosti u površinu implantata, povezujući se sa njim, dok između njih ostaju samo mikropore. Takav način veze je izuzetno pogodan jer takav mikroprostor ne omogućuje prisustvo bilo kog organizovanog tkiva. Ovde se takođe odvija fizičko-hemijski proces koji povezuje implant i tkivo na atomskom i molekularnom nivou [5].

Nakon ugradnje keramičkog implanta, organizam može da reaguje na četiri načina [6]: ako je materijal toksičan, okolno tkivo odumire; ukoliko je materijal netoksičan i biološki neaktivan, oko njega se formira vlaknasto tkivo; ako je materijal netoksičan i bioaktivan, uspostavlja se veza između prirodnog tkiva i implanta u dodirnoj oblasti; i ukoliko je materijal netoksičan, a rastvorljiv okolno tkivo će ga vremenom zameniti. U zavisnosti od odgovora organizama na ugradjeni implant, biokeramički materijali se mogu klasifikovati u četiri grupe. Prvu grupu čini gusta bioinertna keramika koja se pripaja za kost cementiranjem implantata u tkivo ili punjenjem defekta presovanjem, čiji je predstavnik Al_2O_3 . Drugu grupu čine porozni inertni keramički implantati, pri čijoj ugradnji dolazi do urastanja kosti unutar pora, što mehanički pričvršćuje kost za materijal (porozni Al_2O_3 , kalcijum-hidroksiapatit prevučeni poroznim metalima). Gusta bioaktivna keramika predstavlja treću grupu keramičkih implanata, pri čijoj se ugradnji formira hemijska veza sa koštanim tkivom, a primeri su guste forme kalcijum-hidroksiapatita, bioaktivna stakla, staklo-keramički kompozitni materijali itd. Četvrtu grupu čine gusta, neporozna (ili porozna), resorbilna keramika koja se postepeno zamenjuje koštanim tkivom (CaSO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i druge kalcijum-fosfatne soli). Na slici 1 prikazani su delovi ljudskog skeleta koji uspešno mogu da budu zamenjeni ili obnovljeni uz pomoć nekih biokeramičkih materijala.



Slika 1.1. Klinička upotreba biokeramičkih materijala

S obzirom da je naziv ovog rada: „Ispitivanje uticaja parametara procesiranja na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata dobijenih različitim tehnikama sinterovanja“, u daljem tekstu će akcenat biti na keramičkim aloplastičnim biomaterijalima na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata tj. sintetičkim materijalima koji se koriste kao supstituenti za određene delove koštanog tkiva.

Potreba za korišćenjem sintetičkih koštanih supstituenata se iz dana u dan sve više povećava, a pretpostavka je da će transplantacija kosti humanih donora i životinja u budućnosti biti prevaziđena ili sasvim isključena iz kliničke prakse. Pored činjenice da se mogu jednostavno čuvati u bolnicama, bez potrebe za koštanim bankama, sintetski biomaterijali mogu imati kontrolisan kvalitet uz optimizovane mehaničke i biološke karakteristike neophodne za specifične namene. Oni takođe mogu oblikovanjem biti prilagođeni koštanom defektu uz korišćenje minimalnih invazivnih tehnika. Pošto ograničena dostupnost autogenetske kosti predstavlja glavni problem za hirurgiju i pacijente, neorganski implantati bazirani na kalcijum-hidroksiapatitu i kalcijum-fosfatima sintetskog porekla su dobra alternativa autogenetskom materijalu [7]. Zajednička osobina svih bioaktivnih keramičkih materijala je da se pri njihovoj ugradnji na površini formira sloj kalcijum-hidroksiapatita, koji

ima identičnu strukturu kao i neorganska komponenta koštanog tkiva [6, 8]. Upravo preko ovako nastalog sloja se formira veza sa koštanim tkivom, a adhezija novonastalog sloja i kosti je često veća od kohezivnih sila u samom implantnom materijalu ili u živom tkivu.

1.2. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata

Zahvaljujući odličnoj bioaktivnosti i biokompatibilnosti, kao i zbog strukturne sličnosti sa mineralima kostiju i zuba, kalcijum-hidroksiapatit, $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, HAP, je predmet mnogih istraživanja u oblasti biomaterijala, a u cilju dobijanja kalcijum-hidroksiapatita u obliku pogodnom za zamenu određenih delova koštanog tkiva. Uprkos brojnim istraživanjima koja su vođena s ciljem da se dobiju materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, i dalje se intenzivno radi na pronalaženju optimalnih uslova procesiranja, a u cilju dobijanja materijala optimalne mikrostrukture, mehaničkih svojstava, bioaktivnosti, biokompatibilnosti, itd.

Prva publikacija koja o uspešnoj reparaciji koštanih defekata materijalom na bazi kalcijum-fosfata datira iz 1920. godine [9]. Pola veka kasnije, Levitt (1969) i Monroe sa saradnicima (1971.) svoje studije baziraju na metodama koje omogućuju dobijanje keramičkih materijala na bazi apatita polazeći od minerala fluorapatita, pritom ukazujući na mogućnost korišćenja ovako dobijenih materijala u medicini i stomatologiji [10, 11].

Clark sa saradnicima [12] i Hubbard [13] su među prvima opisali postupak za dobijanje kalcijum-fosfatne keramike polazeći od komercijalno dostupnih kalcijum-fosfatnih reagenasa. Nedugo zatim, Nery sa saradnicima [14] objavljuje prvu studiju proisteklu iz kliničke primene bifaznih biokeramičkih materijala na bazi trikalcijum-fosfata i kalcijum-hidroksiapatita.

Sredinom sedamdesetih godina, tri grupe autora [15]: Jarcho sa saradnicima u SAD [16-17], deGroot i Denisen u Evropi [18-20] i Aoki u Japanu [21, 22] istovremeno ali nezavisno baziraju svoj istraživački rad na razvoju i komercijalizaciji kalcijum-hidroksiapatita kao biomaterijala za reparaciju i zamenu koštanog tkiva. Njihova istraživanja su bila bazirana na činjenici da se mineralni deo kostiju u najvećem procentu sastoji od kalcijum-hidroksiapatita, oslanjajući se na Hench-ova istraživanja iz ranih sedamdesetih, u kojima se nastajanje hemijskih veza između kostiju i staklo-keramičkih biokompozita objašnjava formiranjem međusloja bogatog kalcijum-fosfatom.

Danas se biokeramički materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata najčešće koriste u obliku: poroznih i gustih keramičkih formi [23-27], kalcijum-fosfatnih cemenata [28, 29], biokeramičkih prevlaka na različitim metalima [30-33], kompozitnih materijala na njihovoj bazi itd.

U zavisnosti od zastupljenosti i veličine pora, keramika na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata se koristi u:

- gustoj sinterovanoj formi,
- obliku biokeramike kontrolisane poroznosti i
- formi skafolda.

Pod gustim sinterovanim biokeramičkim materijalima podrazumevaju se materijali sa maksimalnom vrednošću otvorene mikroporoznosti od 5 vol % i prečnikom pora ne većim od 1 μm [18, 20, 34]. Gusti sinterovani oblici na bazi HAP-a i kalcijum-fosfata dobijaju se konvencionalnim postupkom najčešće kroz tri sukcesivna koraka. Prvi korak je sinteza prahova kalcijum-hidroksiapatita koristeći komercijalno dostupne reagense, drugi korak je kompaktiranje na visokim pritiscima u kompakt željenog oblika i veličine i na kraju sinterovanje konvencionalnim tehnikama, na temperaturama do 1300°C [15].

Snižavanjem temperature i skraćivanjem vremena sinterovanja moguće je uticati na poboljšanje mnogih svojstava finalnog materijala. Savremene metode procesiranja gustih formi HAP-a se baziraju na sintetisanju nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita optimalnih fizičko-hemijskih karakteristika, zatim na dobijanju kompakata velikih polaznih gustina pomoću visokih pritisaka, i nakon toga sinterovanju koristeći savremene tehnike, kao što su toplo presovanje, mikrotalasno sinterovanje, spark plazma sinterovanje, toplo izostatsko presovanje itd. Na taj način se dobijaju guste forme kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata željenih svojstava, koje odgovaraju primenama ovih biomaterijala za reparaciju i supstituciju određenih delova koštanog tkiva. O prednostima i manama konvencionalnih i savremenih postupaka za dobijanje gustih formi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, kao i uticaju parametara procesiranja na svojstva ovog tipa biokeramičkih materijala će biti više reči u narednim poglavljima.

Guste forme kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata se u medicinskoj i stomatološkoj praksi primenjuju kao samostalni implantni materijali (npr. maksiofacijalni i dentalni implantni) ili kao delovi kompleksnijih sistema (npr. pri izradi dentalnih proteza, prilikom izrade veštačkih kukova itd.) [35, 36]. Koristeći navedene metode, guste forme HAP-a mogu se dobiti u vidu pravilnih i nepravilnih delova za zamenu pojedinih delova zuba. Moguće je dobiti ih i u obliku pogodnom za zamenu određenih delova srednjeg uha, o čemu govore brojne publikacije [37, 38]. Ova vrsta biomaterijala se neposredno koristi prilikom zamene korena zuba, sa ciljem da se minimalizuje resorpcija alveolarnog grebena kao i da se sačuva njegov oblik i veličina, što znatno povećava verovatnoću da zub sačuva svoju funkciju [20, 39]. Koriste se i za povećavanje alveolarnih grebena, sa ciljem da organizam bolje prihvati ugrađene dentalne proteze [18, 40, 41]. U formi blokova guste HAP forme se koriste kao mete pri površinskoj implantaciji određenih vrsta jona.

Pojedini autori navode da se guste forme HAP mogu koristiti kao materijal za ispunu koštanih defekata u dentalnoj i ortopedskoj praksi [42-47]; kao umetak pri ugradnji metalnih implantata [48]; kao matrix pri formiranju kompozitnih materijala [49, 50]; kao materijal za ispunu zubne pulpe [51, 52]; kao materijal za maksiofacijalne rekonstrukcije gde se zahtevaju precizno izrađeni oblici za zamenu određenih delova koštanog tkiva [17, 53] itd.

Sve navedene primene baziraju se na superiornijim mehaničkim svojstvima guste kalcijum-fosfatne keramike, u odnosu na porozne kalcijum-fosfatne keramičke materijale. Od mehaničkih karakteristika potencijalnih implantnih gustih formi u mnogome zavisi njihova potencijalna primena. Žilavost, tvrdoća, čvrstoća na pritisak i savijanje i svi ostali mehanički parametri u velikoj meri zavise od oblika i udela poroznosti u dobijenom materijalu. Porozna kalcijum-fosfatna keramika se sama ne može primenjivati na mestima koja su izložena velikom naprezanju, već u kombinaciji sa polimerima, kao prevlaka na metalima ili u kombinaciji sa gustim biokeramičkim materijalima u zavisnosti od vrste aplikacije.

Kontrolisano porozni biokeramički materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata su takođe u velikoj meri zastupljeni u kliničkoj praksi [54-56]. Za razliku od gustih formi čiji glavna prednost leži u dobrim mehaničkim svojstvima i postojanosti tokom vremena, porozni biokeramički materijali se usled postojanja pora odlikuju većom potencijalnom dodirnom površinom za ostvarivanje veze sa tkivom. Oni tako mogu da ostvare čvrst mehanički kontakt sa živim tkivom i na taj način doprinesu boljoj osteokonduktivnosti [35, 57, 58].

Porozni biokeramički materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata su našli primenu u inženjerstvu tkiva, kao i u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova [59, 60]. Kontrolisano porozni biokeramički materijali mogu da se svrstaju u dve grupe, a to su materijali kontrolisane mikroporoznosti i materijali kontrolisane makroporoznosti. Makroporoznost, prema pojedinim autorima, ima uticaj na kontrolu prilaza tkiva i bioloških fluida implantiranom materijalu, dok mikroporoznost ima uticaja na adheziju implantiranog materijala i tkiva, kao i na brzinu resorpcije kalcijum fosfata.

Kod makroporozne keramike veza između implanta i tkiva se formira urastanjem kostiju unutar pora na površini ili kroz ceo implant. Da bi tkivo moglo da uraste u materijal veličina pora treba da iznosi od 100 – 400 μm u prečniku, kako bi se obezbedilo snabdevanje krvlju za rast vezivnog tkiva. Vaskularno tkivo se ne javlja ako su pore manje od 100 μm [54, 61]. Kao dobro rešenje za dobijanje materijala sa kontrolisanom veličinom pora ovih dimenzija korišćena je mikrostruktura korala (Goniopora i Porites). White je sa saradnicima [3, 62] razvio proces kojim je preslikao mikrostrukturu korala i tako dobio uniformne pore željene veličine. Porozni materijali se mogu dobiti i kompaktiranjem prahova sa raznim jedinjenjima čijim bi se naknadnim uklanjanjem iz strukture (sagorevanjem, rastvaranjem itd.) dobila poroznost kontrolisanog udela i dimenzija. Predtretman hidroksiapatita pre sinterovanja vodonik-peroksidom takođe može biti izazivač kontrolisane makroporoznosti. Porozni biokeramički materijali sa veličinom pora od 100 – 150 μm , a maksimalnom oko 500 μm su

predstavnicima skafoldnih materijala. Osnovna uloga osteokonduktivnih skafolda je održavanje prostora ili volumena u kome se može formirati kost. Ovo je naročito važno kod defekata "kritične veličine", kod kojih postoji konkurencija između rasta koštanog i mekog tkiva unutar defekta [63-67].

Kontrolisanjem mikroporoznosti biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, tj. kontrolisanjem oblika i veličina pora, moguće je uticati na njihove mehaničke karakteristike. Kumar sa saradnicima je polazeći od kompozitnog praha na bazi HAP i cirkonijum-dioksida, sastavljenog od mikrosfernih čestica, dobio sinterovani materijal sa prisustvom pora sfernog oblika veličine nekoliko mikrona i izuzetno dobrim mehaničkim karakteristikama za ovaj tip keramičkih materijala. Pažljiva kontrola poroznosti, u kombinaciji sa dobrim mehaničkim karakteristikama može biti dobar preduslov za dobijanje implantnog materijala optimalnih svojstava za pojedine kliničke primene [27, 56, 59, 68]. Više o uticaju poroznosti na svojstva biokeramičkih materijala, o postupcima za dobijanje kontrolisano poroznih formi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, kao i o uticaju parametara procesiranja na svojstva ovog tipa biokeramičkih materijala će biti više reči u narednim poglavljima.

Kalcijum-fosfatni biokeramički materijali se u zavisnosti od broja faza koje sadrži dele u tri grupe [69]:

- Monofazna: hidroksiapatit (HAP), α i β trikalcijum-fosfat (α – TCP, β – TCP) i tetrakalcijum-fosfat (TTCP);
- Bifazna (BCP): α -TCP + β -TCP, HAP + α -TCP, HAP + β -TCP, α -TCP + TTCP;
- Multifazna: različite mešavine monofazne keramike.

Stabilnost pojedinih faza kalcijum-fosfatne keramike zavisi od temperature, prisustva vode i od prirode okruženja [3, 70]. Na temperaturi tela, u kontaktu sa telesnim fluidima stabilne su samo dve faze: pri $\text{pH} < 4,2$ stabilna faza je $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dok je pri $\text{pH} \geq 4,2$ stabilna faza $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Na visokim temperaturama nastaju, a nakon toga su stabilne na sobnoj temperaturi i druge kalcijum-fosfatne faze, kao što su Ca_3PO_4 (α - i β -trikalcijum-fosfat) i $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (tetrakalcijum-fosfat, TTCP).

2. KALCIJUM-HIDROKSIAPATIT

Termin apatit predstavlja čitavu grupu jedinjenja slične, ali ne identične strukture. Opšta hemijska formula apatita je [71]:



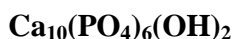
pri čemu A, BO_4 i X mogu biti:

A = Ca, Mg, Sr, Ba, Fe, Cd, Pb, Al...

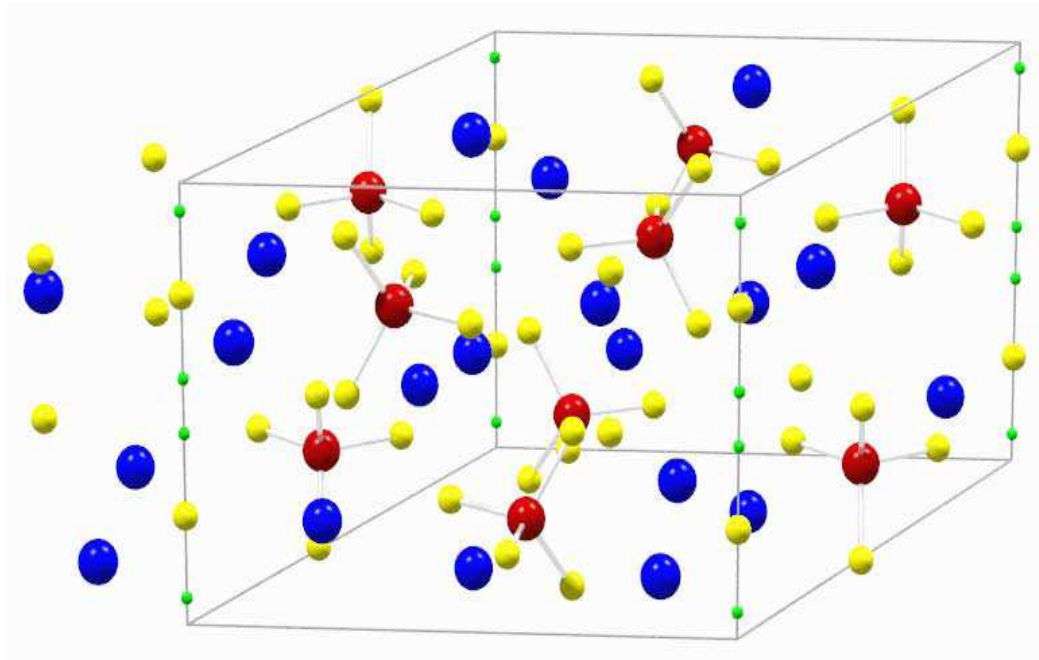
$BO_4 = PO_4^{3-}, VO_4^{3-}, SiO_4^{4-}, AsO_4^{3-}, CO_3^{2-}$

X = $OH^-, Cl^-, F^-, CO_3^{2-}$

Kalcijum-hidroksiapatit je tipičan predstavnik ove grupe jedinjenja sa tačno definisanom hemijskom formulom:



Kristalna struktura kalcijum-hidroksiapatita prikazana je na slici 2.1 [72]. Hidroksiapatit kristališe heksagonalno i ima prostornu grupu $P6_3 / m$. Jedinična ćelija hidroksiapatita ima dve ivice iste dužine $a = b = 9,432 \text{ \AA}$, dok treća ivica koja je normalna na prethodne dve ima dužinu $c = 6,881 \text{ \AA}$. Hidroksilni joni leže na uglovima rombične baze jedinične ćelije praveći stubove hidroksilnim grupama sa rastojanjem polovine visine jedinične ćelije. Šest jona kalcijuma je asociirano sa ovim hidroksilnim grupama praveći jednakostranične trouglove. Trouglovi su normalni na hidroksilne grupe. Susedni trouglovi su međusobno rotirani za 60° . Četiri atoma kalcijuma leže duž dva razdvojena niza koji su paralelni nizovima hidroksilnih grupa na polovini rastojanja između trouglova kalcijuma. Ovi atomi kalcijuma su koordinirani atomima kiseonika iz ortofosfornog tetraedra. Atomi kiseonika iz hidroksilnih grupa su pomereni za $0,3 \text{ \AA}$ od ravni trouglova kalcijuma. Hidroksilne grupe su tako orjentisane da se O-H veza nalazi duž ose, ali ne seče ravan trouglova kalcijuma.



a)

b)



*Slika 2.1. Kristalna struktura kalcijum-hidroksiapatita:
 (a) 3D pozicija atoma, (b) projekcija u pravcu c-ose [41, 72].*

Kalcijum-hidroksiapatit se javlja u tri modifikacije:

- stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit (HAP),
- kalcijum deficitaran hidroksiapatit (CDHAP) i
- oksihidroksiapatit (OHAP).

Stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit je onaj koji se može predstaviti formulom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Do odstupanja od stehiometrijskog sastava hidroksiapatita dolazi usled nedovoljnih količina kalcijuma pri sintezi HAP-a, a takođe i usled prisustva malih količina karbonata tokom sinteze, pri čemu se fosfatna grupa (tetraedarska) zamenjuje karbonatnom grupom (planarnom). Kompenzacija valentnosti se vrši zamenom O^{2-} jona OH^- jonima po šemi $\text{PO}_4^{3-} \leftrightarrow [\text{CO}_3\text{OH}]^{3-}$. Tako nastaje kalcijum deficitarni hidroksiapatit (CDHAP), odnosno karbonatni kalcijum-hidroksiapatit, koji je identičan biološkom hidroksiapatitu koji čini mineralnu fazu koštanog tkiva [73]. Oksihidroksiapatit (OHAP) se može predstaviti formulom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x$, gde kiseonični joni i šupljine zamenjuju hidroksilne jone. U slučaju da je umesto hidroksilnih grupa prisutan fluor, on će ležati u centru trouglova kalcijuma. Kada su u strukturi apatita prisutni i fluoridni i hidroksilni joni doći će do stvaranja vodoničnih veza, a ovaj apatit ima manju rastvorljivost u odnosu na hidroksiapatit i fluoroapatit (najmanju rastvorljivost ima apatit u kome je odnos hidroksilnih i fluoridnih jona 1 : 1).

2.1. Kalcijum-hidroksiapatit u prirodi

Hidroksiapatiti se osim u biološkim sistemima sreću i u prirodi [74, 75, 76]. U magmatskim i metamorfnim stenama apatiti se javljaju kao primarni minerali, dok se u sedimentnim stenama sreću kao sporedni sastojci. Pod uticajem atmosferskih prilika, tokom miliona godina, primarni minerali su se rastvarali i na taj način fosfati su dospevali u hidrosferu gde su se koncentrisali najpre u morskim organizmima, a zatim na dnu okeana. Sedimentni apatiti nalaze se blizu zemljine površine u slojevima debljine od nekoliko centimetara do preko deset metara. Najbogatija nalazišta apatita otkrivena su u Maroku, Americi, Kini, Tunisu, Kazahstanu, Alžiru i Jordanu.

Apatiti koji se sreću u prirodi obično nemaju stehiometrijski sastav. U njima su uobičajeni kristalografski defekti, izazvani suptitucijom velikog broja jona. Česta pojava u prirodnim apatitima je da na mestima hidroksilnih grupa prisutan fluor. Primeri polikristalnog i monokristalnog prirodnog apatita prikazani su na slici 2.2. Njihova različita boja potiče upravo od inkorporiranih jona obojenih metala [77, 78].



Slika 2.2. Primeri polikristalnog (levo) i monokristalnog (desno) prirodnog apatita [74]

U prirodi je poznato više od 200 vrsta fosfatnih jedinjenja, među kojima samo apatiti mogu da posluže kao komercijalni izvor fosfora [79]. Osim u medicinske svrhe hidroksiapatiti se koristi i kao materijal za sorpciju određenih jona, kao katalizator, kao materijal za punjenje hromatografskih kolona, kao gasni senzor itd. Kalcijum–hidroksiapatit je ipak najznačajnija so kalcijuma i fosfora, i njegovo najznačajnije pojavljivanje u prirodi je u vidu neorganske komponente koštanog tkiva živih organizama.

2.2.Kalcijum-hidroksiapatit u biologiji i medicini

Kalcijum-hidroksiapatit je predstavnik bioloških apatita koji su konstituenti mineralne faze kalcificiranog tkiva (enamel, zubi i kosti), kao i neke od patoloških kalcifikacija kao što su zubni kamenac, kamen u urinarnom traktu itd. Biološki apatiti se razlikuju i međusobno, i od sintetičkog HAP po stehiometriji, sastavu, kristalnoj strukturi i ostalim fizičko-hemijskim i mehaničkim svojstvima (Tabela 2.1.). Biološki apatiti su obično kalcijum deficitarni i u njihovoj strukturi je uglavnom izvršena supstitucija fosfatnih jona karbonatnim [80, 81].

Biološki apatiti gleđi razlikuju se od apatita dentina ili kosti po kristaliničnosti i koncentraciji CO_3^{2-} i Mg^{2+} . Apatiti enamela sadrže najmanju količinu karbonatnih i jona magnezijuma i imaju veće kristale u poređenju sa dentinom ili kostima. Apatit enamela je manje rastvoran od apatita dentina ili kosti, ali je rastvorljiviji od gustog HAP dobijenog na visokoj temperaturi. Razlike u veličini kristala i rastvorljivosti između apatita enamela, dentina i kosti mogu biti pripisane delom i razlici u koncentraciji karbonatnih i jona magnezijuma koji su prisutni u njima [82, 83, 84]. Biološki apatiti humanog enamela, dentina i kosti takođe daju različite proizvode nakon sinterovanja iznad 800°C , jer se razlikuju po sastavu, prvenstveno usled različite kalcijum deficitarnosti. Sinterovanjem apatita kostiju iznad 800°C dobija se uglavnom HAP i mala količina CaO. Sinterovanjem apatita enamela i

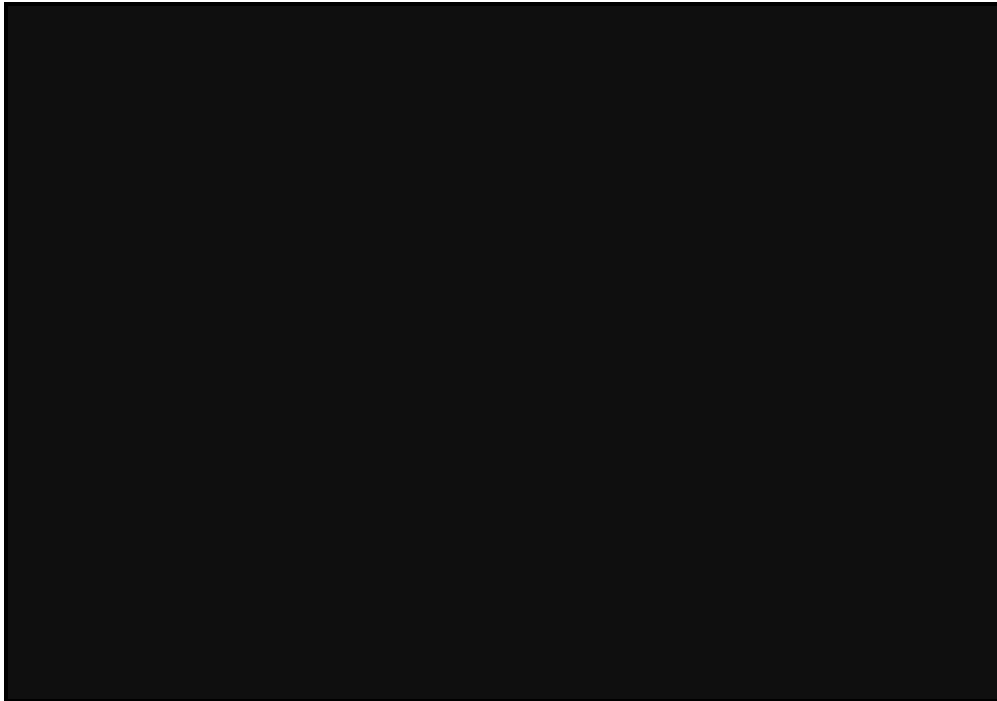
dentina iznad 800°C dobija se HAP i mala količina β -TCP (oko 5 mas.% u enamelu i oko 12 mas.% u dentinu) [15, 34, 85].

Tabela 2.1. Uporedni prikaz sastava, kristalografskih i mehaničkih karakteristika humane gleđi, kostiju i sintetisanog hidroksiapatita [15, 85]

	Enamel	Kost	Sintetisani HAP
Sastav (mas. %):			
Kalcijum, Ca	36,0	24,5	39,6
Fosfor, P	17,7	11,5	18,5
(Ca/P) molarni	1,62	1,65	1,67
Natrijum, Na	0,5	0,7	tr
Kalijum, K	0,08	0,03	tr
Magnezijum, Mg	0,44	0,55	tr
Karbonatni joni, CO_3^{2-}	3,2	5,8	-
Fluoridni joni, F^-	0,01	0,02	-
Hloridni joni, Cl^-	0,30	0,10	-
Pepeo (potpuno neorganski)	97,0	65,0	100
Organski deo	1,0	25,0	-
Apsorbovana H_2O	1,5	9,7	-
Elementi u tragovima: Sr, Pb, Ba, Fe, Zn, Cu	tr	tr	tr
Kristalografske osobine			
Parametri rešetke (+/- 0.003 Å)			
a-osa	9,441	9,419	9,422
c-osa	6,882	6,880	6,880
Indeks kristaličnosti	70-75	33-37	100
Veličina kristala, nm	130 x 30 nm	250 x 25-50	
Proizvodi nakon sinterovanja (950°C)	HA + TCP	HA + CaO	HA

Osnovna funkcija skeletnog sistema je da daje potporu telu i da štiti pojedine delove tela i organe. Kosti se sastoje od organskog i neorganskog dela. Organski deo sintetišu uglavnom osteoblasti, a čine ga vlakna kolagena i amorfna osnovna supstanca. Osnovna supstanca se sastoji od glikoproteina i glikozaminoglikana, dok neorganski deo čine kristali kalcijum-hidroksiapatita igličastog oblika dužine 20-40 nm i debljine 1,5-3 nm, koji leže duž vlakana kolagena dajući kosti tvrdoću i otpornost.

Struktura kostiju prikazana je na slici 2.3. Kolagena vlakna u kalcifiranom matriksu grade pravilno raspoređene lamele (debljine 3-7 μm). Ove lamele su međusobno paralelne i organizovane su kao koncentrični valjkovi oko središnje šupljine tj. Haversovog kanala u kome se nalaze krvni sudovi i nervna vlakna okružena vezivnim tkivom. Sve koncentrične lamele koje okružuju jedan Haversov kanal se nazivaju Haversov sistem ili osteon. Svaki osteon je izgrađen od 4-20 lamela. Kolagena vlakna u jednoj lameli su međusobno paralelna i čine spirale oko Haversovog kanala [2, 86].



Slika 2.3. Mikro i makro struktura kosti

Kost se može posmatrati kao kompozitni materijal sastavljen od tri glavne komponente: polimera, neorganske komponente i viskozne tečnosti.

Neorganska komponenta kostiju sadrži različite kalcijum-fosfate. Najvažniji i najzastupljeniji je kalcijum-hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, koji se obično javlja sa mnogim supstitucijama u molekulu: K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , i Na^+ umesto Ca^{2+} ; karbonatni joni umesto

fosfatnih jona i fluoridni joni umesto OH^- grupe [87]. Neke od navedenih supstituenata imaju značajan uticaj na strukturu i mehanička svojstva minerala kostiju.

Proces stvaranja kostiju naziva se osteogeneza ili osifikacija [2]. Osteogeneza je složen proces. Odvija se u mladom vaskularizovanom vezivu mezenhimnog tipa, u kome se pojavljuju koštane ćelije koje stvaraju kost (osteoblasti) i remodelirajuće ćelije (osteoklasti). Osteoblasti su ovalne ćelije veličine 15-20 mikrometara. Sintetišu organski matriks, koji se sastoji od mukopolisaharida (osteomukocid) i kolagenskih vlakana. Postoji još jedan tip ćelija - prelazna forma, između mezenhimnih ćelija i osteoblasta, a to su osteogene ćelije. Nepravilnog su oblika, nešto izdužene sa svetlijom citoplazmom i svetlijim jedrom. Malo se razlikuju od mezehimnih ćelija, ali se nalaze u blizini osteoblasta. Od osteogenih ćelija nastaju osteoblasti. Međutim i od osteoblasta mogu nastati osteogene ćelije. Osteoblasti i osteogene ćelije se nalaze, kod potpuno formirane kosti, u koštanim kanalima (Haversovim i Volkmanovim), u endoostu i u unutrašnjem sloju periosta. Osnovna funkcionalna karakteristika osteogeneze je stalno i istovremeno odvijanje dva paralelna procesa: stvaranje i razaranje kosti. Prvi obezbeđuju osteoblasti, a drugi osteoklasti. Mišljenje je da se hidroksiapatit ne taloži direktno iz vanćelijskog fluida u kosti, ali da se prekursor kalcijum-fosfat prvi formira i transformiše u hidroksiapatit. Pretpostavlja se da je inicijalni mineral brušit, tj. da ovaj mineralni prekursor obezbeđuje ravnotežu u keramičkoj fazi kostiju [88, 89].

Posmatrano mikroskopski čitav skelet je, izuzev ljuske lavirinta, građen od lamelarne kosti, tj. od sistema koštanih lamela koje nastaju okoštavanjem međućelijske supstance, tj. ulaganjem kalcijumovih soli u supstancu između kolagenih fibrila. Postoji mišljenje da je veza između kolagena iz kosti i mineralne faze mnogostruka i kompleksna. Kada osteoblasti stvaraju kost, sadrže vodu umesto minerala. Postepeno, organski matriks, nazvan osteoid, "sazreva" i kalcifikacija počinje. Pretpostavlja se da je inicijalna precipitacija kristala minerala katalizovana elementima u kolagenskoj strukturi, kao i drugim biohemijskim regulatorima. Prema tome, fizičko uređenje ove dve faze razvija se na osnovu strukture svake od ovih faza. Inicijalni kristali rastu u trakama kolagena, i zatim se šire kroz celu strukturu kolagena. Kod ljudi, nova kost postiže oko 70 % svoje mineralne kapacitivnosti za period od otprilike 4 dana. Ovaj proces je poznat kao primarna mineralizacija. Sekundarna mineralizacija zahteva mesece sporog i asimptotskog dovođenja kosti u normalan mineralni sadržaj. To nije maksimum mineralizacije koju kost može da dostigne. Ponekad se uočava da je koštani matriks hiperkalcificiran. U literaturi se navodi da je vreme potrebno da se ovaj proces završi oko 8 meseci posle inicijalnog formiranja dela kosti, ali se može dogoditi da traje i godinama posle. Hipermineralizacija uključuje ne samo dalju mineralizaciju organskog matriksa, već i mineralizaciju mekog tkiva u ćelijskom međuprostoru. Ovo je patološko stanje, koje se ne dešava kod normalne kosti, uključuje izumiranje ćelija, i po svoj prilici doprinosi tome da kost bude krta i manje žilava. Hipermineralizacija je takođe uočena uz razlaganje usled zamora materijala. Pretpostavlja se da osteociti održavaju sadržaj jona minerala kosti na nivou ispod koncentracije u krvnom serumu. Izumiranje osteocita može teoretski dozvoliti

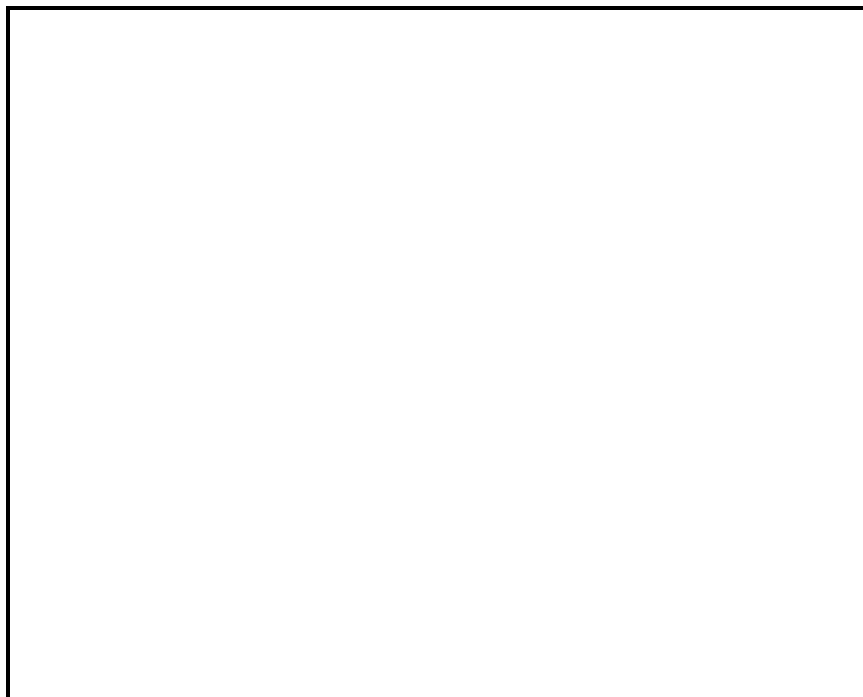
hipermineralizaciju. Tok stvaranja kosti u suštini teče u dve faze i one se sukcesivno smenjuju. U prvoj fazi osteoblasti izgrađuju organski matriks (osteomukoid, osteoalbumin i kolagena vlakna) i on se naziva osteoid. U drugoj fazi osteoid se mineralizuje i postaje koštano tkivo. Mineralizacija je taloženje kristala kalcijum-hidroksiapatita u intracelularnu supstancu. Pod uticajem alkalne fosfataze koju luče osteoblasti, cepaju se glicerofosfati, oslobađajući fosfatne jone koji se vezuju sa jonima kalcijuma iz tkiva u kalcijum-fosfate, koji predstavljaju osnovni deo mineralnog dela kosti, približno 85 %. Kalcijum-karbonat je zastupljen sa približno 10 %, a ostatak čine kalcijum-hlorid i magnezijum-hlorid. Sve ove soli stvaraju kristale hidroksiapatita, koji oblažu fibrile, a prodiru delimično između njih. Potpuna mineralizovana kost sastoji se od dva osnovna dela: organskog (oko 33 %) i neorganskog (oko 67 %).

Osim u kostima, kalcijum-hidroksiapatit se i u zubima javlja kao osnovni konstituent, ali u nešto drugačijem obliku, a i sam hemijski sastav delova zuba se razlikuje u poređenju sa hemijskim sastavom kostiju. Hemijski sastav neorganskog dela zuba i kostiju (izražen u procentima) prikazan je u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Uporedni prikaz sastava neorganskog dela zuba i kosti

Sloj zuba	Mineralni sastojci	Ca	P	CO ₂	Mg	N	Ca/P	P/CO ₂
gled	96,0	35,8	17,4	3,06	0,38	0,41	2,08	5,69
dentin	76,0	27,14	13,5	3,84	0,85	3,44	2,01	4,75
cement	72,7	25,93	12,4	3,42	0,78	4,28	2,08	3,64
kost	71,3	26,42	11,8	4,23	0,42	4,48	2,22	2,80

Osnovnu masu zuba čini zubni dentin ili zubna kost. U predelu zubne krunice nju prekriva zubna gled (deo sa najvećim sadržajem mineralnih sastojaka, tabela 2.2), a u predelu korena zubnu kost prekriva zubni cement. U središnjem delu krunskog i korenskog dela je zubna pulpa koja se sastoji od krvnih sudova i nervnih završetaka (Slika 2.4). Dentin predstavlja tkivo slično kosti, avaskularno i kalcifikovano. Oko 70% mase dentina čine soli kalcijuma. Nekalcifikovan je samo tanak sloj dentina (predentin) koji se nalazi neposredno uz odontoblaste.



Slika 2.4. Struktura zuba

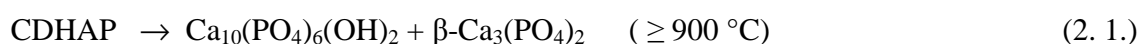
Osnovni izvorni materijal za stvaranje neorganskih soli kosti i zuba, fosfor i kalcijum, se nalaze u krvi. Pre deponovanja fosfata kalcijuma u neokoštalom tkivu kosti i zuba dolazi do deponovanja organskih fosfatnih jedinjenja, najčešće u vidu ATP i glikogena u osnovnom tkivu koje okoštava u toku formiranja kosti. Posle složenih biohemijskih i fizioloških procesa dolazi do formiranja apatita koji ispunjava medjuprizmatične prostore kod zubne kosti. Ceo ovaj proces zavisi od količine kalcijuma i fosfora u krvi i samom tkivu koje okoštava, od pravilne funkcije nekih endokrinih žlezda (paratireoidne, tireoidna i hipofiza) i od prisustva vitamina u hrani, a naročito A, D i C.

2.3. Svojstva kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata

Kao što je već rečeno, sa jedne strane, kao najvažniji konstituent neorganske faze kostiju i zuba, a sa druge strane kao jedinjenje koje je moguće dobiti iz vodenih rastvora i pogodnim načinom procesiranja prevesti u biokeramički materijal željenih karakteristika, kalcijum- hidroksiapatit predstavlja predmet mnogih istraživanja. Stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit ima teorijski sastav: 39,68 mas. % Ca, 18,45 mas. % P, Ca/P maseni odnos 2,151, Ca/P molarni odnos 1,67.

Stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit ima veliku termičku stabilnost na temperaturama do 1200 °C, tj. na temperaturama manjim od 1200 °C ne dolazi do fazne transformacije HAP u druge kalcijum-fosfate. Uslovi sinteze praha kao i karakteristike dobijenog praha u mnogome utiču na fazni sastav sinterovanih biokeramičkih materijala. Ispitivanjem uticaja parametara sinteze pri precipitaciji HAP na termičku stabilnost HAP, došlo se do zaključka da niska koncentracija reaktanata i visoka reakciona temperatura dovode do povećanja termičke stabilnosti [28, 29]. Odsustvo pikova ostalih kalcijum-fosfata na difraktogramima prahova HAP žarenih na temperaturama manjim od 1200 °C, predstavlja svojevrsnu potvrdu njihove stehiometrijske prirode [23, 24, 26].

U slučaju kada je Ca/P molarni odnos manji od 1,67, tj. kada je reč o kalcijum deficitarnom hidroksiapatitu (CDHAP), sinterovanjem na temperaturama u intervalu od 900 do 1500 °C, dolazi do formiranja sledećih kalcijum-fosfatih jedinjenja: β -TCP, α -TCP (nastaje transformacijom β -TCP na temperaturama iznad 1100 °C), tetrakalcijum-fosfat $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ (TTCP) i oksiapatita prema reakcijama [90]:



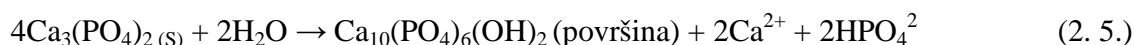
Iz jednačine 2.4 se može uočiti da kao jedan od produkata termičkog razlaganja HAP može biti i CaO. Prema nekim autorima, proizvod žarenja kalcijum deficitarnog hidroksiapatita na temperaturama iznad 900 °C je anhidrovni dikalcijum-fosfat, DCP. Kako DCP nije stabilan na ovim temperaturama, on se transformiše u β -TCP, koja predstavlja čestu pojavu pri sinterovanju CDHAP na temperaturama iznad 900 °C. Na temperaturama iznad 1100 °C trikalcijum-fosfat se pojavljuje i u vidu svoje visokotemperaturne faze α -TCP, koja nastaje transformacijom β -TCP. Ukoliko se sinterovanje apatita odvija uz prisustvo vodene pare formiranje drugih kalcijum-fosfatnih faza (β - i α -TCP, TTCP) će biti smanjeno i HAP će biti dominantna faza u konačnom proizvodu [91, 92]. Na stabilnost određene faze tokom žarenja može da se utiče i supstituisanjem određenih jona u strukturi HAP.

β - TCP ne može da se dobije precipitacijom iz vodenih rastvora, već samo može da nastane kao proizvod pri sinterovanju CDHAP. Može da se dobije kontrolisanim žarenjem prirodnih kostiju, s tim što u sastavu konačnog proizvoda zaostaju prirodno supstituisani joni [74]. β - TCP je stabilnija faza na sobnoj temperaturi, dok je visokotemperaturna modifikacija α -TCP rastvorljivija u vodi. Idelna struktura za stabilnost β - TCP je struktura koja u sebi sadrži vakansije koje su male da se u njih smesti jon kalcijuma, ali su dovoljno velike da

prihvate jon magnezijuma, koji utiče na stabilnost ove faze. Čist β - TCP nikada nije pronađen u biološkim sistemima, već samo u obliku β -(Ca,Mg)₃(PO₄)₂ [82, 93-97]. U medicinskoj praksi, β - TCP se koristi u obliku fosfatnih cementa [98-101] ili se nalazi u sastavu keramičkih biomaterijala u kombinaciji sa HAP [26, 27, 56,68, 102-109].

Kao što je već naglašeno, na temperaturama do 1125 °C trikalcijum-fosfat nastaje u obliku svoje visokotemperaturne modifikacije α -TCP. S obzirom da prisustvo silicijuma u malim procentima stabilizuje ovu fazu, neki autori je zovu silicijum-stabilisan α -TCP. U prisustvu jona silicijuma α -TCP može da nastane i na temperaturama nižim od 1000 °C. β - i α -TCP imaju isti hemijski sastav, ali se znatno razlikuju po pitanju kristalne strukture i rastvorljivosti. α -TCP faza je dosta reaktivna u vodenim rastvorima, tj. sklona je hidrolizi, zahvaljujući čemu je ovaj materijal našao izuzetno široku primenu pri proizvodnji fosfatnih cementa [28, 29, 110-118].

Kalcijum-hidroksiapatit i trikalcijum-fosfat (β - i α -TCP) su najčešće zastupljena jedinjenja u sintetskim biokeramičkim materijalima. Kalcijum-fosfatna faza reaguje sa vodom ili telesnim fluidima, na 37°C i formira se kalcijum-hidroksiapatit prema jednačini:



Primena kalcijum-fosfatne keramike u mnogome zavise od njenih mehaničkih svojstava. O mehaničkim svojstvima biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata biće dosta reči kasnije, a u tabeli 2.3. date su literaturne vrednosti nekih strukturnih i mehaničkih karakteristika hidroksiapatita.

Tabela 2.3. Fizičko-hemijske i strukturne karakteristike hidroksiapatita

Prostorna grupa	P6 ₃ /m
Parametri rešetke	a = b = 9,432 Å; c = 6,881 Å
Teorijska gustina [g/cm ³]	3,168
Tvrdoća po Vickersu – u [GPa]	0,6-3
Čvrstoća na pritisak [MPa]	500 – 1000
Čvrstoća na savijanje [MPa]	115 – 200
Jung-ov modul [GPa]	80 – 100
Žilavost k _{Ic} [MPa m ^{1/2}]	0,6-1,0

Drugi kalcijum-fosfati, kao što je β -trikalcijum-fosfat (β -TCP) imaju lošija mehanička svojstva od HAP, zbog čega im je primena ograničena. Zahvaljujući tome što se β -TCP rastvara mnogo brže od HAP, i tome što lako podleže transformacijama i resorpciji pod uticajem osteoklasta, u njegovom prisustvu dolazi do stimulacije aktivnosti osteoblasta u

procesu stvaranja kosti. Stoga se u cilju dobijanja keramike dobrih mehaničkih karakteristika i odgovarajućih resorbilnih svojstava, HAP meša sa β -TCP. Ova keramika je poznata pod nazivom bifazna kalcijum-fosfatna keramika (BCP).

Na mehanička svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata pored parametara procesiranja, kao što su vreme zadržavanja na temperaturi sinterovanja, maksimalna temperatura pri procesiranju, pritisak na kome se presuju polazni kompakti, primenjene tehnike sinterovanja kojima se materijal finalno procesira, u velikoj meri utiču karakteristike polaznih prahova. Od karakteristika polaznih prahova, pored već pomenutog Ca/P molarnog odnosa, veliki uticaj na svojstva materijala imaju i oblik i veličina čestica prahova, stepen njihove aglomerisanosti, oblik aglomerata, hemijski sastav itd.

2.4. Sintetisanje prahova kalcijum-hidroksiapatita

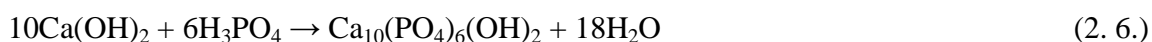
Veliki broj postupaka sinteze kalcijum-hidroksiapatita je do danas objavljen sa ciljem da se dobije prah sa optimalnim karakteristikama, u zavisnosti od potencijalne namene. S obzirom da karakteristike polaznog praha, kao što su veličina čestica, stepen aglomerisanosti, odnos Ca/P, specifična površina itd., u velikoj meri određuju svojstva sinterovanih biokeramičkih materijala, sintetisanju prahova HAP sa razlogom poklanja velika pažnja. Primera radi, odnos Ca/P polaznog praha kalcijum-hidroksiapatita ima uticaj na fazni sastav sinterovanog biokeramičkog materijala. Veličina i oblik čestica praha i stepen njihove aglomerisanosti utiču na kompresibilnost i gustinu polaznih kompakata, samim tim na izbor uslova sinterovanja, koji određuju mnoga svojstva sinterovanih biokeramičkih materijala. Najveći broj postupaka sinteze bazira se na dobijanju hidroksiapatita iz vodenih rastvora, a karakteristike praha u velikoj meri zavise od stepena presićenja rastvora u odnosu na neku kalcijum-fosfatnu fazu. Kalcijum-hidroksiapatit je moguće dobiti iz kalcijum-fosfatnih prekursora ili bez njih, a prekursori mogu biti: oktakalcijum-fosfat, amorfni trikalcijum-fosfat, dikalcijum-fosfat dihidrat itd. Hidroksiapatit je moguće dobiti direktno, bez pojave prekursora, iz rastvora koji ima niži stepen presićenja prema hidroksiapatitu u poređenju sa rastvorima iz kojih su dobijene amorfne prekursorske faze.

Kalcijum-hidroksiapatit je moguće dobiti: različitim modifikacijama precipitacije iz vodenih rastvora [119-122], primenom hidrotermalnih uslova sinteze [123-127], reakcijama u čvrstom stanju [128, 129], sol-gel tehnikama [130-132], hidrolizom drugih kalcijum-fosfata, precipitacijom u prisustvu uree, glicina, formaldehida, heksametilentaamina [133-136], primenom sprej pirolize [137], sintezama sa primenom ultrazvuka i mikrotalasa [138, 139] itd.

Hidroksiapatiti dobijeni navedenim tehnikama su u najvećem broju slučajeva kalcijum deficitarni (Ca/P molarni $< 1,67$) [140-142]. Ukoliko se sinteza izvodi u vrlo baznoj sredini,

talog može da sadrži karbonate, što utiče na povećanje odnosa Ca/P iznad 1,67. Treba naglasiti da je do sada ogroman broj studija bio posvećen problematici vezanoj za sintezu stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita (Ca/P = 1,67), s obzirom da je upravo ovaj Ca/P odnos preduslov za dobijanje monofaznih kalcijum-hidroksiapatitnih biokeramičkih materijala [143, 144].

Prema pojedinim autorima, sinteze koje vode ka formiranju stehiometrijskog HAP-a se mogu podeliti na osnovu mnogih kriterijuma u nekoliko vrsta [145]. Najčešće korišćene sinteze su, kako ih u literaturi navode, precipitacione metode bazirane na teorijskom sastavu kalcijum-hidroksiapatita. Zajedničko za ove reakcije je da odnos Ca/P u reakcionoj smeši mora da bude 1,67. Polazna jedinjenja kalcijuma su obično CaCO₃, CaO, Ca(OH)₂ itd. Pri sintetisanju stehiometrijskog HAP poželjno je uspostaviti inertnu atmosferu u cilju sprečavanja apsorpcije CO₂, koji je uvek prisutan u vazduhu i vrlo lako se inkorporira u apatitnu strukturu. Ulaskom CO₃²⁻ u hidroksiapatitnu strukturu, mogu da nastanu dva tipa karbonatnih hidroksiapatita. Tip »A« nastaje u slučaju kada jedan jon CO₃²⁻ supstituiše dva jona OH⁻, pri čemu se formira jedna vakancija. U tipu »B«, karbonatni jon zamenjuje fosfatni jon, a pritom nastaje katjonska vakancija. Od jedinjenja fosfora pri sintetisanju stehiometrijskog HAP najčešće se koristi ortofosforna kiselina visoke čistoće ili amonijum-hidrogenfosfat, a tipična reakcija koja prati ove postupke sinteze je:



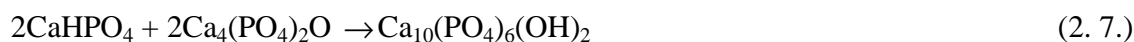
Nitrati i amonijumove soli se često koriste umesto hlorida i soli natrijuma [146], zbog jednostavnog razlaganja soli NH₄NO₃, koja nastaje pri ovim procesima kao nuzproizvod. pH rastvora se najčešće održava oko vrednosti 10, a obično se reguliše upravo dodatkom amonijaka. Precipitacija iz rastvora se odigrava ili istovremenim dodavanjem soli kalcijuma i fosfatnih jedinjenja u vodu ili dodavanje fosfatnog rastvora u vodeni rastvor soli kalcijuma. Odstojavanje rastvora nakon reakcije predstavlja važan stupanj kako bi se osiguralo dobijanje stehiometrijskog HAP [147]. Tokom starenja dobijeni HAP je sklon aglomeraciji pri čemu sitni kristali postaju sve krupniji kako se Ca/P odnos približava vrednosti 1,67 [148]. Sinteza se obično odvija pri kontrolisanoj brzini dodavanja reaktanata uz stalno mešanje, na temperaturama od 25 °C do 90 °C. pH vrednost se tokom sinteze smanjuje uklanjanjem hidroksilnih jona iz rastvora tokom taloženja hidroksiapatita.

Ovim metodama se dobijaju velike količine hidroksiapatita usled velikog prinosa ovih reakcija. Problemi se obično javljaju usled nedovoljno precizne kontrole faktora koji upravljaju procesom precipitacije: pH, temperature, Ca/P odnosa regenerasa i dr., što može dovesti do dobijanja proizvoda neželjenih karakteristika.

HAP je moguće dobiti i precipitacionim sintezama koje vode ka dobijanju stehiometrijskog hidroksiapatita, a bazirane su na ravnotežama u rastvorima. Naime, stehiometrijski HAP je izuzetno stabilna faza u rastvorima pri pH 4,3 na 25 °C. Pod

pretpostavkom da se pH održava na navedenoj vrednosti, pojedini autori tvrde da bi i pri različitim odnosima Ca/P u reakcionoj smeši, konačan proizvod mogao biti stehiometrijski HAP [149-152]. U toku dovoljno dugog odležavanja precipitata u matičnom rastvoru na pH 4,3 dolazi do hidrolize drugih kalcijum-fosfata, a kao konačan proizvod dobija se kalcijum-hidroksiapatit [81-83, 153, 154]. Apatiti dobijeni raznim modifikovanim precipitacionim metodama mogu imati dosta različite karakteristike, kako u stehiometrijskom smislu, tako i u pogledu morfologije, kristaličnosti itd, a sva ova svojstva zavise od temperature rastvora, vremena starenja taloga, atmosfere, brzine dodavanja reaktanata i od niza drugih faktora.

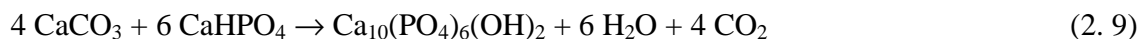
Kalcijum-hidroksiapatit se dobija i reakcijama u čvrstom stanju. Reakcijama u čvrstom stanju dobijaju se aglomerati nepravilnog oblika, nehomogenog sastava zbog nepotpunog odigravanja reakcije. Dva od mnogih načina dobijanja HAP reakcijama između čvrstih reaktanata mogu se predstaviti sledećim hemijskim reakcijama [85]:



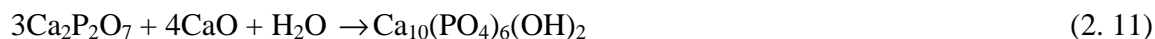
Prema reakciji 2.7. dobija se stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit, a prema 2.8. kalcijum deficitaran kalcijum-hidroksiapatit. Reakcijama u čvrstom stanju HAP se može dobiti i reakcijama monetita ili β -TCP sa kalcijum-hidroksidom. Za dobijanje hidroksiapatita reakcijama u čvrstom stanju, koji je manje kalcijum deficitaran i koji sadrži male količine β -TCP faze nakon sinterovanja, koriste se uglavnom komercijalno dostupna kalcijum-fosfatna jedinjenja.

Dobijanje apatita hidrotermalnim metodama za razliku od precipitacionih metoda daje proizvode visokog stepena kristaličnosti, jasno definisane i često uniformne strukture. Sinteza se izvodi tretiranjem smeše reaktanata u autoklavima na definisanoj temperaturi i pritisku. Kao i svim ostalim metodama sinteze, i hidrotermalnom metodom varirajući parametre sinteze može se u mnogome uticati na karakteristike dobijenih prahova.

Kalcijum-karbonat u prisustvu odgovarajuće količine CaHPO_4 ili $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ može dati HAP prema sledećim hemijskim reakcijama:



Prah kalcijum-hidroksiapatita se može dobiti hidrotermalnom reakcijom kalcijum-fosfata i kalcijum-oksida u prisustvu vodene pare:



Dobijeni HAP je stehiometrijski. Potpuna sinteza se izvrši nakon 3 h na $p = 30$ MPa i $T = 350^\circ\text{C}$. Eksperimenti su izvođeni u atmosferi azota. HAP se hidrotermalnim putem može dobiti velikim brojem modifikovanih metoda od kojih su neke: "gel growth" metoda, "flux growth" metoda, raznim modifikacijama reakcija $\text{Ca}(\text{EDTA})^{2-}$ u fosfatnim rastvorima itd [123-127].

3. PROCESIRANJE I SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA

Nakon sinteze prahova kalcijum-hidroksiapatita, naredne faze u procesiranju biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata su:

- oblikovanje i
- sinterovanje.

3.1. Oblikovanje keramičkih materijala presovanjem prahova

Tokom procesiranja keramičkih materijala, oblikovanje predstavlja proces pri kome dobija polazni kompaktni željenog oblika, nakon čega sinterovanjem materijal dobija svoje konačne dimenzije [155]. Kao naziv za oblikovani čestični kompaktni koristi se engleska reč „green body“, u prevodu zeleno telo, ali je u literaturi prihvaćen i često korišćen termin polazni kompaktni. Metode oblikovanja keramičkih prahova su: oblikovanje presovanjem, oblikovanje iz suspenzija i oblikovanje plastičnih keramičkih masa. Dva osnovna tipa presovanja prahova su uniaksijalno i izostatsko presovanje.

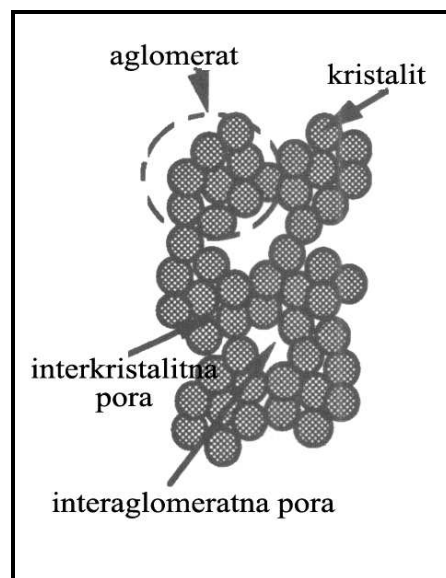
Presovanje obuhvata tri osnovna koraka: punjenje kalupa prahom, dejstvo sile tj. formiranje polaznog kompakta i vađenje isprensa iz kalupa. Svi navedeni koraci su od izuzetnog značaja, ali treba istaći da pri procesu oblikovanja kompakata presovanjem postoji još niz međukoraka koji mogu doprineti poboljšanju svojstava polaznih kompakata, a samim tim i proces sinterovanja učiniti efikasnijim.

Tokom presovanja primena pritiska dovodi do razbijanja mekih aglomerata i preuređenja čestične strukture, pri čemu se translacionim i rotacionim kretanjem keramičkih čestica vrši njihova preraspodela i preuređenje u jednu novu, mnogo efikasniju i uređeniju pakovanu strukturu. Vrlo bitne karakteristike polaznih kompakata su polazna gustina, specifična površina, raspodela veličina pora i oblik pora. Polazna gustina u velikoj meri zavisi

od veličine primenjenog pritiska. Sa povećanjem primenjenog pritiska polazna gustina, koordinacioni broj čestica i jačina kompakta rastu, dok zapremina, veličina i broj pora opadaju. Oblik, veličina i raspodela veličina pora u velikoj meri utiču na proces sinterovanja, tako da je moguće da se dva uzorka istih polaznih gustina različito ponašaju tokom sinterovanja usled različite raspodele veličina pora.

Veličina i raspodela veličina čestica praha imaju značajan uticaj na karakteristike polaznog kompakta. Pri presovanju nanočestičnih keramičkih prahova, za postizanje polazne gustine veće od 40 % teorijske vrednosti zahtevaju se izuzetno visoki pritisci. Uticaj veličine čestica polaznog praha na veličinu pritiska pritiska presovanja se može objasniti većom površinom kontakta po jedinici zapremine kod malih nego kod velikih čestica. Ta veća površina kontakta smanjuje pogonsku silu za preuređenje čestica, usled čega se prahovi sa nano dimenzijama čestica presuju na znatno višim pritiscima.

Stepen aglomerisanosti nanočestičnih prahova kao i oblik, priroda i morfologija aglomerata imaju veliki uticaj na svojstva polaznih kompakata. Na slici 3.1 prikazana je šema aglomerisanog praha na kome se vide položaji interaglomeratnih i intraaglomeratnih (interkristalitnih) pora.



Slika 3.1. Šema aglomerisanog praha

Ukoliko su aglomerati tvrdi i mikronskih su veličina, velika je verovatnoća da će sinterovan uzorak sadržati pore mikronskih dimenzija, što će se nepravilno odraziti na stepen denzifikacije tokom termičke obrade, tj. zahtevaće se viša temperatura sinterovanja za dobijanje gustih materijala. Tvrdi aglomerati koji nekogod se razbiju pod dejstvom pritiska,

će prouzrokovati pojavu bimodalne raspodele veličina pora u ispresku, tj. pored međučestičnih pora u uzorku će biti prisutne i prisutne znatno krupnije međuaglomeratne pore. Presovanjem mekih agregata na visokim pritiscima veličina pora se u velikoj meri smanjuje, a raspodela veličina pora je obično vrlo uska, tako da je za sinterovanje ovako dobijenog polaznog kompakta potrebna niža temperatura. Stepent aglomerisanosti i raspodela veličina pora mogu biti određeni u prahu, presovanim i sinterovanim kompaktima pomoću živinog porozimetra. Kod neaglomerisanog praha prisutna je samo jedna vrsta pora (slika 3.2.a). Ove pore su malih dimenzija i nazivamo ih intraaglomeratnim ili interkristalnim porama. Prisustvo drugih pikova na dijagramu raspodela veličina pora (slike 3.2 b,c) ukazuje na prisustvo pora većih dimenzija tj. interaglomeratnih pora.

Slika 3.2. Dijagram raspodele pora: a) neaglomerisanog praha, b) praha sa aglomeratima iste veličine i c) praha sa aglomeratima različitih veličina

Kompaktiranjem pre sinterovanja se povećava površina kontakta između čestica i smanjuje se mogućnost za zaostajanje interaglomeratnih pora u dobijenom keramičkom materijalu. Nanokristalna keramika se primarno dobija presovanjem metastabilnih nanoprahova na visokim pritiscima, i do nekoliko GPa, a zatim sinterovanjem tako dobijenih kompakata [156, 157].

3.2. Konvencionalno sinterovanje

Definicija procesa sinterovanja prema Balshin-u i Fedochenk-u (1961) glasi: “Sinterovanjem se naziva kvantitativna i kvalitativna promena prirode kontakta između čestica praha, izazvana toplotnom pokretljivošću atoma ili jona i uzajamnim delovanjem čestica sa

atmosferom sinterovanja, koje je praćeno povećanjem kontaktne površine, smanjenjem poroznosti i povećanjem mehaničke čvrstoće sinterovanog tela”. Prema drugoj definiciji, sinterovanje je procesna tehnika koja se koristi u cilju dobijanja materijala kontrolisane gustine polazeći od keramičkih prahova uz pomoć toplotne energije.

Tokom procesa sinterovanja disperzni sistem prelazi u fizički kontinuum, tj. očvršćava u jednu celinu uz smanjenje poroznosti, povećanje gustine i porast mehaničke čvrstoće. Materijali dobijeni sinterovanjem keramičkih prahova imaju osobne svojstvene čvrstim telima, ali i neke posebne osobine poput termičkih, dielektričkih, magnetskih i optičkih u uslovima kada je postignuta homogenost strukture sa finim zrnom, poroznost bliska nuli i definisana kristalna struktura [155, 158, 159].

Tokom sinterovanja u sistemu su u svim fazama prisutne pore, a u zavisnosti od prirode pora razlikuju se tri stadijuma sinterovanja: prvi stadijum obuhvata stanje sistema povezanih čestica sa otvorenim porama i bez znatnije promene gustine, drugi stadijum u kome sistem čestica počinje da se skuplja, pore se zaokružuju i zatvaraju, dok treći stadijum odgovara sistemu koji sadrži zatvorene i izolovane pore, udaljene jedne od drugih i između njih nema međudejstva.

Prema Robertsovom shvatanju, sinterovanje se deli samo na dva stupnja: sinterovanje u prisustvu otvorenih pora i sinterovanje u prisustvu zatvorenih pora.

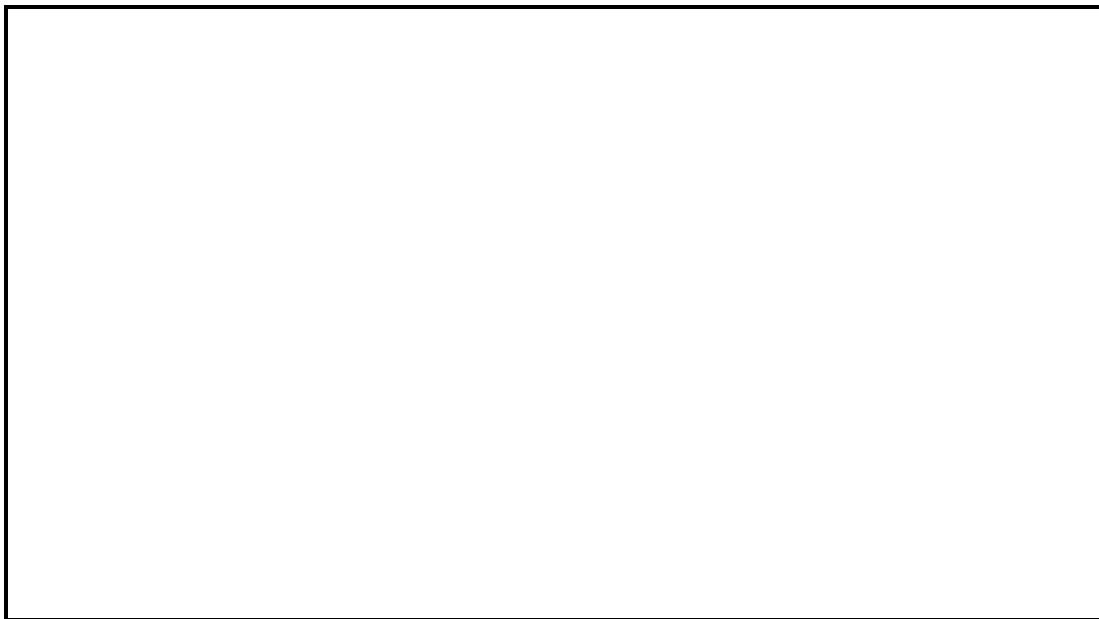
Prema Kofstad-u, proces sinterovanja može biti izdijeljen u više perioda. U toku početnog perioda hrapavost površine čestice opada, čestice počinju da se povezuju i stvaraju agregate. Pri kraju prvog perioda počinje rast zrna i pojavljuju se metastabilne pore i pritom dolazi samo do neznatnog skupljanja od nekoliko procenata. Intermedijerni period je vreme u toku kojeg se rast zrna nastavlja, a dimenzije pora opadaju. Završni period počinje kada telo postiže 90-95% teorijske gustine, kada pore postaju diskontinualne i zatvorene. Pore obično zaostaju na granicama zrna. Završni stadijum može da obuhvati kompletno uklanjanje zaostalih pora, što vodi ka potpuno gustom materijalu. Kao negativna pojava u ovom periodu, može da nastupi diskontinualni rast određenih velikih zrna na račun malih, a zatvorene pore pritom postaju izolovane unutar zrna i odvojene od granice zrna. Ukoliko dođe do ovog fenomena, potpuna denzifikacija postaje veoma teška. Termin sinterovanje se redovno odnosi na proces kojim se istovremeno postiže povećanje čvrstoće i gustine kompaktnog praha. Ponekad je moguće povećati mehaničku čvrstoću, a da ne dođe do povećanja gustine, dok je obrnuta pojava krajnje neverovatna.

Prema Show-u, razlikuju se tri postupka sinterovanja keramičkih materijala. Sinterovanje u čvrstoj fazi je najčešći proces sinterovanja u toku koga svi konstituenti finalnog keramičkog materijala ostaju u čvrstom stanju, a materije se transportuje difuzijom kroz čvrstu fazu, koja dovodi do promene oblika zrna i kompletne denzifikacije keramičkog tela. Drugi postupak je viskozo sinterovanje pri kome se na temperaturi sinterovanja stvara dovoljna količina viskozne faze, koja popunjava pore polaznog keramičkog tela. Treći vid sinterovanja je sinterovanje u prisustvu tečne faze, tj. termička obrada pri kojoj se na temperaturi

sinterovanja stvara tečna faza, ali u količini koja nije dovoljna da na principu viskoznog tečenja popuni pore u poroznom telu. Formirana tečna faza olakšava preuređenje čestica i omogućuje značajnu promenu oblika čestica, popunjavanje pora i formiranje gustog keramičkog tela mehanizmom rastvaranja čvrste faze u njoj i naknadnog ponovnog očvršćavanja.

Svi pomenuti postupci sinterovanja se u suštini sastoje od dva osnovna procesa: denzifikacije (povećanje gustine materijala) i rasta zrna (povećanje veličine zrna materijala). Pojedinačnim objašnjenjem ova dva procesa je najjednostavnije shvatiti proces sinterovanja.

Gustina je po mnogima najvažnija karakteristika biokeramičkih materijala. Veće vrednosti gustine mogu se postići ukoliko je: vreme sinterovanja duže, polazna gustina oblikovanog uzorka veća, temperatura sinterovanja viša, veličina čestica polaznog praha manja, sinterovanje potpomognuto primenom pritiska, mikrotalasa i sl. Proces sinterovanja polaznih kompakata je šematski prikazan na slici 3.3. Kao što se vidi sa slike, denzifikacija keramičkih materijala se odvija u tri faze [160].



Slika 3.3. Promena gustine i strukture keramičkog kompakta sa vremenom sinterovanja (TD-teorijska gustina)

U početnoj fazi sinterovanja dolazi do preuredjivanja strukture polaznih kompakata (translatornim i rotacionim pomeranjima čestica) i početka stvaranja vratova između čestica, što je praćeno veoma malim povećanjem gustine. Ta faza se može okarakterisati kao faza

početnog rasta vratova između čestica. Početna faza sinterovanja se završava kada se dostigne oko 60-75% teorijske gustine. Drugu ili intermedijarnu fazu sinterovanja karakteriše intenzivan rast vratova između čestica, pri čemu čestice gube svoj početni oblik, a međučestični prostor se znatno deformiše, usled čega nastaju povezani kanali pora. Nakon ove faze sinterovanja materijali praktično predstavljaju čvrsta tela, koja sadrže znatnu količinu povezane mreže kontinualnih pora, otvorenih prema spoljašnjoj površini. Skupljanje tih tzv. otvorenih pora je veoma intenzivno, što je i razlog najvećeg povećanja gustine, tj. najintenzivnije denzifikacije. Kada otvorene pore usled skupljanja postanu suviše uske da bi bile stabilne, one se transformišu u zatvorene pore, a proces sinterovanja ulazi u treću fazu, tj. finalnu fazu sinterovanja. Prelaz od otvorene ka zatvorenoj poroznosti se dešava pri gustinama oko 90-93% teorijske gustine, zavisno od diedarskog ugla θ , definisanog izrazom:

$$\gamma_b = 2\gamma_{sg} \cdot \cos\theta/2 \quad (3.1.)$$

pri čemu su γ_{sg} i γ_b površinska energija i energija granice zrna. Kraj finalne faze sinterovanja karakteriše eliminacija zatvorenih pora i približavanje teorijskoj gustini sinterovanog keramičkog materijala.

Kada se govori o konvencionalnom sinterovanju obično se postavljaju dva pitanja: zašto dolazi do sinterovanja, tj. koja je vučna (pogonska) sila sinterovanja i kako se proces sinterovanja odvija, tj. koji su mehanizmi sinterovanja.

Pogonska sila za sinterovanje keramičkih materijala je smanjenje slobodne energije sistema usled zamene međufazne granice čvrsto/gas, koja poseduje veću energiju, međufaznom granicom čvrsto/čvrsto, koja poseduje manju energiju. Te promene mogu biti praćene samo promenom oblika pora bez skupljanja, a samim tim i bez densifikacije ili promenom oblika i veličina pora uz pojavu skupljanja, što odgovara promeni zapremine pora, a samim tim i povećanju gustine. Vučna sila za densifikaciju poroznog tela je smanjenje Gibsove energije sistema. Eliminisanjem površine čvrsto/gas dolazi do smanjenja zapremine pora, V_p , a tako i celokupne zapremine uzorka, V , usled skupljanja poroznog tela. Promena Gibsove energije je data izrazom:

$$dG = \gamma_{sg} \cdot dA_{sg} + \gamma_b \cdot dA_b \quad (3.2.)$$

gde su γ_{sg} i γ_b površinska energija i energija granice zrna, a dA_{sg} i dA_b su odgovarajuće promene površine i površine granice zrna. Transport atoma ili jona je prouzrokovan razlikom hemijskih potencijala između mesta njihove početne i krajnje destinacije. Ta razlika nije ista za sve atome, tj. jone u posmatranom materijalu, pa se razmatra njena srednja vrednost i definiše kao potencijal sinterovanja, $\Delta\mu$. Medjutim, u literaturi se češće sreće termin napon sinterovanja, Σ , koji je definisan tako da ima isti uticaj na denzifikaciju materijala kao i jedan

primenjeni, spoljašnji hidrostatički napon istog intenziteta i istog znaka. Napon sinterovanja se može predstaviti izrazom:

$$\Sigma = dG/dV = \gamma_{sg}(\delta A_{sg}/\delta V) + \gamma_b(\delta A_b/\delta V) \quad (3.3.)$$

gde je dV promena zapremine pora (pri konstantnoj zapremini zrna). Slično tome se i potencijal sinterovanja, $\Delta\mu$, može izraziti preko:

$$\Delta\mu = (\gamma_{sg} \cdot dA_{sg} + \gamma_b \cdot dA_b) / d\zeta \quad (3.4.)$$

gde ζ predstavlja broj atoma/jona koji je tokom procesa transportovan. Ako se jedan atom/ion transportuje sa granice zrna do površine pore, tada se pora skuplja pošto taj atom/ion sada praktično okupira deo pore, a okolna struktura se pomera prema centru pore zahvaljujući uklonjenom atomu. Prema Cocks-u, ako se zanemari doprinos energije granice zrna, uz usvajanje da su pore sferičnog oblika, rešenje izraza 3.3. ima oblik

$$\Sigma = 2\gamma_{sg} / r \quad (3.5.)$$

gde je r poluprečnik pore. Vidi se da je za keramička tela sa manjim porama (malo r), vučna sila za densifikaciju veća. To daje obrazloženje zašto su u pogledu sinterovanja poželjnija polazna keramička tela dobijena od neaglomerisanih prahova sa manjim česticama. Pošto je veličina pore određena veličinom čestica između kojih se ona formira, jasno je da keramičko telo formirano od manjih čestica sadrži manje pore, usled čega je vučna sila za densifikaciju veća.

Glavni problem, koji treba razumeti u teoriji i praksi sinterovanja, je uklanjanje pora tokom procesa. Mnogi eksperimentalni rezultati su pokazali da je spora denzifikacija karakteristična za keramička tela koja sadrže velike pore, i da se pri sinterovanju (bez primene pritiska) manje pore eliminišu na nižim temperaturama nego veće. Ovu pojavu je objasnio Kingery, koji je rekao da ako je granica između pore i zrna konkavna (posmatrano iz pore), doći će do migracije granice prema pori, tj. pora će se skupljati i finalno nestati. Nasuprot tome, ako je međufazna granica pora/zrna konveksna, njeno pomeranje će teći prema zrnju, tako da će pora da raste (slično kao i kod rasta zrna). Da li će pora biti konkavna ili konveksna zavisi od veličine pore, veličine okolnih zrna i diedarskog ugla. Prelazno stanje između ta dva slučaja, tj. konkavne pore koja se skuplja i konveksne pore koja raste, okarakterisano ravnim granicom, se definiše kao kritičan odnos veličine pore prema veličini zrna. Prema tome, pora se skuplja ne zato što je mala, već zato što je odnos veličine te pore prema veličini okolnih zrna manji od definisanog kritičnog odnosa. Pokazano je da se za datu mikrostrukturu određenog keramičkog materijala može odrediti kritična veličina pore, ako se zna srednja veličina zrna i diedarski ugao.

Na osnovu prikazanog razmatranja se može zaključiti da je temperatura konvencionalnog sinterovanja (bez primene pritiska) keramičkog tela prilagođena najvećim

porama prisutnim u materijalu. Do potpunog eliminisanja pora će doći kada temperatura sinterovanja bude dovoljno visoka da obezbedi porast veličine zrna do tog nivoa, da rastuća vrednost kritične veličine pore dostigne veličinu najvećih pora u materijalu. To znači da tek kada se obezbede uslovi da su veličine svih pora u kompaktu manje od kritične veličine pore, može doći do potpune denzifikacije keramičkog tela. Izneto razmatranje objašnjava i lošu sinterabilnost oblikovanih tela dobijenih iz aglomerisanih prahova, jer su interaglomeratne pore te koje uzrokuju znatno povećanje temperature sinterovanja.

Iako je pogonska sila sinterovanja ista za sve sisteme, mehanizmi kojima se postiže krajnje stanje sistema su različiti [161]. Neki od mehanizama transporta materije koji se javljaju tokom procesa sinterovanja su: isparavanje – kondenzacija, viskozni tok, površinska difuzija, difuzija duž granice zrna, zapreminska difuzija i plastične deformacije. Od navedenih mehanizama, difuzija i viskozni tok su od najvećeg značaja u keramičkim sistemima. Mehanizmom isparavanje – kondenzacija, prenos mase se ostvaruje usled razlike napona pare čvrste faze u različitim delovima sistema. Između dve čestice koje sinteruju (slika 3.4.), obrazuje se kontakt, tzv. vrat, koji ima konkavnu površinu, dok čestice koje sinteruju imaju konveksnu površinu. Zahvaljujući većem naponu pare čvrste faze na konveksnoj površini, a smanjenom naponu pare na konkavnoj površini vrata, materija isparava sa konveksne površine, prenosi se kroz gasnu fazu i kondenzuje na konkavnoj površini vrata, usled čega se povećava kontakt između čestica (mehanizam 6 na slici 3.4.). Ovaj mehanizam ne dovodi do promene rastojanja centara čestica, tj. ne doprinosi skupljanju sistema. Za mehanička svojstva materijala, pored smanjenja poroznosti, važno je i povećanje stepen ostvarenog kontakta, što se ovim mehanizmom postiže. Da bi ovaj mehanizam došao do izražaja, potrebno je da temperatura bude dosta visoka, da bi napon pare bio dovoljno izražen. Iz toga razloga ovaj mehanizam nema previše veliki značaj za oblast keramike, ali figuriše kao mehanizam u određenoj fazi sinterovanja.

Difuzija materije u čvrstom stanju omogućava transport materije zahvaljujući razlici koncentracije vakancija na konveksnoj i konkavnoj površini. Ova razlika je rezultat pojava na krivim graničnim površinama, usled čega je koncentracija vakancija na konkavnoj površini veća nego na ravnoj površini, a na konveksnoj je manja. Prilikom sinterovanja dve sferne čestice između kojih se formira vrat koji ima konkavnu površinu, dolazi do kretanja vakancija iz oblasti vrata prema površini čestica, što odgovara difuziji materije u suprotnom smeru, odnosno sa površine čestica u oblast vrata. Pri tome materija može biti transportovana površinskom difuzijom, ali i zapreminskom difuzijom, što znači da materija sa površine difunduje po površini i kroz zapreminu zrna do vrata. Ovi mehanizmi difuzije su na slici 3.4. označeni redom sa 1 i 3. Površinska difuzija ne doprinosi skupljanju proizvoda, već samo povećanju stepena ostvarenog kontakta čestica.



Slika 3.4. Mehanizmi sinterovanja

Koncentracija vakancija na granici dva zrna koja sinteruju je manja od koncentracije u vratu, jer se na granici zrna javlja naprezanje, tzv. kontaktni pritisak. Iz tog razloga dolazi do difuzije vakancija iz vrata u granicu zrna, odnosno difuzije materije iz granice zrna u vrat. Pri tome, difuzija može biti duž granice zrna (mehanizam 2 na slici 3.4.) ili iz granice zrna kroz zapreminu zrna do vrata (mehanizam 4 na slici 3.4.). Difuzija materije iz granice zrna u površinu vrata obezbeđuje približavanje čestica što proizvodi makroskopski efekat skupljanja materijala koji sinteruje. Ovi mehanizmi dovode istovremeno do promene oblika i veličine pora, odnosno do smanjenja ukupne poroznosti.

Ukoliko u materijalu koji sinteruje postoje dislokacije, doći će do difuzije materije iz dislokacije u površinu vrata, odnosno šupljina iz vrata u dislokaciju. Ovaj mehanizam (oznaka 5 na slici 3.4.) takođe doprinosi skupljanju proizvoda, jer se materija iz zapremine čestice premešta u vrat, ali je doprinos ovog mehanizma ukupnom skupljanju vrlo mali, zbog toga što se dislokacije u keramičkim materijalima ne javljaju u značajnoj meri.

Veličina zrna sinterovanih biokeramičkih materijala u velikoj meri određuje njegova svojstva, a do rasta zrna dolazi u najvećoj meri u finalnoj fazi sinterovanja. Tokom ovog stadijuma sinterovanja prosečna veličina zrna se povećava na taj način što veća zrna rastu na račun manjih. Mogućnost razumevanja i kontrolisanja ovog procesa važno je iz dva razloga. Prvi je činjenica da veličina zrna utiče na mehanička, električna, magnetna, optička i druga svojstva keramičkih materijala, a takođe i na bioaktivnost i biokompatibilnost biokeramičkih materijala. Drugi razlog vezan je za sprečavanje pojave tzv. diskontinualnog rasta zrna.

Povećanje srednje veličine zrna tokom zagrevanja finostrukturnog materijala može da se odvija procesom normalnog i abnormalnog rasta zrna (slika 3.5.). Pri normalnom rastu veličina svih zrna raste ujednačeno a finalni proizvod je uniformna mikrostruktura. Drugi slučaj je abnormalni rasti zrna (slika 3.5.) kod koga nekoliko većih zrna raste i troši matricu koju čine okolna manja zrna, što izaziva neuniformnost kako u pogledu mikrostrukture, tako i u pogledu svojstava sinterovanog materijala. Abnormalan rast zrna može da dovede i do odvajanja pora

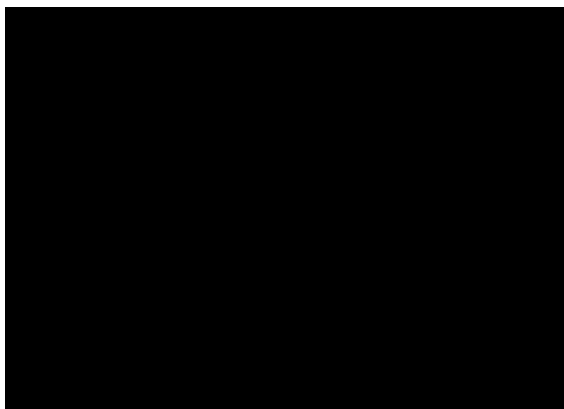
od granice zrna i njihovog uvlačenja unutar samih zrna, čime se limitira krajnja gustina, jer se tako nastale pore daljom termičkom obradom teško mogu ukloniti iz sistema.



Slika 3.5. Proces normalnog i abnormalnog rasta zrna

Prilikom normalnog rasta zrna dolazi do povećanja prosečne veličine zrna, a time se smanjuje broja zrna u sistemu. Pogonska sila za taj proces je razlika u energiji koju poseduje fino-zrno polazno keramičko telo i krupnozrni finalni produkt, što je posledica smanjenja ukupne površine granice zrna, samim tim i ukupne energije granice zrna.

Dobro poznat model normalnog rasta zrna, dali su strane Burke i Turnbull. Njihovo modelovanje uključuje pomeranje granice usled transporta atoma preko granice pod dejstvom pritiska, kao posledica zakrivljenosti površine granice zrna. Razmatranjem sila, koje nastaju usled površinske zakrivljenosti na jednom izolovanom delu granice zrna, autori su zaključili da granica zrna teži da se pomera prema centru zakrivljenosti pošto to smanjuje ukupnu površinu granice, a tako i ukupnu energiju sistema. Posmatrano u dvodimenzionalnoj projekciji, energetski najpovoljniji slučaj je kada se granice zrna seku pod uglom od 120° . U dvodimenzionalnom preseku ovaj uslov je ispunjen samo ukoliko su zrna heksagonalnog oblika. Ukoliko zrna imaju manji broj strana od šest ona će biti konveksna, a ukoliko je broj strana veći od šest, zrna će biti konkavna. S obzirom da se granica zrna pomera prema centru svoje zakrivljenosti, zrna sa manje od šest stranica teže da se smanjuju, a zrna sa više od šest stranica teže da rastu, kao što je prikazano na slici 3.6.



Slika 3.6. Ravnotežni oblik zrna i pravac pomeranja granice zrna

Osnovni ciljevi sinterovanja su povećanje gustine i minimalizovanje zaostale poroznosti materijala. Ali često da bi se dobio materijal sa optimalnim svojstvima za pojedine namene, neophodno je obezbediti i dobijanje mikrostrukture sa finim (malim) zrnima i uskom raspodelom veličina zrna. Međutim, kao što se pokazalo, denzifikacija i rast zrna teku paralelno, pri čemu je rast zrna veoma izrazit baš u finalnoj fazi sinterovanja, kada i veoma mala povećanja gustine dovode do velikog porasta veličine zrna.

Pravila koja važe pri sinterovanju materijala sa submikronskim i mikronskim veličinama zrna, često ne mogu da se primene prilikom procesiranja nanostrukturnih keramičkih materijala. Iz svih ranije navedenih razloga je od velikog značaja mogućnost kontrole rasta zrna, a postiže se na više načina: skraćivanjem vremena i snižavanjem temperature sinterovanja, primenom pritiska tokom procesa sinterovanja, korišćenjem mikrotalasa, primenom spark plazma tehnike, ali će o svemu ovome biti više reči kasnije.

3.3. Dobijanje i svojstva sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata

Sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita konvencionalnim tehnikama obično se odvija na temperaturama između 1000°C i 1500°C, a HAP kao stabilna faza može da nastane na temperaturama do 1360°C. Zahvaljujući svojoj krtoj prirodi i relativno lošoj sinterabilnosti kalcijum-hidroksiapatita, biokeramika na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata ima niske vrednosti žilavosti i tvrdoće, posebno u fiziološkim uslovima, što u mnogome ograničava njenu primenu u slučajevima gde su visoke vrednosti navedenih mehaničkih parametara neophodne. Dobijanje gustih nanostrukturnih formi vrši se u cilju poboljšanja mehaničkih karakteristika keramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-

fosfata. Mehanička svojstva gustih sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita u velikoj meri zavise od karakteristika polaznih prahova HAP, pri čemu se prvenstveno misli na veličinu čestica, prisustvo i oblik aglomerata, specifičnu površinu, jonsku supstituciju, stehiometriju, stepen kristalčnosti itd.

Veliki broj eksperimenata je poslednjih godina izveden da bi se definisali optimalni parametri sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita, u cilju dobijanja pogodnih oblika, optimalnih svojstava za ugradnju u ljudski organizam. Nanočestični prahovi su zbog svoje velike površinske energije metastabilni i skloni aglomerisanju. Veliki problem pri sinterovanju nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita predstavlja eliminacija intraaglomeratnih pora, koje su često uzročnik loše sinterabilnosti.

Najčešće korišćena metoda za dobijanje gustih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata je sinterovanje kompakata ispresovanih na visokim pritiscima, konvencionalnim postupkom. Visokotemperaturni postupci za dobijanje HAP dovode do formiranja HAP veće kristaliničnosti, sa veličinom zrna i do nekoliko desetina mikrona, koji pokazuje minimum resorpcije tokom aktivnosti osteoklasta, pri čemu mogu ostati na mestu implantacije godinama, pa čak i decenijama. Dugotrajano prisustvo neresorbovanog keramičkog materijala može ići na štetu odvijanja procesa remodelovanja koštanog tkiva [162]. Ova svojstva mogu biti poželjna za određene primene, ali mogu imati nedostatke u nekim drugim slučajevima, npr. kod mlađih pacijenata ili dece u razvoju gde su resorbilni implantati poželjni, jer je poželjno da implantirani materijal vremenom počne da prelazi u koštano tkivo.

Ostale korišćene tehnike sinterovanja HAP su: mikrotalasno sinterovanje, sinterovanje uz pomoć pritiska, kao što su toplo presovanje, spark plazma sinterovanje i toplo izostatsko presovanje. Primena novih tehnika sinterovanja ima za cilj dobijanje potpuno gustih nanostrukturnih materijala, sa što je moguće manjom prosečnom veličinom zrna. Gusta struktura i veličina zrna u velikoj meri određuju mehaničke i biološke karakteristike dobijenih sinterovanih materijala [2, 144, 161, 163]. Čist HAP ima maseni odnos Ca/P od 2,151, odnosno molarni odnos 1,67. Kod gustih sinterovanih formi HAP, ovaj odnos varira u zavisnosti od učešća α - i β -TCP faze u finalnom proizvodu.

Povećanjem temperature sinterovanja intezivira se fazna transformacija HAP u α - i β -TCP. Uticaj nastajanja TCP faza pri sinterovanju HAP može da se posmatra sa više aspekata. Generalno, nastajanje TCP-a ima negativan uticaj na sam proces sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita, ali i TCP faza kao i HAP ima odličnu biokompatibilnost. Formiranje TCP faze tokom sinterovanja negativno utiče na mehaničke karakteristike, pre svega na tvrdoću i žilavost dobijene biokeramike, uprkos većoj teorijskoj vrednosti koeficijenta žilavosti (K_{ic} (HAP) = 0,6 – 1,0 MPa m^{1/2}, K_{ic} (TCP) = 1,3 MPa m^{1/2}) [35].

Kao što je u prethodnim poglavljima navedeno, prvi pokušaji sinterovanja sintetičkog hidroksiapatita beleže se 1970-tih godina. Od tada do danas veliki broj naučnih timova se bavio ovom problematikom, proučavajući uticaj različitih parametara na sam proces

sinterovanja kao i na mehaničke i biološke karakteristike sinterovanih kompakata. Ispitivanja uticaja osobina polaznih prahova kao što su: kristaličnost, stepen aglomerisanosti, stehiometrija, jonska supstitucija, kao uslova procesiranja (p , T , t , atmosfera u kojoj se sinterovanje odvija...), vršena su u cilju dobijanja gustih struktura kalcijum-hidroksiapatita sa što boljim karakteristikama, kako u morfološkom i mehaničkom, tako i u biološkom smislu [68, 164-167].

Uticaj stepena kristaličnosti prahova HAP na denzifikaciju proučavala je Landi sa saradnicima. Sintetisanjem kalcijum-hidroksiapatita modifikovanom precipitacionom metodom na različitim temperaturama, oni su varirali stepen kristaličnosti dobijenih prahova, a zatim dilatometrijskim merenjima u temperaturnom intervalu od 750-1250 °C ispitivali sinterabilnost istih. Analizom mikrostrukture sinterovanih kompakata i dilatometrijskih merenja izveden je zaključak da nizak stepen kristaličnosti prahova HAP pozitivno utiče na proces denzifikacije, što objašnjavaju simultanim dejstvom većeg broja fenomena koji prate proces sinterovanja. Sinterovanjem polaznih kompakata na temperaturama od 1000-1215 °C, dobijeni su uzorci sa značajnim udelom pora, koji opada sa porastom temperature sinterovanja, ali je praćen sa druge strane značajnim rastom zrna [68].

Ispitujući uticaj temperature sinterovanja u intervalu od 1000-1450 °C na mikrostrukturu i mehaničke karakteristike stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita, Ramesh je dobio monofazni kalcijum-hidroksiapatitni materijal na temperaturama do 1400 °C, dok iznad 1400 °C došlo do delimične transformacije HAP u α -TCP. Ustanovljeno je da je optimalna temperatura sinterovanja 1250°C, na kojoj je dobijena gusta uniformna mikrostruktura sa prosečnom veličinom zrna od 2 μ m. Uzorci dobijeni na temperaturama nižim od 1250°C su bili porozni. Sa povećanjem temperature iznad 1250°C zrna su rasla a gustina opadala, što je pripisano početku dekompozicije HAP. Najveća vrednost tvrdoće, 6,08 GPa, izmerena je kod uzorka sinterovanog na 1250°C tokom 2 h [168].

Gibson je sa saradnicima proučavao strukturne promene tokom sinterovanja usled fazne transformacije kalcijum deficitarnog hidroksiapatita u β -TCP [169]. Sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita sa odnosom Ca/P od 1,50 na temperaturama 500-1100 °C oni su ustanovili XRD i FTIR analizom da ova fazna transformacija počinje da se odvija u intervalu temperatura 710-740 °C.

Bonfield i saradnici su ispitivali uticaj vremena i temperature sinterovanja na svojstva sinterovanih kompakata, dobijenih sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita u različitim atmosferama. Kod plaznih prahova variran je procenat supstituisanih karbonatnih jona u intervalu od 3,2 do 7,8 %. Polazni kompakati su sinterovani u atmosferi suvog CO₂ i CO₂ sa 3 % vodene pare, u temperaturnom intervalu od 700-1300 °C. Sinterovanjem na 1000 °C tokom 24 h, u atmosferi CO₂ sa 3 % vodene pare postignute su gustine bliske teorijskim. Ustanovljeno je da se oko 70 % karbonatnih jona redukuje tokom sinterovanja u struji vlažnog CO₂. Sinterovanjem u struji vlažnog CO₂ dobijena je translucetna biokeramika, dok se keramika dobijena sinterovanjem u struji suvog CO₂ odlikuje belom bojom i znatno većim

znom. Ovu pojavu objašnjavaju nepotpunim procesom densifikacije u atmosferi suvog CO₂, što je posledica manje izraženog redukcionog svojstva CO₂ bez prisustva vodene pare [165].

Polazeći od dva praha HAP istog hemijskog sastava, od kojih je jedan dobijen direktnom precipitacionom metodom, a drugi *spray-dry* metodom, Patel je ispitivao uticaj temperature kalcinacije u intervalu 400-1000 °C na svojstva HAP [170]. On je posmatrajući karakteristike ova dva praha došao do zaključka da se *spray-dry* metodom dobijaju prahovi čije su čestice uže raspodele veličina i definisanijeg oblika, ali da su svojstva dobijene keramike polazeći od ovako dobijenih prahova vrlo slična. Kalcinacijom prahova HAP, kako autori tvrde, se u velikoj meri utiče na njihove karakteristike, pre svega na specifičnu površinu, što ima veliki uticaj na njihovu potencijalnu primenu u medicini u formi praha. Oni navode da promene u strukturi prahova HAP tokom kalcinacije nemaju veliki uticaj na svojstva keramičkih blokova ili granula dobijenih njihovim sinterovanjem.

Ispitujući uticaj parametara sinteze prahova HAP na svojstva sinterovane biokeramike konvencionalnim postupkom, Thangamani je sa saradnicima dobio kompakte gustine oko 97 %, sa zrnima mikronskih veličina i pojavom abnormalnog rasta zrna na temperaturama preko 1200 °C [171]. Maksimalna vrednost žilavosti koju su izmerili bila je 0,88 MPa m^{1/2}, kod uzorka sinterovanog na 1100 °C. Tvrdoća od 6,3 GPa izmerena je kod uzorka dobijenog sinterovanjem na 1300 °C, a najveća vrednost pritisne čvrstoće keramičkih materijala dobijenih u ovom radu iznosi 60,3 MPa.

Razmatrajući metode procesiranja, svojstva i potencijalne primene bifaznih HAP-β-TCP biokeramičkih materijala, LeGeros sa saradnicima ističe da se ova vrsta biomaterijala najčešće dobija sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita na temperaturama iznad 700 °C. Oni navode da se variranjem odnosa Ca/P, a samim tim i onosa HAP/β-TCP u keramičkom materijalu direktno utiče na njegove biološke karakteristike, a samim tim i na potencijalnu medicinsku primenu. Oni takođe potenciraju da primena ovih materijala u medicini u velikoj meri zavisi od mehaničkih svojstava, na koje stvaranje β-TCP tokom sinterovanja utiče negativno. U kliničkoj praksi bifazna biokeramika se primenjuje u obliku granula, praha kao i u gustim formama prilagođenim određenoj nameni [172].

Raynaud je sa timom ispitivao proces kalcinacije i sinterovanja kalcijum deficitarnog hidroksiapatita, kroz uticaj supstituisanog hidrogenfosfatnog jona na specifičnu površinu praha kao i na svojstva dobijene bifazne HAP-β-TCP sinterovane keramike. On navodi da odnos Ca/P u velikoj meri ima uticaj na sinterabilnost kalcijum deficitarnog hidroksiapatita, čije sinterovanje počinje na oko 700 °C, pri čemu na toj temperaturi počinje i fazna transformacija HAP u β-TCP. Oni ističu da veliki udeo nastalog β-TCP ima štetan uticaj na sinterabilnost bifazne biokeramike. Sinterovani kompakti dobijeni u ovom radu se odlikuju prisustvom pora, a veličina zrna raste sa smanjenjem odnosa Ca/P [173].

Ispitujući uticaj temperature i parcijalnog pritiska vodene pare na kinetiku površinske redukcije hidroksiapatita tokom kalcinacije, ista grupa autora u drugom radu zaključuje da vodena para ima katalitičko dejstvo na proces rasta zrna pri sinterovanju hidroksiapatita.

Analizirajući mehanizme koji potencijalno imaju uticaj na redukciju površine tokom sinterovanja HAP, oni zaključuju da je na temperaturama ispod 850 °C površinska difuzija dominantan mehanizam. Oni takođe navode da adsorpcija i desorpcija vodene pare na površini čestica HAP kontroliše difuzione procese. Primećeno je da se na temperaturama manjim od 850 °C zrna povezuju bez značajnije densifikacije, dok su na višim temperaturama densifikacioni mehanizmi izraženiji [174].

Ispitujući uticaj dopiranja hidroksiapatita jonima silicijuma, Patel sa saradnicima zaključuje da supstitucija jonima silicijuma ima uticaj na inhibiranje rasta zrna pri konvencionalnom sinterovanju na 1200 °C [175]. Vrednosti gustine, tvrdoće i modula elastičnosti uzoraka čistog HAP i HAP dopiranog silicijumom bile su istog reda veličine.

Kalcijum-hidroksiapatitna biokeramika je obično bele boje, ali ukoliko se odlikuje velikom gustinom i zrnom nano dimenzija implantni materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita mogu biti translucetni. Transparentnost gustih formi kalcijum-hidroksiapatita omogućuje primenu ovih materijala za gajenje specifičnih vrsta ćelijskih kultura i perkutano praćenje vaskularizacije. Barallet je sintetisao translucetnu keramiku na bazi HAP sinterovanjem u atmosferi CO₂ na temperaturi od 1300 °C i pri atmosferskom pritisku. Maksimalnu transmitancu, 13 % na pločici debljine 2 mm, imao je uzorak sinterovan tokom 4 h na 1300 °C, sa prosečnom veličinom zrna od nekoliko mikrona. On zaključuje da atmosfera CO₂ pospešuje rast zrna, ali i da utiče na eliminaciju pora što u velikoj meri utiče na translucetnost materijala [176].

Sung sa saradnicima je sinterujući nanočestične prahove kalcijum-hidroksiapatita dobijene precipitacionom metodom, sa različitim Ca/P odnosom, na 1000 °C dobio materijale guste mikrostrukture sa veličinom zrna od oko 100 nm. Sinterovanjem prahova HAP na 1000 °C, najmanji udeo β-TCP u sinterovanom materijalu dobijen je pri odnosu Ca/P od 1,70, dok pri odnosu od 1,75 dolazi do nastajanja CaO tokom procesa sinterovanja [177].

Varirajući koncentraciju reaktanata i temperaturu, Kothapalli je sintetisao prah hidroksiapatita modifikovanim precipitacionim metodama i došao do zaključka da su upravo ova dva parametra ključna za veličinu i oblik dobijenih čestica HAP. On je dobijene igličaste čestice HAP dužine 53–165 nm presovao na 150 MPa, a polazne kompakte sinterovao na 1200 °C tokom 1 h, sa ciljem da ispita uticaj gustine biokeramike na njenu pritisnu čvrstoću. Analizom dobijenih rezultata, definisana je pozitivna korelacija između gustine sinterovanih uzoraka i savojne čvrstoće dobijene biokeramike. Najveća vrednost savojne čvrstoće, 57.4 MPa izmerena je kod uzorka koji je imao najveću gustinu, (92 %), a koji je dobijen sinterovanjem praha HAP sintetisanog reakcijom na 70 °C pri koncentraciji reaktanata od 20 g/l [178].

Landi sa timom je ispitivala uticaj uslova sinteze HAP i parametara sinterovanja na karakteristike karbonatnog tipa kalcijum-hidroksiapatita. Prah sa udelom karbonatnih jona u strukturi od 5,8 % sinterovan je u intervalu temperatura 500-1400°C, u različitim atmosferama (vazduh, suv i vlažan CO₂). Najsličnije karakteristike biološkom hidroksiapatitu imao je

uzorak sinterovan na 900 °C u atmosferi vlažnog ugljen-dioksida. Karbonatni hidroksiapatiti dobijeni u ovom radu su termički vrlo stabilni, a sekundarna faza u vidu CaO ili TCP se formira tek na temperaturama između 1300-1400 °C, u količini koja zavisi od atmosfere sinterovanja [179].

Mezahi je sa saradnicima ispitujući uticaj cerijumom sabilisanog praha ZrO₂ na sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita došao do zaključka da je 1 % dodatog ZrO₂ optimalan, jer je sa povećanjem njegovog sadržaja u kompozitnom materijalu primećen intenzivniji prelazak HAP u TCP tokom sinterovanja, što negativno utiče na mehanička svojstva biokeramičkog proizvoda [180].

Polazeći od nanočestičnog HAP, Shi je presovanjem na ekstremno visokom pritisku od 2,5 GPa spustio temperaturu sinterovanja HAP na 700 °C. Ovako visok pritisak uticao je na to da dobijeni materijali budu crno obojeni [181]. Dobijeni uzorci su se odlikovali tvrdoćom od 5 GPa i žilavošću u intervalu od 0,5-1,0 MPa m^{1/2}.

Teorijski model denzifikacije i rasta zrna tokom konvencionalnog sinterovanja monofazne hidroksiapatitne keramike, u cilju proučavanja sinterabilnosti HAP koristili su He i saradnici. Polazni kompakti su sinterovani na temperaturama od 1100 °C do 1150 °C, pri čemu su u svim slučajevima uočene relativno porozne mikrostrukture, a eksperimentalno dobijene vrednosti su diskutovane i poređene sa modelom. Oni zaključuju da difuzija duž granice zrna predstavlja dominantan mehanizam pri denzifikaciji hidroksiapatita. Rezultati proistekli iz eksperimenta vezani za rasta zrna kalcijum-hidroksiapatita tokom sinterovanja imaju dobro slaganje sa korišćenim teorijskim modelom. Oni su takođe izračunali vrednosti energija aktivacije za denzifikaciju i rast zrna, koje imaju vrednosti 1150 i 1020 kJ/mol, respektivno, u okviru posmatranog temperaturnog opsega [182].

Ulogu simuliranog telesnog fluida prilikom sinteze karbonatnog hidroksiapatita proučavala je E. Landi. Na ovaj način dobijen je nanočestični prah, sa veličinom čestica od 20 nm. Sa ciljem da se dobije gusta biokeramika na bazi HAP, nanočestični prah osušen "spray-dried" metodom je izostatski presovan na pritiscima u intervalu od 100 do 350 MPa, i konvencionalno sinterovan u opsegu temperatura od 1250-1450 °C. Vrednosti savojnih čvrstoća kompakata dobijenih na ovaj način nalaze se u intervalu 65-80 MPa, u zavisnosti od vrste praha i temperature sinterovanja (ljudska kost ima vrednost od oko 90 MPa). Iznenadjuće visoke vrednosti pritisnih čvrstoća imale su skafoldne forme dobijene sinterovanjem na 1250 °C, korišćenjem praha dobijenog u medijumu STF. Vrednost pritisnih čvrstoća ovih materijala bila je oko 23 MPa [183].

Weinand je ispitujući mogućnost dobijanja kompozitnog materijala polazeći od HAP i titan-dioksida, pokazao da je tvrdoća uzoraka opadala sa povećanjem udela titan-dioksida u uzorku [184]. Vrednosti gustine i tvrdoće uzoraka su opadale sa povećanjem temperature sinterovanja sa 1000°C na 1200 °C.

Kalcinacijom prirodnog koštanog tkiva, Oktar je sa saradnicima dobio prah kalcijum-hidroksiapatita, koji je sinterovanjem u opsegu temperatura 1000°C-1400 °C preveden u

biokeramički materijal [185]. Najveću vrednost tvrdoće su izmerili na uzorku sinterovanom na 1400 °C, dok je maksimalna čvrstoća izmerena na uzorku sinterovanom na 1200 °C, dok je sa daljim povećanjem temperature njena vrednost opadala.

Uticaj temperature na mikrostrukturu, pritisnu čvrstoću i mikrotvrdoću materijala dobijenih konvencionalnim sinterovanjem kalcinisanog humanog koštanog tkiva, ispitivao je Oktar u svojim eksperimentima. Polazni kompakti praha dobijenog kalcinacijom humanog koštanog tkiva na 850 °C, sinterovani su u atmosferi vazduha na 1000, 1100, 1200 i 1300 °C tokom 4 h. Najveći stepen denzifikacije je uočen kod uzorka sinterovanog na temperaturama većim od 1200 °C. Dobijeni materijali se odlikuju relativno poroznim mikrostrukturama, ali i boljim mehaničkim karakteristikama od materijala dobijenih u prethodnim radovima sličnim postupkom. Izmerene vrednosti pritiska čvrstoće su okvirno 60 MPa, a mikrotvrdoće oko 0,25 GPa. Autor navodi da prisustvo fluora u malim količinama može da ima pozitivan uticaj na mehaničke karakteristike dobijenih materijala [186].

Nakon sintetisanja stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita precipitacionom metodom i sinterovanja u intervalu temperatura 1140-1340 °C, Prokopiev je ispitivao uticaj temperature sinterovanja na mikrostrukturu i mehaničke karakteristike sinterovanih hidroksiapatita. Zrna konvencionalno sinterovanih kompakata su bila mikronskih veličina, i nalazila su se u rasponu od 2,3 do 3,5 μm. Jungov modul elastičnosti i pritisna čvrstoća ovako dobijene hidroksiapatitne biokeramike se povećava sa povećanjem temperature sinterovanja, a vrednosti se nalaze u okviru intervala 16-73 GPa, odnosno 5-13,8 MPa, respektivno [187].

Uticaj morfoloških karakteristika nanočestica kalcijum-hidroksiapatita na proces denzifikacije pri konvencionalnom sinterovanju na 1250 °C ispitivao je Banerje sa saradnicima. Oni su pošli od igličastih i sferičnih nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita, sa ciljem da konvencionalnim postupkom sinterovanja dobiju guste biokeramičke materijale optimalnih svojstava. Sa povećanjem udela igličastih čestica HAP, dobijene su poroznije mikrostrukture sinterovanih uzoraka. U zavisnosti od udela igličastih čestica u polaznom prahu, dobijeni materijali su imali različite vrednosti mehaničkih parametara, posebno mikrotvrdoće i žilavosti. Povećanje udela igličastih čestica izazvalo je pad mikrotvrdoće uzoraka sa 5,5 GPa na 3,4 GPa, dok je pritom vrednost koeficijenta žilavosti povećana sa 0,6 na 1,0 MPa m^{1/2}. Ove vrednosti ukazuju na činjenicu da morfologija čestica polaznog praha ima veliki uticaj pre svega na proces denzifikacije, a potom i na mehaničke karakteristike dobijene keramike na bazi HAP [188].

Varirajući odnos Ca/P u polaznom prahu u intervalu od 1,60 do 1,65, Pattanayak je sa saradnicima proučavao stabilnost kalcijum-hidroksiapatitne faze u gustoj keramičkoj formi. Sintetisani prahovi kalcijum-hidroksiapatita su najpre mešani sa 5 % polivinil alkohola kao aditiva za presovanje, a zatim kompaktirani uniaksijalno na izuzetno visokim pritiscima u intervalu od 400 MPa do 1,2 GPa. Rendgenskom difrakcionom analizom konstatovana je stabilnost kalcijum-hidroksiapatitne faze do 600 °C, dok na višim temperaturama kalcijum deficitarni hidroksiapatit prelazi delimično u druge kalcijum-fosfate. Prahovi kompaktirani na

600 MPa i konvencionalno sinterovani na temperaturama od 900-1200 °C, odlikuju se gustinama od 2,11 do 2,95 g/cm³. Najveću vrednost savojne čvrstoće od 48,7 MPa imao je uzorak sinterovan na 1100 °C. Posmatrajući zavisnost gustine od primenjenog pritiska primećeno je da se gustina kompakata povećava sa povećanjem pritiska, dok se gustina sinterovanih uzoraka povećava do pritiska od 800 MPa, za ostaje konstantna do pritiska od 1000 MPa, nakon čega sa daljim povećanjem pritiska opada [189].

Tan je sa saradnicima ispitujući uticaj pritiska na sinterabilnost HAP, presovanjem polaznih kompakata na 200 MPa izostatski, snizio temperature sinterovanja HAP sa 1250 °C na 1050 °C [190]. Materijali dobijeni sinterovanjem uzoraka prethodno izostatski presovanih na 200 MPa odlikovali su se većim vrednostima gustine, modula elastičnosti i tvrdoće u poređenju sa uzorcima presovanim uniaksijalno na nižim pritiscima.

Polazeći od aglomerisanih precipitaciono dobijenih prahova HAP sa Ca/P odnosom nešto manjim od teorijskog, Bianco je ispitujući fazu stabilnost HAP ustanovio da je HAP većinska stabilna faza tokom sinterovanja do 1300 °C, dok se neznatne količine TCP javljaju već oko 800 °C [191]. Nehomogenost mikrostrukture sintervanih uzoraka on objašnjava postojanjem tvrdih aglomerata u polaznom prahu.

Konvencionalno sinterovanje biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita, polazeći od HAP dobijenog korišćenjem prirodnih resursa, proučavao je Balazi sa saradnicima. Kalcinisanjem ljuski od jaja na 900 °C, prethodno grubo očišćenih od primesa, dobijen je prah koji je potom mešan sa fosfornom kiselinom, varirajući odnos Ca/P i vreme mlevenja smeše. Veće specifične površine imali su prahovi dobijeni pri manjem odnosu Ca/P i dužim vremenom mlevenja (24 h). Nakon toga kompaktni prah je sinterovan na temperaturama od 900-1100 °C tokom 2 h. Monofazna hidroksiapatitna keramika je dobijena konvencionalnim sinterovanjem prahova dobijenih pri većem odnosu Ca/P u polaznoj smeši i pri kraćem vremenu mlevenja na temperaturi od 1000 °C [192].

Mogućnost dobijanja biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita sa orjentisanim zrnima, koristeći magnetno polje tokom procesiranja, proučavao je Chen sa timom. U njihovim istraživanjima polazni kompakti su konvencionalno sinterovani na 1200 °C tokom 2 h, u prisustvu magnetnog polja. Navedenim postupkom dobijena je gusta biokeramika sa orijentisanim zrnima u pravcu ose koja je paralelna dejstvu magnetnog polja. Oni navode da se ovim postupkom uz menjanje pravca dejstva magnetnog polja može uticati na preferentnu orijentaciju kristala u strukturi biokeramike na bazi HAP [193].

Koristeći bakterije roda *Serratia*, Ledo je sa saradnicima sintetisao kalcijum deficitaran hidroksiapatit sa veličinom kristalita oko 50 nm [194]. Analizom uzoraka dobijenih sinterovanjem ovako dobijenog HAP na 1200 °C se uočava izražena kristalna struktura i porast kristalita za okvirno 20 %.

Fomin je sa saradnicima polazeći od nanokristalnog HAP, prosečne veličine kristalita od 20 nm, sinterivanjem na 640 °C ispresaka dobijenih presovanjem na 3,5 GPa, dobio kompakte koji se odlikuju prosečnom veličinom zrna od oko 50 nm [195, 196]. Sinterovanje

istih polaznih kompakata na 750 °C rezultiralo je kompaktima tvrdoće od 5,7 GPa, dok je dalje povećanje temperature sinterovanja uticalo na smanjenje tvrdoće uzoraka.

Ispitujući mogućnost poboljšanja mehaničkih svojstava HAP dodavanjem različitih udela itrijum stabilisanog praha cirkonijum-dioksida, Nayak je sinterovanjem kalciniranih kompakata na 1250 °C dobio relativno guste kompakte sa evidentnim prisustvom HAP, TCP, ZrO₂ i CaZrO₃ [197]. Najveće vrednosti pritisne i savojne čvrstoće dobijene su pri udelu cirkonijum-dioksida od 2 %, dok se sa povećanjem udela ZrO₂ u polaznom uzorku čvrstoća smanjivala. Kao razlog ovog smanjenja čvrstoće autori navode različite sinterabilnosti HAP i ZrO₂, kao i prisustvo poroznosti.

Wang je sinterujući nanočestični prah HAP konvencionalnom tehnikom tokom 24 h na 850 °C i tokom 2 h na 900 °C, dobio guste nanostrukturne materijale gustine preko 99 % i sa veličinom zrna ispod 100 nm [198]. Sa smanjenjem veličine zrna on je uočio pojavu povećanja tvrdoće i žilavosti materijala. Tvrdoća uzoraka HAP se kretala u okviru intervala 4,3-5,0 GPa, dok su vrednosti koeficijenta žilavosti bile u opsegu od 0,55 do 1,1 MPa m^{1/2}.

Ispitujući uticaj Ca/P odnosa na dielektrične karakteristike sinterovanih uzoraka HAP, Quilitz je sa saradnicima došao do zaključka da dielektrična konstanta ima trend rasta sa povećanjem Ca/P odnosa [199]. Oni navode da razlozi ove zavisnosti nisu baš precizno definisani, kao i da bi mogli biti u vezi sa mikrostrukturnim svojstvima materijala.

Raksujarit je polazeći od prirodne kosti i polivinil alkohola ispitivao mogućnost dobijanja nanoporoznog materijala sinterovanjem polazne mešavine na 1200 °C [200]. Dobijeni materijali se karakterišu prosečnom veličinom pora od oko 100 nm i pritiskom čvrstoćom od 14,7 ± 3,2 MPa.

Modifikujući precipitacionu metodu za dobijanje HAP dodavanjem limunske kiseline u polazni rastvor, Mitsionis je sa saradnicima zaključio da udeo limunske kiseline u rastvoru ima veliki uticaj na nukleaciju, kao i na svojstva kalcinisanog HAP, pre svega na vrednost specifične površine [201].

Kao što je već ranije rečeno, sinterovani biokeramički materijali na bazi HAP se osim u gustoj formi koriste i u vidu kontrolisano makro i mikro poroznih formi. Prisustvo pora u biokeramičkom materijalu pojačava mehanički kontakt između tkiva i implantiranog materijala [58]. Porozni biokeramički materijali su našli primenu u mnogim oblastima, između ostalog u ortopediji, stomatologiji, inženjerstvu tkiva, u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova itd [59, 60]. Generalno, ključ za dobijanje biomaterijala dobrih svojstava može biti upravo pažljiva kontrola poroznosti u funkciji dobrih mehaničkih svojstava. Dok makroporoznost ima veliki uticaj na osteokonduktivnost i kontroliše prilaz živog bioloških fluida i tkiva ugrađenom implantu, mikroporoznost ima uticaj na adhezivna svojstva materijala, delimično kontroliše brzinu resorpcije kalcijuma i fosfora, a može da utiče i na poboljšanje mehaničkih svojstava biokeramičkih materijala.

Tacret [56] je sa saradnicima u svom radu pokušao da napravi model za predviđanje mehaničkih svojstava makro i mikroporozne bifazne HAP/β-TCP biokeramike, sa ciljem da

optimizuje odnos poroznosti i mehaničkih svojstava. Za formiranje makro pora kontrolisanih dimenzija korišćene su naftalenske čestice prečnika 400 μm , dok su mikroporozni uzorci dobijeni presovanjem praha kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita na 140 MPa i konvencionalnim sinterovanjem na temperaturama od 950-1100 $^{\circ}\text{C}$. Kombinovanjem dva prilaza, u domenu dve merne skale za definisanje dimenzija pora, oni su modelom opisali uticaj oblika i veličina pora na mehaničke karakteristike, između ostalih na žilavost biokeramičkih materijala. Merenjem tvrdoće (10-80 MPa), žilavosti (0.4-0.9 MPam^{1/2}), pritisne čvrstoće (5-20 MPa) i savojne čvrstoće (5-20 MPa) dobijeno je odlično slaganje modela i eksperimentalno utvrđenih vrednosti.

Kontrolisano porozne materijale na bazi HAP dobio je Kawata sa saradnicima proučavajući mogućnost kontrolisanja pora u materijalu polazeći od kompozita sačinjenog od praha hidroksiapatita i ugljeničnih čestica, čija dimenzija upravo određuje veličinu i zastupljenost pora u materijalu [202]. Oni su polazili od kompakata presovanih na pritiscima u opsegu od 20-40 MPa koji su sinterovani na temperaturama od 1000-1300 $^{\circ}\text{C}$, a dobijeni materijali su se karakterisali porama u opsegu od nekoliko mikrona do oko 150 mikrona.

Novu modifikaciju hidrotermalne metode sinteze sa ciljem da dobije porozne materijale u sistemu HAP/TCP, na niskim temperaturama izučavao je Vani sa saradnicima [58]. Oni su dobili porozne uzorke sa veličinom pora od 20 nm, što po mnogim autorima omogućuje nesmetanu cirkulaciju telesnih fluida i poboljšava biokompatibilnost materijala. Bioaktivnost dobijenih biomaterijala dokazali su potapanjem uzoraka u simulirani telesni fluid, pri čemu je formiran novi sloj hidroksiapatita.

Kontrolisano porozne granule na bazi hidroksiapatita i fluorhidroksiapatita polazeći od gelova i ulja kao disperzionog medijuma dobio je Komlev sa saradnicima [203]. Dobijene granule nakon konvencionalnog postupka sinterovanja na 1200 $^{\circ}\text{C}$ tokom 2 h su se odlikovale prisustvom makro pora dimenzija od 50 do 200 mikrona, dok je na njihovoj površini uočena zastupljena otvorena mikroporoznost sa porama dimenzija nekoliko mikrona. Na sličan način je sinterovanjem HAP i TCP Ribeiro dobio granule kontrolisane poroznosti, pri čemu je kao izazivač poroznosti korišćen natrijum-alginat [204]. Dijametri sfernih granula bile su 632 ± 40 μm sa otvorenim porama veličine 2 μm . Kontrolisanjem poroznosti i odnosa HAP/TCP u sinterovanom materijalu, Komlev i saradnici su uspeli da kontrolišu adsorpciju proteina, pri čemu su uočili da se sa povećanjem udela TCP povećava moć sorpcije proteina [205].

3.4. Dobijanje i svojstva mikrotalasno sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata

Sumirajući rezultate analize svojstava biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata dobijenih različitim modifikacijama konvencionalnog postupka sinterovanja, može se konstatovati da su u najvećem broju slučajeva materijali dobijeni na relativno visokim temperaturama imali zrna mikronskih veličina, često neuniformne i porozne mikrostrukture i relativno niske vrednosti mehaničkih parametara. Sinterovani materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata su često vrlo kruti, što u velikom broju slučajeva ograničava njihovu primenu.

Vrednosti koeficijenta žilavosti kod navedenih materijala, što je prikazano u prethodnom poglavlju i tabeli 2.3, retko imaju veću vrednost od $1 \text{ MPa m}^{1/2}$. Generalno, značajna poboljšanja mehaničkih karakteristika biokeramičkih materijala, sa akcentom na žilavost, mogu da se ostvare kroz kontrolu mikrostrukturnih parametara i faznog sastava, pre svega veličine zrna i oblika i veličine pora [26, 27, 56, 59, 206].

Smanjenje veličine zrna sa mikro na nano nivo može da utiče na povećanje žilavosti biokeramičkih materijala na dva načina. Prvi se zasniva na povećanju broja granica zrna na koji pukotina nailazi pri prostiranju. Upravo ovo povećanje broja granica zrna utiče na povećanje apsorpcije energije pukotine, tako da se njena dužina skraćuje, a žilavost materijala se shodno tome povećava. Drugi aspekt povećanja žilavosti materijala sa smanjenjem veličine zrna zasniva se na promeni mehanizma prostiranja pukotine kroz keramički materijal. Naime, mehanizam prostiranja pukotine kod mikrostrukturnih keramičkih materijala je obično transgranularan, tj. pukotina se prostire duž zrna, kao što je shematski prikazano na slici 3.7a. Dovoljno velikim smanjenjem prosečne veličine zrna, mehanizam prostiranja pukotine se menja i postaje intergranularan, jer se pukotina kreće između finih zrna keramičkog materijala (Slika 3.7b). Pukotina na taj način gubi veliku količinu energije zaobilazeći zrna nano dimenzija, što za krajnji rezultat ima porast koeficijenta žilavosti [207-210].

Slika 3. 7. Transgranularni i intergranularni mehanizam prostiranja pukotine

Nanostrukturni gusti i kontrolisano porozni biokeramički materijali se, kao što je prikazano, najčešće dobijaju presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem, a kao tehnike za njihovo dobijanje se često koriste i toplo presovanje, toplo izostatsko presovanje, spark plazma sinterovanje itd. Sinterovanje na visokim temperaturama tokom dugih vremenskih perioda može da dovede do nastanka krupnozrne strukture, a ponekad i do nekontrolisanog rasta pojedinih zrna na račun manjih. Takođe mana visokotemperaturnih procesa pri procesiranju biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata je sklonost HAP ka dekompoziciji na visokim temperaturama. Sve navedeno ukazivalo je na potrebu da se procesiranje biokeramičkih materijala izvodi na što je moguće nižim temperaturama i tokom što je moguće kraćih vremenskih intervala [211-213].

Sa ciljem da se prevaziđu svi navedeni problemi tokom sinterovanja keramičkih materijala, nastala je tehnika sinterovanja uz pomoć mikrotalasa, komercijalno nazvana mikrotalarno sinterovanje [214]. Ova tehnika ima ogromane prednosti, od kojih su neke: izvanredna mogućnost kontrole mikrostrukturnih parametara, odsustvo limita po pitanju oblika i veličine sinterovanih uzoraka (što ovoj tehnici donosi prednost u odnosu na ostale pri izradi materijala vrlo preciznih dimenzija koji imaju primenu u maksiofacijalnoj hirurgiji), poboljšanje mehaničkih parametara biokeramike, itd. Velika prednost ove tehnike u odnosu na ostale je i ekonomski faktor koji proističe iz uštede energije usled sinterovanja na 200-300 °C nižim temperaturama i tokom višestruko kraćih vremenskih intervala.

Tokom protekle decenije, veliki broj istraživačkih timova je koristio mikrotalarno sinterovanje sa ciljem da unaprede svojstva biokeramičkih materijala. Rad baziran na mikrotalarnom sinterovanju kalcijum-hidroksiapatita prvi je objavio Fanga sa saradnicima 1994. godine [215, 216].

Mikrotalarno sinterovanje je vrlo brz proces, fundamentalno različit od konvencionalnog sinterovanja, te se stoga ni jedan zaključak vezan za kinetičke parametre dobijene pri konvencionalnom sinterovanju HAP ne može primeniti na ovu vrstu sinterovanja. Osnovna razlika ova dva tipa sinterovanja je način predavanja energije materijalu koji se sinteruje, koji je u slučaju konvencionalnog sinterovanja baziran na kondukciji od površine materijala ka središtu, dok se u slučaju mikrotalarnog sinterovanja energija prenosi ravnomerno kroz čitavu zapreminu uzorka uz odsustvo temperaturnog gradijenta [217, 218]. Upravo na ovoj karakteristici se bazira prednost mikrotalarnog sinterovanja pri procesiranju biokeramičkih materijala, koji su obično loši provodnici toplote. Zbog odsustva temperaturnog gradijenta tokom sinterovanja, prilikom mikrotalarnog sinterovanja brzina zagrevanja igra mnogo manju ulogu u poređenju sa konvencionalnim postupkom. Na osnovu navedenih činjenica sledi da se procesom mikrotalarnog sinterovanja mogu dobiti materijali uniformnije mikrostrukture, proces može da se odvija pri većim inicijalnim brzinama zagrevanja, a s obzirom na niže temperature sinterovanja i pojava fazne transformacije je manje verovatna.

Fang je sa saradnicima u jednoj od prvih studija objavljenih iz oblasti mikrotalarnog sinterovanja, polazeći od hidrotermalno sintetisanih deaglomerisanih prahova HAP, sinterovanjem tokom 5 min na 1150 °C dobio uzorke koji su imali gustinu blisku teorijskoj i prosečnom veličinom zrna od 200 nm [219]. On navodi kao veliku prednost procesa mikrotalarnog sinterovanja ukupno vreme procesiranja biokeramike na bazi HAP od 20 min, dok je isti prah konvencionalno sinterovan tokom 4 h. Dobijeni materijali su se odlikovali translucennošću, što autori pripisuju osobinama polaznog praha, od kojih ističu čistoću, termičku stabilnost sintetisanog praha HAP, strukturu primarnih čestica itd.

Mikrotalarnim sinterovanjem precipitaciono sintetisanih nanočestičnih prahova hidroksiapatita tokom 5-10 min na 1100 °C, Yang je dobio znatno gušće kompakte od konvencionalno sinterovanih uzoraka na istoj temperaturi tokom 1 h [220]. Mikrotalarno sinterovani biokeramički kompakti su imali oko deset puta manju vrednost prosečne veličine

zrna od konvencionalno sinterovanih materijala. Poredeći reakciju osteoblastnih ćelija sa površinama ove dve vrste biokeramičkih materijala na čijoj su površini uočljive pore mikronskih dimenzija, sa zrnima veličine 3-5 μm i 0,3-0,5 μm , nije uočena bitna razlika.

Koristeći tehniku mikrotalasnog sinterovanja, Katakam je uspeo da dobije funkcionalno gradijentne materijale na bazi HAP, TCP i Ag [221]. On navodi da je upravo tehnika sinterovanja potpomognuta mikrotalasima optimalna za dobijanje materijala ovog tipa zbog mogućnosti kontrolisanja faznog sastava materijala usled kratkog vremena zadržavanja na temperaturi sinterovanja.

Mikrotalasnim sinterovanjem nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita, Varma je tokom 5 min dobio uzorke koji su imali gustinu približno 95 %, dok je prosečna veličina zrna je bila između 200-300 nm. Izmerena vrednost mikrotvrdoće bila je 5,62 GPa. Produženjem vremena sinterovanja na 15 min, zrno je poraslo iznad 500 nm, a mikrotvrdoća je neznatno povećana usled porasta gustine materijala [214].

Wang je polazeći od kompakata sačinjenih od nanočestičnog HAP i H_2O_2 , tehnikom mikrotalasnog sinterovanja tokom 5 min dobio kontrolisano porozne materijale, koji su imali vrednost pritiska čvrstoće od 10 MPa [222]. U poređenju sa konvencionalno sinterovanim uzorcima, dobijene su mnogo uniformnije mikrostrukture i deset puta manja prosečna veličina zrna. Ista grupa autora je polazeći od kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita mikrotalasnim sinterovanjem dobila porozni materijal na bazi HAP i TCP, sa poroznošću od 65 %, prosečnom veličinom zrna od 300 nm i pritiskom čvrstoćom od 6,4 MPa [223]. Najbolje mehaničke karakteristike je imao uzorak sinterovan tokom 5 min, dok je produženje vremena zadržavanja na temperaturi sinterovanja izazvalo pogoršanje mehaničkih svojstava.

Mikrotalasnim sinterovanjem stehiometrijskih nanočestičnih prahova HAP na temperaturama od 1000 $^{\circ}\text{C}$ do 1300 $^{\circ}\text{C}$ tokom 30 min, Ramesh je sa saradnicima proučavao uticaj parametara procesiranja na svojstva dobijenih monofaznih materijala [224, 225]. Vrednosti gustina materijala su rasle od 90 % nakon sinterovanja na 1000 $^{\circ}\text{C}$ do 99 % nakon sinterovanja na 1300 $^{\circ}\text{C}$. Najveću vrednost tvrdoće od 6,4 GPa dobio je nakon sinterovanja na 1150 $^{\circ}\text{C}$, dok je najveću žilavost od 1,45 MPa $\text{m}^{1/2}$ imao materijal sinterovan na 1050 $^{\circ}\text{C}$. Povećanjem temperature iznad navedenih optimuma došlo je do smanjivanja vrednosti mehaničkih parametara usled efekta veličine zrna.

Poredeći module elastičnosti materijala dobijenih tehnikom mikrotalasnog sinterovanja tokom 10 min na 1200 $^{\circ}\text{C}$ sa konvencionalno sinterovanim uzorcima dobijenim na istoj temperaturi tokom 2 h, Oliveira i saradnici ustanovili su da su vrednosti slične, i iznose približno 105 GPa [226].

Nakon što je dobio relativno gust biokeramički materijal tehnikom mikrotalasnog sinterovanja, sa prosečnom veličinom zrna od 300-400 nm, Seo je sa saradnicima ispitivao ponašanje materijala prilikom potapanja u destilovanu vodu sa pH vrednošću 7,4 [227]. Nakon 14 dana granice zrna su se delimično rastvorile, a mikroskopijom je pokazao da se velika mikronska zrna sastoje od manjih sub-zrna, koja su nanometarskih dimenzija. Gustu

polikristalnu keramiku na bazi HAP dobijenu mikrotalasnim sinterovanjem, ista grupa autora je ispitivala tako što je potapanjem u kiseli rastvor pH vrednosti 3 pratila promene na materijalu, ne bi li simulirali uslove razgradnje HAP od strane osteoklasta [228]. AFM analizom su ustanovili različito ponašanje pojedinih zrna, pri čemu su granice između zrna bile rastvorene. Sa produženjem vremena odležavanja materijala u rastvoru, hrapavost površine je postajala sve veća, a sub-zrna su bivala sve uočljivija. Autori naglašavaju da bi ovo mogao da bude dobar put ka definisanju mehanizama resorpcije ovog tipa biokeramičkih materijala.

Chanda je sa saradnicima proučavao sinterabilnost čistih i dopiranih prahova HAP i TCP u uslovima mikrotalasnog sinterovanja i ustanovio da je moguće dobiti odlične rezultate primenjujući navedenu tehniku sinterovanja u svim ispitivanim slučajevima. U svim slučajevima biokeramički prahovi su pokazali dobru denzifikaciju, uniformno skupljanje bez prisustva vidljivih pukotina i pre svega uniformnu mikrostrukturu zahvaljujući ravnomernom zagrevanju po čitavoj zapremini kompakta [229]. Mehanizam loma u slučajevima čistog HAP i TCP bio je intergranularan, dok je u slučajevima dopiranih materijala uočen transgranularni mehanizam loma.

3.5. Metode sinterovanja uz pomoć pritiska

Biokeramički materijali velikih gustina se dobijaju u najvećem broju slučajeva sintezom prahova kalcijum-hidroksiapatita, kompaktiranjem prahova na visokim pritiscima i sinterovanjem. Ukoliko poslednje dve faze teku simultano reč je o sinterovanju potpomognutim pritiskom. U dosadašnjem tekstu je presovanje prahova spominjano u funkciji oblikovanja tela, tj. kao faza procesiranja koja prethodi sinterovanju. U daljem tekstu biće reči o postupcima gde se sinterovanje i dejstvo pritiska odvijaju istovremeno. Sinterovanje potpomognuto pritiskom je dosta zastupljen postupak pri procesiranju biokeramičkih materijala, a omogućava dobijanje biokeramičkih proizvoda izuzetno velikih gustina na temperaturama koje su za 250-300 °C niže nego kod konvencionalnih tehnika sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita.

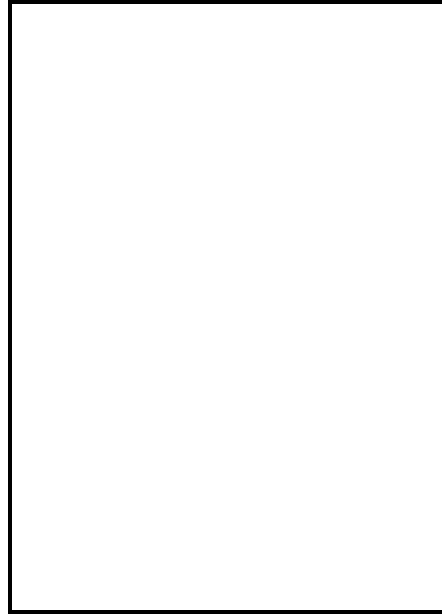
Prilikom sinterovanja uz pomoć pritiska se postižu gustine i preko 99 % teorijske gustine. Sa porastom pritiska uglavnom se smanjuje poroznost sinterovanih uzoraka. Analizama ovih postupaka utvrđeno je da odnos veličine zrna i pora koji su u neposrednom dodiru imaju veliki uticaj na densifikaciju materijala. Naime, ukoliko je veličina zrna keramičkog kompakta znatno veća od veličine pore dodatni pritisak će imati pozitivnu ulogu tokom densifikacije, dok u suprotnom slučaju pritisak nema veliki uticaj na densifikaciju keramičkih materijala.

U zavisnosti od pravca delovanja pritiska, razlikuju se: postupci pri kojima pritisak deluje uniaksijalno (toplo presovanje i spark plazma sinterovanje) i postupci pri kojima pritisak deluje izostatski (toplo izostatsko presovanje).

3.5.1. Dobijanje i svojstva toplo presovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata

Prilikom toplog presovanja uzorak se istovremeno izlaže dejstvu temperature i uniaksijalnog pritiska, a na taj način se povećava pogonska sila denzifikacije u odnosu na postupak konvencionalnog sinterovanja. Uređaj za toplo presovanje, čija je uprošćena šema prikazana na slici 3.8, se sastoji od komore peći u kojoj se nalazi kalup sa uzorkom koji se postavlja između dva klipova. Temperature prilikom toplog presovanja koje se sreću u literaturi dostižu 2200 °C, a primenjeni pritisak ima vrednosti do 50 MPa. Kako se uniaksijalni pritisak direktno preko klipova prenosi na uzorak na izuzetno visokim temperaturama, izbor materijala od koga su napravljeni klipovi i kalup je od posebnog značaja za uspešnu primenu ove tehnike.

Primena visokih temperatura, mogućnost habanja zidova kalupa i mogućnost reakcije između materijala kalupa i samog uzorka, najčešći su razlozi za primenu materijala na bazi grafita, tvrdih borida i karbida kao materijala za izradu kalupa. Iako veoma skupi, kalupi od molibdena i njegovih legura su, zbog superiornih visokotemperaturnih osobina, našli primenu u specifičnim slučajevima, ali samo pod uslovom da je tokom procesa obezbeđena atmosfera koja ove materijale štiti od oksidacije. S obzirom da se kalcijum-hidroksiapatit obično presuje na toplo na temperaturama do 1000 °C, kao materijal za izradu kalupa može da se koristi i gusta keramika dobijena sinterovanjem na višim temperaturama za 300-500 °C od temperature procesiranja.



Slika 3.8. Šema uređaja za toplo uniaksijalno presovanje

Toplo presovanje se obično primenjuje u slučaju sinterovanja keramičkih tela jednostavnih oblika. Najveća prednost ove metode je mogućnost ubrzane denzifikacije na nižim temperaturama i za kraće vreme, pri čemu se može izbeći visokotemperaturna oblast nestabilnosti određene keramičke faze i usporiti ili čak eliminisati rast zrna. Grafitni kalup prilikom toplog presovanja često raguje sa uzorkom, što predstavlja veliki problem pri korišćenju ovog postupka. Iz ovog razloga se kalup često premazuje prahovima hemijski inertnim i stabilnim na visokim temperaturama, kakav je na primer bor-nitrid.

Toplo presovanje se kao metoda za konsolidaciju prahova i kompozitnih materijala primenjuje od 1950. godine. U pojedinim industrijama ne postoji alternativa toplom presovanju zbog niza prednosti, kao što su: pozitivan uticaj pritiska na kinetiku densifikacije i mogućnost kontrole rasta zrna.

Međutim, ovaj postupak zahteva primenu relativno skupe opreme. Česta pojava je i neujednačena raspodela gustine u keramičkim proizvodima dobijenim ovom tehnikom. U nekim slučajevima se pri toplom presovanju može pojaviti anizotropija u mikrostrukturi, kao posledica orjentisane kristalizacije u jednom ili više pravaca ili usled plastične deformacije individualnih čestica. Veliki nedostatak ove metode predstavlja nemogućnost izrade biokeramičkih kompakata sa nepravilnim oblicima, kakvi često imaju primenu u maksiofacijalnoj hirurgiji i ortopediji [230].

Poslednjih decenija toplo presovanje je dosta eksploatisana metoda za procesiranje kako guste tako porozne biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, kao

i kompozita na njihovoj osnovi. Koristeći toplo presovanje, Suchanek je polazeći od precipitaciono dobijenog nanočestičnog praha HAP pomešanog sa različitim količinama vlakana HAP dobijenih hidrotermalno, dobio vrlo guste materijale dobrih mehaničkih karakteristika. Najoptimalnija svojstva materijala dobio je toplim presovanjem na 1000 °C tokom 2 h na pritisku 30 MPa u struji argona. Gustina uzoraka bila je u intervalu 90-97 % teorijske gustine. Žilavost dobijenih kompozita dostigla je vrednost 1,4 MPa m^{1/2}, dok vrednost koeficijenta žilavost materijala bez dodatka hidrotermalno dobijenih vlakana nije prelazila 1,0 MPa m^{1/2}. Vrednosti tvrdoće dobijenih materijala nalaze se u intervalu 4-6 GPa [231].

Raynaud sa saradnicima je polazeći od kalcijum deficitarnog hidroksiapatita sinterovanjem dobio guste bifazne HAP-β-TCP biokeramičke materijale, a cilj sledećih istraživanja bio je da korišćenjem toplog presovanja poboljša mehaničke karakteristike ovih materijala [232]. Uzorci hidroksiapatita su toplo presovani na temperaturama u intervalu od 1100 °C – 1200 °C, na pritisku od 20 MPa, u atmosferi argona. Na temperaturi 1100°C dobijen je kompakt sa homogenom raspodelom i prosečnom veličinom zrna od okvirno 200 nm, ali sa uočljivim porama. Na višim temperaturama primetan je nekontrolisan rast zrna. Koeficijent žilavosti kompakta toplo presovanog na 1200 °C iznosio je 0,7 MPa m^{1/2}, a sa smanjenjem temperature na 1100 °C vrednost se povećava na 1,0 MPa m^{1/2}. Najveće vrednosti žilavosti dobijene su pri odnosu Ca/P u polaznom prahu od 1,67. Nakon potapanja uzoraka toplo presovanih na 1100 °C u simulirani telesni fluid, nakon 30 dana je primećena prva promena i to u vidu interakcije β-TCP zrnaca sa fluidom, pri čemu je površina uzorka postala hrapava sa uočljivim šupljinama, nastalih usled delimičnog rastvaranja β-TCP.

Koristeći tehniku toplog presovanja u hidrotermalnim uslovima, Hashida je uspeo da dobije biokeramički materijal velike gustine i dobrih mehaničkih svojstava pri ambijentalnoj temperaturi od 300 °C. CaHPO₄•2H₂O + Ca(OH)₂, Ca₈H₂(PO₄)₆•5H₂O + Ca(OH)₂, CaHPO₄•2H₂O + NH₃•H₂O, Ca₈H₂(PO₄)₆•5H₂O + NH₃•H₂O su korišćeni kao kombinacije prekursora, dok je pritisak tople prese bio 40 MPa. Dobijeni material se odlikovao lamelarnom strukturom, koja je prema tvrđenju autora imala presudan uticaj na odlične mehaničke karakteristike dobijenih materijala [233].

Sa ciljem da strukturne parametre dovede na nano nivo, An je sa saradnicima, polazeći od nanočestičnih prahova HAP dobio izuzetno guste transparentne materijale metodom toplog presovanja. Na temperaturi od 900 °C oni su dobili potpuno guste materijale na bazi HAP sa oko 70 % većom vrednošću pritiskne čvrstoće u odnosu na komercijalno dostupne materijale ove vrste. Dodavanjem oko 3 % itrijum stabilisanog praha cirkonijum-dioksida u prah HAP pre toplog presovanja, poboljšao je mehaničke karakteristike toplo presovanih kompakata koji su se odlikovali vrlo uniformnom mikrostrukturom [234].

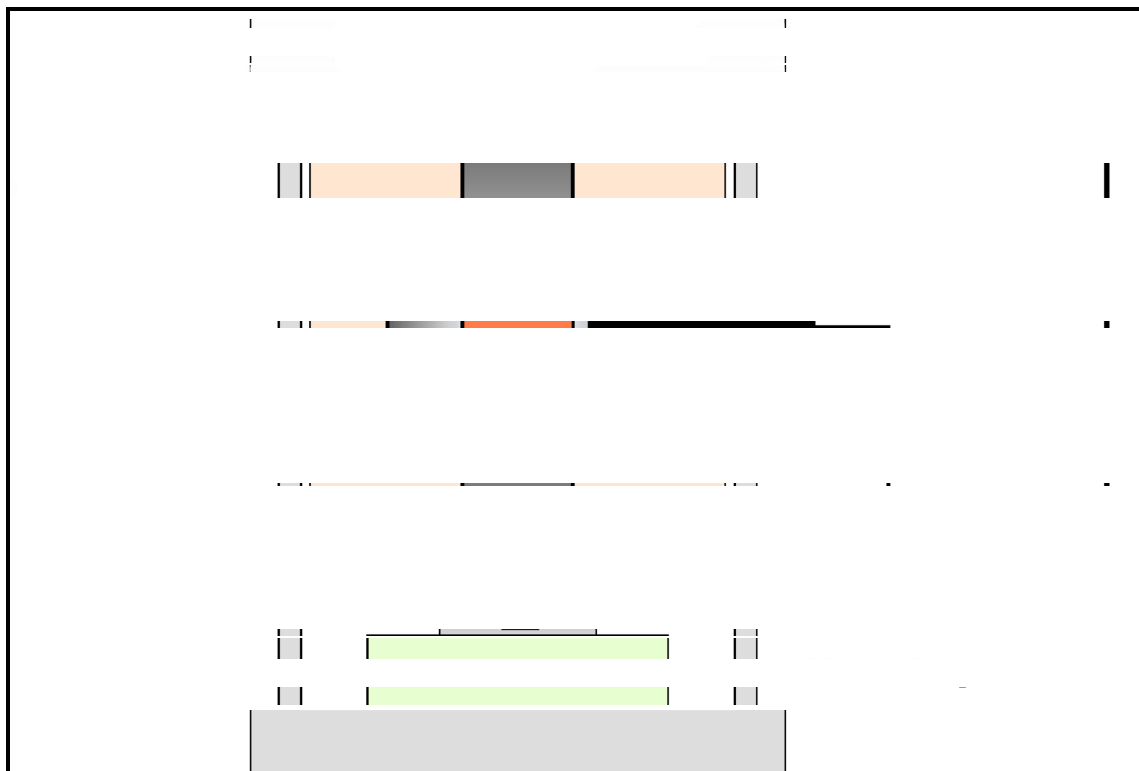
Kombinujući metode XRD i FTIR analize, Kmita je sa saradnicima proučavajući fazni sastav toplo presovanih uzoraka HAP uočio da se u okviru temperaturnog intervala 1150-1300 °C tokom toplog presovanja ne odvija fazna transformacija stehiometrijskog

hidroksiapatita u trikalcijum-fosfat. Oni ističu veliki značaj stabilnosti hidroksiapatine faze tokom procesiranja metodom toplog presovanja sa biološke tačke gledišta [235].

3.5.2. Dobijanje i svojstva spark plazma sinterovanih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata

Spark plazma sinterovanje, SPS, kao jedna od metoda u kojima se električna struja koristi za pospešivanje procesa sinterovanja, patentirano je 1933. godine u Americi, ali tada nije bilo poznato pod ovim nazivom [236, 237]. Nakoliko radova u isto vreme pojavilo se u literaturi pedesetih godina dvadesetog veka, u kojima je korišćena metoda sinterovanja potpomognuta električnom strujom, a koja je kasnije nazvana spark plazma sinterovanjem [238-241]. Danas je spark plazma sinterovanje često korišćena metoda za dobianje gustih biokeramičkih materijala na bazi HAP i kalcijum-fosfata, kao i kompozita na njihovoj osnovi.

Najveće prednosti ove metode su mogućnost sinterovanja za izuzetno kratak vremenski period, sniženje temperature sinterovanja, a samim tim i mogućnost prevođenja nanočestičnog praha u nanostrukturni keramički materijal, kao i mnogo puta potvrđene dobre mehaničke karakteristike materijala dobijenih ovom tehnikom. Primena ove tehnike sinterovanja zasniva se na termičkom efektu stuje, koja omogućava veliku brzinu zagrevanja i aktiviranje sinterovanja na nižim temperaturama, a samim tim sprečava rast zrna sprečavajući aktiviranje visokotemperaturnih mehanizama sinterovanja [160, 242]. Istovremeno korišćenje pritiska pospešuje densifikacioni proces u sinterovanom materijalu. Uprošćena šema uređaja za spark plazma sinterovanje prikazana je na slici 3.9.



Slika 3.9 . Šema peći za spark plazma sinterovanje

Tokom procesa spark plazma sinterovanja kalup sa uzorkom se nalazi, kao što se sa slike može videti, između gornje i donje elektrode koje prenose električni impuls klipovima. Elektrode su povezane sa SPS generatorom električne struje niskog napona (svega nekoliko volta) i velike jačine (preko 1000 A).

Osnovne razlike između konvencionalnog toplom presovanja i SPS sinterovanja su u brzini zagrevanja koja potiče od različite prirode zagrevanja uzorka i kalupa u kome se on nalazi. Dok se pri toplom presovanju uzorak i kalup zagrevaju pomoću grejača koji se nalazi u zatvorenoj komori, u pećima za SPS zagrevanje se vrši Džulovim efektom električne struje koju provodi kalup, a i uzorak ukoliko je provodan. Kao dodatnu ulogu struje pored obezbeđivanja toplotne energije sistemu, navodi se i formiranje plazme, koja ima pozitivan uticaj na sinterovanje kroz efekat „čišćenja“ površine čestica [236]. Ova uloga električne energije pri sinterovanju je podržana od strane mnogih naučnika [243-246]. Tokita je u svom radu izneo neke od dokaza za pozitivnu ulogu plazme pri formiranju vratova između čestica koje sinteruju [247], ali bilo je i mnogih neslaganja sa njegovom teorijom. Nešto kasnije Ozaki [248] izvodeći eksperimente SPS tehnikom, zaključuje da do pražnjenja ne dolazi u slučajevima kada se koristi grafitni kalup. Prihvatajući ulogu plazme, Yanagisawa [249] objavljuje studiju u kojoj podvrgavanjem čestica bakra jednostrukom impulsnom pražnjenju u

trajanju od 500 ms zaključuje da varnica ima uticaj na povezivanje pojedinih, ali ne i svih čestica. I dalje se puno istraživanja bazira na nalaženju konkretnih dokaza za ulogu varnica pri povezivanju čestica tokom sinterovanja.

Veliki broj radova je prisutan u literaturi sa temom korišćenja spark plazma sinterovana pri procesiranju biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata. Korišćenjem ove tehnike ostvaruje se istovremeno dejstvo električne struje i pritiska na prah kalcijum-hidroksiapatita, a rezultat je u velikom broju slučajeva biokeramički materijal sa nano dimenzijama zrna i dobrim mehaničkim svojstvima, a često i nastanak potpuno guste translucetne biokeramike.

Proučavajući sinterabilnost hidroksiapatita metodom SPS u opsegu temperatura od 850 °C do 1100 °C, Gua je dobio uzorke gustina bliskih teorijskoj vrednosti u toku 5 min. Tvrdoća i modul elastičnosti su rasli sa porastom temperature sinterovanja do 950 °C, a sa daljim povećanjem temperature njihove vrednosti su opadale. Maksimalna vrednost žilavosti dobijena spark plazma sinterovanjem na 950 °C i iznosila je 1,25 MPa m^{1/2}, dok je konvencijalnim sinterovanjem istog praha vrednost žilavosti bila manja od 1,0 MPa m^{1/2} [250].

U poređnom analizom materijala dobijenih toplim presovanjem i spark plazma sinterovanjem, polazeći od HAP dobijenog *spray dry* metodom Nakahira je SPS metodom na 700 °C postigao gustinu istu kao toplim presovanjem istog praha na 1200 °C. XRD analizom je u oba slučaja ustanovljena monofaznost materijala, a odležavanjem u STF bolju bioaktivnost su pokazali uzorci dobijeni spark plazma sinterovanjem [251]. Na većim temperaturama dobijeni kompakti su se odlikovali zrnim mikronskih dimenzija, dok je sniženjem temperature veličina zrna znatno redukovana, ali je i gustina uzoraka bila manja. Materijali dobijeni SPS sinterovanjem odlikovali su se prosečnom veličinom zrna od 500 nm.

Khor je sa saradnicima SPS metodom dobio čiste hidroksiapatitne materijale i kompozitne materijale sa 3 vol.% ZrO₂ [252, 253]. Oni takođe ističu bolja mehanička svojstva materijala dobijenih SPS tehnikom od konvencionalno sinterovanih materijala, a konstatuje i poboljšanje mehaničkih svojstava uvođenjem nanočestičnog ZrO₂ u sistem. Odležavanjem u STF je potvrđena bioaktivnost materijala dobijenih SPS tehnikom.

Spark plazma sinterovanjem, Gu je dobio guste kompakte sa relativno dobrim mehaničkim karakteristikama, polazeći od praha kalcijum-hidroksiapatita dobijenog "spray-dried" tehnikom. Nakon *in vitro* ispitivanja sinterovanih kompakata u simuliranom telesnom fluidu tokom 28 dana, formiran je sloj karbonatnog apatita. Apatitni sloj je počeo da se formira nakon 24h, a nakon 28 dana formirana je gusta umrežena struktura sačinjena od mikronskih igličastih kristalita [213].

Gasnom analizom CO₂ nastalog tokom spark plazma sinterovanja karbonatnog HAP, Yamaguchi je ispitivao efekat električne struje na sinterovanje HAP. CO₂ je tokom termičke analize HAP počeo da se izdvaja već na 600 °C, dok je tokom SPS detektovan na nižim

temperaturama. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da se površina čestica HAP tokom procesa SPS zagreva lokalno usled toplotnog efekta električne struje [254].

Mikrosferični prah kalcijum-hidroksiapatita dobijen plazma postupkom, spark plazma sinterovanjem na 1100 °C tokom 3 min preveden je u biokeramički material gustine 96,2%. Prema Xu i saradnicima, upravo su uslovi u slučaju prahova ovog tipa su optimalni za dobijanje gustih biokeramičkih materijala na bazi HAP. Modul elastičnosti i tvrdoća su povećani za oko 15 % povišenjem temperature sa 1000 °C na 1100 °C [255].

U narednoj studiji isti autori su poredili sinterabilnost prahova sa sferičnim česticama u konvencionalnim i SPS uslovima. Tokom SPS na pritisku od 45 MPa i u opsegu temperatura 900-1200 °C tokom 3 min, pri brzini zagrevanja od 100 °C/min, dobijeni su materijali znatno veće gustine nego konvencionalnim sinterovanjem na temperaturama 1000-1400 °C tokom 2 h i 5 h, pri brzini zagrevanja od 5 °C/min, 10 °C/min i 20 °C /min. Od materijala dobijenih konvencionalnim postupkom, najveću gustinu 2,86 g/cm³, imao je uzorak dobijen na 1200 °C tokom 5 h i pri brzini zagrevanja od 10 °C/min [256]. Uzorci dobijeni SPS postupkom na 1100 °C osim većom gustinom, odlikovali su se i znatno manjim zrnom od oko 1,5 μm.

Spark plazma sinterovanjem ultrafinih sfernih čestica HAP/ZrO₂, na 1075 °C tokom 5 min, Kumar je sa saradnicima dobio materijal kontrolisane poroznosti, sa prisustvom sfernih pora koje potiču od polaznog praha. Navedene sferne pore su intraaglomeratne pore koje se nalaze unutar sfernih čestica praha. Upravo ove sferne pore daju ovom tipu materijala specifičnu mikrostrukturu koja za posledicu ima i neobično visoke vrednosti mehaničkih parametara ovog tipa biokeramike. Postavljanjem 2-D modela autori objašnjavaju povećanje žilavosti usled formiranja specifičnog tipa mikrostrukture [59].

Spark plazma sinterovanjem kompozitnog praha HAP/5 vol.% Ag dobijeni su relativno gusti biokeramički materijali, sa ravnomerno raspoređenim česticama srebra u HAP matriksu, dimenzija oko 200 nm. U slučaju materijala dobijenog sinterovanjem čistog hidroksiapatita mehanizam loma bio je transgranularan, dok je dodakom čestica srebra ustanovljeno da je mehanizam loma kombinacija intergranularnog i transgranularnog tipa [257].

Polazeći od praha HAP pomešanog sa 1, 3 i 5 mas. % silicijuma, spark plazma sinterovanjem na 1000 °C tokom 3 h dobijen je materijal za koji je XRD, Raman i XPS analizom utvrđeno da je silicijum u svim slučajevima ušao u apatitnu strukturu. Prisutni silicijum u sistemu izazvao je intenzivniju faznu transformaciju HAP u TCP, što prema nekim autorima pozitivno utiče na biokompatibilnost dobijenih materijala. Sa povećanjem udela silicijuma u polaznoj smeši sa 1 na 5 mas. %, jungov moduo elastičnosti je povećan za približno 15 %, tj. sa 84 GPa na 100 GPa [258].

Ispitujući mogućnost konsolidacije nanočestičnih prahova HAP na niskim temperaturama, Drouet je sa saradnicima spark plazma sinterovanjem dobio materijale u kojima nije došlo do značajnog rasta kristalita i koji su imali dobre mehaničke karakteristike. U poređenju sa klasičnim sinterovanjem, osim finozrnije structure, autori ističu i smanjenu verovatnoću za odvijanje fazne transformacije tokom procesa termičke obrade [259]. Ista

grupa autora ističe da svojstva polaznih prahova u mnogome utiču na mogućnost konsolidacije istih na niskim temperaturama postupkom spark plazma sinterovanja, kao i da su u toku ispitivanja koja mogu da dovedu do boljih mehaničkih svojstava i biokompatibilnosti ovako dobijenih materijala [260].

Poslednjih nekoliko godina razni vidovi karbonskih čestica se dodaju HAP pri sinterovanju u spark plazma uslovima, sa ciljem da se poveća provodljivost matriksa. Xu je sa saradnicima, dodajući karbonske nanotube, uočio poboljšanja mehaničkih svojstava hidroksiapatitnog matriksa. Vrednost modula elastičnosti u ovoj studiji kretala se do vrednosti od 131,1 GPa dok je maksimalna vrednost tvrdoće bila 6,86 GPa, dobijena pri temperaturi sinterovanja od 1100 °C. Na nižim temperaturama dobijene su niže vrednosti navedenih mehaničkih parametara [261].

Mnogi autori navode da se kontrolisanjem osobina polaznih prahova, kao i snižavanjem temperature i skraćivanjem vremena sinterovanja, tokom primene svih navedenih tehnika sinterovanja, može uticati na još značajnija poboljšanja svojstava dobijenih gustih i kontrolisano poroznih biokeramičkih materijala na bazi HAP i TCP.

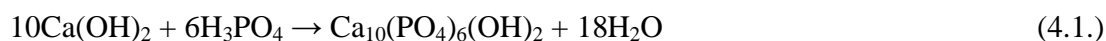
III. EKSPERIMENTALNA PROCEDURA-MATERIJALI I METODE

4. Sinteza prahova kalcijum-hidroksiapatita

U ovom radu kao polazni materijal korišćena su četiri praha kalcijum-hidroksiapatita. Dva praha kalcijum-hidroksiapatita dobijena su modifikovanim precipitacionim metodama, dok su druga dva dobijena hidrotermalnim postupcima sinteze.

4.1. Sinteza stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita modifikovanom precipitacionom metodom

Prah kalcijum-hidroksiapatita sa stehiometrijskim odnosom Ca/P dobijen je modifikovanom precipitacionom metodom [24, 26, 121]. Kalcijum-oksidi, dobijeni žarenjem kalcijum-karbonata analitičke čistoće tokom 4-5 h na 1000 °C u atmosferi vazduha, u malim porcijama je dodavan u destilovanu vodu tokom 10 min, uz konstantno mešanje. Na taj način dobijena suspenzija kalcijum-hidroksida je kroz sito prebačena u reakcioni balon (u cilju odvajanja neproreagovanih zrna CaO). U suspenziju kalcijum-hidroksida je zatim dodavana razblažena fosforna kiselina (1:1) kap po kap, u stehiometrijskom odnosu u skladu sa jednačinom 4.1.



pH vrednost suspenzije je na početku sinteze iznosila 11, a dodavanje fosforne kiseline je prekinuto pri pH=7,5. Dobijena suspenzija je zatim zagrevana tokom 30 min na 94 ± 1 °C uz konstantno mešanje. Nakon zagrevanja suspenzija je ostavljena da odstoji u matičnom rastvoru, sve dok se nije izdvojio gornji bistri sloj, koji je zatim dekantovan. Suspenzija je zatim, u cilju dobijanja granulisanog praha, „spray dry” metodom osušena na 105 °C. Prah sintetisan na ovaj način je obeležen i u daljem tekstu će biti navođen kao HAP1.

4.2. Sinteza kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita modifikovanom precipitacionom metodom

Prah kalcijum deficitarnog hidroksiapatita dobijen je takođe reakcijom kalcijum-oksida, dobijenog žarenjem kalcijum-karbonata analitičke čistoće tokom 24 h na 1000 °C, i odgovarajuće količine fosforne kiseline (u skladu sa jednačinom 4.1.) [23, 26, 122]. Sinteza se

odvijala na temperaturi od 25 °C u četvorogrloj reakcionom balonu u atmosferi azota. Kalcijum-oksidi su najpre dispergovani u destilovanoj vodi, a zatim je dobijena suspenzija titrisana fosfornom kiselinom, brzinom od 1 cm³/min uz konstantno mešanje. Brzina dodavanja fosforne kiseline regulisana je pomoću peristaltičke pumpe. Brzina mešanja je bila 300 rpm. Reakcija je prekinuta pri pH (suspenzije) = 7. Suspenzija je ostavljena u matičnom rastvoru da odstoji 24 h u inertnoj atmosferi uz konstantno mešanje, a zatim je procedena kroz Bihnerov levak i isprana toplom destilovanom vodom. Dobijeni prah je osušen na 105 °C, spraćen u ahatnom avanu i obeležen kao HAP2, kako će u daljem tekstu i biti navođen.

4.3. Sintaza kalcijum-hidroksiapatita hidrotermalnom metodom

Prahovi kalcijum-hidroksiapatita HAP3 i HAP4 dobijeni su hidrotermalnim postupkom [27, 28, 29, 123, 124]. Kao polazna jedinjenja za sintezu kalcijum-hidroksiapatita korišćeni su: kalcijum-hlorid, natrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline, natrijum- dihidrogenfosfat i urea.

Sa ciljem da se dobiju prahova kalcijum-hidroksiapatita sa različitim stepenom kalcijum deficitarnosti, odnos Ca/P u polaznom rastvoru u slučaju sinteze praha HAP3 bio je 1,42, dok je pri sintezi praha HAP4 iznosio 0,96. CaCl₂, Na₂H₂EDTA.2H₂O, NaH₂PO₄ i urea u količinama navedenim u tabeli 4.1., su najpre rastvoreni u 2000 ml destilovane vode (istim redosledom kao što su i navedeni).

Tabela 4.1. Parametri i količine reaktanata pri hidrotermalnoj sintezi kalcijum-hidroksiapatita

Uzorak	Temperatura, °C	Vreme, h	CaCl ₂ , g	Na ₂ H ₂ EDTA.2H ₂ O, g	NaH ₂ PO ₄ , g	Urea, g
HAP3	160	3	15.96	14.8	12	12
HAP4	160	3	11	14.8	12	12

Reakcioni sud sa rastvorom je postavljen u autoklav koji je zatim postepeno zagrevan. Rastvor je u autoklavu toplotno tretiran na 160 °C tokom 3 h. Nakon toga autoklav je prirodno ohlađen tokom 24 h. Nastala suspenzija je procedena kroz filter papir, a dobijeni talog je ispiran toplom destilovanom vodom do negativne reakcije na Cl⁻ jone, a zatim osušen na 105 °C i spraćen u avanu.

5. Karakterizacija prahova kalcijum-hidroksiapatita

Karakterizacija polaznih prahova kalcijum-hidroksiapatita izvršena je određivanjem: raspodele veličine čestica, morfoloških karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom, morfoloških karakteristika primarnih čestica transmissionom elektronskom mikroskopijom, faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom, prisustva karakterističnih grupa infracrvenom spektroskopskom analizom, specifične površine i raspodele veličina pora.

5.1. Određivanje raspodele veličina čestica prahova kalcijum-hidroksiapatita

Raspodela veličina čestica sintetisanih prahova kalcijum-hidroksiapatita određena je laserskim analizatorom veličine čestica, tipa Mastersizer 2000 Malvern Instruments Ltd., UK. Određivanje raspodele veličine čestica je vršeno iz vodene disperzije, prethodno tretirane u ultrazvučnom kupatilu tokom 1 min.

5.2. Određivanje morfologije prahova kalcijum-hidroksiapatita skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Morfološke karakteristike prahova kalcijum-hidroksiapatita određene su skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređaju Jeol JSM 5800 pri naponu struje vlakna od 20 keV. Prahovi kalcijum-hidroksiapatita, pre i posle ultrazvučnog tretmana su naneti na bakarni nosač i napareni legurom zlato/paladijum u neparivaču tipa Polaron SC502 Sputter coater.

5.3. Određivanje morfologije primarnih čestica kalcijum-hidroksiapatita transmissionom elektronskom mikroskopijom

Morfologija primarnih čestica prahova kalcijum-hidroksiapatita određena je transmissionom elektronskom mikroskopijom na uređaju Philips EM400. Uzorci su pripremljeni tako što su prahovi kalcijum-hidroksiapatita najpre dispergovani u apsolutnom alkoholu, zatim tretirani u ultrazvučnom kupatilu i nanešeni na mrežasti nosač, i snimani pri radnom naponu od 120 keV.

5.4. Rendgenska difrakciona analiza prahova kalcijum-hidroksiapatita

Fazni sastav prahova kalcijum-hidroksiapatita određen je rendgenskom difrakcionom analizom na uređajima “Bruker D8 advance diffractometer“ i “PHILIPS PW 1710“, sa $\text{CuK}\alpha$ zračenjem i grafitnim monohromatorom, u intervalu uglova 2θ od 20° do 50° sa korakom $0,02^\circ$.

5.5. Infracrvena spektroskopska analiza prahova kalcijum-hidroksiapatita

Prisustvo karakterističnih hemijskih grupa u prahovima utvrđeno je infracrvenom spektroskopskom analizom na uređaju MB Boman Hartmann MB 100 u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} . Uzorci su pripremljeni tako što su prahovi kalcijum-hidroksiapatita pomešani sa KBr u odnosu ($\text{HAP} : \text{KBr}$) = (1 : 150), a zatim homogenizovani u ahatnom avanu i ispresovani u čeličnom kalupu.

5.6. Određivanje odnosa Ca/P prahova kalcijum-hidroksiapatita

Stehiometrijska odnosno kalcijum deficitarna priroda dobijenih prahova kalcijum-hidroksiapatita utvrđena je određivanjem odnosa Ca/P induktivno-spregnutom plazma spektroskopijom (ICP). Odmerena količina od $0,2500\text{ g}$ uzorka, rastvorena je u razblaženoj HNO_3 . Posle odgovarajućeg razblaživanja, odnos Ca/P je izmeren ICP metodom, na instrumentu Perkin-Elmer ICP/6500. Fosfor je meren na talasnoj dužini $\lambda=213,618\text{ nm}$, a kalcijum na $\lambda=317,933\text{ nm}$.

5.7. Određivanje specifične površine prahova kalcijum-hidroksiapatita

Specifične površine prahova kalcijum-hidroksiapatita određene su B.E.T. metodom, adsorpcijom azota na temperaturi tečnog azota, pomoću uređaja Thermo Finnigan/Sorptomatic 1990.

6. Kompaktiranje prahova kalcijum-hidroksiapatita

Prahovi kalcijum-hidroksiapatita, HAP1-HAP4, kompaktirani su metodama uniaksijalnog i izostatskog presovanja na različitim pritiscima.

6.1. Uniaksijalno presovanje

Prahovi kalcijum-hidroksiapatita su kompaktirani presovanjem na uniaksijalnoj presi, pri pritisku od 100 MPa tokom 1 min. Presovanje je izvršeno u čeličnom visokokvalitetno ispoliranom kalupu prečnika 12 mm.

6.2. Izostatsko presovanje

Prahovi kalcijum-hidroksiapatita su kompaktirani izostatskim presovanjem na 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa i 400 MPa tokom 1 min, u čeličnom kalupu prečnika 3,5 cm. Kao medijum za prenos pritiska korišćeno je hidraulično ulje. Prahovi su presovani u kalupu od silikonske gume prečnika 6 mm.

6.2.1. Ispitivanje uticaja veličine izostatskog pritiska na raspodelu pora i specifičnu površinu ispresovanih kompakata

Specifična površina, ukupna zapremina pora, raspodela mikro i mezopora izostatski ispresovanih kompakata na pritiscima od 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa i 400 MPa određena je pomoću uređaja Thermo Finnigan/Sorptomatic 1990, adsorpcijom azota na temperaturi tečnog azota. Analizom dobijenih rezultata ispitan je uticaj veličine izostatskog pritiska na raspodelu pora i specifičnu površinu ispresovanih kompakata.

6.2.2. Ispitivanje uticaja veličine izostatskog pritiska na mikrostrukturu sinterovanih kompakata kalcijum-hidroksiapatita

Ispitivanje uticaja veličine izostatskog pritiska na mikrostrukturu sinterovanih kompakata kalcijum-hidroksiapatita izvršeno je tako što su izostatski ispresovani kompakati na pritiscima od 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa i 400 MPa sinterovani konvencionalnom metodom u atmosferi vazduha na 1200 °C tokom 2 h. Sinterovanje uzoraka je izvršeno u peći

proizvođača “Elektron”, pri brzini zagrevanja od 20 °C/min. Nakon završetka procesa sinterovanja uzorci su izvađeni iz peći i hlađeni na sobnoj temperaturi. Morfološke karakteristike sinterovanih uzoraka utvrđene su skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređaju Jeol JSM 5800.

6.3. Određivanje gustine ispresovanih kompakata

Polazna gustina uniaksijalno i izostatski ispresovanih kompakata određena je merenjem dimenzija i mase ispresovanih cilindara.

6.4. Uniaksijalno presovanje na ekstremno visokim pritiscima

Sa ciljem da se ispita uticaj ekstremno visokih pritisaka na mogućnost snižavanja temperature sinterovanja HAP, prah kalcijum-hidroksiapatita HAP1 je ispresovan uniaksijalno u kalupu napravljenom od specijalnog čelika na pritisku od 2,5 GPa. Tako dobijeni ispresak je konvencionalno sinterovan na 900 °C tokom 2 h. Za poređenje morfoloških karakteristika, konvencionalno su sinterovani kompakti, izostatski ispresovani na 400 MPa, na 900 °C tokom 2 h. Morfološke karakteristike sinterovanih uzoraka utvrđene su skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

7. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala mikrotalasnim sinterovanjem

Polazni kompakti dobijeni uniaksijalnim i izostatskim presovanjem stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita (HAP1) i kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita (HAP2), sinterovani su u laboratorijskoj peći za mikrotalarno sinterovanje. Sinterovanje je izvršeno u peći tipa Linn High Therm MHTD 1800-4,8/2, 45-135, na temperaturama od 900 °C-1200 °C, tokom 15 min, pri brzini zagrevanja 20 °C/min [26]. Zagrevanje ovog tipa peći obavlja se pomoću šest magnetrona. U svim slučajevima sinterovanja uzorci su bili postavljeni na istom mestu u peći, sa ciljem da se eliminiše uticaj geometrijskog faktora, koji je u velikoj meri uticajan kod ovog tipa sinterovanja. Uzorci su tokom sinterovanja bili postavljeni u preseku dijagonala komore za sinterovanje, a bili su okruženi silicijum-karbidnim cilindrima čija je uloga obezbeđivanje homogenog magnetnog polja u komori peći. Temperatura uzoraka je merena optičkim pirometrom, koji je postavljen na vrhu peći. Nakon završetka procesa

sinterovanja uzorci su hlađeni tokom 1 h do temperature od 300 °C, a zatim izvađeni iz peći i hlađeni na sobnoj temperaturi.

Radi poređenja sa mikrotalasno sinterovanim uzorcima na 900 °C i 1000 °C tokom 15 min, konvencionalno su sinterovani uzorci na 900 °C i 1000 °C tokom 2 h u laboratorijskoj peći za sinterovanje proizvođača “Elektron”, pri istoj brzini zagrevanja polazeći od identičnih polaznih kompakata.

8. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala spark plazma sinterovanjem

Prahovi HAP1 i HAP2 su sinterovani u peći za spark plazma sinterovanje, tipa Dr.Sinter SPS System-825.C, na temperaturama od 900 °C - 1200 °C u vakumu, tokom 5 i 10 min. Oko 3 g praha je sinterovano u grafitnom kalupu prečnika 20 mm. Tokom procesa spark plazma sinterovanja kalup sa uzorkom se nalazio između gornje i donje elektrode koje prenose električni impuls, a koje su povezane sa generatorom impulsa. Nakon što je prah nasut u kalup, na klipove je delovano vrlo malim početnim pritiskom kako bi se kalup učvrstio između elektroda. Tokom procesa sinterovanja, primenjeni pritisak iznosio je oko 40 MPa, napon 4 V i jačina struje 1500 A. Skupljanje uzorka je praćeno sve vreme sinterovanja. Temperatura uzorka tokom procesa sinterovanja je merena optičkim pirometrom kroz otvor koji se nalazi na grafitnom kalupu. Nakon završenog procesa sinterovanja uzorak je hlađen tokom 1 h, unutrašnjim sistemom za hlađenje.

9. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala toplim presovanjem

Toplo presovanje uzoraka kalcijum-hidroksiapatita HAP1 i HAP2 izvršeno je u toploj presi tipa “Astro”. Prahovi kalcijum-hidroksiapatita su prvo izostatski ispresovani na 400 MPa, a dobijeni kompakti prečnika 6 mm su toplo presovani u grafitnom kalupu prečnika 6 mm, pri pritisku od 20 MPa u struji argona [24, 25]. Nakon što je izostatski ispresovan kompakt postavljen u grafitni kalup, na klipove je delovano vrlo malim početnim pritiskom kako bi se kalup postavio između nosača. Unutrašnjost kalupa i klipovi su premazani tankim slojem bor-nitrida čija je funkcija da spreči interakciju između praha kalcijum-hidroksiapatita i grafita. Brzina zagrevanja bila je 40 °C/min. Uzorci su toplo presovani na temperaturama 950 °C i 1000 °C, tokom 1 h i 2 h. Nakon završenog procesa toplog presovanja uzorci su prirodno hlađeni do sobne temperature.

10. Dobijanje gustih biokeramičkih materijala konvencionalnim postupkom sinterovanja

Sa ciljem da se dobije gust mikrostrukturni materijal na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, koji bi poslužio za analizu uticaja smanjenja veličine zrna na svojstva dobijenih biokeramičkih materijala sa mikro na nano nivo, prahovi stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita (HAP1) i kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita (HAP2) sinterovani su konvencionalnim postupkom sinterovanja. Izostatski ispresovani kompakti na 400 MPa, sinterovani su u peći proizvođača "Elektron" tokom 2 h na temperaturi od 1200 °C, uz inicijalnu brzinu zagrevanja od 20 °C/min. Nakon završetka procesa sinterovanja uzorci su izvađeni iz peći i ohlađeni na sobnoj temperaturi.

11. Dobijanje poroznih biokeramičkih materijala mikrotalasnim i konvencionalnim sinterovanjem

U cilju dobijanja biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti, polazni kompakti dobijeni uniaksijalnim presovanjem hidrotermalno dobijenih prahova kalcijum-hidroksiapatita HAP3 i HAP4 na 100 MPa, sinterovani su u laboratorijskoj peći za mikrotalasno sinterovanje [27]. Sinterovanje je izvršeno u peći tipa Linn High Therm MHTD 1800-4,8/2, 45-135, na temperaturama od 900 °C-1200 °C, tokom 15 min, pri brzini zagrevanja od 20 °C/min. Ostali uslovi procesiranja pri mikrotalasnom sinterovanju bili su isti kao uslovi opisani u poglavlju 7. Nakon završetka procesa sinterovanja uzorci su hlađeni tokom 1 h do temperature od 300 °C, a zatim izvađeni iz peći i ohlađeni na sobnoj temperaturi.

Radi poređenja sa mikrotalasno sinterovanim poroznim kompaktima na 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min, konvencionalno su sinterovani uzorci na 1100 °C i 1200 °C tokom 2 h u peći za konvencionalno sinterovanje, polazeći od istih polaznih kompakata.

12. Karakterizacija mikrotalasno sinterovanih, spark plazma sinterovanih, toplo presovanih i konvencionalno sinterovanih biokeramičkih materijala

Karakterizacija dobijenih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata različitim tehnikama sinterovanja izvršena je određivanjem morfoloških karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom i utvrđivanjem faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom. Prosečna veličina zrna i oblik i veličina pora dobijenih materijala određena je analizom slike, korišćenjem softvera Image Pro Plus Programa.

12.1. Određivanje gustine i relativnog linearnog skupljanja dobijenih biokeramičkih materijala

Gustina dobijenih biokeramičkih materijala određena je Arhimedovom metodom. Relativno linearno skupljanje (RLS) uzoraka dobijenih mikrotalasnim i konvencionalnim sinterovanjem izračunato je po jednačini:

$$RLS = (D_o - D)/D_o \quad (12.1.)$$

gde je: D_o – prečnik cilindričnog uzorka pre sinterovanja

D – prečnik cilindričnog uzorka posle sinterovanja.

Skupljanje uzoraka sinterovanih spark plazma tehnikom je mereno pomoću senzora ugrađenog u peći, tokom procesa sinterovanja.

12.2. Analiza mikrostrukture biokeramičkih materijala skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Mikrostrukturne karakteristike sinterovanih biokeramičkih materijala određene su skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređajima Jeol JSM 5800 i Jeol JSM-6460LV pri naponu struje vlakna od 20 keV. Analizirani su prelomi i polirane i nagrižene površine sinterovanih uzoraka. Prelomljeni uzorci učvršćeni su na metalni nosač pomoću grafitne provodne trake. Druga metoda pripreme uzoraka se sastoji iz poliranja uzoraka pomoću dijamantskih pasti i nagrizanja rastvorom HCl ili termičkim postupkom. Uzorci su nakon pripreme napareni legurom zlato/paladijum na neparivaču tipa Polaron SC502 Sputter coater i BAL-TEC, SCD 005 Sputter coater.

12.3. Određivanje prosečne veličine zrna gustih i prosečne veličine pora poroznih biokeramičkih materijala analizom SEM mikrografija

Prosečna veličina zrna i raspodela veličine zrna dobijenih materijala određena je analizom SEM mikrografija korišćenjem softvera Image Pro Plus Programa, verzija 4.0 za windows. Približno 100 zrna je uzeto u obzir da bi se dobila prosečna vrednost veličine zrna. Korišćenjem softvera Image Pro Plus Programa je određen i oblik, veličina i sferičnost pora biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti.

12.4. Rendgenska difrakciona analiza biokeramičkih materijala

Fazni sastav dobijenih biokeramičkih materijala utvrđen je rendgenskom difrakcionom analizom na uređaju “Bruker D8 advance diffractometer“ u intervalu uglova 2θ od 20° do 50° sa korakom $0,02^\circ$.

13. Određivanje mehaničkih karakteristika dobijenih biokeramičkih materijala

13.1. Određivanje tvrdoće

Tvrdoća dobijenih biokeramičkih materijala je određena Vickersovom metodom indentacije. Metoda se sastoji iz utiskivanja dijamantske igle sa vrhom u obliku četvorostrane piramide u ispoliranu površinu uzorka. Površina se pre ispitivanja polira sa ciljem da se izbegne uticaj neravnina na pravac prostiranja pukotine. Nakon testa na površini ispoliranog uzorka se formiraju četvorostrani otisci. Otisci su formirani delovanjem opterećenja na površinu uzorka u trajanju od 10 s na uređaju Weinhem Birkenau tip 532. Za očitavanje otisaka je korišćen optički mikroskop MeF (REICHERT, Beč).

Korišćenjem jednačine 13.1. na osnovu dimenzija dijagonala otisaka izračunata je tvrdoća materijala [262]:

$$\text{Tvrdoća} = 1854.4 \cdot X \cdot (N \cdot 0.168)^{-2} \text{ (GPa)} \quad (13.1.)$$

gde je:

X – masa kojom se deluje (g),

N – dužina dijagonale otiska (μm).

13.2. Određivanje žilavosti

Žilavost (K_{ic}) dobijenih biokeramičkih materijala je određena korišćenjem jednačine Evans-a i Charles-a [262]:

$$K_{ic} = 0,0824 P \cdot c^{-3/2} \text{ (MPa/m}^{1/2}\text{)} \quad (13.2.)$$

gde je:

P – opterećenje (N),

c – dužina pukotine (μm).

Metoda se kao i kod određivanja tvrdoće sastoji iz utiskivanja dijamantske igle sa vrhom u obliku četvorostrane piramide u ispoliranu površinu uzorka. Nakon testa na površini ispoliranog uzorka se formiraju pukotine koje kreću iz temena četvorostranog otiska, a imaju pravac dijagonale. Upravo dužina tih pukotina je merodavna za izračunavanje žilavosti u jednačini 13.2. Otisci su, kao i kod određivanja tvrdoće, formirani delovanjem opterećenja na površinu uzorka u trajanju od 10 s na uređaju Weinhem Birkenau tip 532. Za očitavanje otisaka je korišćen optički mikroskop MeF (REICHERT, Beč) i skenirajući elektronski mikroskop Jeol JSM 5800.

13.3. Nanoindentacija nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala

Mehanička svojstva dobijenih nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala određena su i metodom nanoindentacije na uređaju tipa Triboscope Nanomechanical Testing System (Hysitron, Minneapolis, MN), sa indenterom tipa Berkovich i *in situ* modom [263]. Ova metoda podrazumeva utiskivanje utiskivača poznatog oblika, a najčešće je to trostrana piramida definisane geometrije, u površinu materijala koji se ispituje pri čemu se istovremeno prati zavisnost sile i dubine utiskivanja. Dimenzija glave indentera korišćenog pri ispitivanju bila je 150 nm. U najčešće korišćenoj opciji ove metode, podaci se dobijaju iz jednog punog ciklusa opterećenja tj. utiskivanja indentera u površinu materijala koji se ispituje i rasterećenja.

Na osnovu dobijenih podataka jednostavno se izračunavaju modul elastičnosti ispitivanog materijala E i njegova tvrdoća H . U ovoj disertaciji korišćen je metod Oliver-a i Pharr-a, koji uključuje ekstrapolaciju tangente na vrh krive rasterećenja, u cilju određivanja dubine utiskivanja, kada je indenter u neposrednom kontaktu sa uzorkom pri maksimalnom

opterećenju, P_{\max} . U studiji koja je metodu nanoindentacije prilagodila korišćenju u savremenim uređajima, Oliver i Pharr dali su iscrpan prikaz razvoja ove metode i njene primene u površinskim ispitivanjima materijala. Procedura je zasnovana na problemu elastičnog kontakta prema kome je razvijen metod, koji je davao rešenja za različite oblike indentera kao što su cilindrični i konični. Za elastične kontakte i jednostavne geometrije, opšti odnos između opterećenja i deformacije tj. dubine utiskivanja može se predstaviti odnosom:

$$P = \alpha \cdot h^m \quad (13.3)$$

gde je P opterećenje indentera, h je dubina utiskivanja, a α i m su konstante koje se određuju empirijski na osnovu dijagrama utiskivanja-indentacije.

Nagib krive rasterećenja omogućuje izračunavanje tvrdoće materijala, a može da se koristi za određivanje modula elastičnosti. Dobijeni moduli se obično daju u obliku redukovanih modula, E_r , koji su u relaciji sa vrstom materijala, kao i specifičnostima vezanim za uslove merenja i sam indenter. Ako je tvrdoća materijala mnogo manja od tvrdoće indentera, kao što je slučaj pri merenju tvrdoće biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, jednačina ima oblik:

$$E_r = E/(1 - \nu^2) \quad (13.4.)$$

gde je:

E - Yungov modul,
 ν - Poasonov odnos.

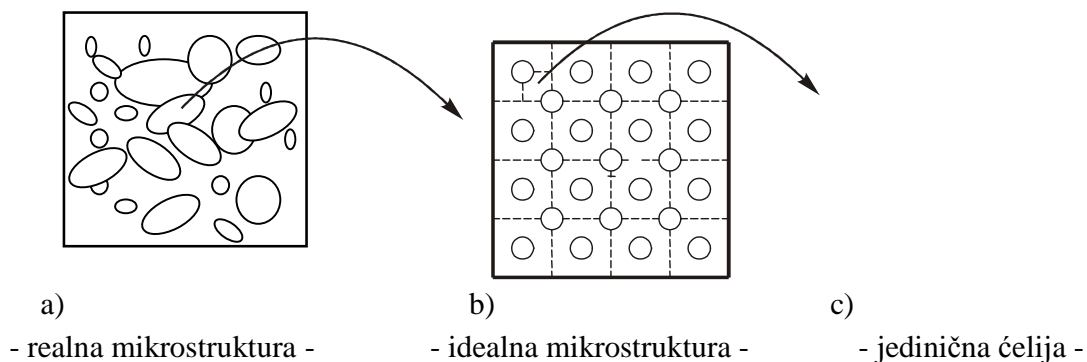
Pri određivanju mehaničkih karakteristika metodom nanoindentacije, na uzorke je delovano opterećenjima od 1 i 2 mN.

14. 3D modelovanje materijala kontrolisane poroznosti metodom konačnih elemenata

Trodimenziono modelovanje metodom konačnih elemenata, preko reprezentativnih zapreminskih elemenata (*unit cell*), je korišćeno da bi se utvrdio uticaj oblika i veličine pora na mehanička svojstva materijala kontrolisane poroznosti na bazi HAP. Sa ciljem da se napravi model koji će što je moguće realnije simulirati mikrostrukturu dobijenih materijala kontrolisane poroznosti, pošlo se od realnog 3D rasporeda pora, šematski predstavljenog na slici 14.1a [264-266]. Ipak, ovakav realan slučaj, sa slučajnom raspodelom pora nije podesan za kompjutersko modelovanje. Korišćenjem metode reprezentativnih zapreminskih elemenata,

kompleksnost ovog problema se u znatnoj meri redukuje. Ovom metodom se pretpostavlja da je porozan keramički materijal sastavljen od mnoštva elementarnih jedinica koje imaju isti oblik, fazni sastav, geometriju ćelije i mehanička svojstva (Slika 14.1b). Površinski centrirana kubna ćelija prikazana na slici 14.1c se smatra reprezentativnim elementom za približnu simulaciju realne mikrostrukture dobijene porozne keramike. Na svakom uglu i na sredini svake strane jedinične ćelije se nalazi po jedna sferna pora, drugim rečima slučajaj raspored pora je idealizovan ovim rasporedom.

Model podrazumeva da jedinična ćelija sve vreme zadržava oblik paralelopipeda, s tim što nakon dejstva sile, stranice ćelije ostaju paralelne i ortogonalne, samo im se dužina menja.



Slika 14.1. Šematski prikaz idealizacije rasporeda i oblika pora prilikom modelovanja

Model takođe podrazumeva: (1) linearno elastično ponašanje keramike na bazi HAP, tj. da je zavisnost između napona i deformacije proporcionalna; (2) da se ispitivana keramika ponaša kao izotropni materijal; (3) da su sve pore istog oblika i istih dimenzija; (4) da se materijal ne uništava pri primenjenim opterećenjima. Za izračunavanje faktora pojačavanja naprezanja za različite oblike pora, jedinična ćelija prikazana na slici 14.2 je opterećena u pravcu y-ose. Zbog simetrije jedinične ćelije i primenjenog opterećenja, kao i zbog izotropnosti materijala, model je uprošćen tako što je jedna osmina jedinične ćelije uzeta u razmatranje (Slika 14.2). Lokalni koordinatni sistem prikazan na slici 14.2 odgovara globalnom koordinatnom sistemu, a dimenzije redukovane jedinične ćelije su prenete sa realne mikrostrukture tj. sa SEM mikrografije materijala čija se svojstva modeluju, i iznose $3 \times 3 \times 3 \mu\text{m}$. Pored dimenzija koje su poslužile za formiranje reprezentativnog elementa, ulazni parametri su bili i dimenzije pora, njihov oblik kao i zapreminski udeo pora u realnom materijalu.



Slika 14.2. Koordinatne mreže konačnih elemenata za: a) sferne i b) nepravilne pore kod hidroksiapatitne keramike

Svi tipovi 3D modela su dobijeni korišćenjem ANSYS 5.7, softver paketa za konačne elemente. Korišćeni elementi su 10-to čvorni tetraedri. Reprezentativna mreža konačnih elemenata korišćena za izračunavanje pristine čvrstoće prikazana na slici 14.2 se sastoji od 69435 elemenata i 97546 čvorova. Svaki čvor ima tri stepena slobode koji odgovaraju tri stepena translacije. Podaci o materijalu korišćeni u analizi konačnim elementima uzeti su iz literature [25], gde je vrednost Jungovog modula približno $E = 100$ GPa, a vrednost Poasonovog koeficijenta $\nu = 0,28$.

15. In vitro i in vivo ispitivanja bioaktivnosti i biokompatibilnosti nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala

15.1. In vitro ispitivanja bioaktivnosti materijala u simuliranom telesnom fluidu

Uticaj veličine zrna, tj. smanjenja zrna sa mikro na nano nivo, na bioaktivnost dobijenih biokeramičkih materijala ispitan je *in vitro* testom u simuliranom telesnom fluidu. Ispitivanja dobijenih materijala su obavljena tako što su uzorci najpre potopljeni u simulirani telesni fluid, 28 dana odležavali na temperaturi od 37 °C, a zatim su osušeni na 105 °C tokom 4 sata. Sastav Kokubo simuliranog telesnog fluida koji je korišćen prilikom *in vitro* testova prikazan je dat u tabeli 15.1. [267, 268].

Tabela 15.1. Sastav simuliranog telesnog fluida

Jon	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
c(mg/l)	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5

Mikrostruktura uzoraka je nakon *in vitro* testova analizirana pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Bioaktivnost dobijenih materijala je ustanovljena analizom morfoligije površine uzoraka nakon tretmana u STF.

15.2. *In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi L929 fibroblasta

Uticaj veličine zrna na biokompatibilnost mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 ispitan je na ćelijskoj liniji humanih fibroblasta L929. Ova fibroblastna mišja ćelijska linija je dobijena iz bolnice Hammersmith, London. Ćelije se permanentno čuvaju u tečnom azotu. Nedelju dana pre eksperimenta ćelije su odmrznute, i ispirane od dimetil-sulfoksida (DMSO) u kome su bile smrznute a zatim su kultivisane u plastičnim bočicama za kulture u termostatu na 37 °C i 5 % CO₂. Medijum za kulturu je bio kompletni RPMI medijum. Posle sedmodnevne kultivacije konfluentan sloj ćelija je ispran od medijuma a zatim tripsiniziran korišćenjem 2 ml 0,1 % rastvora tripsina (Serva, kataloški broj 37260.02) u toku 10 minuta na 37 °C u termostatu. Pod uticajem tripsina ćelije su odlepljene od podloge, isprane dva puta centrifugiranjem, izbrojane a zatim korišćene za eksperimente.

MTT-test

MTT test je korišćen za proučavanje metaboličke aktivnosti ćelija. Princip metode se bazira na merenju aktivnosti sukcinil dehidrogenaza u mitohondrijama vijabilnih ćelija. Kompaktni uzorci kalcijum-hidroksiapatita su postavljeni u centar bazena plastičnih ploča sa 96 bazena. Nakon toga oko uzoraka pažljivo je naneta suspenzija L929 ćelija u kompletnom RPMI medijumu sa 10 % FCS ($0,5 \times 10^4$ ćelija/bazenu). Kontrolu su činili uzorci plastike (cover slips) istih dimenzija kao i uzorci za testiranje. Posebnu kontrolu su činili bazeni samo sa L929 ćelijama. Broj replikata je bio 6. Test uzorci i kontrolni uzorci su pre toga sterilisani autoklaviranjem. Inkubacija materijala sa ćelijama je trajala 24 časa, nakon čega su uzorci pažljivo izvađeni iz bazena a ćelije inkubirane sa 100 µl 3-[4,5 dimetil-tiazol – 2 lil]-2,5 difenil tetrazolium bromidom (MTT) (Sigma, Munich, Germany) (1 mg/mL), rastvorenim u kompletnom RPMI medijumi. Bazen sa 100 µl MTT korišćen je kao blank kontrola. Posle 3 sata inkubacije (37 °C, 5 % CO₂) dodato je 100 µl / bazenu 10 % sodium – dodecil sulfata (SDS) – 0.1N HCl (Serva, Heidelberg, Germany) radi rastvaranja intracelularnog formazana. Ploče su inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi. Optčka gustina (OD) je merena na 570 nm spektrofotometrom (Behring ELISA Processor II, Ingelberg, Germany). Metabolička aktivnost je određena na osnovu OD kontrolnih L929 ćelija bez materijala koja je uzeta kao 100 %.

Vijabilnost ćelija

Kompaktni uzorci kalcijum-hidroksiapatita su postavljeni u centar bazena plastičnih ploča sa 96 bazena kako je opisano kod MTT eseja. Inkubacija materijala sa ćelijama je trajala 24 časa, nakon čega su uzorci pažljivo izvađeni iz bazena a ćelije su tripsinizirane i ispirane. Step en vijabilnosti ćelija je određivan bojenjem ćelija sa 1 % Tripan plavim. Korišćenjem svetlosnog mikroskopa ne vijabilne ćelije se uočavaju kao pozitivne, plavo obojene ćelije. Procenat ne vijabilnih (mrtvih) ćelija je određen na osnovu brojanja minimalno 500 ukupnih ćelija po uzorku. Vijabilnost je izračunata po formuli: $100\% - \% \text{ ne vijabilnih ćelija}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost triplikata.

Test proliferacije

L929 ćelije su kultivisane 24 h odnosno 3 dana sa uzorcima kalcijum-hidroksiapatita ili kontrolnim uzorcima kako je ranije opisano. Posebnu kontrolu su činili bazeni samo sa L929 ćelijama. Po isteku inkubacionog perioda uzorci su pažljivo izvađeni iz bazena a zatim su ćelije tripsinizirane, isprane i izbrojane u Neubair-ovoj komorici. Broj replikata je iznosio 6. Rezultati stepena proliferacije su prikazani u relativnim brojevima, pri čemu je broj ćelija u kulturama bez ispitivanih materijala iznosi 100 %.

Test nekroze

Kompaktni kalcijum-hidroksiapatita su postavljeni u centar bazena plastičnih ploča sa 96 bazena kako je opisano kod MTT eseja. Inkubacija materijala sa ćelijama je trajala 24 h, nakon čega su uzorci pažljivo izvađeni iz bazena a ćelije su tripsinizirane i ispirane. Ćelije su inkubirane sa propidium jodidom (PI) (Sigma) rastvorenim u PBS-u ($40 \mu\text{l PI} / 1\text{ml PBS}$) koji boji nekrotične ćelije. Procenat pozitivnih ćelija je izmeren korišćenjem citofluorimetra. Rezultati su izraženi kao relativna vijabilnost L929 ćelija kultivisanih sa test materijalima u odnosu na vijabilnost ćelija kultivisanih bez materijala.

Kvalitativni esej

Kompaktni uzorci kalcijum-hidroksiapatita su postavljeni u centar bazena plastičnih ploča sa 96 bazena kako je opisano kod MTT eseja. Inkubacija materijala sa ćelijama je trajala 24 časa i nakon toga ćelije su ispitivane ispod invertnog svetlosnog mikroskopa Reichert, Austria analizom. Citotoksični efekat je procenjivan notiranjem malformacija, degeneracija, odlepljivanja od podloge, fragmentacije i lize ćelija oko uzorka.

Tabela 15.2. Kvalitativno morfološko stepenovanje citotoksičnosti

Stepen	Reaktivnost	Izgled ćelijskih kultura
0	odsustvo citotoksičnosti	Ćelije su adherentne i normalnog izgleda, ne uočavaju se znaci lize i degeneracije. Mogu biti prisutne diskretne intracitoplazmatične granule.
1	diskretna citotoksičnost	Do 20% ćelija je zaokrugljenog oblika i slabo adherentno, bez vidljivih intracitoplazmatičnih granula. Pojedine lizirane ćelije. Blaga inhibicija rasta ćelija.
2	blaga citotoksičnost	Do 50% ćelija je zaokrugljenog oblika i slabo adherentno, bez vidljivih intracitoplazmatičnih granula. Umerena liza ćelija. Inhibicija rasta ćelija do 50%.
3	umerena citotoksičnost	Do 70% ćelija je zaokrugljenog oblika ili lizirano, ćelijski sloj je potpuno narušen, inhibicija rasta ćelija veća od 50%.
4	ozbiljna citotoksičnost	Skoro potpuna destrukcija ćelijskog sloja.

15.3. *In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi humanih fibroblasta

Uticao veličine zrna na biokompatibilnost mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 ispitan je na ćelijskoj liniji humanih fibroblasta pluća (MRC-5), koje rastu zalepljene za podlogu suda (Costar, 25cm³) u medijumu „Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM, Gibco BRL, UK)“, sa 4,5g/l glukoze i 10% FCS („fetal calf serum, Sigma“). Medijum sadrži antibiotike: penicilin 100 IU/ml i streptomycin 100µg/ml. Ćelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom, i sa 5 % CO₂ (Heraeus). Ćelijska linija je presađivana dva puta nedeljno, a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0, 1 % tripan plavim. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

DET („Dye exclusion test“-test odbacivanja boje)

Ćelije humanih fibroblasta pluća sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, su tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0, 1 % rastvoru tripan plavog. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijevim šoljama („Center well“, Falcon) na kompakte HAP1, mikrotalasno

sinterovane na 900 °C i 1200 °C tokom 15 min, u koncentraciji $2 \cdot 10^5$ /ml. U kontrolnim uzorcima nije bilo ispitivanih materijala. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, u atmosferi koja sadrži 5 % CO₂ narednih 48 h, 72 h i 96 h. Po isteku inkubacije, nakon 48 h, 72 h i 96 h ćelije su brojane pomoću invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je Neubauer-ova komorica gde se ćelije broje u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata tako da ih ima ukupno 64. Zatim se odmerava 100 µl medijuma sa ćelijama i tome dodaje 100 µl boje 0,1 % tripan-plavog. Rastvor se intenzivno promućka i nekoliko kapi se nanese na sva polja komorice za brojanje. Tripan-plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju neobojene. Broj ćelija u 1ml suspenzije se izračunava iz jednačine:

$$X = x \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000 \quad (15.1.)$$

gde je:

- 10 - dubina komore,
- 2 - faktor dilucije,
- 1000 - zapreminski koeficijent,
- x - broj ćelija u 16 kvadrata (prosečan broj ćelija u 4·16 kvadrata).

Citotoksičnost je izražena u procentima, a računa se prema formuli:

$$CI = (1 - N_s/N_k) \cdot 100, \quad (15.2.)$$

pri čemu je:

- N_k - broj ćelija kontrolnih uzoraka,
- N_s - broj ćelija uzoraka sa ispitivanim materijalom.

Frakcija preživelih ćelija izražava se u procentima, a računa se prema formuli:

$$\%K = (N_s/N_k) \times 100 \quad (15.3.)$$

pri čemu je:

- N_k - broj ćelija kontrolnih uzoraka,
- N_s - broj ćelija uzoraka sa ispitivanim materijalom.

Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT- test)

Ćelije humanih fibroblasta pluća sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, se takođe najpre tripsiniziraju, resuspenduju i izbroje u 0,1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijevim šoljama (50mm, Center well, Falcon) u kojima su se nalazili ispitivani materijali, u koncentraciji $2 \cdot 10^5$ /ml. Kontrolni uzorci nisu sadržali ispitivane materijale. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljaju se da odleže u termostatu na 37 °C, u atmosferi koja sadrži 5 % CO₂ narednih 48 h. Po isteku perioda inkubacije vrši se presejavanje ćelija sa ispitivanih supstanci u svež medijum. Vijabilne ćelije su posejane (u koncentraciji 5×10^3 /100µl) u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama odležavaju u termostatu na 37 °C, narednih 48 h, 72 h i 96 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µl/otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 µl 0,04 mol/HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržali samo medijum i rastvor MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba.

Citotoksičnost je izražena u procentima prema formuli:

$$CI = (1 - A_s/A_k) \cdot 100 \quad (15.4)$$

pri čemu je:

A_k - apsorbancija kontrolnih uzoraka,

A_s - apsorbancija uzoraka sa ispitivanim materijalom.

Frakcija preživelih ćelija izražava se u procentima, a računa se prema formuli:

$$\%K = (N_s/N_k) \times 100 \quad (15.5)$$

pri čemu je:

N_k - broj ćelija kontrolnih uzoraka,

N_s - broj ćelija uzoraka sa ispitivanim materijalom.

Agar difuzioni test

Kao medijum pri agar difuzionom testu korišćen je „Eagle's Basal Medium“, koji sadrži 2,2 g/l natrijum-bikarbonata, 3,0 g/l HEPES-a i 50 ml/l seruma. Pripremljena je i dupla koncentracija medijuma bez HEPES-a i pri koncentraciji natrijum-bikarbonata od 1 g/l. Pri ovom testu moguće je koristiti bilo koji 3 % agar ili 3 % agarozu u destilivanoj vodi. Agar je sterilisan autoklaviranjem, a medijum prečišćen filtriranjem. Osnovna boja pripremljena je rastvaranjem stok solucije 1 % vodenog rastvora „neutral red“ u 1/100 ml/l slanog fosfatnog pufera, neposredno pre korišćenja. Rastvor „neutral red“ je čuvan zaštićen od svetla. Korišćene su Petrijeve šolje prečnika 100 mm.

Korišćene su takođe ćelije u logaritamskoj fazi rasta. Pripremljeno je po 10 ml ćelijske suspenzije ($2,5 \times 10^5$ ćelija/ml) u Petrijevim šoljama i inkubirano na 37 °C, u atmosferi sa 5 % CO₂, tokom 24h. Sterilni agar je otopljen na 100 °C u vodenom kupatilu i ohlađen na 37 °C. Agar je zatim pomešan sa dva puta koncentrovanim, sveže pripremljenim medijumom u odnosu 1:1 i zagrejan na 48 °C. Aspiriran je medijum iz svake Petrijeve šolje i zamenjen sa 10 ml svežom agar/medijum mešavinom. Agar je ostavljen da očvrstne na sobnoj temperaturi (oko 30 min), zatim je dodato 10 ml „neutral red“ rastvora i ostavljeno 15 – 20 min. Višak „neutral red“ rastvora je odbačen. Petrijeva šolja je bila zaštićena od svetla da se, u prisustvu „neutral red“ ćelije ne bi oštetile. U svaki sud je zatim dodato po dva uzorka test materijala i kontrole, pazeći pritom da uzorci budu udaljeni jedan od drugog kao i od zidova Petrijevih šolja, i inkubirano na 37 °C tokom 24 h. Ispitivan materijal je ispitan u kvadriplikatu (dva suda po vrsti test materijala).

Obezbojenost zone oko testiranog materijala i kontrole je procenjena pomoću invertnog mikroskopa sa kalibrisanom pregradom, a indeks obezbojavanja (Decolorization Index) i indeks liziranja (Lysis Index) su određeni za svaki uzorak. Odgovor ćelije (Cell response) se predstavlja kao količnik: indeks obezbojavanja/indeks liziranja.

15.4. *In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1

Adhezija osteoblastnih ćelija na monofaznom hidroksiapatitnom materijalu ispitana je na gustim mikrotalasno sinterovanim uzorcima. Za potrebe ovog eksperimenta, izostatskim presovanjem stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita (HAP1) na 400 MPa dobijeni su diskovi prečnika 8 mm koji su mikrotalasno sinterovani na 1200 °C tokom 15 min. U eksperimentu su korišćene dve grupe test materijala, tj. kompakti mikrotalasno sinterovanog HAP1 pre i posle modifikacije naelektrisanja površine. Naelektrisanje površine materijala je modifikovano da bi se ispitaio uticaj negativnog naelektrisanja površine gustih biokeramičkih

hidroksiapatitnih materijala na adheziju osteoblastnih ćelija. Prevođenje naelektrisanja površine uzoraka iz pozitivnog u negativno izvršeno je u autoklavu postupkom hidrogenizacije, pri čemu se odvija depozicija jona vodonika na površini hidroksiapatitnog materijala. Uzorci HAP1 su tokom 1 h bili izloženi dejstvu vodonika, pri radnom pritisku od 6 MPa. Efekat modifikacije naelektrisanja površine je utvrđen detektovanjem emisije elektrona oslobođenih iz površine uzorka.

Ćelije korišćene u eksperimentu bile su mišji osteoblasti MC3T3-E1, odgajane u McCoyevom medijumu u koji je dodato 10 % seruma telećeg fetusa, HEPES pufer i penicilin/streptomycin. Pre ispitivanja, u medijum sa kulturom ćelija je dodat tripsin-EDTA, nakon čega su ćelije odležale tokom 1 h na 37 °C. U ovako pripremljenu kulturu ćelija, pri koncentraciji 5×10^5 ćelija/ml potopljeni su uzorci HAP-a i ostavljeni da odstoje tokom 1 h na 37 °C. Nakon 1 h suspenzija je dekantovana, a neprilepljene ćelije su uklonjene ispiranjem sa fosfatnim puferovanim rastvorom.

Uzorci su fiksirani u 2,5 % rastvoru glutaraldehida puferovanom sa natrijum-kakodilatom i pripremljeni za SEM dehidratacijom u etanolu, nakon čega su osušeni u tečnom CO₂. SEM snimci osteoblastnih ćelija na površini materijala dobijene su pri uvećanju 300 puta i na radnom odstojanju od 13 mm. Ukupan broj ćelija i procenat ćelija u svakom stadijumu atehzije određen je brojanjem ćelija na četiri uzorka.

15.5. SEM histološka analiza u okviru *in vitro* ispitivanja

Histološka ispitivanja u okviru *in vitro* testova urađena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređaju JEOL-JSM 6460LV. Uzorci sa ćelijskim kulturama nakon *in vitro* ispitivanja su fiksirani na bakarnom nosaču i prvo posmatrani skenirajućim elektronskim mikroskopom u niskom vakumu, pri radnom pritisku od 50 Pa i naponu od 20 KeV. Nakon snimanja mikrografija pri niskom vakumu, osušeni uzorci su napareni zlatom i posmatrani u visokom vakumu, pri istom radnom naponu.

15.6. *In vivo* ispitivanja biokompatibilnosti materijala metodom primarne kutane iritacije

Iritacioni potencijal materijala ispitivan je prema međunarodnim standardima za ispitivanje biokompatibilnosti, ISO 10993-10:2002/Amd 1: 2006, Biološka evaluacija medicinske opreme, Deo 10: Testovi iritacije i odložene reakcije hipersenzibilizacije.

Test materijali (*Test uzorci*):

Iritacioni potencijal ispitivan je za sledeće materijale:

- Monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min
- Monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 1200 °C tokom 15 min

Test materijal (u obliku diskova prečnika 6,5 mm) bio je u čvrstom stanju pre nanošenja na kožu.

Negativna kontrola: Kao negativna kontrola korišćen je materijal koji ne izaziva iritacionu reakciju, hipoalergijski elastični flaster za fiksiranje (SENSIFIKS).

Pozitivna kontrola: Kao pozitivna kontrola korišćen je preparat koji potvrđeno dovodi do iritacionih promena, sterilni vodeni rastvor mlečne kiseline (2-hydroxypropanoic acid) koncentracije 98 %, proizvođač Sigma), na sterilnom filter papiru Milipore, dijametra 5 mm x 2 mm.

Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su urađeni na kunićima mužkog pola (Novozelanski beli kunići, telesne mase $4,2 \pm 0,4$ kg). Do početka eksperimenta životinje su držane u vivarijumu Instituta za fiziologiju, pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperature 22 ± 2 °C, 14 sati svetlo/10 sati mrak, pristup vodi i hrani *ad libitum*).

Eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta u Beogradu (br. 3556 od 16.01.2009 godine), i sprovedeni su u saglasnosti sa principima Vodiča Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja, kao i prema međunarodnim standardima ISO10993-2: zahtevi za blagostanje životinja.

Dvadeset četiri sata pre primene test materijala, krzno u predelu dorzalne strane trupa obrijano je električnim brijačem na svakom kuniću. Na svakom kuniću obrijana oblast kože leđa bila je podeljena u 4 polja iste površine (20 mm x 20 mm), a test material je primenjen na samo dva od četiri polja. Na druga dva polja primenjeni su negativna kontrola (samo hipoalergijski adhezivni flaster, bez test materijala) i pozitivna kontrola (98% mlečna kiselina). Tri kunića su korišćena po grupi; kako je svaki kunić imao po dva mesta za aplikovanje test-materijala, to je ukupno šest oblasti kože bilo moguće analizirati, radi utvrđivanja iritativnih efekata test materijala i njihovih poređenja sa pozitivnom i negativnom kontrolom.

Svi ispitivani delovi kože kunića (tretirani i kontrolni) prekriveni su gazom i hipoalergijskim flasterom. Test-materijal je u direktnom kontaktu sa kožom bio tokom četiri sata. Nakon četiri sata uklonjeni su hipoalergijski flaster, gaza i test supstanca. Nakon jednog sata izvršeno je makro-patološko ispitivanje kože na znake iritacije (prisustvo eritema i edema). Ispitivanje je ponovljeno posle 24 sata, 48 sati i 72 sati (Draize et al. 1944). U toku procene iritacije kože utvrđivano je prisustvo eritema i edema. Stepem izraženosti eritema i edema gradiran je na skali od 0 do 4.

Klasifikacija eritema izvršena je na sledeći način: 0 – odsustvo eritema, 1 – veoma slab eritem, jedva uočljiv, 2 – dobro definisan eritem, 3 – umeren do težak eritem, 4 – veoma težak eritem (intenzivan, tamno crven), do povreda u dubini kože (Tabela 15. 3).

Klasifikacija edema izvršena je na sledeći način: 0 – odsustvo edema, 1 – veoma slab edem, jedva uočljiv, 2 – slab edem (granica polja dobro definisana, uzdignuta - prsten), 3 – umeren edem (uzdiže se približno 1mm), 4 – težak edem (uzdiže se više od 1 mm i širi se više, dalje od mesta izlaganja) (Tabela 15. 4).

Tabela 15. 3. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija eritema

<i>Klasifikacija eritema</i>	<i>Gradiranje</i>
<i>Odsustvo eritema</i>	<i>0</i>
<i>Veoma slab eritem, jedva uočljiv</i>	<i>1</i>
<i>Dobro definisan eritem</i>	<i>2</i>
<i>Umeren do težak eritem</i>	<i>3</i>
<i>Veoma težak eritem (intenzivan)</i>	<i>4</i>

Tabela 15. 4. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija edema

<i>Klasifikacija edema</i>	<i>Gradiranje</i>
<i>Odsustvo edema</i>	<i>0</i>
<i>Veoma slab edem, jedva uočljiv</i>	<i>1</i>
<i>Slab edem (granice polja uzdignuta)</i>	<i>2</i>
<i>Umeren edem (uzdiže se 1 mm)</i>	<i>3</i>
<i>Težak edem (uzdiže se više od 1 mm)</i>	<i>4</i>

Skor primarne kutane iritacije izračunavan je za svakog kunića po formuli:

$$SPI = \left[\frac{\sum (Er + Ed)_{24h} + (Er + Ed)_{48h} + (Er + Ed)_{72h}}{\text{broj životinja}} \right]_T - \left[\frac{\sum (Er + Ed)_{24h} + (Er + Ed)_{48h} + (Er + Ed)_{72h}}{\text{broj životinja}} \right]_K$$

gde je Er - eritem; Ed- edem.

Indeks primarne kutane iritacije (PII) izračunavan je kao aritmetička sredina vrednosti SPI od tri testirane životinje. $PII = \Sigma SPI / 3$.

Testirani materijal je, na osnovu vrednosti PII, ocenjivan kao: neiritirajući, blago iritirajući, umereno iritirajući i veoma iritirajući (Tabela 15.5.).

Tabela 15. 5. Ocena test materijala na osnovu indeksa primarne kutane iritacije (PII)

PII	Ocena test materijala
0,0 – 0,4	neiritirajući
0,5 – 1,9	blago iritirajući
2,0 – 4,9	umereno iritirajući
5,0 – 8,0	veoma iritirajući

Statistička analiza

Rezultati eritema i edema su prikazani kao pojedinačna vrednost za svaku životinju i svako mesto aplikovanja test supstance. Rezultati skora primarne kutane iritacije i indeksa primarne kutane iritacije prikazani su kao srednja vrednost. Poređenje značajnosti razlika između srednjih vrednosti skora primarne kutane iritacije između eksperimentalnih grupa vršeno je uz pomoć Student t-testa. Razlika je smatrana statistički značajnom na nivou $p < 0,05$.

IV. REZULTATI I DISKUSIJA

16. Rezultati karakterizacije polaznih prahova kalcijum-hidroksiapatita

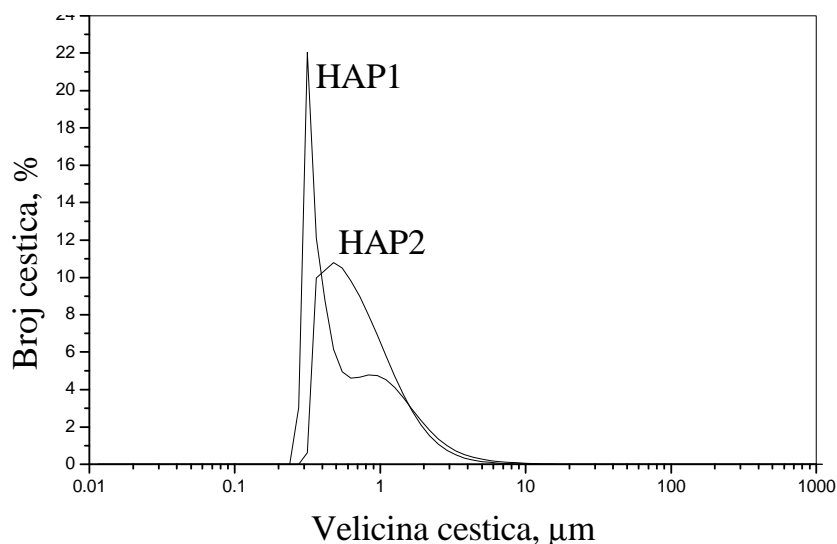
U ovom poglavlju prikazani su rezultati karakterizacije sintetisanih prahova kalcijum-hidroksiapatita određivanjem:

- raspodele veličine čestica,
- morfoloških karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom,
- morfoloških karakteristika primarnih čestica transmisionom elektronskom mikroskopijom,
- faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom,
- prisustva karakterističnih grupa infracrvenom spektroskopskom analizom,
- odnosa Ca/P i specifične površine B.E.T. metodom.

16.1. Rezultati određivanja raspodele veličina čestica kalcijum-hidroksiapatita

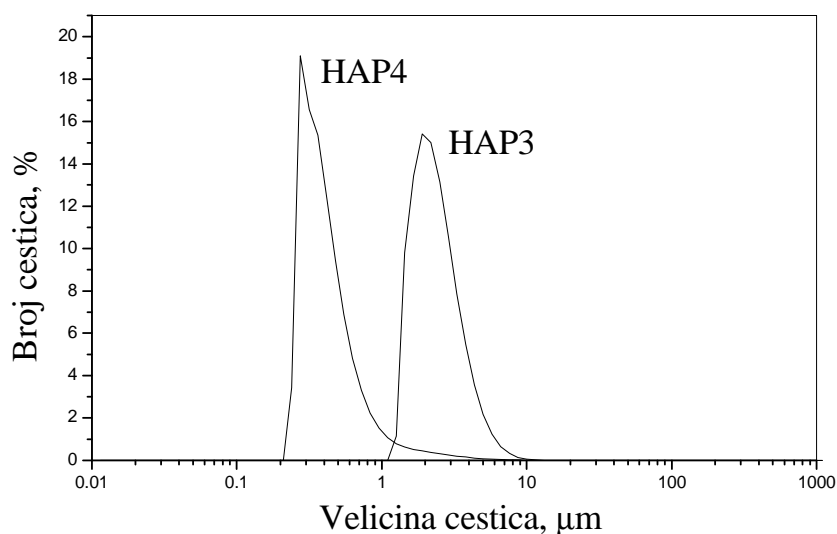
Raspodela veličina čestica precipitaciono sintetisanih prahova kalcijum-hidroksiapatita, HAP1 i HAP2, prikazana je na slici 16.1. Sa slike se uočava da su čestice prahova HAP1 i HAP2 nalaze veličine od 200 nm do 5 μ m. Analizom dijagrama raspodele veličina čestica praha HAP1 primećuje se prisustvo izrazito velikog broja čestica u opsegu 200 - 400 nm, dok najveći broj čestica iz tog intervala ima veličinu od 300 nm. Prah HAP2 sadrži čestice znatno šire raspodele dimenzija, a najveći broj čestica ima veličinu od 350 nm do 800 nm.

Kod oba precipitaciono dobijena praha se uočava priličan broj čestica veličine od 1-5 μ m. S obzirom na činjenicu da su nanočestični prahovi metastabilni, zahvaljujući visokoj vrednosti površinske energije, oni su često skloni aglomerisanju. Navedene vrednosti veličina čestica ukazuju da su precipitaciono sintetisani prahovi kalcijum-hidroksiapatita HAP1 i HAP2 delimično sačinjeni od aglomerata dimenzija od 1 μ m do 5 μ m. Kako je raspodela veličina čestica prahova HAP određena iz vodenog rastvora prethodno tretiranog ultrazvukom, veliki broj čestica veličine nekoliko stotina nanometara ukazuje na činjenicu da su prisutni aglomerati mekani, tj. da se čestice pod dejstvom ultrazvuka delimično deaglomerišu. Sve ove tvrdnje bi trebalo da potvrde rezultati određivanja morfologije prahova skenirajućom i transmisionom elektronskom mikroskopijom.



Slika 16.1. Raspodela veličina čestica prahova HAP1 i HAP2

Raspodela veličina čestica hidrotermalno sintetisanih prahova kalcijum-hidroksiapatita, HAP3 i HAP4, prikazana je na slici 16.2. Sa slike se može uočiti da se prah HAP3 sastoji od čestica nešto većih dimenzija, što se može dovesti u vezu sa većom koncentracijom polaznog rastvora, tj. većim polaznim odnosom Ca/P, usled povećane mase rastvorenog CaCl_2 za oko 50 %. Većina čestica praha HAP3 se nalaze u intervalu od 1,5 μm do 5 μm. Ove vrednosti ukazuju da je prah HAP3 aglomerisan, kao i da su aglomerati vrlo otporni na dejstvo ultrazvuka, za razliku od prahova HAP1 i HAP2. Raspodela veličina čestica praha HAP4 ukazuje na prisustvo čestica u rasponu od 250 nm do 3 μm. Ovi rezultati dovode do zaključka da je prah HAP4 takođe sačinjen od aglomerata mikronskih dimenzija, ali i da je evidentno prisustvo čestica nanometarskih dimenzija nakon tretmana ultrazvukom.



Slika 16.2. Raspodela veličina čestica prahova HAP3 i HAP4

16.2. Rezultati određivanja morfologije prahova kalcijum-hidroksiapatita skenirajućom elektronskom mikroskopijom

SEM mikrografije praha kalcijum-hidroksiapatita HAP1 prikazane su na slikama 16.3 i 16.4. Na slici 16.3 prikazana je mikrgrafija praha HAP1, granulisanog „spray dry” metodom na 105 °C, koji nije ultrazvučno tretiran. Sa mikrografije se uočava prisustvo uglavnom sferičnih granula mikronskih dimenzija i manjeg broja nepravilnih aglomerata, dimenzija od nekoliko stotina nanometara.



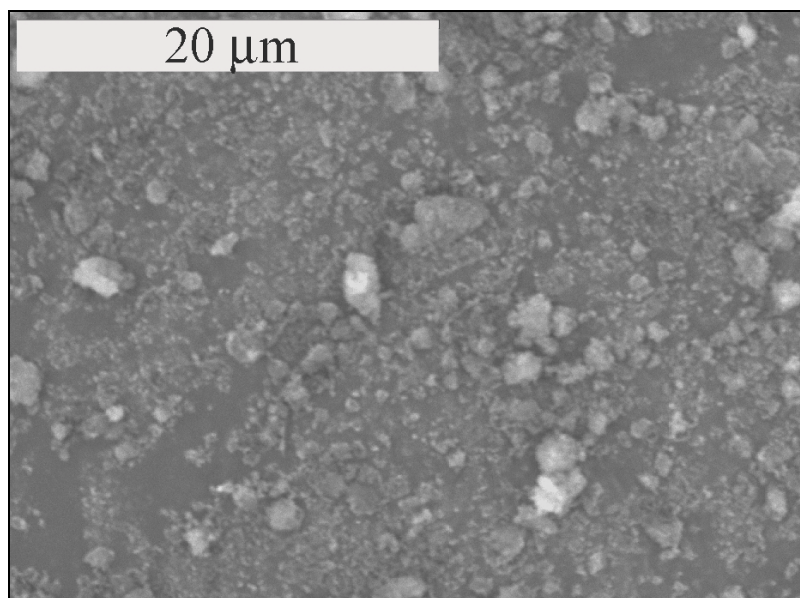
Slika 16.3. SEM mikrografija praha HAP1

Da bi se utvrdila struktura aglomerata, prah je dispergovan u apsolutnom alkoholu i tretiran ultrazvukom. SEM mikrografija tako pripremljenog uzorka praha HAP1 prikazana je na slici 16.4. Sa slike se uočava prisustvo finih subčestica dimenzija približno 200-300 nm, što je u skladu sa rezultatima raspodele veličina čestica za prah HAP1.



Slika 16.4. SEM mikrografija praha HAP1 nakon tretiranja ultrazvukom

Na slikama 16.5 i 16.6 prikazane su SEM mikrografije praha HAP2. Na slici 16.5 primećuje se prisustvo aglomerata nepravilnog oblika mikronskih dimenzija, kao i određen broj neaglomerisanih čestica HAP. Nakon tretmana u ultrazvučnom kupatilu, kao i u slučaju praha HAP1, uočava se prisustvo velikog broja finih subčestica dimenzija nekoliko stotina nanometara (Slika 16.6).



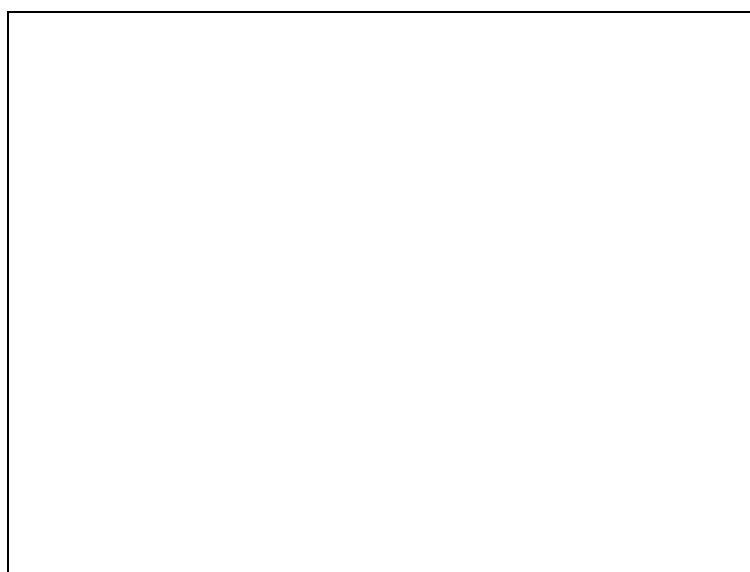
Slika 16.5. SEM mikrografija praha HAP2



Slika 16.6. SEM mikrografija praha HAP2 nakon tretiranja ultrazvukom

Formiranje većih čestica iz inicijalno formiranih nanokristala se objašnjava njihovom agregacijom. Matijević [269-274] i saradnici su objasnili da formiranje uniformnih čestica u koloidnim sistemima uglavnom ide kroz fazu inicijalnog indukcionog perioda gde dolazi do zasićenja rastvora koji vodi nukleaciji čestica. Dalje ti nukleusi rastu difuzionim mehanizmom, pri čemu se formiraju primarne čestice (subčestice) koje se agregiraju formirajući sekundarne čestice, tj. aglomerate.

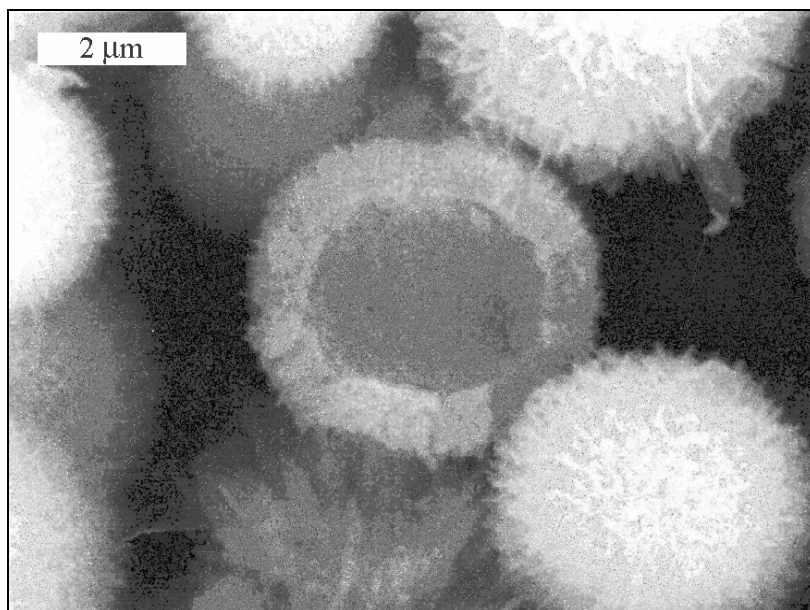
Sa mikrografije na slici 16.7 se može uočiti da su hidrotermalnom sintezom dobijeni sferni aglomerati vrlo pravilnog oblika i uske raspodele veličina, koje se kreću u opsegu od 1,5 do 5 μm , sto je u skladu sa rezultatima raspodele veličina čestica za prah HAP3, prikazanim na slici 16.2.



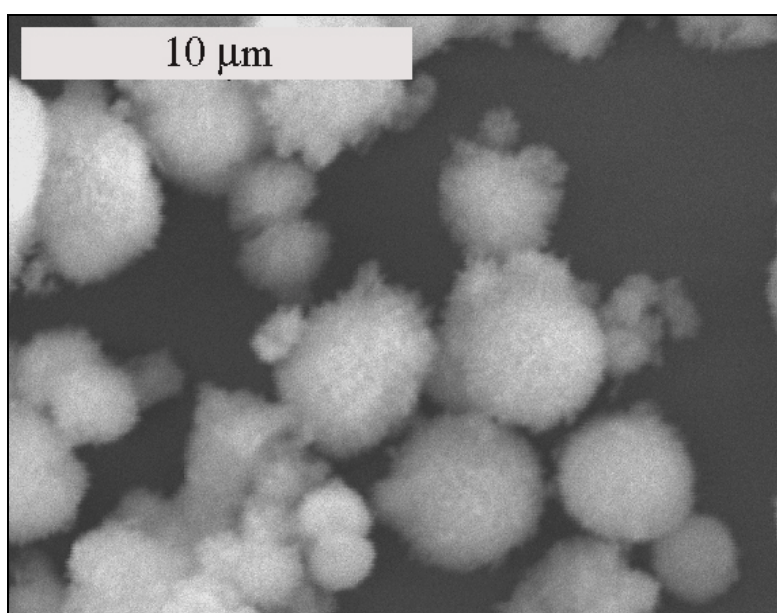
Slika 16.7. SEM mikrografija praha HAP3

Prikazane sferne čestice su aglomerati sačinjeni od štapićastih subčestica nanometarskih dimenzija, što se može uočiti na slici 16.8. Analizom mikrostrukture preseka sfernih aglomerata uočava se da su ovi aglomerati šuplji, te da je evidentno prisustvo sfernih intraaglomeratnih pora.

Sa slike 16.9. se uočava da je i u slučaju sinteze praha HAP4 dobijen aglomerisan prah, kao i da su aglomerati uglavnom sfernog oblika. Dimenzije čestica od kojih je sačinjen prah HAP4 su nešto manje u poređenju sa sfernim česticama praha HAP3.



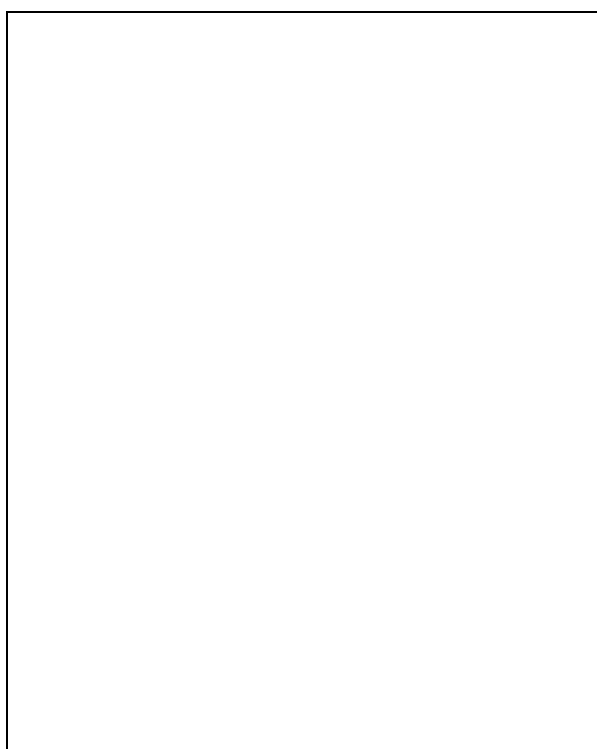
Slika 16.8. SEM mikrografija preseka sferne čestice praha HAP3



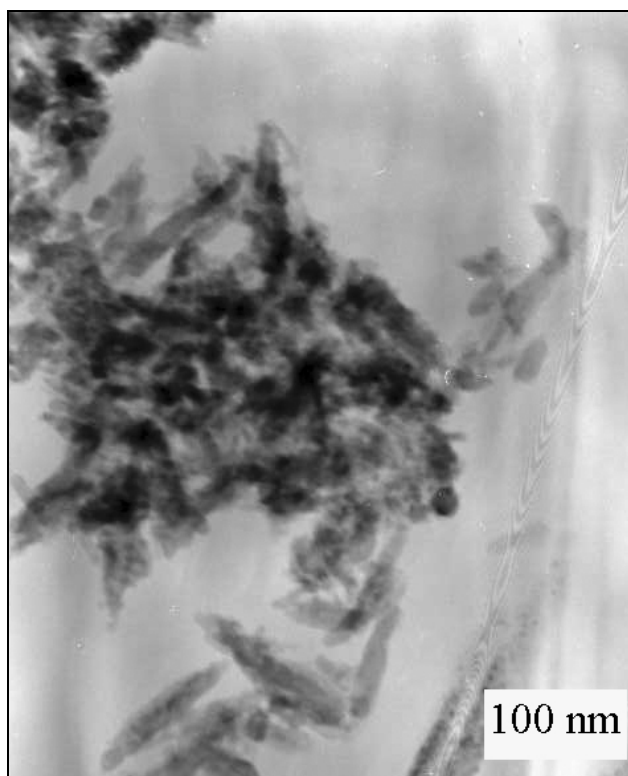
Slika 16.9. SEM mikrografija praha HAP4

16.3. Rezultati određivanja morfologije primarnih čestica kalcijum-hidroksiapatita transmisionom elektronskom mikroskopijom

Morfologija primarnih čestica prahova HAP1 i HAP2 prikazana je na TEM snimcima 16.10 i 16.11. Analizom ovih slika može se zaključiti da se prahovi HAP1 i HAP2 sastoje od primarnih čestica, vrlo slične morfologije dužine do 100 nm i širine oko 20-30 nm. Dobijene nanočestice imaju igličast oblik i vrlo su uske raspodele veličina. Čestice kalcijum-hidroksiapatita HAP1 su neznatno većih dimenzija od čestica praha HAP2.



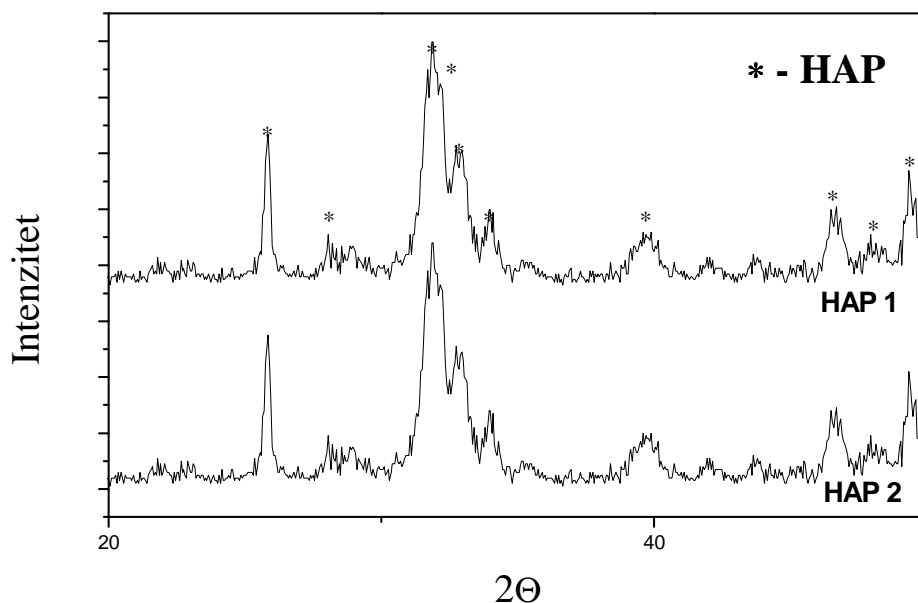
Slika 16.10. TEM snimak primarnih čestica praha HAP1



Slika 16.11. TEM snimak primarnih čestica praha HAP2

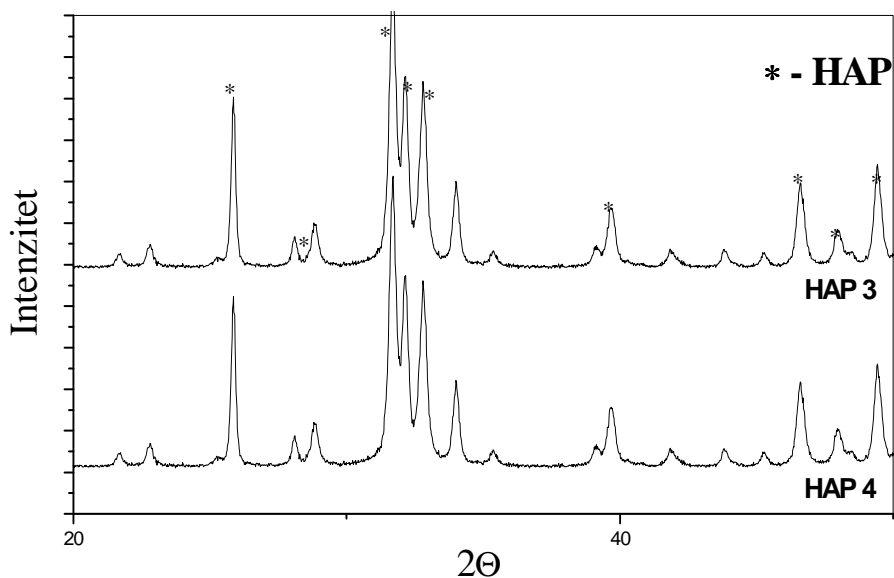
16.4. Rezultati rendgenske difrakcije analize prahova kalcijum-hidroksiapatita

Na slici 16.12 prikazani su rezultati rendgenske difrakcije analize prahova HAP1 i HAP2. Sa dijagrama se može zaključiti da je modifikovanim precipitacionim sintezama došlo do formiranja kalcijum-hidroksiapatita, tj. da u oba slučaja postoji veliko slaganje položaja difrakcionih pikova sa pikovima karakterističnih za kalcijum-hidroksiapatit na kartici JCPDS 9-432. Analizirajući difrakcione pikove prahova HAP1 i HAP2 nije uočeno prisustvo drugih faza. Na osnovu intenziteta i širine pikova, može se uočiti da kalcijum-hidroksiapatiti HAP1 i HAP2 imaju relativno nizak stepen kristaliničnosti. Primarne čestice prahova HAP1 i HAP2 su sastavljene od kristalita veličine oko 35 nm, čija je veličina ustanovljena korišćenjem Shererove jednačine. Odavde se može zaključiti da primarne čestice sadrže 2-3 kristalita.



Slika 16.12. Rendgenska difrakciona analiza prahova HAP1 i HAP2

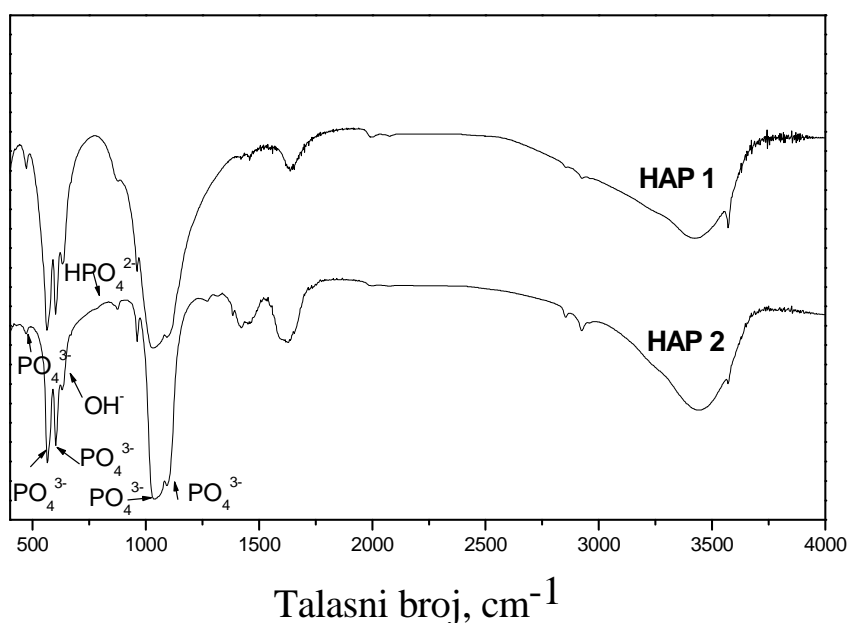
Rezultati rendgenske difrakcione analize prahova HAP3 i HAP4 su prikazani na slici 16.13. Kao i u slučaju precipitaciono sintetisanih prahova, kod oba difraktograma se uočava veliko slaganje sa pikovima na kartici JCPDS 9-432, pa se može zaključiti da je hidrotermalnim sintezama u oba slučaja došlo do formiranja kalcijum-hidroksiapatita. Prisustvo drugih faza nije uočeno, a analizom oblika pikova uočava se nešto veća kristaliničnost u odnosu na prahove HAP1 i HAP2. Korišćenjem Šererove jednačine izračunata je veličina kristalita hidrotermalno dobijenih prahova, i ona iznosi približno 50 nm.



Slika 16.13. Rendgenska difrakciona analiza prahova HAP3 i HAP4

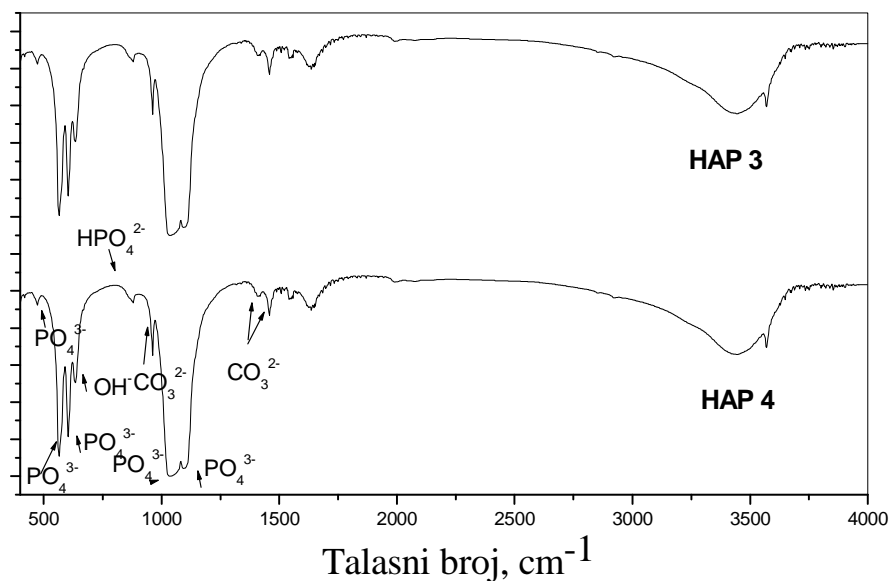
16.5. Rezultati infracrvene spektroskopske analize prahova kalcijum-hidroksiapatita

Rezultati FTIR analize prahova HAP1 i HAP2 prikazani su na slici 16.14. FTIR spektri oba praha sadrže trake karakteristične za kalcijum-hidroksiapatit. Trake karakteristične za fosfatne grupe uočavaju se na 462, 553, 595, 958 i 1024-1115 cm^{-1} . Trake karakteristične za hidroksilne jone javljaju se na 3584 i 636 cm^{-1} , a traka karakteristična za HPO_4^{2-} jon uočljiva je na 873 cm^{-1} . Široke trake na 1650 i 3440 cm^{-1} ukazuju na prisustvo adsorbovane vode u materijalu.



Slika 16.14. Infracrvena spektroskopska analiza prahova HAP1 i HAP2

FTIR spektri prahova HAP3 i HAP4 prikazani su na slici 16.15, a na njima se uočava prisustvo traka karakterističnih za kalcijum-hidroksiapatit, na istim talasnim dužinama kao i na slici 16.14. Jasno izražene trake koje se javljaju na FTIR spektrima prahova HAP3 i HAP4, na talasnim brojevima 873, 1420 i 1480 cm^{-1} potiču od inkorporiranih karbonatnih jona u apatitnu strukturu.



Slika 16.15. Infracrvena spektroskopska analiza prahova HAP3 i HAP4

16.6. Rezultati određivanja odnosa Ca/P i specifične površine prahova kalcijum-hidroksiapatita

Rezultati proistekli iz određivanja odnosa Ca/P induktivno-spregnutom plazma spektroskopijom prahova HAP1 i HAP2 dati su u tabeli 16.1. Vrednost Ca/P odnosa kod praha HAP1 iznosi 1,67, što odgovara stehiometrijskom odnosu karakterističnom za kalcijum-hidroksiapatit. Stehiometrijski odnos Ca/P u dobijenom prahu bi trebalo da bude garancija da tokom sinterovanja na temperaturama do 1200 °C neće doći do fazne transformacije kalcijum-hidroksiapatita u trikalcijum-fosfat.

Odnos Ca/P u slučaju praha HAP2 iznosi 1,62. Na osnovu ove vrednosti se može zaključiti da je kalcijum-hidroksiapatit HAP2 kalcijum deficitaran, kao i da tokom sinterovanja može doći do delimične fazne transformacije u trikalcijum-fosfat.

Tabela 16.1. Vrednosti odnosa Ca/P prahova HAP1 i HAP2

Oznaka praha	Odnos Ca/P
HAP1	1,67 ± 0,01
HAP2	1,62 ± 0,01

U tabeli 16.2 su prikazani polazni odnosi Ca/P u rastvoru pre hidrotermalnog tretmana pri sintezi HAP3 i HAP4. Na osnovu ovih vrednosti može se očekivati da odnos Ca/P bude bliži stehiometrijskom u slučaju HAP3, kao i da će se prilikom sinterovanja u manjem procentu odviti fazna transformacija kalcijum-hidroksiapatita u trikalcijum-fosfat.

Tabela 16.2. Vrednosti odnosa Ca/P u polaznom rastvoru prahova HAP3 i HAP4

Oznaka praha	Odnos Ca/P
HAP3	1,42 ± 0,01
HAP4	0,96 ± 0,01

U tabeli 16.3 prikazane su vrednosti specifičnih površina sintetisanih prahova. Najveću vrednost specifične površine ima prah HAP2. Može se primetiti da hidrotermalno sintetisani prahovi imaju znatno manje vrednosti specifičnih površina od precipitaciono dobijenih kalcijum-hidroksiapatita, što može da se dovede u vezu sa većom kristaliničnošću hidrotermalno sintetisanih prahova.

Tabela 16.3. Vrednosti specifičnih površina prahova HAP1 – HAP4

Oznaka praha	Specifična površina, m ² /g
HAP1	59 ± 5
HAP2	72 ± 1
HAP3	39 ± 3
HAP4	36 ± 3

17. Karakterizacija uniaksijalno i izostatski ispresovanih kompakata kalcijum-hidroksiapatita

Uniaksijalnim presovanjem prahova kalcijum-hidroksiapatita HAP1-HAP4, pri dejstvu pritiska od 100 MPa dobijeni su kompakati čije su gustine prikazane u tabeli 17.1. Vrednost gustina polaznih kompakata prahova HAP1 i HAP2 su identične, i iznose 44 % od teorijske gustine kalcijum-hidroksiapatita. Kompakti dobijeni uniaksijalnim presovanjem prahova HAP3 i HAP4 imaju neznatno veću vrednost gustine, i ona iznosi 1,40 g/cm³ tj. oko 45% od teorijske gustine kalcijum-hidroksiapatita.

Tabela 17.1. Vrednosti gustina uniaksijalno presovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 100MPa

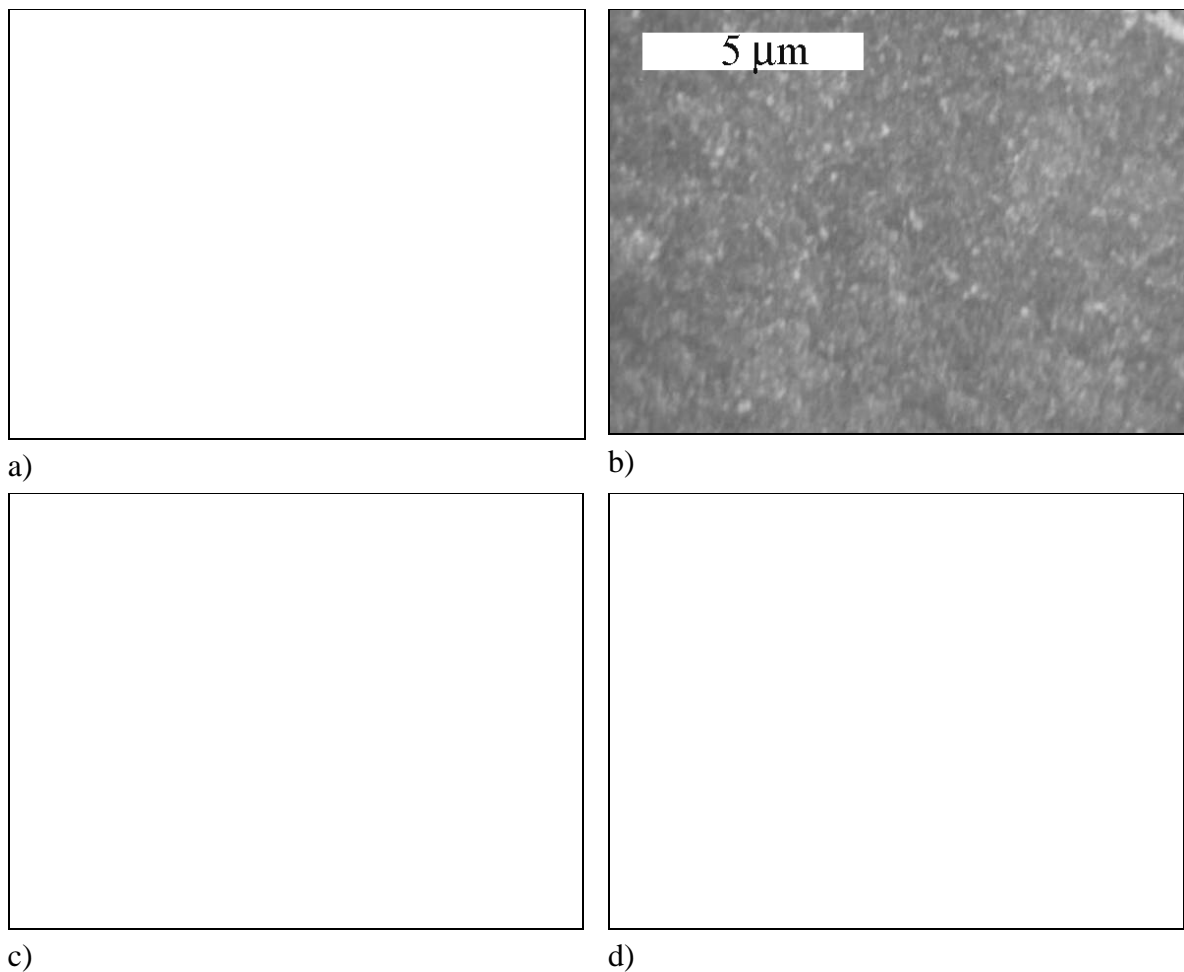
Oznaka praha	Gustina kompakata, g/cm ³	% teorijske gustine
HAP1	1,35	44
HAP2	1,35	44
HAP3	1,40	45
HAP4	1,40	45

Sa ciljem da se dobije veća polazna gustina kompakata, a samim tim i da se poveća dodirna površina između čestica pre sinterovanja, prahovi HAP1-HAP4 su najpre ispresovani uniaksijalno na 100 MPa, a zatim izostatski na 400 MPa, a gustine tako dobijenih kompakata su prikazane u tabeli 17.2. Iz tabele se može oučiti da se kompakti dobijeni izostatskim presovanjem prahova odlikuju znatno većim polaznim gustinama, i da se vrednosti polaznih gustina kreću i do 60% od teorijske vrednosti u slučaju HAP1. Kompakti drugih prahova se odlikuju nešto manjim, ali takođe relativno visokim vrednostima polaznih gustina. U slučaju hidrotermalno sintetisanih prahova, izostatskim presovanjem na 400 MPa, postižu se za oko 13 % veće polazne gustine u poređenju sa uniaksijalno presovanim kompaktima.

Tabela 17.2. Vrednosti gustina izostatski presovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 400 MPa

Oznaka praha	Gustina kompakata, g/cm ³	% teorijske gustine
HAP1	1,89	60
HAP2	1,76	56
HAP3	1,83	58
HAP4	1,83	58

Na slici 17.1 prikazane su SEM mikrografije izostatski ispresovanih kompakata HAP1-HAP4 na 400 MPa. Sa mikrografija se uočava izuzetno gusta mikrostruktura ispresovanih kompakata HAP1 i HAP2. Na osnovu mikrografske analize se može zaključiti da su prahovi HAP1 i HAP2 sačinjeni od mekih aglomerata, i da je presovanjem moguće dobiti kompakte izuzetno visokog stepena uniformnosti. U slučaju prahova HAP3 i HAP4 se takođe uočava gusto pakovanje polaznih čestica, ali je primetno da su sferni aglomerati čestica postojani i nakon dejstva izuzetno visokog pritiska. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je u slučaju prahova HAP3 i HAP4 reč o izuzetno tvrdim i postojanim sfernim aglomeratima.



Slika 17.1. SEM mikrografije izostatski ispresovanih kompakata HAP1 – HAP4 na 400 MPa

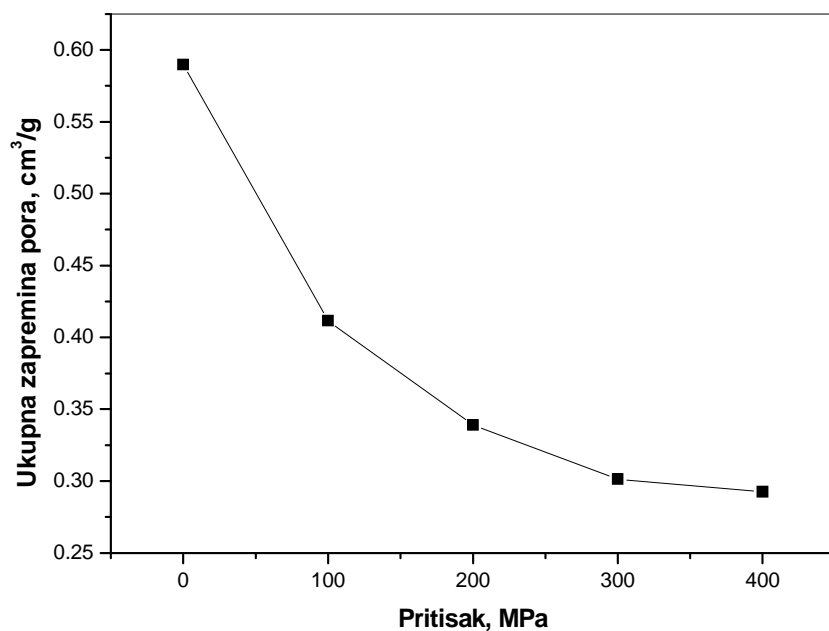
17.1. Rezultati ispitivanja uticaja veličine izostatskog pritiska na raspodelu pora ispresovanih kompakata

Sa ciljem da se utvrdi zavisnosti raspodele veličina pora i specifične površine kompakata polaznih prahova od veličine primenjenog pritiska, stehiometrijski prah kalcijum-hidroksiapatita HAP1 je izostatski ispresovan na pritiscima od 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa i 400 MPa. Gustine dobijenih kompakata su prikazane u tabeli 17.3., odakle se može videti da gustine značajno rastu sa povećanjem pritiska.

Tabela 17.3. Vrednosti gustina izostatski presovanih kompakata HAP1 na 100 - 400 MPa

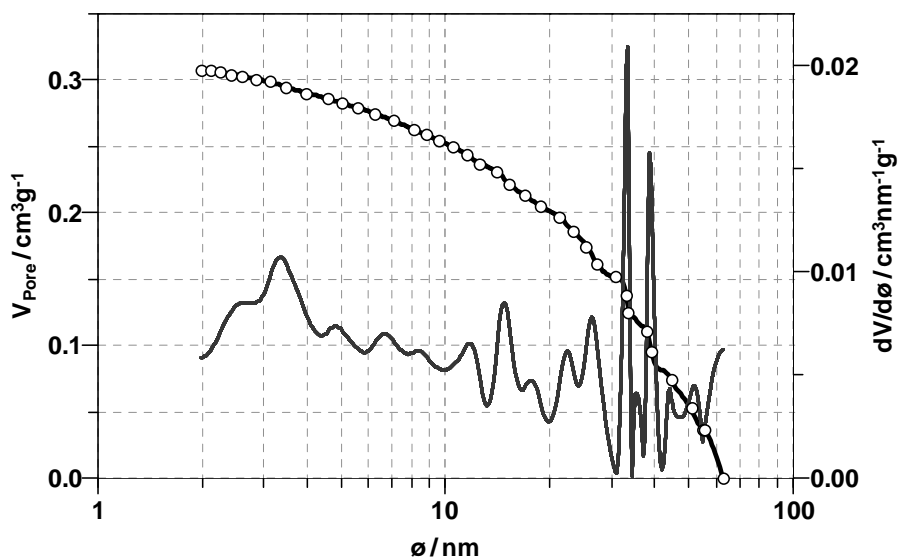
Pritisak, MPa	Gustina kompakata, g/cm ³	% teorijske gustine
100	1,43	45
200	1,54	49
300	1,67	53
400	1,89	60

Na slici 17.2 je prikazana zavisnost ukupne zapremine pora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska. Ukupna zapremina pora nepresovanog praha kalcijum-hidroksiapatita iznosila je 0,59 cm³/g. Nakon presovanja praha na 100 MPa specifična zapremine pora je smanjena na 0,41 cm³/g. Daljim povećanjem pritiska vrednost ukupne zapremine pora je sve vreme imala trend pada, a pri maksimalnom primenjenom pritisku od 400 MPa iznosila je 0,29 cm³/g, što je za približno 50 % manja vrednost od polazne zapremine pora nepresovanog praha. Da bi se ustanovilo u kom opsegu se kreću veličine pora ispresovanih kompakata, određena je njihova raspodela u mezo i mikro intervalu, a utvrđena je i zavisnost zapremine mikro i mezo pora od pritiska.

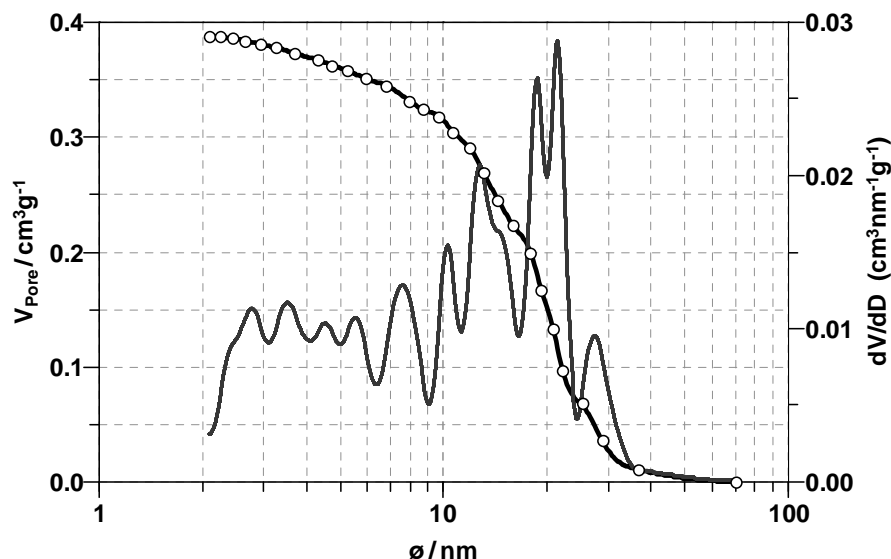


Slika 17.2. Ukupna zapremina pora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska

Raspodela veličina mezopora praha HAP1 prikazana je na slici 17.3. Sa dijagrama se uočava vrlo široka raspodela veličina, kao i da najveći udeo pora u mezo opsegu (2-50 nm) ima vrednost od 30-40 nm. Sa slike 17.4 uočava se da se presovanjem na pritisku od 100 MPa pikovi sa maksimalnom visinom na dijagramu raspodele mezopora pomeraju ka manjim vrednostima, tj. da se najveći udeo pora nalazi u intervalu od 10-25 nm.

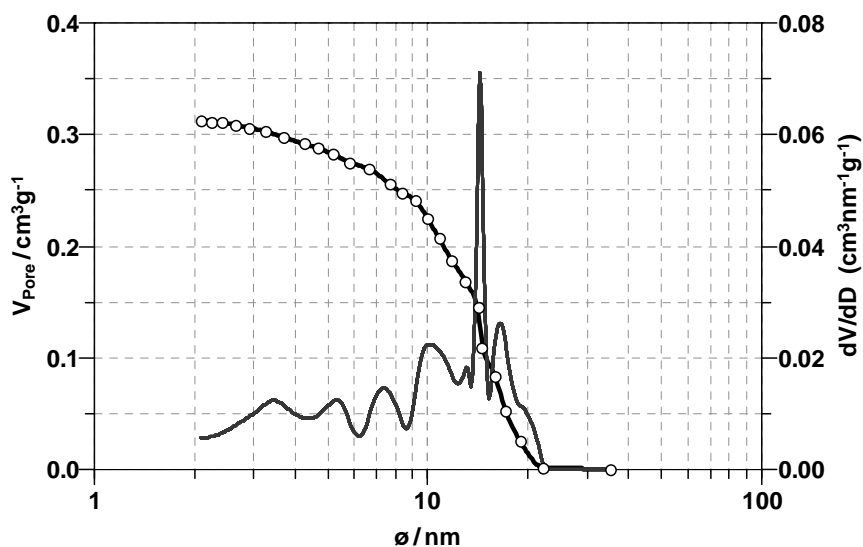


Slika 17.3. Raspodela veličina mezopora praha HAP1

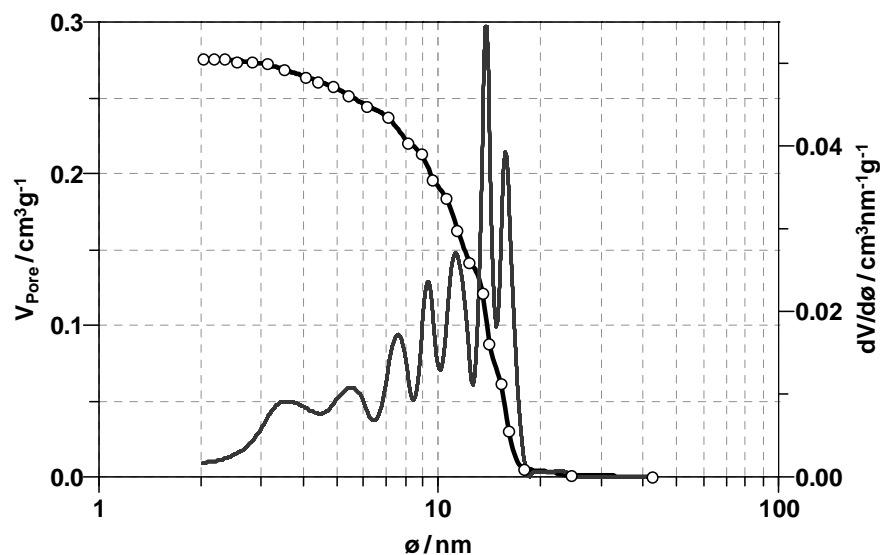


Slika 17.4. Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 100 MPa

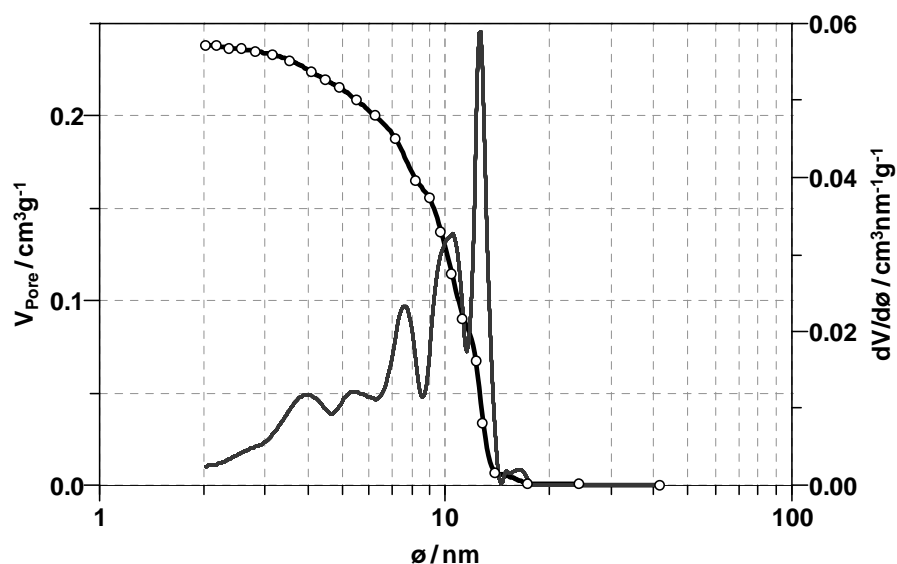
Daljim povećanjem pritiska na 200 MPa dobija se kompakt koji karakteriše izuzetno uska raspodela veličina mezopora, a najveći udeo mezopora ima vrednost približno 15 nm (Slika 17.5.). Sa dijagrama na slici 17.5 takođe se uočava znatno manji broj pora u intervalu od 2-10 nm, što je posledica smanjenja dimenzija pora iz mezo u mikro opseg usled dejstva većeg pritiska. Daljim povećanjem pritiska na 300 MPa, odnosno 400 MPa, (Slike 17.6 i 17.7.) trend pomeranja pikova sa maksimalnom visinom na dijagramu raspodele mezopora prema manjim vrednostima se nastavlja.



Slika 17.5. Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 200 MPa

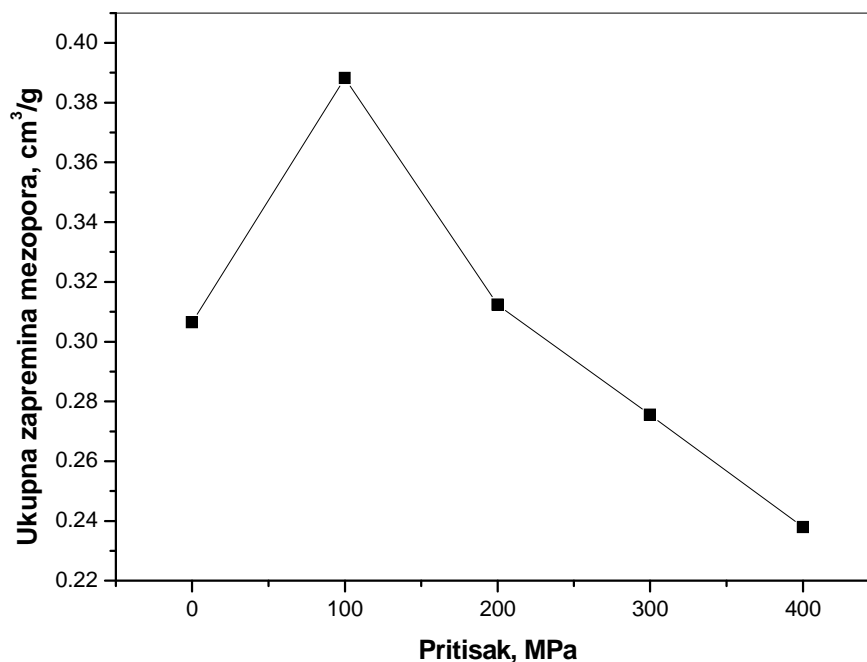


Slika 17.6. Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 300 MPa



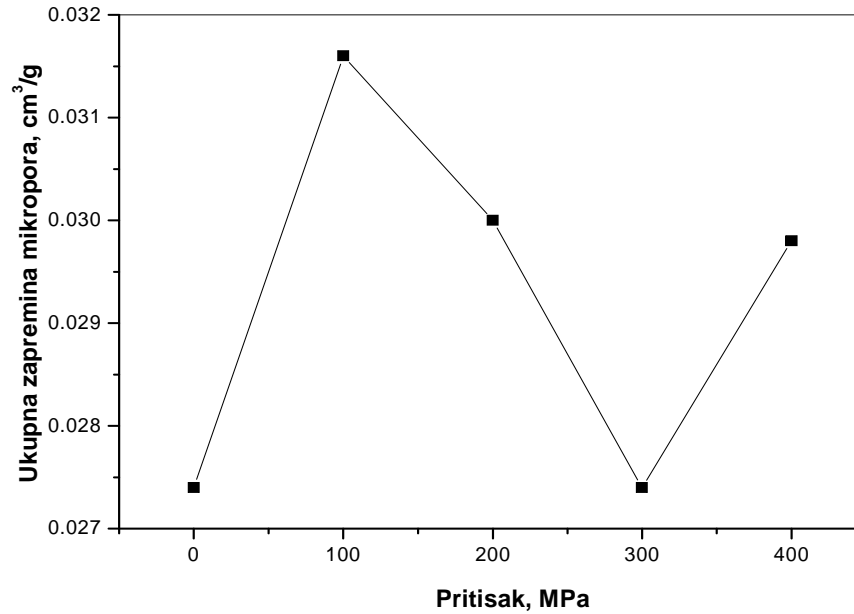
Slika 17.7. Raspodela veličina mezopora kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa

Pomeranja pikova sa maksimalnom visinom na dijagramu raspodele mezopora prema manjim vrednostima sa povećanjem pritiska, prati smanjenje ukupne zapremine mezopora, što je prikazano na slici 17.8. Na dijagramu 17.8 se može uočiti povećanje ukupne zapremine mezopora pri presovanju na 100 MPa, u odnosu na nepresovan prah, što je posledica smanjenja veličine pora većih od 50 nm na mezo nivo veličina. Poredeći ukupnu zapreminu pora i ukupnu zapreminu mezopora, (Slike 17.2 i 17.8), možemo zaključiti da većina prisutnih pora u kompaktima HAP1 presovanim na pritiscima u intervalu 100-400 MPa pripada mezo nivou.



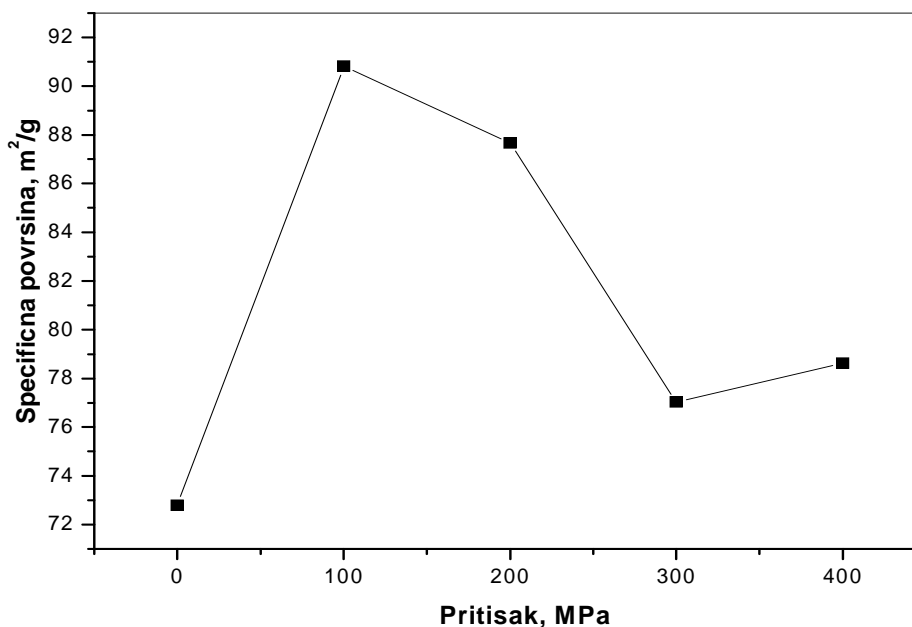
Slika 17.8. Zapremina mezopora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska

Zapremina mikropora kompakata HAP1 u funkciji pritiska prikazana je na slici 17.9. Sa dijagrama se vidi da uzorak ispresovan na 100 MPa ima znatno veći udeo mikropora od samog praha HAP1. Razlog za to može da bude smanjenje veličine određenog broja mezopora, bliskim po dimenzijama mikroporama (slike 17.3 i 17.4.) ispod vrednosti od 2 nm. Daljim povećanjem pritiska do vrednosti od 300 MPa ukupna zapremina mikropora se smanjuje, što je posledica smanjenja njihovog broja i dimenzija usled dejstva izrazito velikih pritisaka, a zatim beleži porast kod kompakta ispresovanog na 400 MPa. S obzirom na činjenicu da je daljim povećanjem pritiska logično bilo da se veličina mikropora i dalje smanjuje, pretpostavka je da ovaj porast njihove ukupne zapremine može da bude posledica smanjenja većeg broja mezopora na nivo ispod 2 nm, tj, da je upravo vrlo visok pritisak od 400 MPa uzrok ovog trenda rasta udela mikropora.



Slika 17.9. Zapremina mikropora kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska

Identičan trend porasta i opadanja kao na dijagramu zavisnosti zapremine mikropora od pritiska, uočljiv je i na dijagramu zavisnosti specifične površine kompakata HAP1 od pritiska (Slika 17.10.), što je logičan sled s obzirom na dominantan uticaj mikropora na vrednost specifične površine.



Slika 17.10. Specifična površina kompakata HAP1 u funkciji izostatskog pritiska

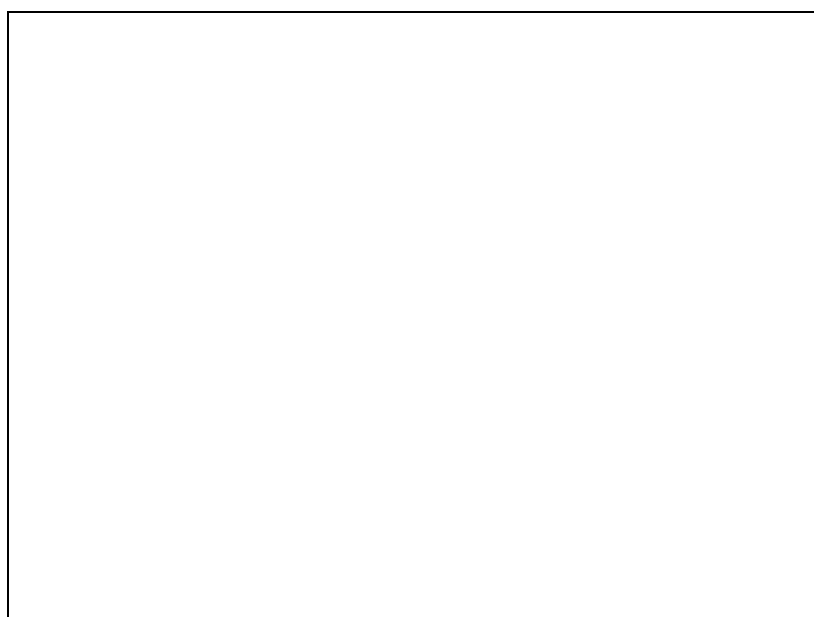
Uopšteno posmatrano, analizom uticaja pritiska na raspodelu i ukupnu zapreminu pora, može se zaključiti da se izostatskim presovanjem na 400 MPa dobija polazni kompakt sa najmanjom ukupnom zapreminom pora, minimalnom zapreminom mezopora i najmanjom dimenzijom mezopora.

17.2. Rezultati ispitivanja uticaja pritiska na sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita

Sa ciljem da se ustanovi uticaj izostatskog pritiska na sinterabilnost kalcijum-hidroksiapatita, kompakti HAP1 ispresovani izostatski na pritiscima od 100-400 MPa sinterovani su na temperaturi 1200 °C tokom 2 h. Mikrostrukture sinterovanih uzoraka su prikazane na slikama 17.11-17.14. Sa SEM slika se uočava da sa porastom pritiska od 100 MPa do 300 MPa dolazi do intenziviranja denzifikacije materijala pri sinterovanju.



Slika 17.11. SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 100 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h

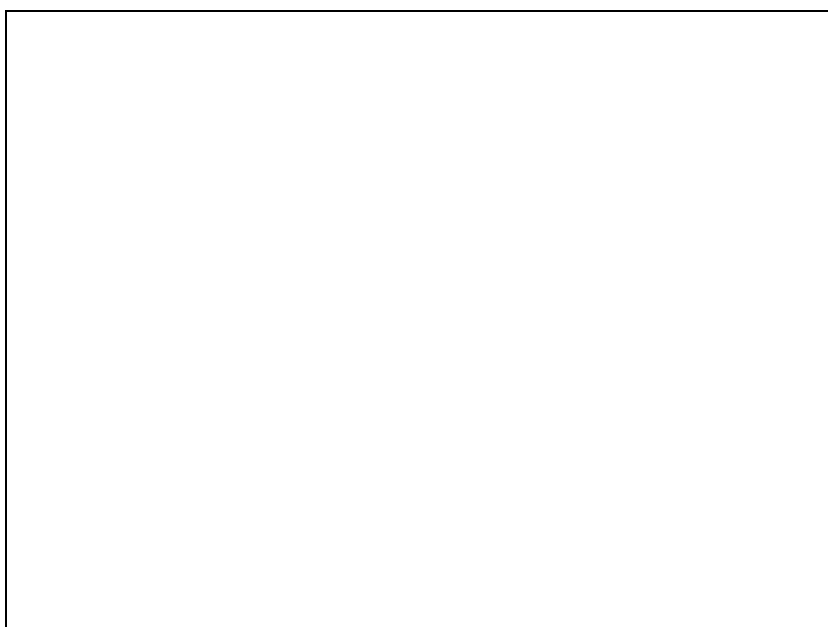


Slika 17.12. SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 200 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h



Slika 17.13. SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 300 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h

Mikrostruktura uzorka izostatski ispresovanog na 400 MPa, a zatim sinterovanog na 1200 °C (Slika 17.14.) ukazuje na znatan porast gustine dobijenog uzorka u odnosu na uzorke presovane na nižim pritiscima, što je bilo za očekivati nakon analize rezultata dobijenih određivanjem raspodela pora ispresovanih kompakata. Gustina uzoraka ispresovanog na 400 MPa i sinterovanog na 1200 °C iznosi 3,00 g/cm³ tj. 95% od teorijske gustine kalcijum-hidroksiapatita. Prosečna veličina zrna uzorka dobijenog pri ovim uslovima iznosila je 3 μm.



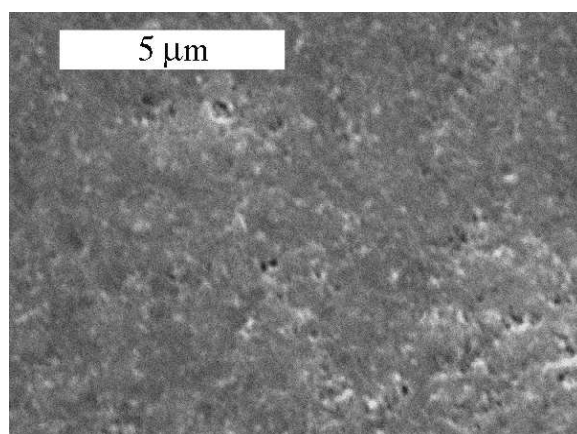
Slika 17.14. SEM mikrografija kompakta HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h

Generalno, ispitivanjem uticaja veličine izostatskog pritiska na presovanje nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita, zaključeno je da se presovanjem na pritisku od 400 MPa dobijaju polazni kompakti najvećih gustina ($1,89 \text{ g/cm}^3$ ili 60 % TG), najmanje ukupne zapremine pora, najuže raspodele veličina pora i najmanje zapremine mezopora, kao i da se sinterovanjem ovako dobijenih kompakata dobijaju materijali najvećih gustina i najuniformnije mikrostrukture.

17.3. Rezultati uniaksijalnog presovanja i sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita na ekstremno visokim pritiscima

Jedan od osnovnih ciljeva pri procesiranju savremenih biokeramičkih materijala je dobijanje materijala velikih gustina i uniformnih mikrostrukture sa što je moguće manjom prosečnom veličinom zrna. Jedan od načina da se dobije gust biokeramički materijal sa finostrukturom je snižavanje temperature sinterovanja, presovanjem prahova na ekstremno visokim pritiscima, reda veličine GPa. Na ovaj način se značajno povećava mehanički kontakt između čestica praha i iz tog razloga je sinterovanje moguće na nižim temperaturama. Na slici 17.15a je prikazana mikrostruktura uzorka dobijenog presovanjem praha HAP1 na pritisku od 2,5 GPa i sinterovanog na 900 °C tokom 2 h.

S obzirom na činjenicu da je temperatura sinterovanja kalcijum-hidroksiapatita u konvencionalnim uslovima najčešće 1200 °C, u ovom slučaju primena ekstremno visokih pritisaka uticala je na snižavanje temperature sinterovanja na 900 °C. Sinterovanjem na 300 °C nižoj temperaturi od uobičajene za kalcijum-hidroksiapatit, dobijen je gust uzorak koji se odlikuje prosečnom veličinom zrna od 150 nm.



a)

b)

Slika 17.15. SEM mikrografija kompakta HAP1: a) uniaksijalno ispresovanog na 2.5 GPa, b) isostatski ispresovanog na 400 MPa, a nakon toga sinterovanih na 900 °C tokom 2 h

Na slici 17.15b je prikazana mikrostruktura uzorka ispresovanog na 400 MPa i sinterovanog pri istim uslovima kao i uzorak na slici 17.15a. Na slici 17.15b se uočava porozna mikrostruktura i pored primene relativno velikog pritiska od 400 MPa, koji očigledno nije dovoljan da bi snizio temperaturu sinterovanja u konvencionalnim uslovima na 900 °C. Poredeći ove dve mikrostrukture može se konstatovati pozitivan efekat primene ekstremno visokih pritisaka na densifikaciju i mikrostrukturne karakteristike dobijenih biokeramičkih materijala.

18. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem

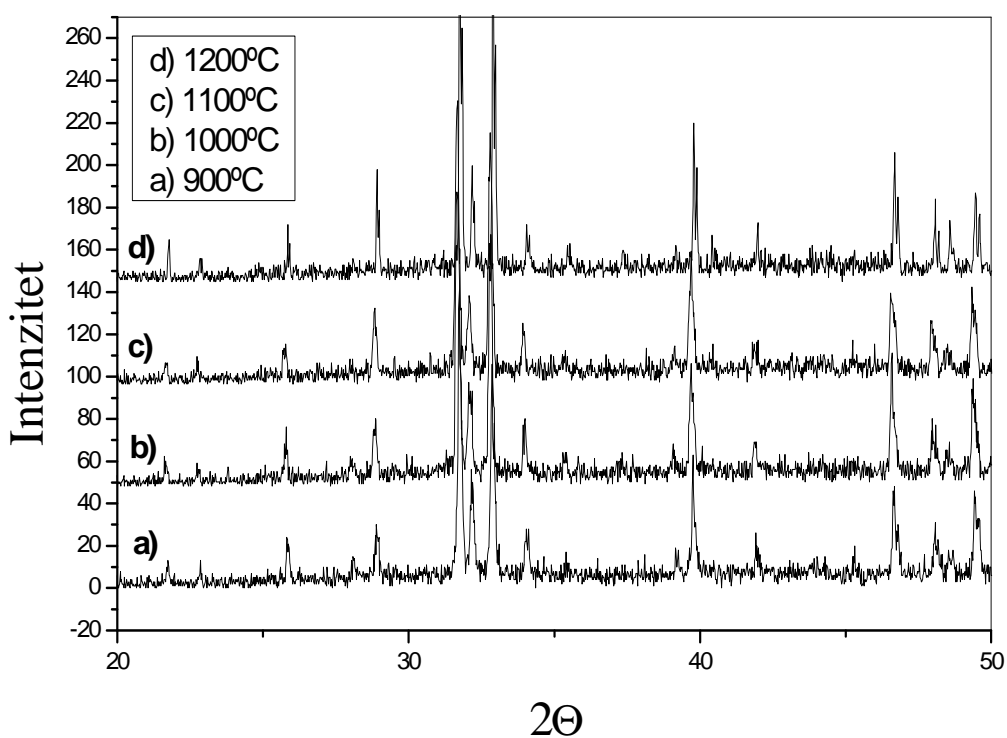
Primena mikrotalasa pri procesiranju biokeramičkih materijala sinterovanjem imala je za cilj da snižavanjem temperature i skraćivanjem vremena sinterovanja limitira rast zrna, a samim tim omogući dobijanje materijala optimalnih mikrostrukturnih, faznih i mehaničkih karakteristika. Homogena raspodela temperatura po zapremini uzorka, koju omogućuje homogeno mikrotalaso polje uspostavljeno u komori za sinterovanje, omogućuje dobijanje materijala izuzetno homogene mikrostrukture.

Sa ciljem da se dobiju gusti biokeramički materijali, monofazni kalcijum-hidroksiapatitni i bifazni na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, sa zrnima nano dimenzija, polazni kompakti HAP1 i HAP2 su mikrotalaso sinterovani na temperaturama od 900-1200 °C tokom 15 min. Karakterizacijom je utvrđen uticaj parametara procesiranja mikrotalasnim sinterovanjem na mikrostrukturu, fazni sastav i mehanička svojstva dobijenih biokeramičkih materijala.

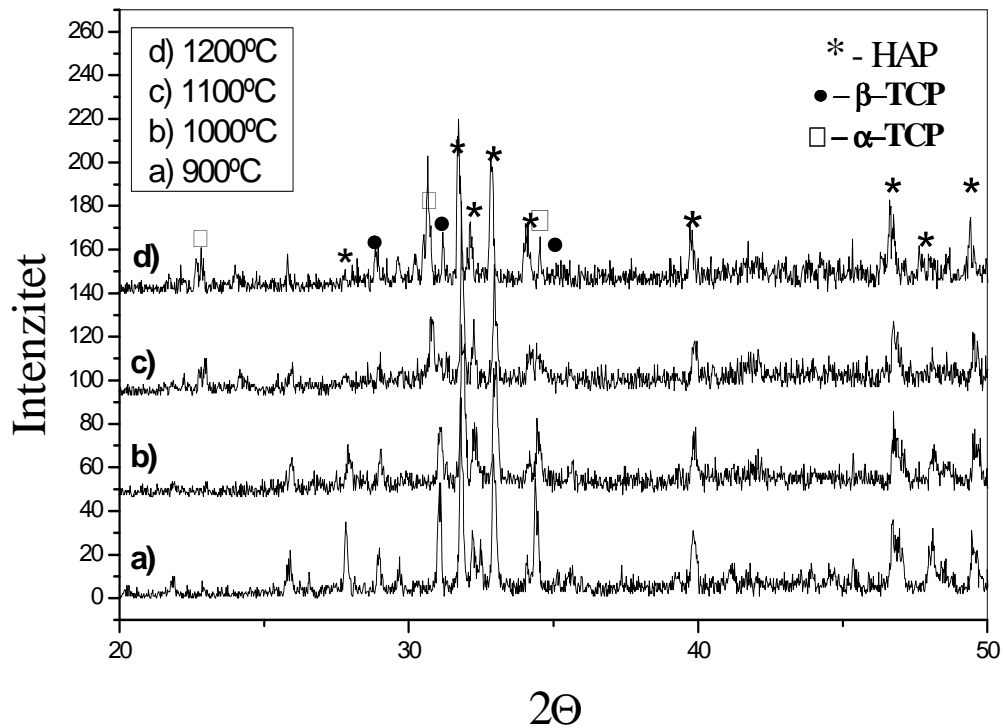
18.1. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom

Rezultati rendgenske difrakcione analize uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita, HAP1, na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min su prikazani na slici 18.1. Analizom difraktograma je utvrđeno prisustvo pikova karakterističnih za kalcijum-hidroksiapatit kod svih sinterovanih uzoraka. Odsustvo pikova karakterističnih za trikalcijum-fosfat u svim slučajevima pokazuje da nije došlo do fazne transformacije kalcijum-hidroksiapatita, te se može sa sigurnošću tvrditi da je mikrotalasnim sinterovanjem praha HAP1 došlo do formiranja monofaznog kalcijum-hidroksiapatitnog biokeramičkog materijala.

Na slici 18.2 prikazani su XRD dijagrami uzoraka HAP2 mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min. Analizom ovih dijagrama dolazi se do zaključka da se sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita, HAP2, na 900 °C i 1000 °C dobijaju bifazni kompakti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i β -trikalcijum-fosfata. Sa difraktograma se može uočiti da je u oba slučaja kalcijum-hidroksiapatit dominantna faza. U slučaju uzorka sinterovanog na 1000 °C uočava se nešto veći procenat nastalog β -trikalcijum-fosfata u odnosu na uzorak sinterovan na 900 °C. Poređenjem faznog sastava ova dva uzoraka sa uzorcima sinterovanim na 1100 °C i 1200 °C, primećuje se da se na temperaturama iznad 1100 °C odigrava fazna transformacija β -TCP u α -TCP, kao i da se udeo α -TCP u uzorku povećava sa povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C.



Slika 18.1. Rendgenska difrakciona analiza uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP1 na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min



Slika 18.2. Rendgenska difrakciona analiza uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP2 na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min

18.2. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Mikrostrukture uzoraka dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP1 na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min prikazane su na slikama 18.3-18.6. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom površine lomova je utvrđeno da se dobijeni biomaterijali odlikuju gustim i uniformnim mikrostrukturama. Sa mikrografije uzorka sinterovanog tokom 15 min na 900 °C prikazanog na slici 18.3 se može uočiti gusta mikrostruktura, homogena raspodela veličine zrna, prosečne veličine zrna 130 nm.

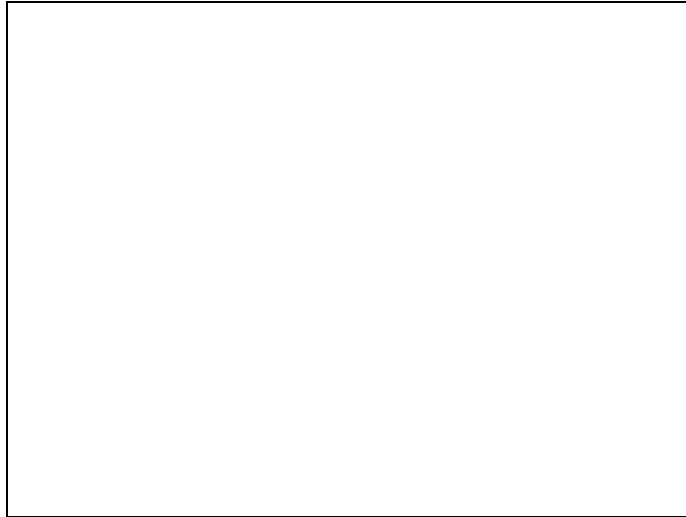


Slika 18.3. SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

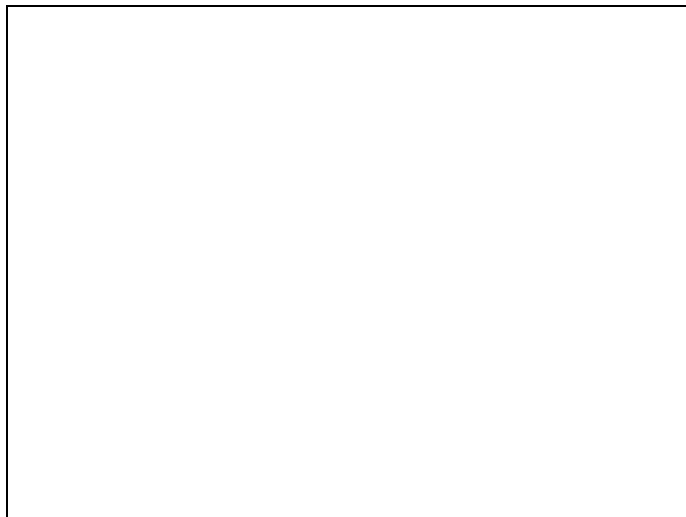


Slika 18.4. SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min

SEM mikrografi uzoraka HAP1 na slikama 18.4-18.6 ukazuju na postepen porast zrna sa nano na mikro nivo sa povećanjem temperature sinterovanja. Mikrostruktura uzorka sinterovanog na 1000 °C, prikazana je na slici 18.4. Sa ove slike se može uočiti takođe gusta mikrostruktura, homogena raspodela veličine zrna sa nešto većom vrednošću prosečne veličine zrna od 250 nm. Dalje povećanje temperature sinterovanja na 1100 °C utiče na porast zrna na 0,75 μm (Slika 18.5.). Mikrostruktura uzorka sinterovanog tokom 15 min na 1200 °C, (Slika 18.6.), odlikuje se takođe gustom mikrostrukturuom i prosečnom veličinom zrna od 1,6 μm .



Slika 18.5. SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min

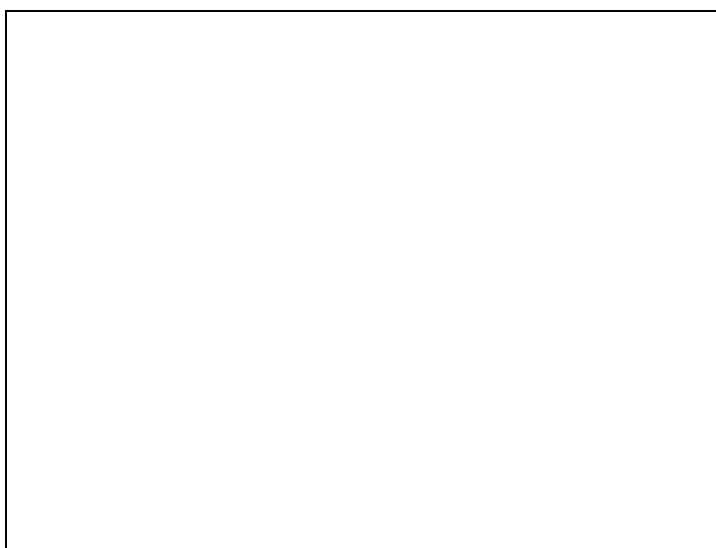


Slika 18.6. SEM mikrografija uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

Na slikama 18.7-18.10 prikazane su mikrostrukture bifaznih HAP/TCP biokeramičkih kompakata mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min. Prosečna veličina zrna uzoraka mikrotalasno sinterovanih na 900 °C i 1000 °C je 100 nm i 480 nm, respektivno (Slike 18.7 i 18.8.).



Slika 18.7. SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

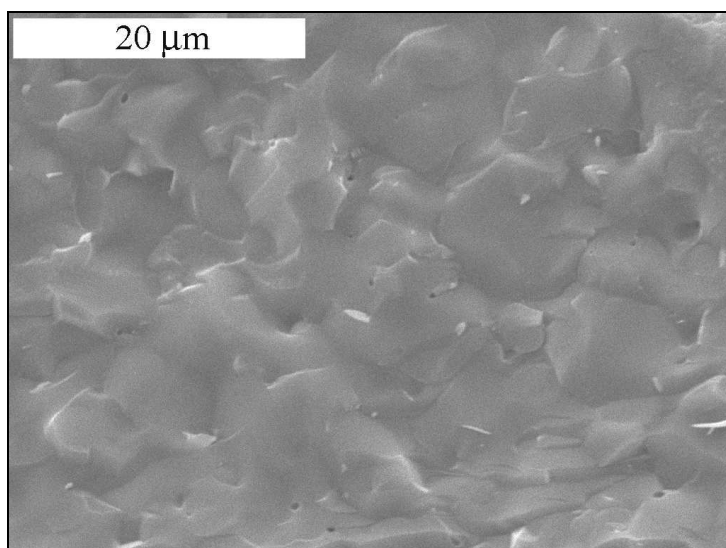


Slika 18.8. SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min



Slika 18.9. SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min

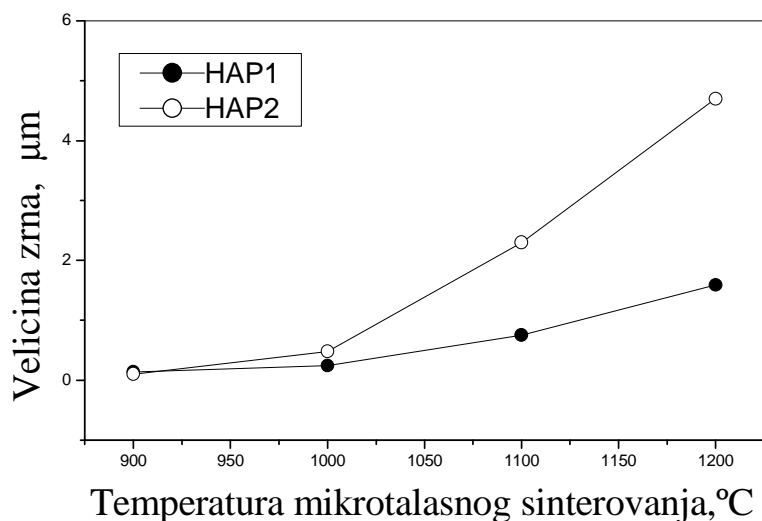
Povećanje temperature sinterovanja na 1200 °C izaziva rapidno povećanje prosečne veličine zrna na 4,7 μm (Slika 18.10.), što je trostruko veća vrednost veličine zrna u odnosu na sinterovan kompakt HAP1 u kome nije došlo do fazne transformacije HAP-a u TCP.



Slika 18.10. SEM mikrografija uzorka HAP2 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

Na slici 18.11 prikazana je zavisnost veličine zrna od temperature sinterovanja u slučaju monofaznih HAP1 i bifaznih HAP2 biokeramičkih materijala, koja pokazuje da su prosečne veličine zrna u slučaju HAP2 značajno veće na temperaturama većim od 1000 °C

u odnosu na HAP1. Sa povećanjem temperature sinterovanja povećava se razlika vrednosti prosečne veličine zrna bifaznih HAP/TCP kompakata u odnosu na monofazne HAP kompakte.

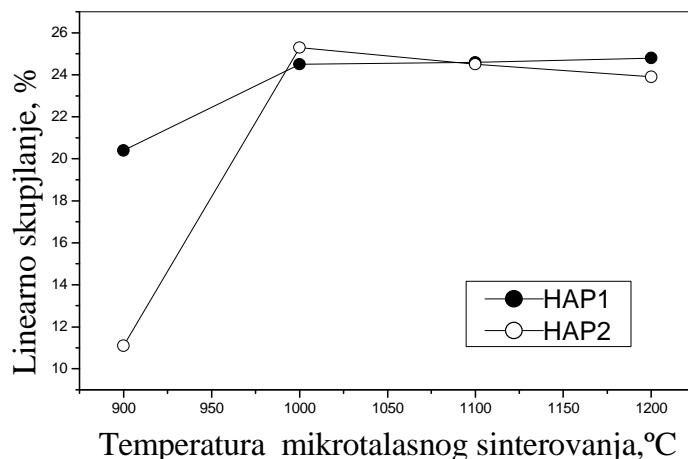


Slika 18.11. Veličina zrna HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

Brži rast zrna pri sinterovanju kalcijum deficitarnog hidroksiapatita je u skladu sa objavljenim rezultatima Raynauda sa saradnicima [173]. Prema njihovim tvrdnjama, povezivanje primarnih čestica HAP-a se tokom sinterovanja odvija u tri sukcesivna koraka: zaobljivanje čestica, formiranje mostova na mestima kontakata čestica i formiranja zrna stapanjem čestica, brzinom koja prema njihovim tvrdnjama raste sa smanjenjem odnosa Ca/P. Nastajanje vakancija odlaskom CO₂ iz strukture omogućuje olakšani transfer materije, i utiče na brži rast zrna u slučaju sinterovanja kalcijum deficitarnog HAP. Brži rast zrna sa smanjenjem odnosa Ca/P u polaznom prahu prema istim autorima je dovedeno u vezu sa intenzivnijim povezivanjem čestica na nižim temperaturama u slučaju kalcijum deficitarnog HAP-a, što se prema njihovim pretpostavkama dešava pre početka fazne transformacije HAP-a u TCP.

18.3. Rezultati određivanja gustine i relativnog linearnog skupljanja

Na slici 18.12 prikazano je relativno linearno skupljanje kompakata HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja. Sa dijagrama se uočava da je tokom sinterovanja kompakata HAP1 na 900 °C i 1000 °C skupljanje iznosilo 20,4 % odnosno 24,5 %, respektivno. Daljim povećanjem temperature sinterovanja do 1200 °C vrednost relativnog linearnog skupljanja se neznatno povećava, dok je ranije uočen značajan rast prosečne veličine zrna u okviru ovog intervala temperatura, sa nano na mikro nivo.



Slika 18.12. Relativno linearno skupljanje HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

Gustine monofaznih kompakata HAP1 sinterovanih na temperaturama od 900 °C do 1200 °C su prikazani u tabeli 18.1, a nalaze se u okviru intervala od 2,76 g/cm³ do 2,98 g/cm³.

Tabela 18.1. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP1 na 900 - 1200 °C

Temperatura sinterovanja, °C	Gustina kompakata, g/cm ³
900	2.76
1000	2.79
1100	2.90
1200	2.98

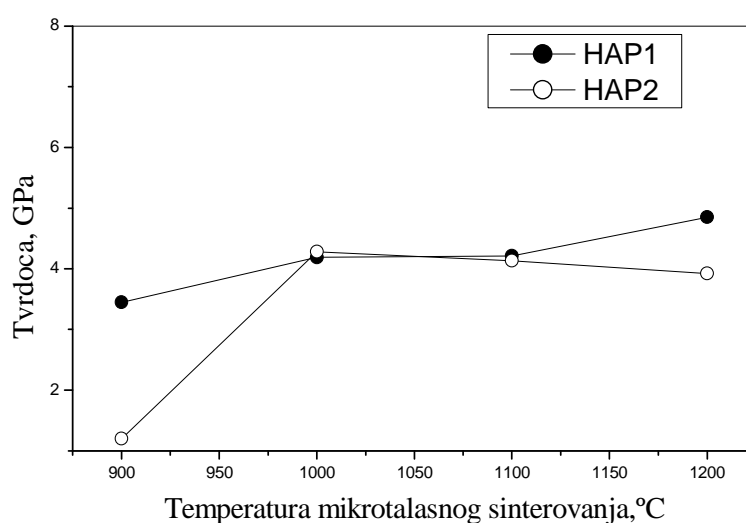
Tokom sinterovanja kompakta HAP2 vrednost relativnog linearnog skupljanja na 900 °C iznosi svega 11 %. Razlog ovako malom skupljanju materijala je loša sinterabilnost kalcijum deficitarnog HAP2 na temperaturi 900 °C, što se potvrđuje vrednošću gustine uzorka koja iznosi svega 1,60 g/cm³ (Tabela 18.2.). Povećanjem temperature sinterovanja na 1000 °C, vrednost relativnog linearnog skupljanja rapidno raste i dostiže maksimalnu vrednost od približno 25 %, dok sa daljim povećanjem temperature do 1200 °C neznatno opada. Gustina kompakata HAP2 sinterovanog na 1000 °C iznosi 2,60 g/cm³, dok sa daljim porastom temperature sinterovanja na 1200 °C i gustina biokeramičkih kompakata dobijenih sinterovanjem HAP2 opada do vrednosti 2,56 g/cm³. Smanjenje vrednosti relativnog linearnog skupljanja kao i smanjenje gustine bifaznog materijala sa porastom temperature sinterovanja iznad 1000 °C pripisuje faznoj transformaciji β -TCP (3,07 g/cm³) → α -TCP (2,84 g/cm³), koja je obično praćena ekspanzijom i nastankom faze sa manjom teorijskom gustinom.

Tabela 18.2. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP2 na 900 - 1200 °C

Temperatura sinterovanja, °C	Gustina kompakata, g/cm ³
900	1.60
1000	2.60
1100	2.58
1200	2.56

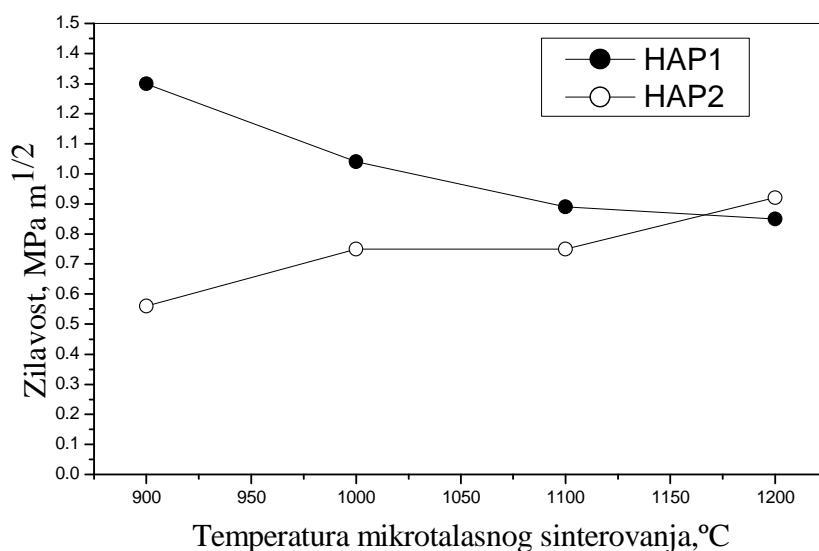
18.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem

Dijagram na slici 18.13 prikazuje zavisnost tvrdoće sinterovanih uzoraka HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja. U slučaju monofaznih HAP1 kompakata, povećanje temperature mikrotalasnog sinterovanja sa 900 °C na 1200 °C dovodi do relativno malog povećanje tvrdoće, sa 3,45 GPa na 4,85 GPa. U slučaju bifaznih HAP/TCP kompakata, maksimalna vrednost tvrdoće se postiže sinterovanjem na 1000 °C, i iznosi 4,28 GPa, što je i očekivano s obzirom na vrednosti pre svega relativnog linearnog skupljanja, a takođe i gustine. Daljim povećanjem temperature sinterovanja, vrednost tvrdoće bifaznih HAP/TCP kompakata opada. Smanjenje tvrdoće pripisuje se sa jedne strane ekspanziji izazvanom faznom transformacijom β -TCP \rightarrow α -TCP, koja inicira pojavu naprezanja u sinterovanom materijalu, a sa druge strane intenzivnom rastu zrna do vrednosti 4,7 μ m, pri sinterovanju HAP2 na 1200 °C [173, 198]. Generalno, ovi razlozi mogu biti uzrok manjih vrednosti tvrdoće bifaznih HAP/TCP materijala u poređenju sa monofaznim materijalima na bazi kalcijum-hidroksiapatita.



Slika 18.13. Tvrdoća uzoraka HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

Žilavost mikrotalasno sinterovanih monofaznih uzoraka kalcijum-hidroksiapatita i bifaznih HAP/TCP kompakata u funkciji temperature sinterovanja prikazana je na slici 18.14. Vrednost žilavosti bifaznog HAP/ β -TCP kompakta dobijenog na 900 °C iznosi 0,56 MPa m^{1/2}, dok povećanje temperature sinterovanja na 1000 °C utiče na povećanje žilavosti na 0,75 MPa m^{1/2}. Dalje povećanje temperature sinterovanja na 1200 °C iniciralo je delimičnu transformaciju β -TCP u α -TCP, koja je praćena povećanjem žilavosti do vrednosti 0,92 MPa m^{1/2}. Povećanje žilavosti sa povećanjem temperature sinterovanja objašnjava se većim stepenom sinterovanja na višim temperaturama, bez obzira što se gustina kompakata smanjuje sa povećanjem temperature. Gustina se smanjuje, kao što je već rečeno zbog fazne transformacije β -TCP (3,07 g/cm³) veće gustine u α -TCP (2,84 g/cm³) manje gustine. Drugi potencijalni razlog za povećanje žilavosti je veći udeo trikalcijum-fosfata u bifaznom sistemu, koji ima veću teorijsku vrednost žilavosti od kalcijum-hidroksiapatita (Teorijske vrednosti koeficijenata žilavosti: K_{ic} (HAP) = 0,9 MPa m^{1/2} i K_{ic} (TCP) = 1,3 MPa m^{1/2}).



Slika 18.14. Žilavost uzoraka HAP1 i HAP2 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

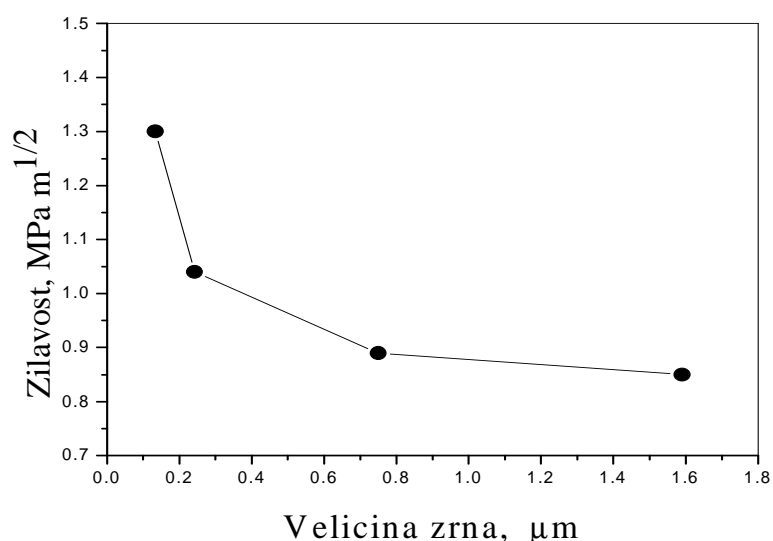
Uprkos većoj teorijskoj vrednosti koeficijenta žilavosti trikalcijum-fosfata, njegovo nastajanje tokom sinterovanja HAP ima negativan efekat na sam proces sinterovanja, kao i na mehanička svojstva sinterovanog materijala, što se vidi poređenjem vrednosti žilavosti bifaznih materijala sa monofaznim hidroksiapatitnim materijalima, dobijenih na 900 °C, 1000 °C i 1100 °C. Sam proces sinterovanja se prema pojedinim autorima usporava sa porastom udela TCP u bifaznoj smeši [55, 173, 232]. Prisustvo većeg udela TCP u HAP matriksu može biti limitirajući faktor za sinterovanje, što se dovodi u vezu sa difuzionim fenomenima i intenzivnijem povezivanjem primarnih čestica koje se odvija na nižim temperaturama od temperature fazne transformacije. Kao što je već navedeno, ovaj fenomen je povezan sa nastajanjem vakancija u strukturi prilikom sinterovanja kalcijum deficitarnog HAP, što omogućuje olakšani transfer materije direktno utičući na brži rast

zrna u bifaznom sistemu. Generalno posmatrano monofazni biokeramički materijali na bazi HAP-a imaju bolja mehanička svojstva u odnosu na bifazne HAP/TCP materijale, te je stoga odsustvo TCP u biokeramičkim materijalima, sa stanovišta mehanike poželjno.

Analizom dijagrama prikazanog na slici 18.14, uočava se da mikrotalasno sinterovani monofazni biokeramički materijali imaju veće vrednosti žilavosti u odnosu na bifazne biokeramičke materijale. Vrednosti koeficijenata žilavosti monofaznog HAP i bifaznog HAP/TCP kompakta sinterovanih na 900 °C iznose 1,30 MPa m^{1/2} i 0,56 MPa m^{1/2}, respektivno, dok vrednosti koeficijenata žilavosti kompakata sinterovanih na 1100 °C iznose 0,89 MPa m^{1/2} i 0,75 MPa m^{1/2}, respektivno. Uočava se da snižavanje temperature sinterovanja i smanjenje veličine zrna ka nano nivou utiče na povećanje razlike vrednosti žilavosti između monofaznih materijala na bazi HAP i bifaznih HAP/TCP biomaterijala, kao i da je ta razlika u slučaju materijala sinterovanih na 900 °C veća od 50 %.

Sa slike 18.14 se uočava da žilavost monofaznog HAP raste sa sniženjem temperature sinterovanja, što ide u prilog činjenici da smanjenja veličine zrna ima dominantan uticaj na porast žilavosti ovih materijala. Žilavost monofaznih HAP kompakata se sa smanjenjem temperature sinterovanja sa 1200 °C na 900 °C povećava od vrednosti 0,85 MPa m^{1/2} na 1,3 MPa m^{1/2} (Slika 18.14).

Na slici 18.15 je prikazana zavisnost žilavosti monofaznih materijala na bazi HAP u funkciji prosečne veličine zrna. HAP kompakti sinterovani na 1200 °C i 1100 °C, koji se odlikuju prosečnom vrednošću veličine zrna od 1,59 μm i 750 nm, imaju vrednosti koeficijenata žilavosti od 0,85 MPa m^{1/2} and 0,89 MPa m^{1/2}, respektivno.



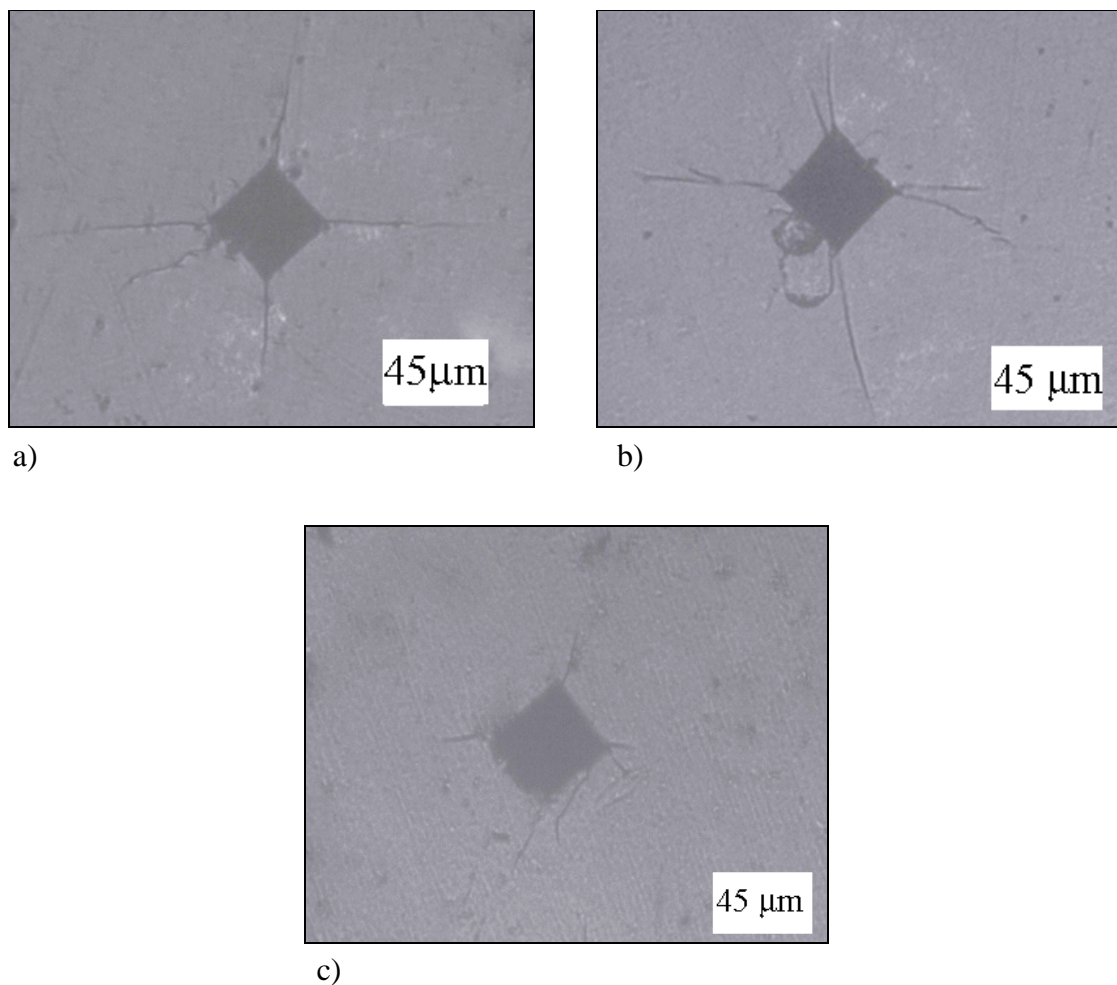
Slika 18.15. Žilavost uzoraka HAP1 u funkciji veličine zrna

Smanjenje prosečne veličine zrna na 240 nm inicira povećanje žilavosti do vrednosti od $1,04 \text{ MPa m}^{1/2}$, dok je maksimalna vrednost žilavosti od $1,30 \text{ MPa m}^{1/2}$, izmerena kod uzorka sa prosečnom veličinom zrna od 130 nm. Generalno, vrednosti koeficijenta žilavosti HAP koje se sreću u literaturi se kreću u intervalu od 0,60 do $1 \text{ MPa m}^{1/2}$ [181, 188, 198, 232]. Raynaud sa saradnicima [232] je dobio metodom toplog presovanjem materijale na bazi HAP koji su se odlikovali koeficijentom žilavosti od $1,0 \pm 0,1 \text{ MPa m}^{1/2}$. Benarjee sa saradnicima [188] je konvencionalnim sinterovanjem dobio biokeramiku na bazi HAP sa žilavošću od 0,6 do oko $1 \text{ MPa m}^{1/2}$. Vrednost žilavosti uzorka HAP dobijenog u ovom radu procesom mikrotalasnog sinterovanja na $900 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 15 min je za oko 30 % veća od prosečnih vrednosti objavljenih u literaturi za ovaj tip keramičkih materijala.

Tip loma kod mikrostrukturne keramike na bazi HAP, koja se dobija na visokim temperaturama konvencionalnim postupkom sinterovanja, je obično transgranularan, tj. pukotina se prostire duž zrna keramičkog materijala [26, 161, 171, 209]. Povećanje žilavosti sa smanjenjem veličine zrna se obično dešava kod biokeramike gde je mehanizam loma intergranularan, gde glavni doprinos povećanju otpora prostiranju pukotine pružaju granice zrna, kojih je znatno veći broj u slučaju nanostrukturnog materijala.

Mehanizam loma u slučaju monofaznih mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP u ovom radu je intergranularan, što je potvrđeno SEM snimcima površine lomova (18.3-18.6.), gde su uočljiva čitava zrna istrgnuta iz strukture. Snižanjem temperature i skraćivanjem vremena sinterovanja primenom mikrotalasa, limitiran je rast zrna, a samim tim je povećana apsorpcija energije pukotine na granicama zrna duž njenog prostiranja.

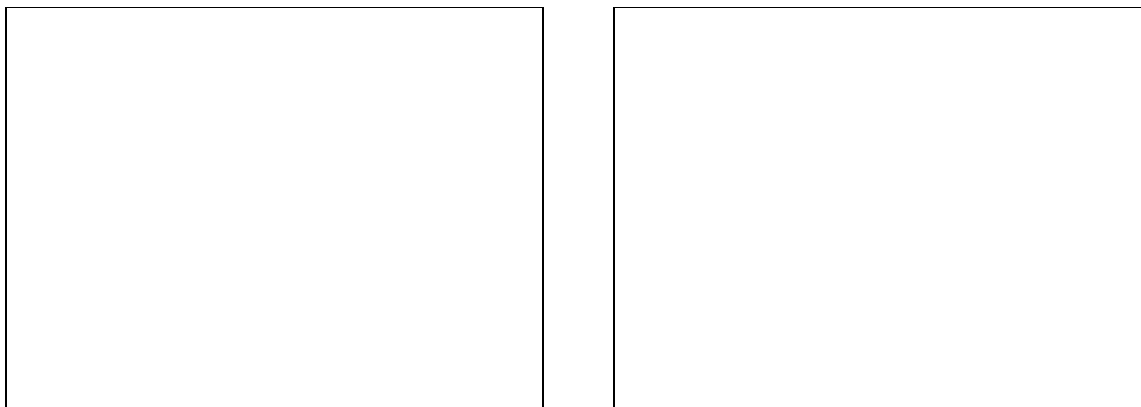
Na slikama 18.16 a, b i c prikazani su otisci Vickersove piramide na ispoliranoj površini uzoraka HAP1, mikrotalasno sinterovanih na temperaturama $1200 \text{ }^\circ\text{C}$, $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ i $900 \text{ }^\circ\text{C}$. Sa slika se jasno vidi da su nakon Vickersovog testa pukotine višestruko manje prilikom testiranja uzoraka sa nano dimenzijama zrna, u poređenju sa uzorcima koji sadrže zrna mikronskih dimenzija.



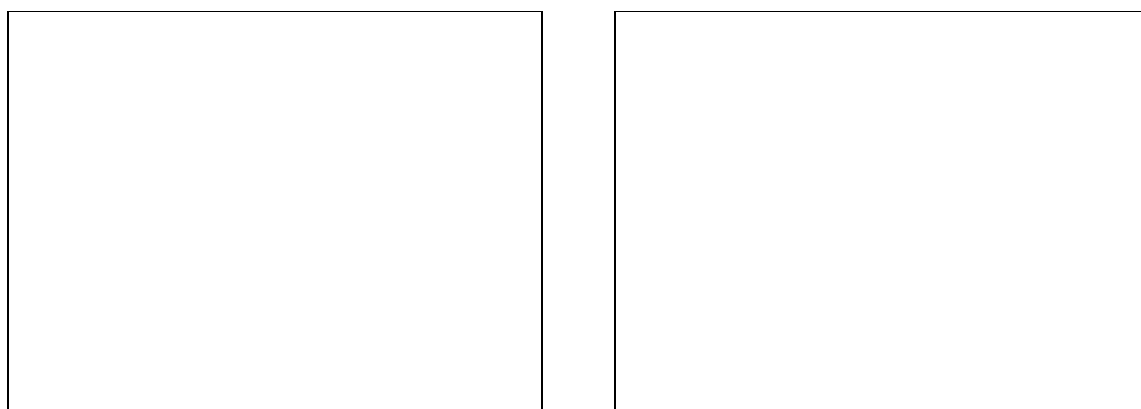
Slika 18.16. Mikrografije ispoliranih površina monofaznih HAP1 kompakata nakon Vickersovog testa, mikrotalasno sinterovanih na: a) 1200 °C b) 1100 °C i c) 900 °C

18.5. Uporedna analiza karakteristika gustih biokeramskih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem

Biomaterijali mikrotalasno sinterovani tokom 15 min, upoređeni su sa konvencionalno sinterovanim uzorcima tokom 2 h na istim temperaturama. Mikrografije na slikama 18.17 i 18.18 prikazuju mikrostrukture konvencionalno sinterovanih uzoraka HAP1 i HAP2 na 900 °C i 1000 °C tokom 2 h. Na osnovu slika se može zaključiti da se konvencionalnim sinterovanjem na 900 °C i 1000 °C, tokom osam puta dužeg vremena sinterovanja u odnosu na mikrotalasno sinterovanje, dobijaju uzorci koji se odlikuju neuniformnim i poroznim mikrostrukturama.



Slika 18.17. SEM mikrografije uzoraka HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovanih na 900 °C tokom 2 h



Slika 18.18. SEM mikrografije uzoraka HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovanih na 1000 °C tokom 2 h

Vrednosti relativnog linearnog skupljanja ovako dobijenih kompakata su za oko 2 % manje u poređenju sa mikrotalasno sinterovanim uzorcima na istim temperaturama tokom osam puta kraćeg vremenskog intervala. Poredeći konvencionalno sinterovane materijale sa mikrotalasno sinterovanim uzorcima, zaključeno je da se pri mikrotalasnom sinterovanju za višestruko kraće vreme sinterovanja dobijaju uniformnije i gušće mikrostrukture, koje potvrđuju pozitivan uticaj mikrotalasa na sinterovanje kalcijum-hidroksiapatita zahvaljujući homogenoj raspodeli energije mikrotalasa, koja obezbeđuje uniformno zagrevanje po celoj zapremini uzorka.

U tabeli 18.3 prikazane su mehaničke karakteristike mikrotalasno i konvencionalno sinterovanih uzoraka.

Tabela 18.3. *Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem*

Temperatura sinterovanja, °C	900	900	1000	1000
Vrsta sinterovanja	konvencionalno	mikrotalasno	konvencionalno	mikrotalasno
Vreme, min	120	15	120	15
Tvrdoća, GPa	2,75	3,45	3,95	4,19
Žilavost, MPa m ^{1/2}	0,77	1,30	0,89	1,04

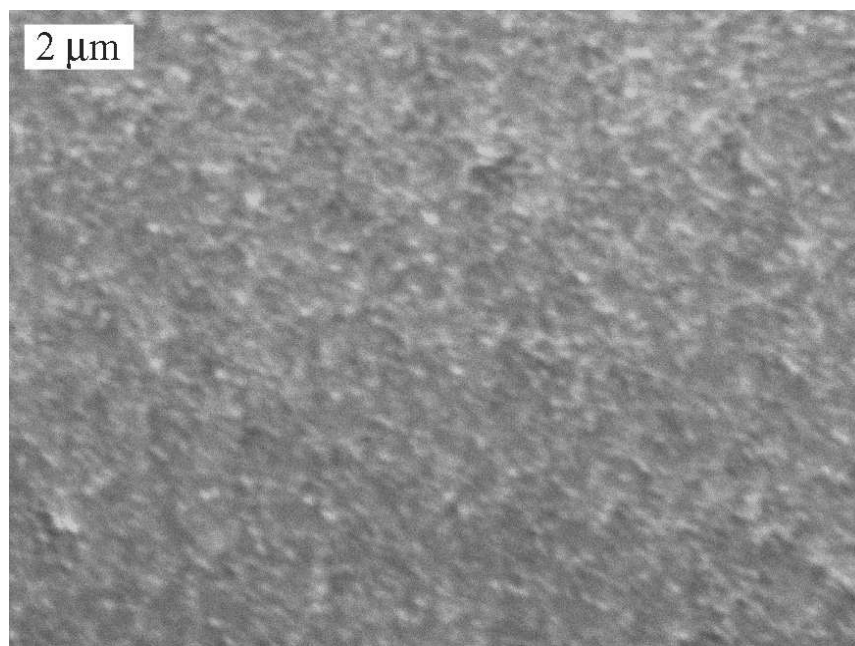
Uočava se da se mikrotalasno sinterovani uzorci tokom osam puta kraćeg vremena sinterovanja odlikuju znatno većim vrednostima i žilavosti i tvrdoće. Razlika u vrednostima mehaničkih karakteristika je veća kod uzoraka dobijenih na 900 °C, gde je vrednost žilavosti za oko 80 % veća kod uzorka dobijenog mikrotalasnim sinterovanjem.

18.6. Rezultati karakterizacije gustih biokeramičkih materijala izostatski ispresovanih i mikrotalasno sinterovanih

Sa ciljem da se dobiju materijali većih gustina i još boljih mehaničkih svojstava, prah HAP1 je izostatski ispresovan na 400 MPa, a zatim je mikrotalasno sinterovan na 850 °C, 900 °C i 1200 °C tokom 15 min. Mikrostrukture dobijenih kompakata prikazane su na slikama 18.19, 18.20 i 18.21. Sa SEM mikrografije prikazane na slici 18.19 se vidi da je sinterovanjem na 1200 °C tokom 15 min dobijena potpuno gusta mikrostruktura, sa zrnima veličine od 1 do 4 μm. Gustina ovog uzorka je veća od 99 % od teorijske vrednosti za HAP.

Snižavanjem temperature sinterovanja na 900 °C, dobijen je uzorak sa gustinom od 96 % od teorijske gustine i prosečnom veličinom zrna od približno 150 nm (Slika 18.20.). Na slici 18.21 prikazana je mikrostruktura uzorka sinterovanog tokom 15 min na 850 °C. Snizavanjem temperature sinterovanja na 850 °C gustina uzorka je smanjena na 93 %, dok prosečna vrednost veličine zrna ovog uzorka iznosi približno 100 nm (Slika 18.21.).

Slika 18.19. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min



Slika 18.20. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

Slika 18.21. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski ispresovanog na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 850 °C tokom 15 min

Uzorak HAP1 izostatski ispresovan na 400 MPa i mikrotalasno sinterovan na 1200 °C tokom 15 min, odlikuje se tvrdoćom od 5,0 GPa, dok koeficijent žilavosti ima vrednost 0,87 MPa m^{1/2} (Tabela 18.4.). Snižavanjem temperature sinterovanja na 900 °C, pri istom vremenu sinterovanja, žilavost materijala se povećava do vrednosti 1,34 MPa m^{1/2}, što je ujedno najveća vrednost žilavosti kod mikrotalasno sinterovanih materijala .

Tabela 18.4. Uslovi procesiranja i mehanička svojstva monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem

Temperatura sinterovanja, °C	1200	900	850
Vrsta sinterovanja	mikrotalasno	mikrotalasno	mikrotalasno
Vreme, min	15	15	15
Tvrdoća, GPa	5,0	4,75	3,5
Žilavost, MPa m ^{1/2}	0,87	1,34	1,17

Tvrdoća monofaznog HAP se neznatno smanjuje sa snižavanjem temperature sinterovanja na 900 °C, i njena vrednost iznosi 4,75 GPa. Poređenjem vrednosti žilavosti i tvrdoće ovih uzoraka sa uniaksijalno presovanim, a zatim mikrotalasno sinterovanim uzorcima pri istim uslovima, može se zaključiti da se izostatskim presovanjem na 400 MPa pre sinterovanja postiže blago povećanje žilavosti, dok se tvrdoća materijala značajno povećava, približno za 20 %. Daljim snižavanjem temperature sinterovanja na 850 °C, vrednost tvrdoće se smanjuje na 3,5 GPa, dok žilavost pada do vrednost od 1,17 MPa m^{1/2}, a razlog je povećanje poroznosti usled slabije denzifikacije materijala tokom sinterovanja.

19. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem

Procesiranjem biokeramičkih materijala tehnikom spark plazma sinterovanja imalo se za cilj da se primenom električnih impulsa, proizvedenih pri naponu od 4 V i jačini struje od 1500 A, snizi temperatura sinterovanja i višestruko skрати vreme sinterovanja. Kao i u slučaju mikrotalasnog sinterovanja na taj način je moguće limitirati rast zrna, poboljšati karakteristike sinterovanog materijala i dovesti do velike uštede energije. Sa ciljem da se dobiju gusti biokeramički nanostrukturni materijali, monofazni na bazi kalcijum-hidroksiapatita i bifazni na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, sa nano dimenzijama zrna, polazni prahovi HAP1 i HAP2 su sinterovani na temperaturama od 900-1200 °C tokom 5-10 min u peći za spark plazma sinterovanje. Karakterizacijom je utvrđen uticaj parametara spark plazma sinterovanja na mikrostrukturu, fazni sastav, gustinu i mehanička svojstva dobijenih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata.

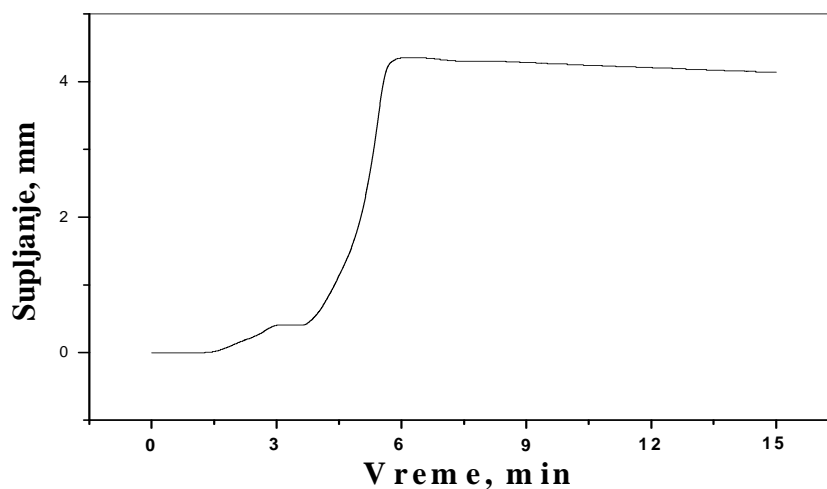
19.1. Rezultati određivanja gustine i skupljanja

U tabeli 19.1 prikazane su vrednosti gustina uzoraka HAP1 dobijenih spark plazma sinterovanjem na 900 °C, 1000 °C i 1200 °C tokom 10 min. S obzirom na teorijsku vrednost gustine kalcijum-hidroksiapatita koja iznosi 3,16 g/cm³, može se uočiti da su postupkom spark plazma sinterovanja dobijeni uzorci gustina bliskih teorijskoj vrednosti. Najveću gustinu 3,12 g/cm³ tj. 98,5 % TG je imao kompakt dobijen sinterovanjem na 1000 °C. Manja gustina uzorka sinterovanog na 1200 °C se može objasniti izuzetno velikim rastom zrna (videće se kasnije na SEM mikrografiji uzorka) i usled toga delimičnim pucanjem uzorka, pa se može zaključiti da je 1200 °C previsoka temperatura za sinterovanje praha HAP1 spark plazma tehnikom. Sinterovanjem na 900 °C gustine uzoraka su bile nešto manje, približno 90 % od teorijske vrednosti za HAP.

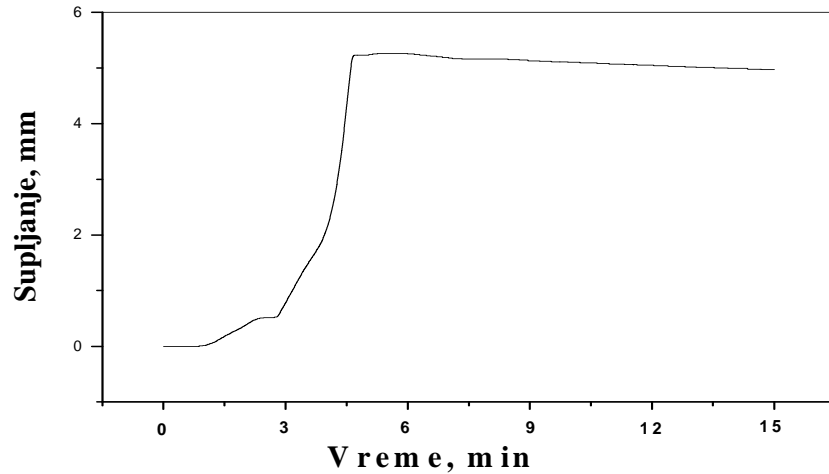
Tabela 19.1. Vrednosti gustina spark plazma sinterovanih kompakata HAP1 na 900 - 1200 °C

Temperatura sinterovanja, °C	Gustina kompakata, g/cm ³
900	2,85
1000	3,12
1200	3,03

Skupljanje uzoraka tokom procesa sinterovanja prikazano je na slikama 19.1 - 19.3. U svim slučajevima se postiže maksimalna vrednost skupljanja neposredno nakon postizanja temperature sinterovanja (približno 5 min od početka zagrevanja sistema). Najveće skupljanje se uočava u slučaju sinterovanja na 1000 °C, što je i očekivano s obzirom na vrednosti gustina iz tabele 19.1. Nakon postizanja maksimalne vrednosti skupljanja, uzorci se neznatno šire tokom zadržavanja na temperaturi sinterovanja.

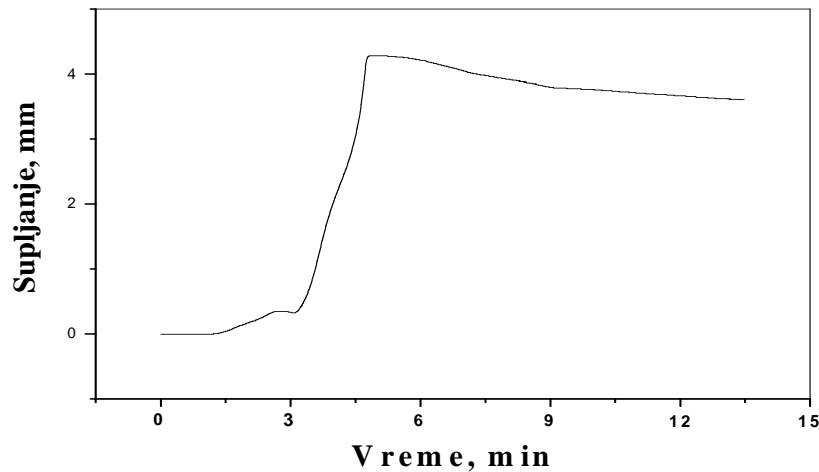


Slika 19.1. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plazma sinterovanja na 900 °C tokom 10 min



Slika 19.2. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plasma sinterovanja na 1000 °C tokom 10 min

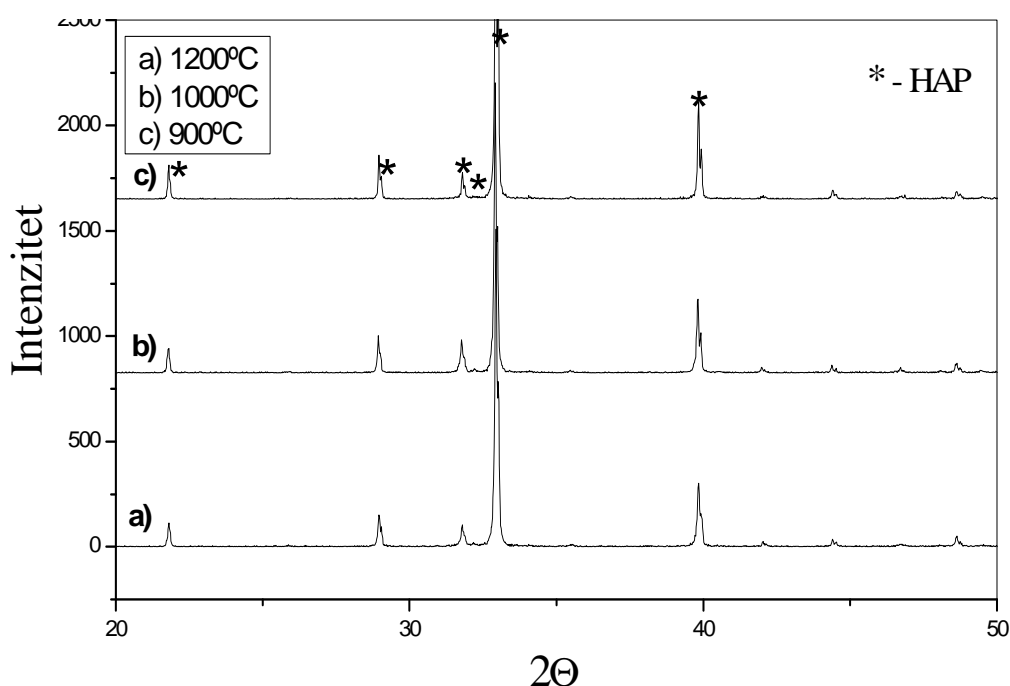
Uočena ekspanzija se intenzivira sa povećanjem temperature sinterovanja: najmanja na 900 °C, nešto viša na 1000 °C, a značajno viša na 1200 °C, što se može dovesti u vezu sa rastom zrna, koje je u slučaju SPS HAP1 znatno intenzivnije na visokim temperaturama. Poređenjem krivih skupljanja pri sinterovanju na 900 °C i 1000 °C, uočava se nešto manja ekspanziju na 900 °C, ali je skupljanje na 1000 °C dosta veće, što rezultira većom gustinom kompakta sinterovanog na 1000 °C.



Slika 19.3. Skupljanje u funkciji vremena tokom procesa spark plasma sinterovanja na 1200 °C tokom 10 min

19.2. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom

Rezultati rendgenske difrakcione analize uzoraka kalcijum-hidroksiapatita, HAP1, sinterovanog spark plazma tehnikom na 900 °C, 1000 °C i 1200 °C su prikazani na slici 19.4. Analizom difraktograma u slučaju sva tri uzoraka identifikovani su isključivo pikovi karakteristični za kalcijum-hidroksiapatit. Odsustvo pikova karakterističnih za trikalcijum-fosfat u svim slučajevima pokazuje da nije došlo do fazne transformacije kalcijum-hidroksiapatita, te se može se sa sigurnošću tvrditi da je spark plazma sinterovanjem praha HAP1 došlo do formiranja monofazne biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita. Oblik pikova ukazuje na vrlo visok stepen kristaličnosti dobijenog biomaterijala.

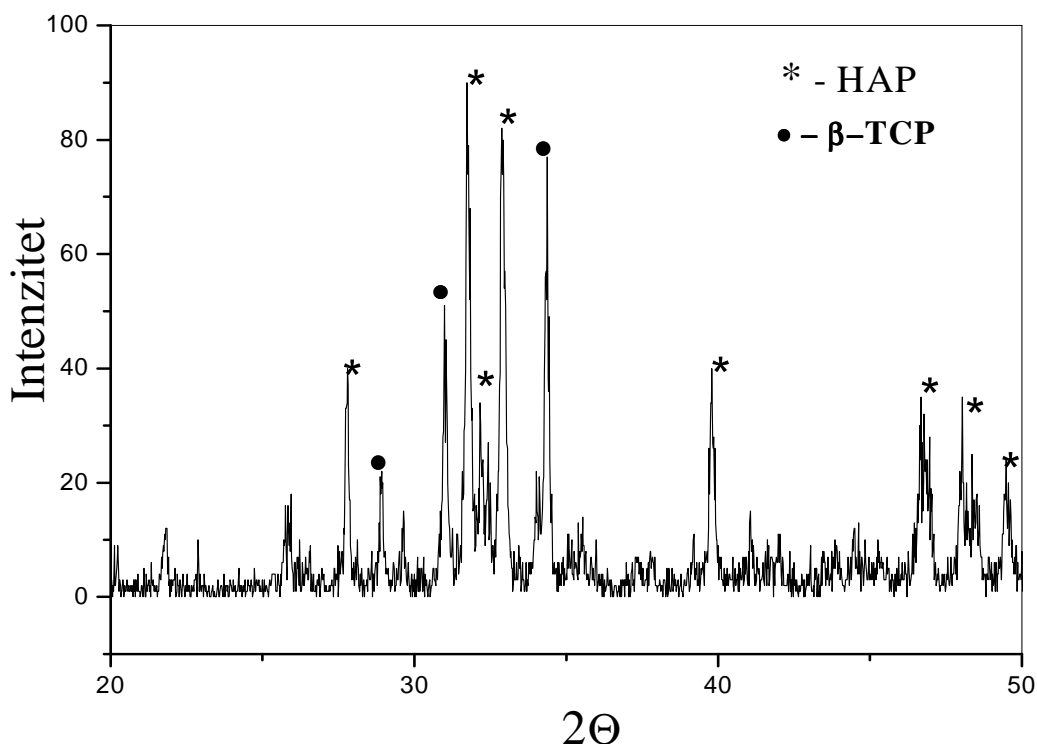


Slika 19.4. Rendgenska difrakciona analiza materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem HAP1 na 900 °C, 1000 °C i 1200 °C tokom 10 min

Poređenjem oblika i odnosa visina pikova uzoraka spark plazma sinterovanih sa pikovima mikrotalasno sinterovanih uzoraka na istim temperaturama (Slika 18.1), uočava se da je pri spark plazma sinterovanju praha HAP1 došlo do preferentne kristalizacije usled dejstva pritiska tokom sinterovanja. Slična pojava bi trebala da se uoči prilikom rendgenske difrakcione analize toplo presovanih uzoraka HAP1.

Na slici 19.5 prikazan je XRD dijagram uzorka HAP2 dobijenog spark plazma sinterovanjem na 900 °C tokom 10 min. Analizom ovog dijagrama uočava se da sinterovanjem kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita spark plazma tehnikom, kao i

u slučaju mikrotalasnog sinterovanja, na 900 °C dobija bifazni biokeramički materijal na bazi kalcijum-hidroksiapatita i β -trikalcijum-fosfata.



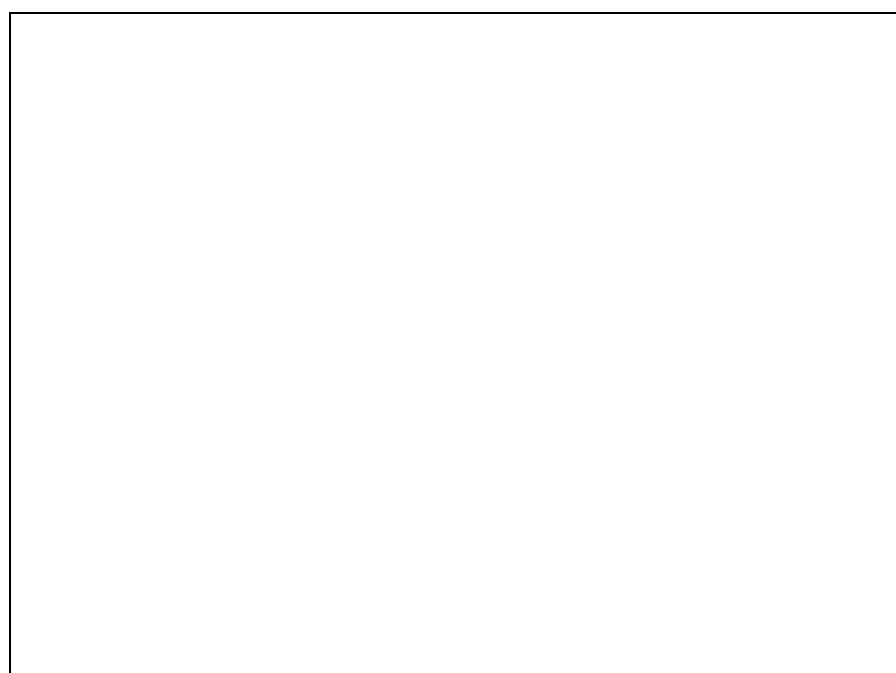
Slika 19.5. Rendgenska difrakciona analiza materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem HAP2 na 900 °C tokom 10 min

19.3. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Mikrostruktura uzorka HAP1, spark plazma sinterovanog na 1200 °C tokom 10 min, prikazana na slici 19.6, pokazuje da je sinterovanjem pri ovim uslovima došlo do znatnog rasta zrna, a uočene su i pukotine koje su verovatno posledica velike brzine zagrevanja i visokih temperatura sinterovanja. Smanjenjem vremena zadržavanja uzorka na 1200 °C na 5 min, dobijen je uzorak čija je mikrostruktura prikazana na slici 19.7. Prikazani uzorak se odlikuje gustom mikrostrukturom, ali je veličina zrna izuzetno velika i iznosi približno 20 μm.



Slika 19.6. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1200 °C tokom 10 min



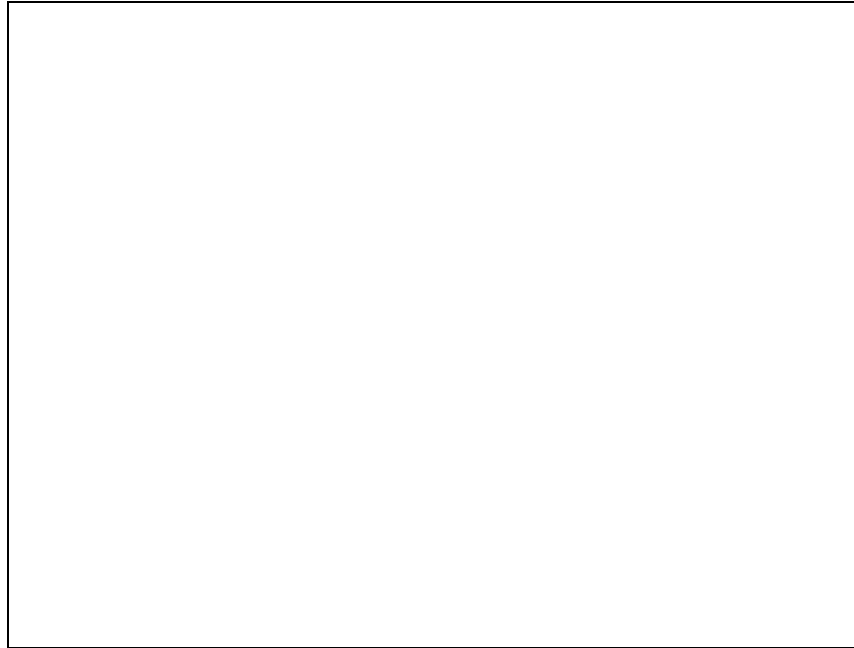
Slika 19.7. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1200 °C tokom 5 min

Da bi se pronašli parametri procesiranja spark plazma sinterovanjem koji će rezultirati gustim materijalom, sa nanometarskom prosečnom veličinom zrna, temperatura sinterovanja je dalje snižavana, najpre na 1000 °C, a zatim na 900 °C, a morfologija ovako dobijenih uzoraka prikazana je na slikama 19.8-19.10. Uzorak sinterovan na 1000 °C tokom 10 min odlikuje se izuzetno gustom mikrostrukturuom, što je u skladu sa izmerenom gustinom prikazanom u tabeli 19.1, dok se veličina zrna kreće u intervalu od 1-7 µm. Analizom slike 19.8. može se uočiti da je na 1000 °C došlo do formiranja prilično neuniformne strukture i široke raspodele veličina zrna, što je ukazalo na potrebu da se temperatura sinterovanja smanji na 900 °C.



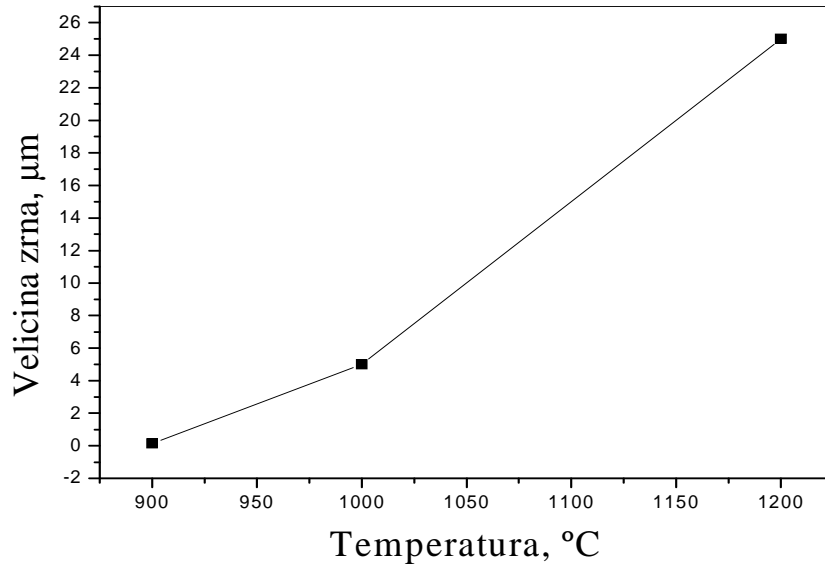
Slika 19.8. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 1000 °C tokom 10 min

Uzorak sinterovan na 900 °C tokom 10 min, prikazan na slici 19.9, odlikuje se relativno gustom mikrostrukturuom i prosečnom veličinom zrna od 250 nm. Skraćivanjem vremena sinterovanja na 5 min, na temperaturi sinterovanja od 900 °C veličina zrna je smanjena na 150 nm. Uočava se da je prosečna veličina zrna uzoraka sinterovanih na 900 °C u odnosu na uzorak sinterovan na 1000 °C manja okvirno dvadeset do trideset puta (Slika 19.11.), sto može da bude bitan preduslov za poboljšanje mehaničkih svojstava i pored nešto manje vrednosti gustine (Tabela 19.1.).



Slika 19.9. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 10 min

Slika 19.10. SEM mikrografija uzorka HAP1 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 5 min



Slika 19.11. Veličina zrna HAP1 u funkciji temperature spark plazma sinterovanja

Kako je sinterovanjem na 900 °C dobijen monofazni materijal uniformne strukture sa najmanjim zrnima, kalcijum deficitarni HAP2 je sinterovan pri istim uslovima u peći za spark plazma sinterovanje, sa ciljem da se istom tehnikom dobije nanostrukturni bifazni biokeramički kompakt. Mikrostruktura preloma ovako dobijenog bifaznog uzorka prikazana je na slici 19.12, a sa nje se uočava gusta mikrostruktura (gustina uzorka iznosi 3,09 g/cm³) sa prosečnom veličinom zrna od oko 800 nm. Veća prosečna vrednost veličine zrna u odnosu na uzorak HAP1 sinterovan pri istim uslovima objašnjava se faznom transformacijom HAP u β -TCP, što je u prethodnom poglavlju primećeno i detaljnije objašnjeno prilikom mikrotalasnog sinterovanja praha HAP2. Bifazni kompakt dobijen spark plazma sinterovanjem na 900 °C karakteriše se pet puta većim zrnom u odnosu na uzorak pri čijem sinterovanju nije došlo do fazne transformacije. Karakterizacijom mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 i HAP2 je takođe utvrđena veća vrednost prosečne veličine zrna u slučaju bifaznih kompakata, ali je razlika u dimenzijama zrna bila znatno manja (Slika 18.11.).



Slika 19.12. SEM mikrografija uzorka HAP2 spark plazma sinterovanog na 900 °C tokom 10 min

Na osnovu ispitivanja uticaja parametara procesiranja na mikrostrukturne i fazne karakteristike spark plazma sinterovanih biokeramičkih materijala, može se zaključiti da se ovom tehnikom sinterovanja mogu dobiti gusti nanostrukturni materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i bifazni na bazi kalcijum-hidroksiapatita i β -trikalcijum-fosfata, koji se u odnosu na konvencionalno sinterovane materijale odlikuju većim gustinama i višestruko manjim zrnom. Monofazni materijali dobijeni SPS HAP1 na 900 °C imaju zrna sličnih dimenzija kao i kod materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem na istoj temperaturi, ali imaju i nešto veće gustine.

19.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem

Mehaničke karakteristike monofaznih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem pri različitim uslovima procesiranja prikazani su u tabeli 19.2. Tvrdća i žilavost uzoraka sinterovanih na 1200 °C tokom 5 i 10 min nisu prikazani u tabeli, usled vrlo niskih vrednosti tvrdoće (manjih od 1 GPa) i nemogućnosti izazivanja pukotine u pravcu dijagonale otiska utiskivanjem Vickersovog indenta. Uzorak HAP1 sinterovan na 1000 °C tokom 10 min, sa mikronskom veličinom zrna, odlikuje se tvrdoćom od 2,30 GPa, dok koeficijent žilavosti ima vrednost od 0,8 MPa m^{1/2}. Snižavanjem temperature na 900 °C pri istom vremenu sinterovanja rastu i tvrdoća i žilavost, do vrednosti 3,15 GPa i 0,93 MPa m^{1/2}, respektivno. Skraćivanjem vremena sinterovanja na 5 min, vrednost tvrdoće raste na 4,75 GPa, dok žilavost dostiže vrednost od 1,00 MPa m^{1/2}.

Tabela 19.2. *Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike monofaznih HAP biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem*

Temperatura sinterovanja, °C	Vreme, min	Tvrdoća, GPa	Žilavost, MPa m ^{1/2}
1000	10	2,30	0,80
900	10	3,15	0,93
900	5	4,75	1,00

Uočava se da se i žilavost i tvrdoća monofaznih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem povećavaju sa smanjenjem veličine zrna. Poređenjem vrednosti mehaničkih parametara spark plazma sinterovanog uzoraka HAP1 na 900 °C i 1000 °C sa mikrotalasno sinterovanim uzorcima na istoj temperaturi, uočava se da mikrotalasno sinterovani uzorci, dobijeni na istim temperaturama, imaju veće vrednosti i žilavosti i tvrdoće. S obzirom na činjenicu da je kalcijum-hidroksiapatit relativno loš provodnik električnog impulsa, može se pretpostaviti da bi dodavanje pojedinih nanostrukturnih provodnih materijala u određenom procentu, u velikoj meri doprineli denzifikaciji matriksa sačinjenog od stehiometrijskog hidroksiapatita HAP1 i time uticali na bolje karakteristike novonastalog kompozitnog materijala.

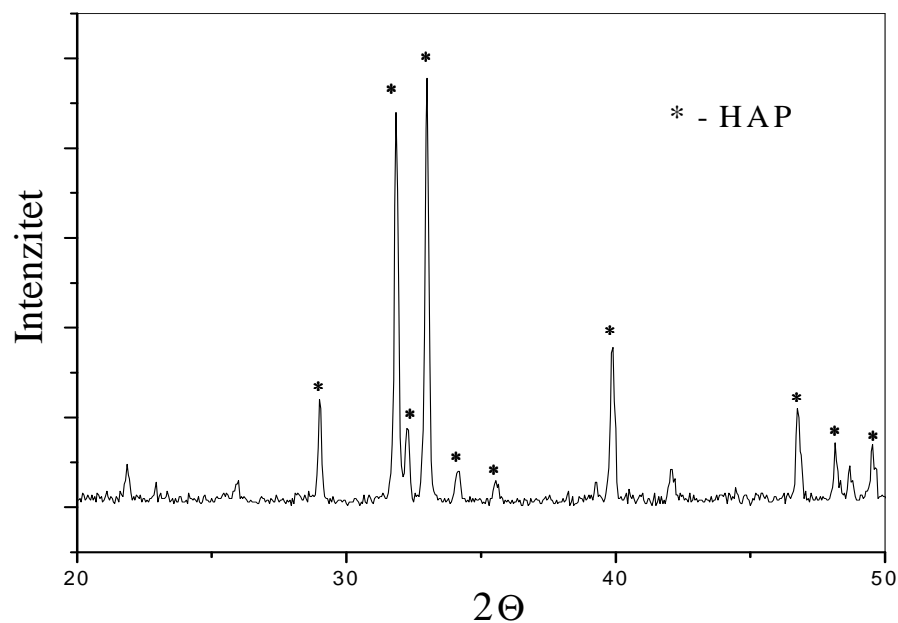
20. Procesiranje i svojstva gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem

Toplim presovanjem kao jednom od metoda sinterovanja uz pomoć pritiska na visokim temperaturama, kojom se u praksi postižu velike gustine keramičkih materijala, u ovom radu dobijeni su materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata. Precipitaciono sintetisani prahovi kalcijum-hidroksiapatita HAP1 i HAP2 su najpre izostatski ispresovani na 400 MPa, nakon čega su toplo presovani na 950 °C i 1000 °C varirajući vreme sinterovanja, u struji argona, pri pritisku od 20 MPa, a rezultati karakterizacije ovako dobijenih materijala su prikazani u ovom poglavlju.

20.1. Rezultati određivanja faznog sastava i mikrostrukturnih karakteristika biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem

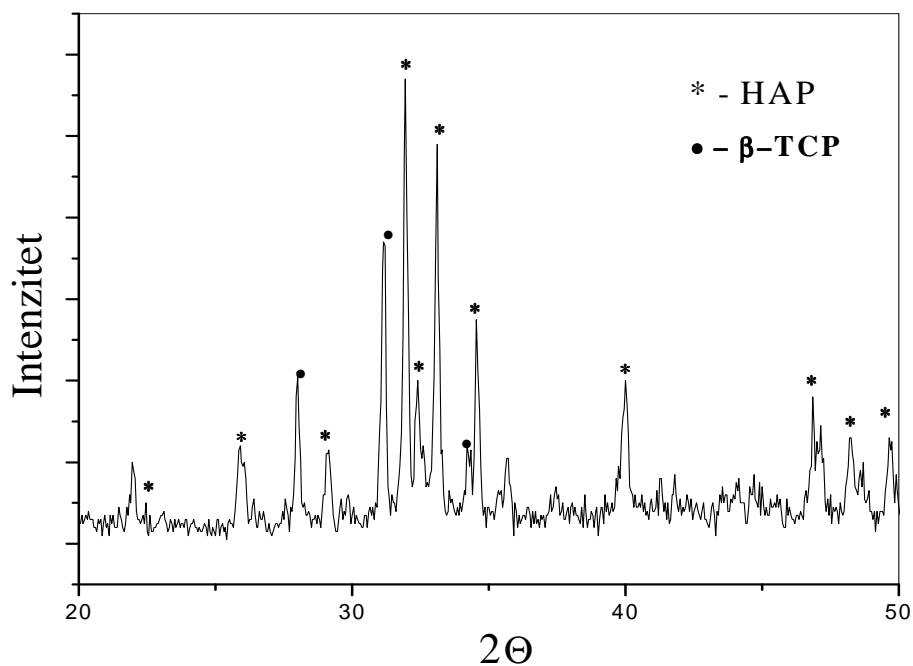
Na slici 20.1 su prikazani rezultati rendgenske difrakcione analize toplo presovanog kompakta stehiometrijskog kalcijum-hidroksiapatita, HAP1 na 1000 °C tokom 2 h, što predstavlja maksimalnu temperaturu i najduže vreme toplog presovanja primenjeno u ovom radu. Analizom pikova difraktograma je utvrđeno da pri ovim uslovima nije došlo do fazne transformacije kalcijum-hidroksiapatita u trikalcijum-fosfat. Stoga se može se sa sigurnošću tvrditi da je toplim presovanjem praha HAP1 došlo do formiranja monofazne biokeramike na bazi kalcijum-hidroksiapatita, kao i u slučaju mikrotalasnog sinterovanja i spark plazma sinterovanja istog praha.

Oblik pikova ukazuje na vrlo visok stepen kristaličnosti dobijenog biomaterijala, kao i u slučaju spark plazma sinterovanih kompakata HAP1 (Slika 19.4.). Poređenjem oblika i odnosa veličina pikova toplo presovanog uzorka sa pikovima spark plazma sinterovanog uzorka na istoj temperaturi, uočava se da je i u slučaju toplo presovanih kompakata HAP1 došlo do preferentne kristalizacije usled dejstva pritiska tokom procesiranja.



Slika 20.1. XRD dijagram uzoraka HAP1 toplo presovanog 2 h na 1000°C u struji argona

XRD dijagram uzoraka HAP2 toplo presovanog na 1000 °C tokom 2 h, prikazan je na slici 20.2. Analizom ovog dijagrama se uočava da toplim presovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita, slično kao u slučaju mikrotalasnog sinterovanja i spark plazma sinterovanja, dobija bifazni kompakt na bazi kalcijum-hidroksiapatita i β -trikalcijum-fosfata, pri čemu je kalcijum-hidroksiapatit dominantna kristalna faza.

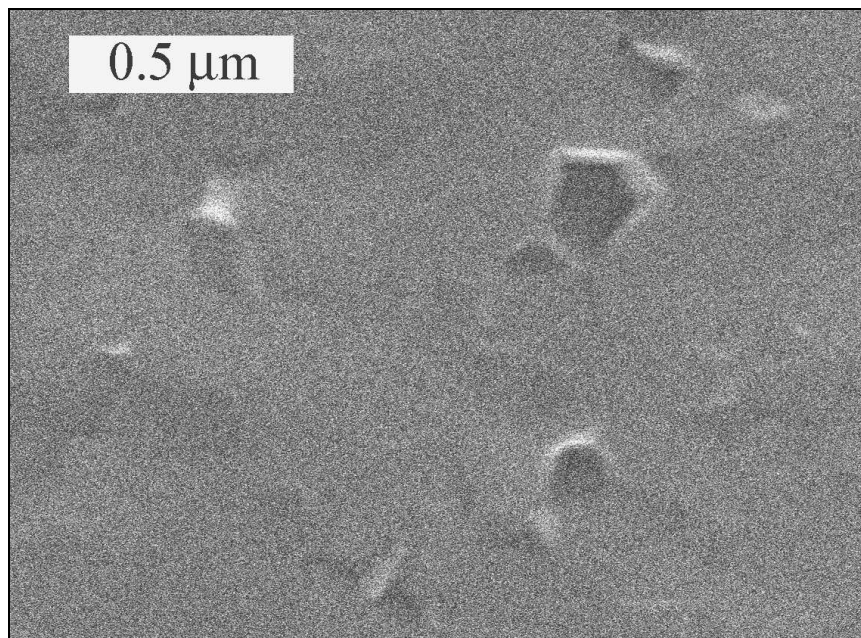


Slika 20.2. XRD dijagram uzoraka HAP2 toplo presovanog 2 h na 1000°C u struji argona

Na slikama 20.3 i 20.4 prikazane su mikrostrukture površine lomova uzoraka HAP1 tople presovanih na 1000 °C tokom 2 h i 1h, respektivno. Sa mikrografija se uočavaju izuzetno guste mikrostrukture u oba slučaja, a na osnovu dimenzija istrgnutih zrna iz strukture uočava se da su zrna nano dimenzija.

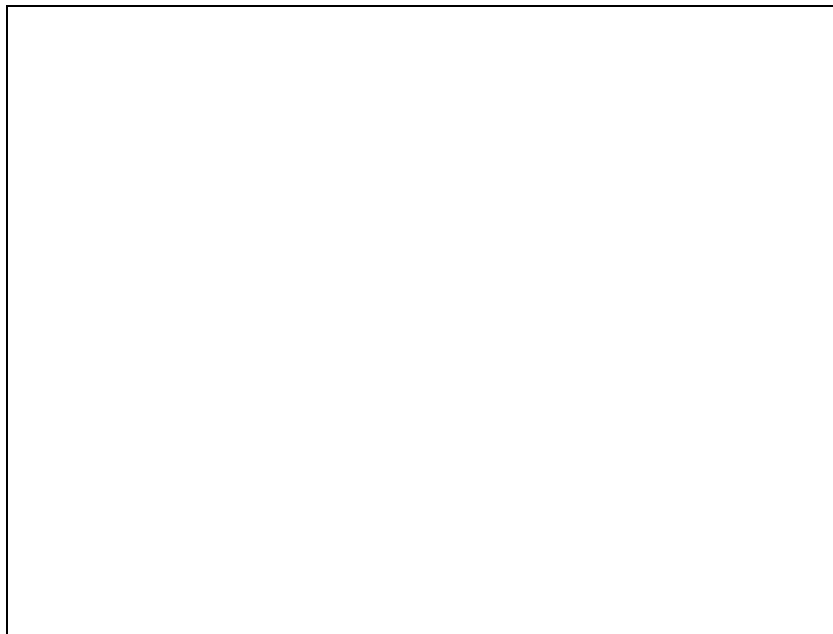


Slika 20.3. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i tople presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 2 h



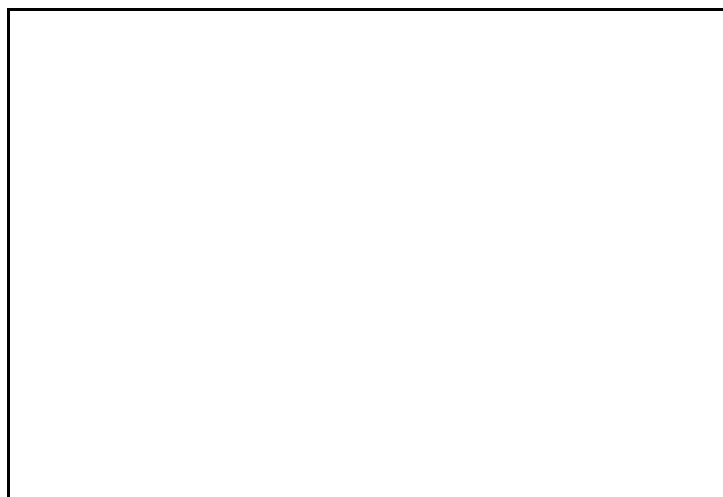
Slika 20.4. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i tople presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 1 h

Toplim presovanjem na 950 °C tokom 2 h dobijen je takođe izuzetno gust kompakt, čija je nanostruktura prikazana na slici 20.5. Na slici 20.5 se mogu uočiti zrna istrgnuta iz strukture čija je dimenzija manja od 100 nm.

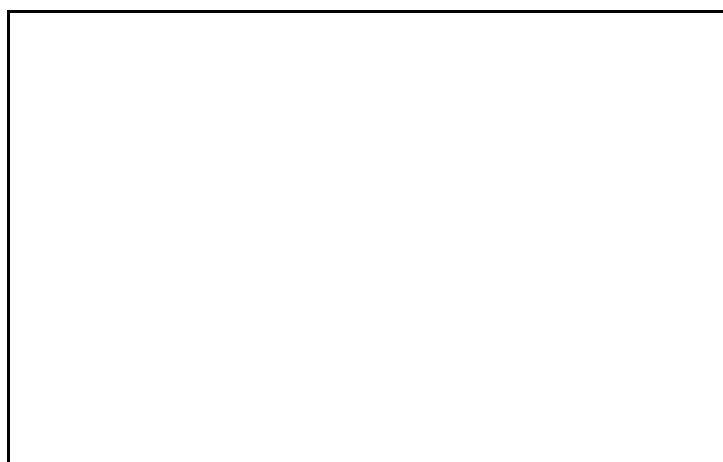


Slika 20.5. SEM mikrografija uzorka HAP1 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 950 °C tokom 2 h

Na slikama 20.3-20.5 se uočava da uzorci sadrže zrna nano dimenzija. Raspodela veličina zrna toplo presovanih uzoraka je određena korišćenjem softvera Image Pro Plus Program, pri čemu je više od 100 zrna uzeto u obzir pri proračunu, a prikazana je histogramski. Rezultati raspodele veličine zrna su prikazani na slikama 20.6-20.8. Na slici 20.6 je prikazana raspodela veličina zrna uzorka HAP1 toplo presovanog na 1000 °C tokom 2 h, a sa histograma se uočava da se najveći broj zrna nalazi u intervalu veličina od 200-700 nm. Prosečna vrednost veličine zrna ovog uzorka iznosi 380 nm.

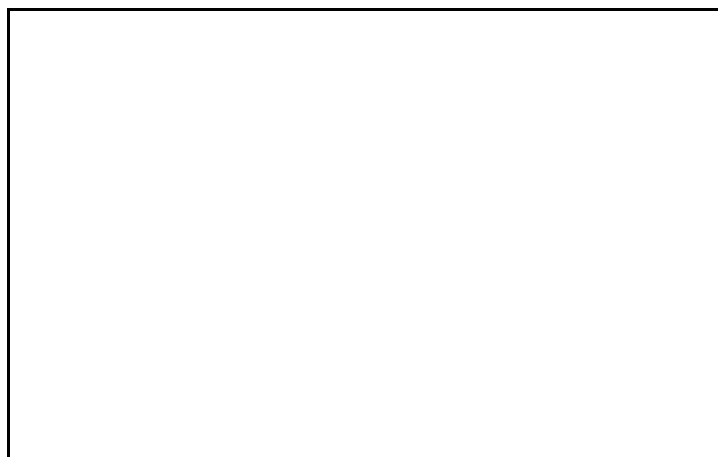


Slika 20.6. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 1000 °C tokom 2 h



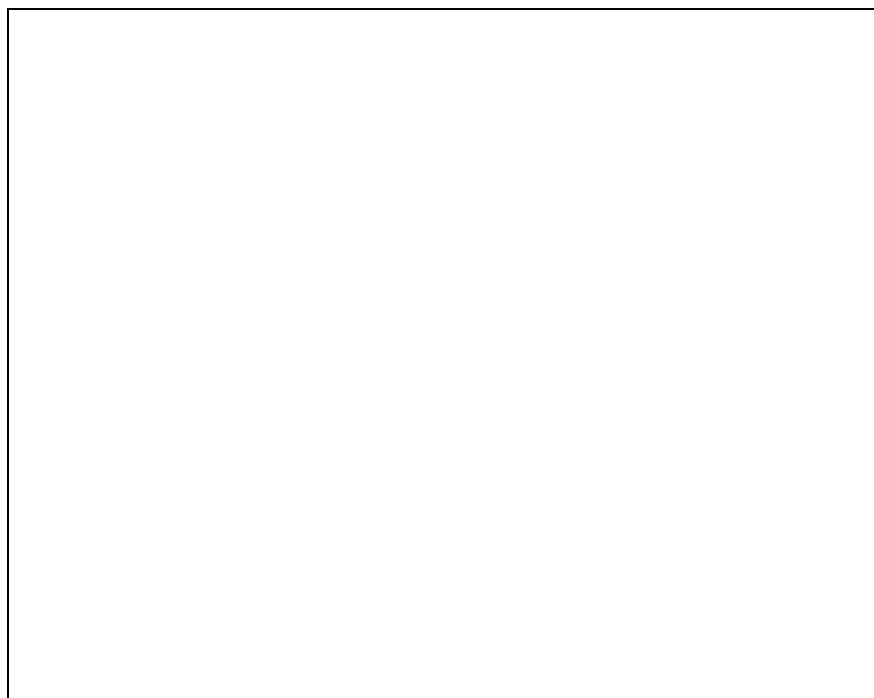
Slika 20.7. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 1000 °C tokom 1 h

Smanjenjem vremena zadržavanja uzorka na temperaturi od 1000 °C na 1 h, prosečna vrednost veličine zrna se smanjuje na 140 nm. Sa histograma na slici 20.7 može se primetiti da je raspodela veličina zrna znatno uža, te da se veličine zrna nalaze u intervalu od 100-300 nm. Toplim presovanjem hidroksiapatita HAP1 na 950 °C tokom 2 h dobijena su zrna uglavnom manjih dimenzija od 100 nm, a prosečna vrednost veličine zrna iznosi 50 nm (Slika 20.8, tabela 20.1).

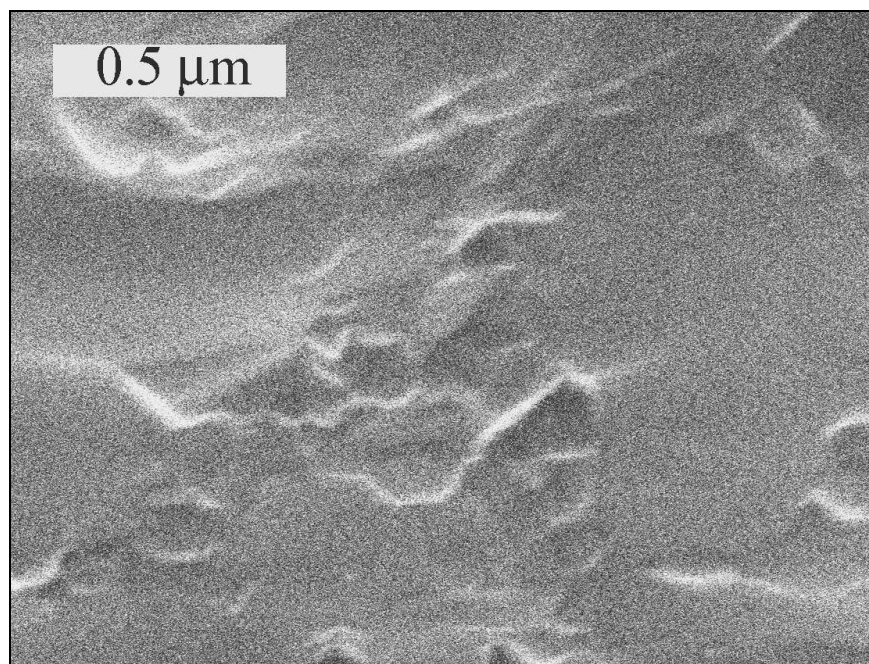


Slika 20.8. Raspodela veličina zrna kompakta HAP1 toplo presovanog na 950 °C tokom 2 h

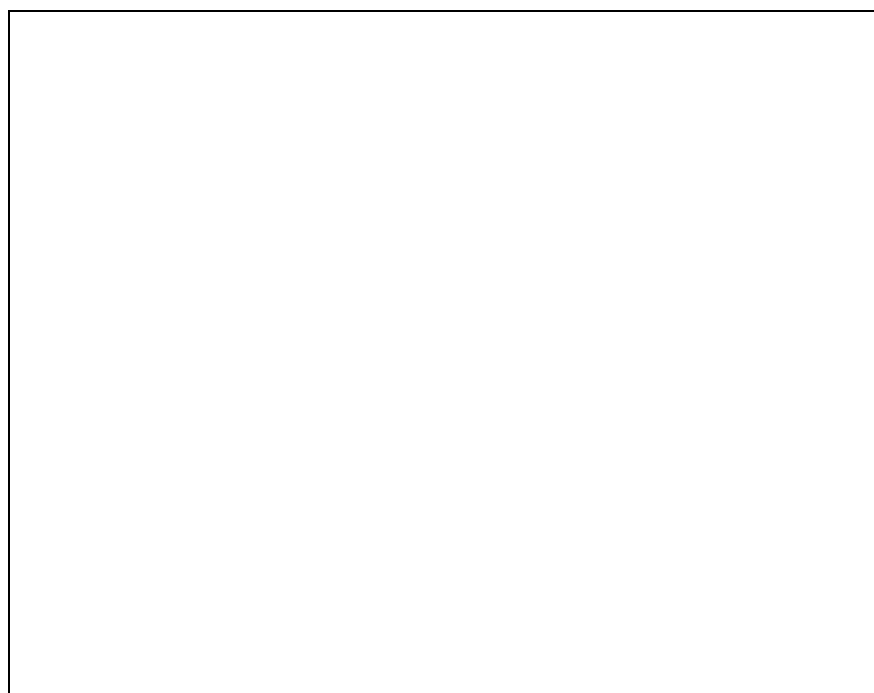
Na slikama 20.9 i 20.10 su prikazane SEM mikrografije bifaznih kompakata dobijenih toplim presovanjem praha HAP2 na 1000 °C tokom 2 h i 1 h. Dobijeni uzorci se odlikuju gustim mikrostrukturama i prosečnom veličinom zrna od 400 nm u slučaju uzorka procesiranog tokom 2h, dok prosečna veličina zrna uzorka dobijenog tokom 1 h iznosi 170 nm. Smanjenjem temperature toplog presovanja na 950 °C, veličina zrna bifaznog HAP2 kompakta je smanjena na 80 nm (Slika 20.11).



Slika 20.9. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 2 h



Slika 20.10. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 1000 °C tokom 1 h



Slika 20.11. SEM mikrografija uzorka HAP2 izostatski presovanog na 400 MPa, i toplo presovanog na 20 MPa i 950 °C tokom 2 h

U tabeli 20.1, uz prosečne vrednosti veličine zrna, prikazane su i gustine toplo presovanih uzoraka HAP1 i HAP2. Vrednosti gustina translucenčnih HAP1 biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem se kreću u intervalu od 2,93 - 3,06 g/cm³, što predstavlja 93-97 % od teorijske vrednosti za kalcijum-hidroksiapatit.

Tabela 20.1. Veličina zrna i gustina presovanih uzoraka HAP1 and HAP2

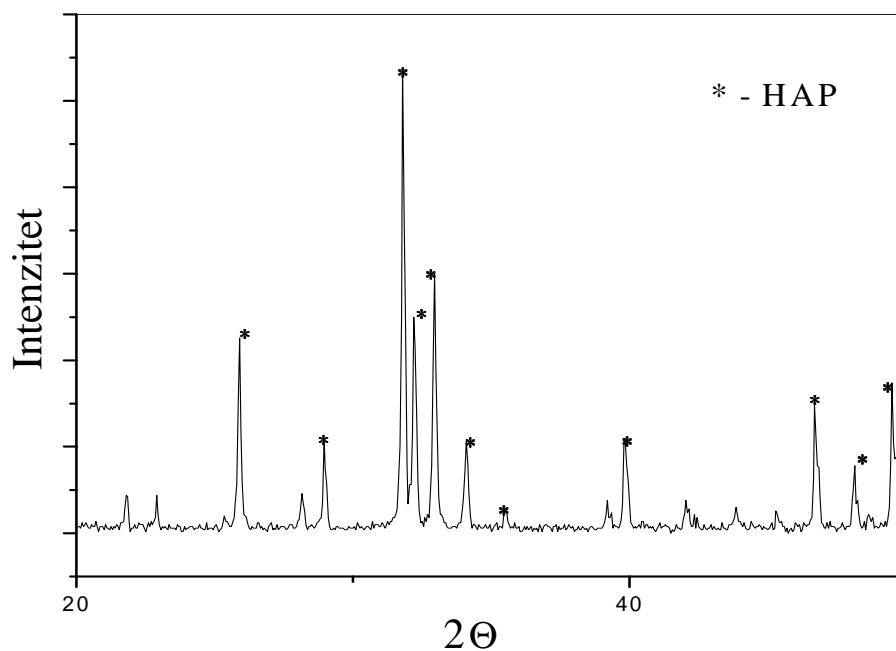
Oznaka uzorka	Temperatura , °C	Vreme, h	Gustina, g/cm ³	Veličina zrna, nm
HAP1	950	2	2,93	50
HAP1	1000	1	3,06	140
HAP1	1000	2	3,05	380
HAP2	950	2	3,00	80
HAP2	1000	1	3,10	170
HAP2	1000	2	3,06	400

Gustine bifaznih HAP2 kompakata nakon toplog presovanja se nalaze u intervalu od 3,00 g/cm³ do 3,10 g/cm³. Poređenjem prosečnih veličina zrna, uočava se da slično materijalima dobijenim prethodnim tehnikama, i u slučaju toplo presovanih materijala veličina zrna je veća pri nastajanju bifaznog sistema pri istim uslovima procesiranja, što je pojašnjeno u poglavlju 18.

20.2. Rezultati određivanja faznog sastava i mikrostrukturnih karakteristika biokeramičkih materijala dobijenih konvencionalnim sinterovanjem

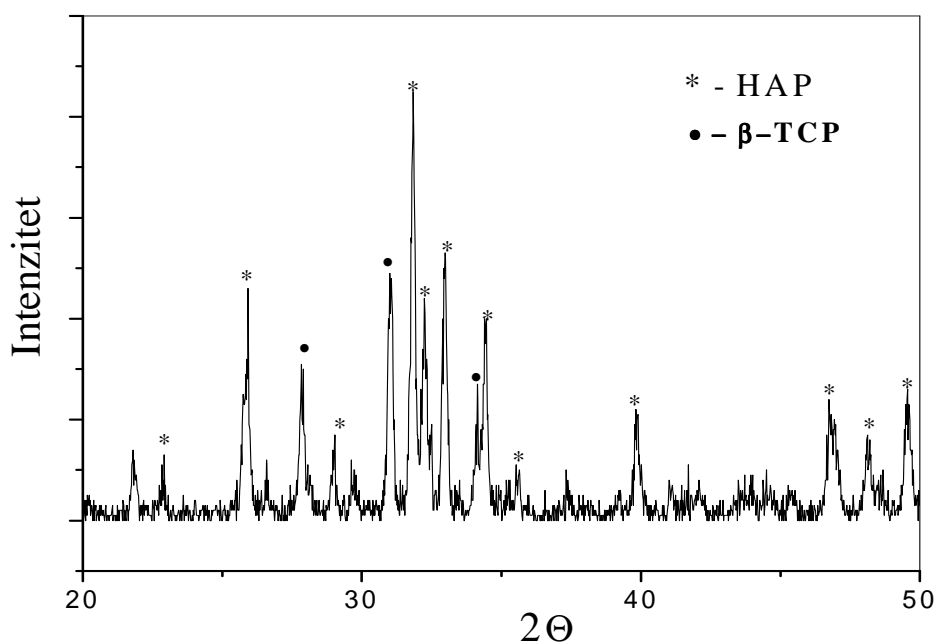
U cilju uporedne analize strukturnih, faznih, mehaničkih i nanomehaničkih karakteristika gustih nanostrukturnih materijala dobijenih toplim presovanjem sa gustim mikrostrukturnim materijalima, polazni kompakti izostatski ispresovani na 400 MPa su konvencionalno sinterovani na 1200 °C tokom 2h, što predstavlja najčešće uslove za sinterovanje HAP u konvencionalnim uslovima [24, 26, 27]. Ovim postupkom dobijeni su biokeramički materijali gustine 3,00 g/cm³, odnosno 95% teorijske gustine HAP.

Na slici 20.12 su prikazani rezultati rendgenske difrakcione analize konvencionalno sinterovanog kompakta kalcijum-hidroksiapatita, HAP1 na 1200 °C tokom 2 h. Analizom pikova difraktograma utvrđeno je da nije došlo do fazne transformacije kalcijum-hidroksiapatita u trikalcijum-fosfat, stoga se može zaključiti da je konvencionalnim sinterovanjem praha HAP1 na 1200 °C tokom 2 h došlo do formiranja monofaznog biokeramičkog materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita.



Slika 20.12. XRD dijagram uzoraka HAP1 konvencionalno sinterovanog tokom 2 h na 1200°C

Na slici 20.13 prikazan je XRD dijagram uzoraka HAP2 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h. Analizom ovog dijagrama uočava se da se konvencionalnim sinterovanjem kalcijum deficitarnog kalcijum-hidroksiapatita, dobija bifazni keramički materijal na bazi kalcijum-hidroksiapatita i β -trikalcijum-fosfata.



Slika 20.13. XRD dijagram uzoraka HAP2 konvencionalno sinterovanog tokom 2 h na 1200°C

Analizom SEM mikrofografija uzoraka HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovanih na 1200 °C, slike 20.14 i 20.15, uočavaju se vrlo slične guste mikrostrukture. Mikrostruktura dobijenih materijala se odlikuje uskom raspodelom veličina zrna, sa prosečnom veličinom zrna od 3 µm.

Slika 20.14. SEM mikrofografija uzorka HAP1 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2h (poliran i nagrižen uzorak)

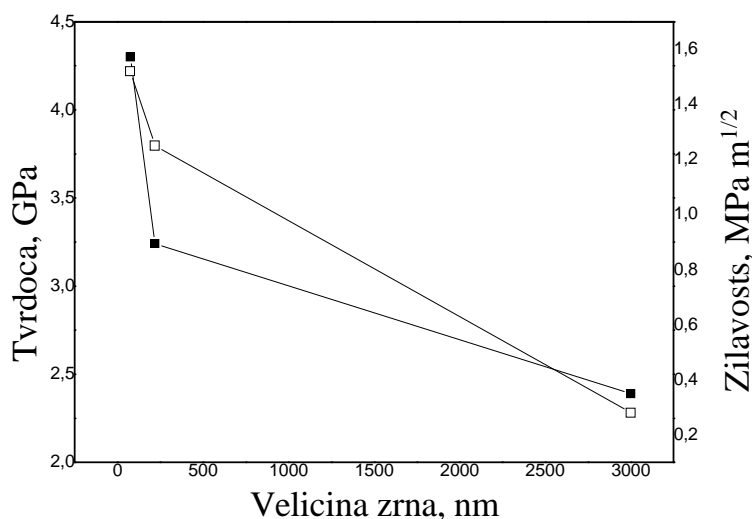
Slika 20.15. SEM mikrofografija uzorka HAP2 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2h (poliran i nagrižen uzorak)

Mikrostrukturni biokeramički materijali dobijenim konvencionalnim sinterovanjem u daljem radu su poređeni sa nanostrukturnim biokeramičkim materijalima, u cilju ispitivanja uticaja smanjenja veličine zrna u gustoj strukturi sa mikro na nano nivo na mehaničke i nanomehaničke karakteristike biomaterijala na bazi HAP i TCP.

20.3. Rezultati ispitivanja uticaja veličine zrna na karakteristike gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem mikroindentacijom

Mikroindentacijom su određene vrednosti žilavosti i tvrdoće, testirajući Vickersovom metodom tri uzorka HAP1: konvencionalno sinterovan na 1200 °C tokom 2 h (prosečne veličine zrna od 3 μm), toplo presovan na 1000 °C tokom 1 h (prosečne veličine zrna od 140 nm) i toplo presovan na 950 °C tokom 2 h (prosečne veličine zrna od 50 nm).

Dijagram na slici 20.16 prikazuje zavisnost tvrdoće monofaznih biokeramičkih materijala HAP1 u funkciji veličine zrna. Sa slike se uočava da smanjenje prosečne veličine zrna sa 3 μm na 140 nm dovodi do povećanja vrednosti tvrdoće sa 2,39 GPa na 3,24 GPa. Sa daljim smanjenjem zrna na 50 nm, tvrdoća raste do vrednosti 4,30 GPa. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da smanjenje zrna sa mikro na nano nivo kod monofaznih biokeramičkih materijala utiče na povećanje tvrdoće za približno 45 %.



Slika 20.16. Žilavost i tvrdoća nanostrukturnih toplo presovanih i mikrostrukturnih sinterovanih uzoraka HAP1 u funkciji veličine zrna (■ – tvrdoća, □ - žilavost)

Žilavost monofaznih biokeramičkih materijala u funkciji veličine zrna takođe je prikazana na slici 20.16. Vrednost žilavosti gustog mikrostrukturnog uzorka HAP1 dobijenog konvencionalnim sinterovanjem na 1200 °C tokom 2 h, sa prosečnom veličinom zrna od 3 μm, iznosi 0,28 MPa m^{1/2}. Sa smanjenjem prosečne veličine zrna na 140 nm, vrednost žilavosti je povećana na 1,25 MPa m^{1/2}. Daljim smanjenjem zrna na 50 nm, vrednost koeficijenta žilavosti dostiže vrednost od 1,52 MPa m^{1/2}. U poredjenju sa literaturnim vrednostima žilavosti kalcijum-hidroksiapatita [181, 188, 198, 232], čija vrednost uglavnom ne prelazi 1,0 MPa m^{1/2}, vrednost žilavosti uzorka sa prosečnom veličinom zrna od 50 nm, dobijenog toplim presovanjem HAP1 na 950 °C, je veća za približno 50 %. Na osnovu slike 20.16 može se zaključiti da smanjenje veličine zrna sa mikro na nano nivo utiče na simultano povećanje žilavosti i tvrdoće monofaznih biokeramičkih materijala, što je prvi put pokazano u radu sačinjenom od rezultata iz ove doktorske disertacije [24], a potvrđeno citatom u časopisu "Biomaterials" u okviru rada čiji su autori J. Wang i L. Shaw [198].

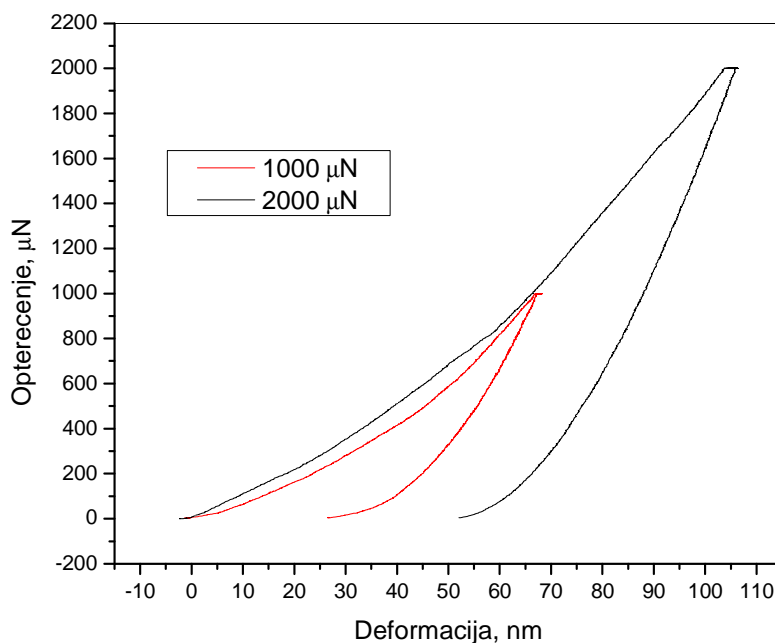
Porast žilavosti usled smanjenja prosečne veličine zrna sa mikro na nano nivo, može se objasniti promenom mehanizma loma. Tip loma kod mikrostrukturne HAP keramike dobijene konvencionalnim postupkom sinterovanja na visokim temperaturama je obično transgranularan [198]. Sniženje temperature sinterovanja primenom toplog presovanja sa 1200 °C na 950 °C, uticalo je na smanjenje dimenzija zrna sa jedne strane, i sa druge strane promenom mehanizma loma iz transgranularnog u intergranularan. Činjenica da je mehanizam loma u slučaju toplo presovanih HAP1 uzoraka intergranularan je potvrđena na slikama površine loma (20.3-20.5), gde su uočljiva čitava zrna istrgnuta iz nanostrukture. Upravo u ovoj činjenici se nalazi odgovor za višestruko povećanje žilavosti kod toplo presovanih HAP1 kompakata, jer glavni doprinos povećanju otpora prostiranju pukotine upravo pružaju granice zrna, kojih je znatno veći broj u slučaju nanostrukturnog materijala. Pravac prostiranja pukotine prilikom intergranularnog tipa loma vodi između zrna, a kako je kod nanostrukturnih materijala veliki broj zrna zbog malih dimenzija na putu prostiranja pukotine, ona na velikom broju mesta gubi energiju i samim tim joj je ukupna dužina manja. Intergranularan tip loma je uočen i prilikom loma mikrotalasno i spark plazma sinterovanih uzoraka, sačinjenih od zrna nano dimenzija [26].

20.4. Rezultati ispitivanja nanomehaničkih karakteristika gustih biokeramičkih materijala dobijenih toplim presovanjem i konvencionalnim sinterovanjem nanoindentacijom

U cilju ispitivanja uticaja veličine zrna i faznog sastava na nanomehaničke karakteristike, gustih mikro- i nanostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi HAP i TCP, upoređeni su uzorci HAP1 i HAP2 konvencionalno sinterovani na 1200 °C tokom 2 h i uzorci toplo presovani na 1000 °C tokom 1 h. U cilju pojednostavljenja diskusije, nanostrukturni uzorci HAP1 i HAP2 označeni su kao S1 i S2, dok su uzorci HAP1 i HAP2 sa mikro dimenzijama zrna označeni kao S4 i S3, redom [25].

Test nanoindentacije na gustim sinterovanim materijalima na bazi HAP i TCP, je najpre sproveden pri primenjenom opterećenju od 1 mN i brzinom opterećivanja i rasterećivanja od 50 $\mu\text{N/s}$. Pri većem opterećenju od 2 mN, brzina opterećivanja i rasterećivanja bila je 100 $\mu\text{N/s}$, sa vremenom zadržavanja od 20s na maksimalnom opterećenju u oba slučaja. Vreme zadržavanja od 20 s na maksimalnom opterećenju je odabrano da bi se minimalizovao efekat puzanja materijala, koji bi mogao imati uticaja na izračunate vrednosti Jungovog modula elastičnosti i tvrdoće.

Slika 20.17 predstavlja primer tipične zavisnosti sile i dubine utiskivanja indenta pri ispitivanju nanoindentacijom uzorka S3. Prikazana kriva se, kao i krive dobijene prilikom ispitivanja drugih uzoraka odlikuje kontinualnošću, bez velikih skokova i padova pri opterećenju i rasterećenju površine uzorka.



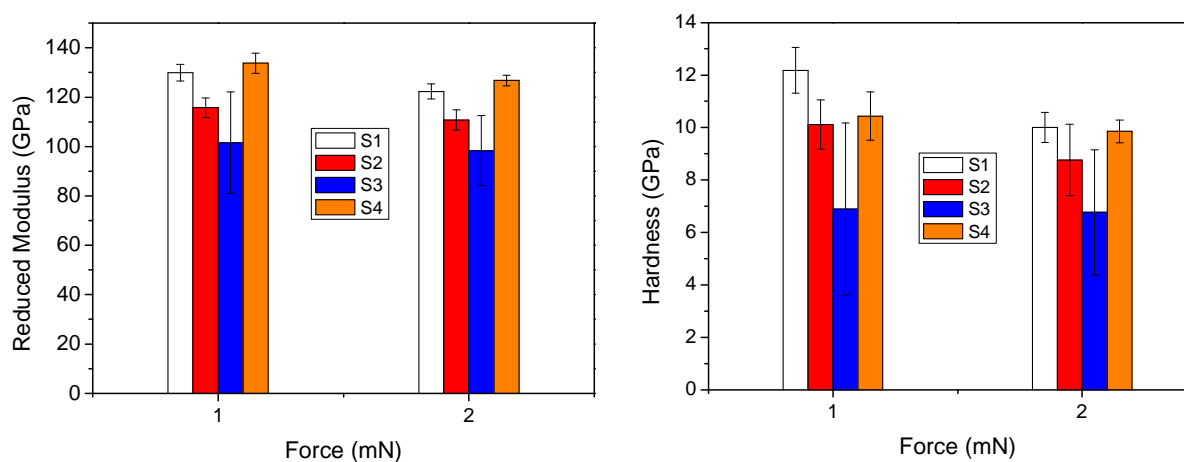
Slika 20.17. Tipična zavisnost sile- dubine utiskivanja indenta za uzorak S3

Skeniranjem površine otiska indenta, skenirajući mikroskop sa pokretnom sondom (SPM), (Slika 20.18.), nisu uočene niti pukotine niti lomovi oko površine otiska indenta. Dodatnim skeniranjem i 3D snimkom deformisane površine, pokazano je formiranje nagomilavanja materijala po ivicama otiska kome je pojava brazdastog profila duž linije indenta dala uobičajenu korektnu formu. Slično nagomilavanja materijala je inače primetan kod monokristala hidroksiapatita, pokazujući da je plastičnost uobičajena pojava kod nanostrukturne hidroksiapatitne keramike [275, 276]. Tvrdoća i Jungov moduo izračunati prema Oliveru i Pharru, mogu u mnogome zavisiti od nagomilavanja površine, posebno ukoliko je odnos dubine otiska indenta i maksimalnog pomeranja tokom testiranja veći od 0,7. U našem slučaju ovaj odnos je bio u svim slučajevima manji od 0,7, tako da se može konstatovati da nagomilavanje materijala nije uticalo na tačnost određivanja nanomehaničkih karakteristika.

Redukovani moduli elastičnosti i tvrdoće sinterovanih i toplo presovanih uzoraka testiranih nanoindentacijom prikazani su na slici 20.19. U slučaju zrna nano dimenzija i u slučaju zrna mikro dimenzija, pri obe vrednosti primenjene sile, vrednosti modula i tvrdoće su veće kod uzoraka gde nije došlo do formiranja bifaznog sistema, tj. prelaska HAP u β -TCP (S1,S4) od vrednosti dobijenih testiranjem bifaznog materijala, HAP/ β -TCP (S2,S3), što nedvosmisleno pokazuje da formiranja β -TCP pri sinterovanju ima negativan efekat na nanomehaničke karakteristike gustih biokeramičkih materijala. Znatno veće vrednosti standardne devijacije rezultata pri testiranju bifaznih HAP/ β -TCP uzoraka, ukazuju takođe na lošije nanomehaničke karakteristike izazavane nehomogenim karakteristikama ispitivane površine uzorka, koje su posledica formiranja druge faze.

Slika 20.18. SPM slika sa površinskim otiskom uzorka S1, pri sili indenta od 2000 μ N, region hrapavosti od 23 nm i skeniranom veličinom površine 2 μ m

Sa slike 20.19 se uočavaju nešto manje vrednosti modula i znatno manje vrednosti tvrdoće sa povećanjem opterećenja. He [277] i saradnici navode da pri većim opterećenjima postoji veća verovatnoća za nastanak oštećenja uzorka u vidu pukotina i lomova, što može biti razlog smanjenja vrednosti mehaničkih parametara. S obzirom da prilikom testiranja uzoraka u ovoj disertaciji nije došlo do stvaranja vidljivih oštećenja ni pri jednom opterećenju u okruženju indenta, ovaj njihov zaključak ne može primeniti. Mnogo podesnije objašnjenje ove pojave se može dati na osnovu činjenice da se procesom poliranja površine uzorka pojedini slojevi sabijaju i da izazivaju pojavu zaostalih naprezanja. Veća standardna devijacija vrednosti mehaničkih parametara pri primeni manjeg opterećenja, ukazuje da se relnije vrednosti dobijaju primenom opterećenja od 2 mN. Razlika vrednosti tvrdoće uzorka S1, pri različitim opterećenjima je 17,9 %. Kod ostalih uzoraka S2, S3 i S4 razlike vrednosti tvrdoća su 13,4 %, 1,9 % i 5,7 %, respektivno. Uočava se da uzorci sa manjom vrednošću zrna imaju veća odstupanja tvrdoća u zavisnosti od primenjene sile. Sličan trend odstupanja vrednosti uočen je i pri određivanju modula, ali sa manjim vrednostima odstupanja. Objašnjenje za odstupanja vrednosti tvrdoće i modula u velikoj meri kod nanostrukturnih materijala može da bude i činjenica da je dubina utiskivanja indenta, okvirno 110 nm, vrlo bliska vrednosti veličine zrna materijala (najmanja vrednost iznosi 140 nm).



Slika 20.19. Redukovani moduli i tvrdoće uzoraka testiranih nanoindentacijom

Poredeći nanomehaničke karakteristike uzoraka sa različitim veličinom zrna može se izvesti nekoliko zaključaka, a pažljivim biranjem uslova procesiranja može se glasati za i protiv prisustva β -TCP u implantnim materijalima, kao definitivno negativne pojave za mehaničke karakteristike, ali isto tako i kao jedne vrlo biokompatibilne faze. Kod čistog HAP, smanjenje veličine zrna izaziva povećanje vrednost tvrdoće, a smanjenje vrednost modula, manje pri sili od 2 mN, a više pri sili od 1 mN. Ova pojava je u skladu sa očekivanjima proizašlih iz Hall-Petch jednačine [278, 279]. Kod bifaznih potencijalno

implantnih HAP/ β -TCP materijala, sa smanjenjem veličine zrna utiče se na povećanje vrednosti tvrdoće i modula, i pri dejstvu sile od 1mN i pri dejstvu sile od 2 mN. Uočavamo da smanjenje veličine zrna u oba slučaja, i kod monofaznih i kod bifaznih materijala, utiče na povećanje tvrdoće.

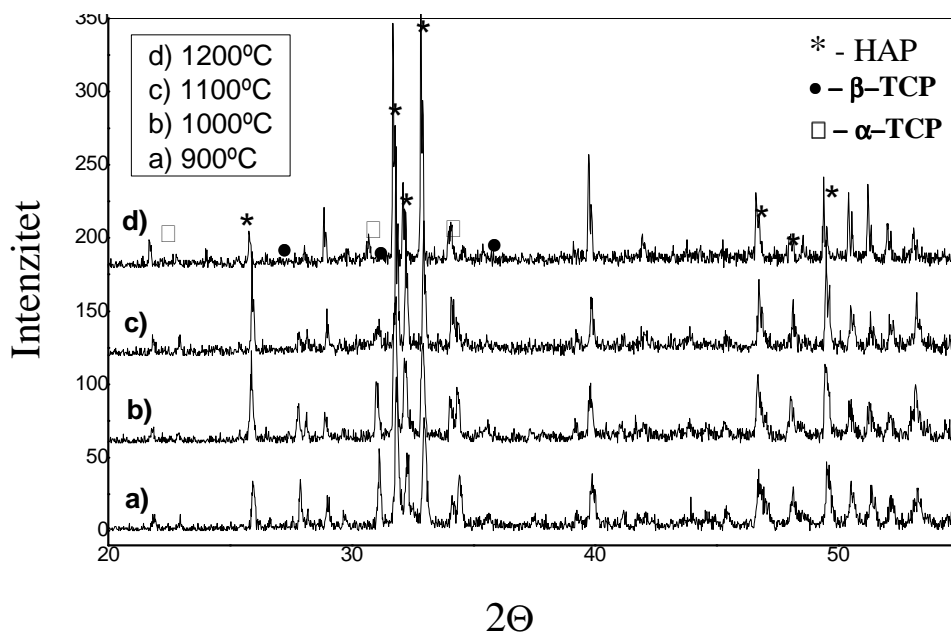
Dobijene vrednosti modula i tvrdoća su u rangu literaturnih vrednosti, što je još jedna potvrda da se materijali dobijeni u ovom radu na osnovu ispitanih mehaničkih svojstava mogu koristiti kao materijali za reparaciju koštanog tkiva [280-282]. Maksimalna vrednost modula elastičnosti je izmerena na monofaznom mikrostrukturnom uzorku sa veličinom zrna od 3 μm i iznosi 133 GPa, dok je maksimalna vrednost tvrdoće zabeležena kod nanostrukturnog uzorka sa veličinom zrna od 140 nm, i ona iznosi 12,18 GPa. Vrednosti modula i tvrdoće za bifazne materijale sa mikronskim dimenzijama zrna iznose (101.61, 6.76) GPa, dok kod uzoraka sa nano dimenzijama zrna iznose (115.72, 8.76) GPa, što je u redu veličina sa nanomehaničkim svojstvima prirodnih i sintetskim materijala ovog tipa u literaturi.

21. Procesiranje i svojstva poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem

Sa ciljem da se dobiju biokeramički materijali kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, hidrotetalno dobijeni prahovi HAP3 i HAP4 su mikrotalasno sinterovani na temperaturama od 900 °C do 1200 °C tokom 15 min. Nakon dejstva izostatskog pritiska od 400 MPa (Slika 17.1 c,d), sferna struktura čestica i sferni oblik intraaglomeratnih pora u njihovom središtu nisu narušeni. Polazna ideja bila je da se mikrotalasnim sinterovanjem polaznih kompakata dobije kontrolisano porozni materijal, čija bi maksimalna dimenzija pora upravo bila određena dimenzijom sfernih intraaglomeratnih pora, dok bi interaglomeratne pore nepravilnog oblika tokom sinterovanja bile eliminisane ili bi se sa njihovim smanjivanjem povećavala njihova sferičnost. Na taj način bi se dobio materijal kontrolisane poroznosti, u kome bi se najveći broj zaostalih pora odlikovao sferičnošću, što bi prema literaturnim podacima mogao biti dobar preduslov za dobre mehaničke karakteristike dobijenog biokeramičkog materijala [27, 56, 221].

21.1. Rezultati određivanja faznog sastava rendgenskom difrakcionom analizom

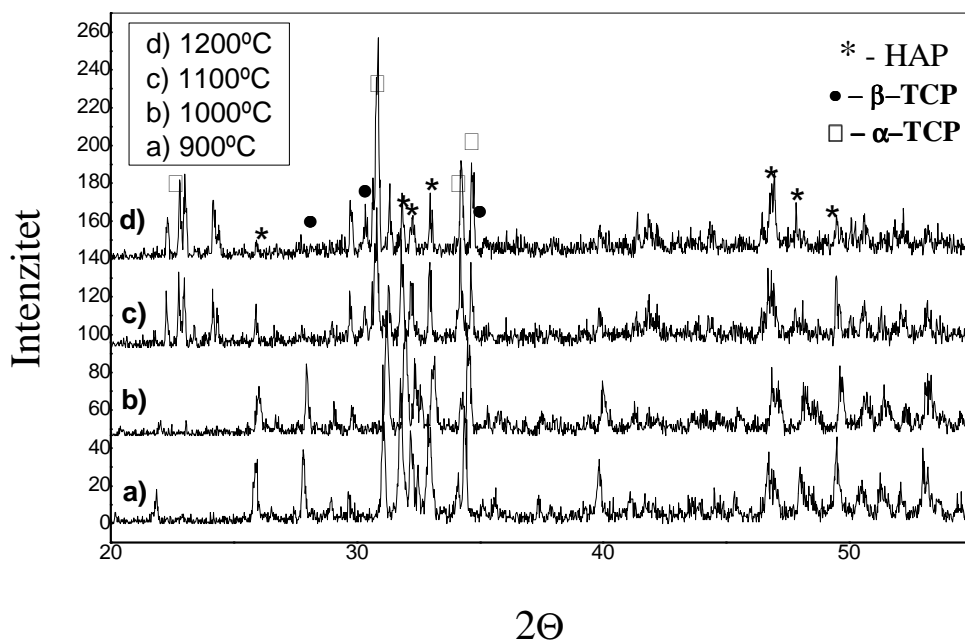
Rezultati rendgenske difrakcione analize kompakata HAP3, mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min prikazani su na slici 21.1.



Slika 21.1. Rendgenska difrakciona analiza HAP3 biokeramičkih materijala mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min

XRD dijagrami pokazuju da se kalcijum-hidroksiapatit u materijalima sinterovanim na sve četiri temperature javlja kao dominantna kristalna faza. Mali deo kalcijum-hidroksiapatita se na temperaturama 900 °C i 1000 °C transformisao u β -TCP. Na 1100 °C je dobijen uzorak kod koga je osim β -TCP prisustva i neznatna količina α -TCP, dok se kod uzorka sinterovanog na 1200 °C pored dominantne hidroksiapatitne faze javlja samo mali udeo α -TCP.

XRD dijagrami kompakata HAP4, mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min prikazani su na slici 21.2. Analizom dijagrama se uočava da se sinterovani uzorci sadrže, kao i u slučaju HAP3, HAP i TCP, s tim što se na osnovu odnosa pikova zaključuje da se znatno veći udeo HAP transformisao u TCP u odnosu na sinterovane HAP3 kompakte, čime je definitivno potvrđeno da je sa manjim polaznim odnosom Ca/P u reakcionoj smeši dobijen kalcijum deficitarniji hidroksiapatit (Ca/P (HAP3) = 1,42 i Ca/P (HAP4) = 0,96).



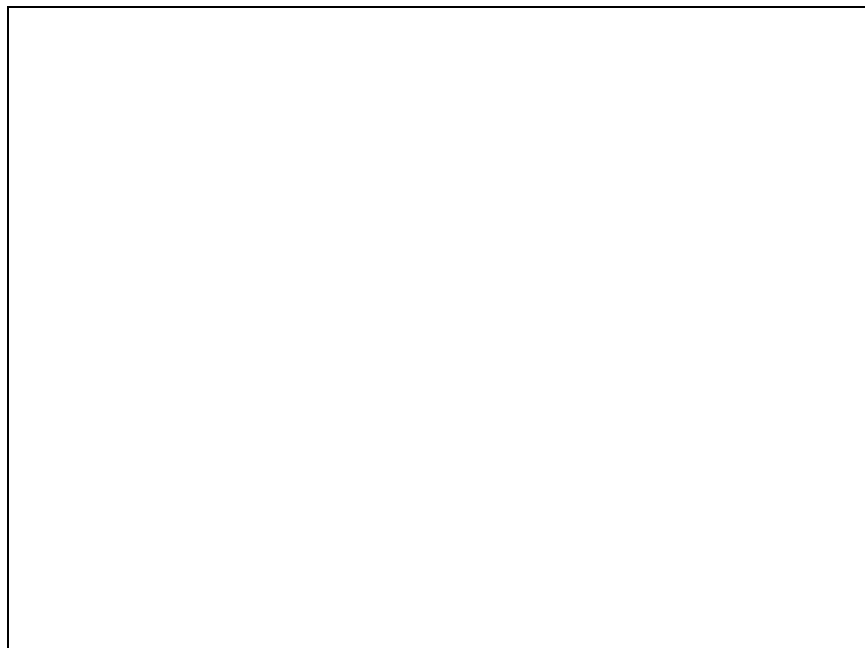
Slika 21.2. Rendgenska difrakciona analiza HAP4 biokeramičkih materijala mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min

Mikrotalasnim sinterovanjem kalcijum-hidroksiapatita HAP4 na 900 °C i 1000 °C dobijen je bifazni kompakt sastavljen od HAP i β -TCP, dok je nakon sinterovanja na 1100 °C identifikovano prisustvo značajnog udela α -TCP. Povećanje temperature sinterovanja na 1200 °C rezultira materijalom u kome je dominantna kristalna faza α -TCP, dok se HAP i β -TCP javljaju u vrlo maloj količini.

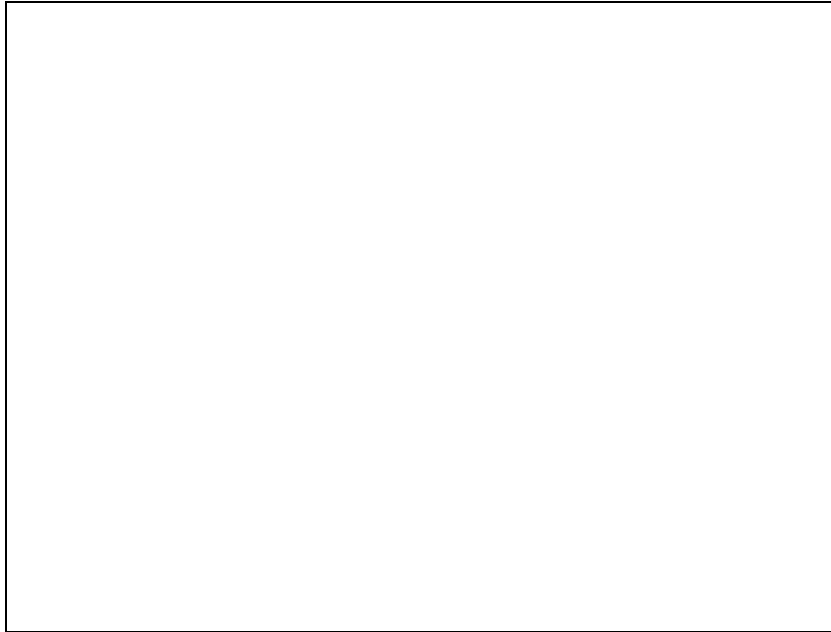
21.2. Analiza mikrostrukturnih karakteristika skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Mikrostrukturne kaarakteristike kompakata, dobijenih presovanjem prahova HAP3 i HAP4 na 100 MPa, a nakon toga mikrotalasno sinterovanih na 900 °C, 1000 °C, 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min prikazani su na slikama 21.3 - 21.6, odnosno na slikama 21.7 - 21.10, respektivno.

Sa slike 21.3 se uočava da nakon presovanja na 100 MPa i sinterovanja na 900 °C, sferna sruktura čestica HAP3 nije narušena i da vratovi između čestica nisu formirani. Primećena je mala promena oblika subčestica u okviru sfernih aglomerata usled dejstva temperature od 900 °C. Mikrostruktura uzorka sinterovanog na 1000 °C, prikazana je na slici 21.4, a sa ove slike se može uočiti da je došlo do slabog povezivanja sfernih aglomerata, kao i da je došlo do nastanka sferičnih zrna nanometarskih dimenzija po površini sfernih aglomerata. Povećanjem temperature na 1100 °C došlo je do stvaranja čvrstih i stabilnih veza između sfernih aglomerata, što se može uočiti na površini loma ovog uzorka prikazang na slici 21.5. Na mikrografiji se uočava postojanje sfernih intraaglomeratnih pora i interaglomeratnih pora nepravilnog oblika. Mikrostruktura uzorka sinterovanog tokom 15 min na 1200 °C, (slika 21.6.), odlikuje se takođe poroznom mikrostrukturom, pri čemu je udeo sfernih pora znatno veći u odnosu na uzorak sinterovan na 1100 °C, što je delimično posledica nestanka a delimično zaokruživanja pora nepravilnog oblika. Nešto deblji vratovi između sfernih čestica su uočeni na površini loma uzorka sinterovanog na 1200 °C.

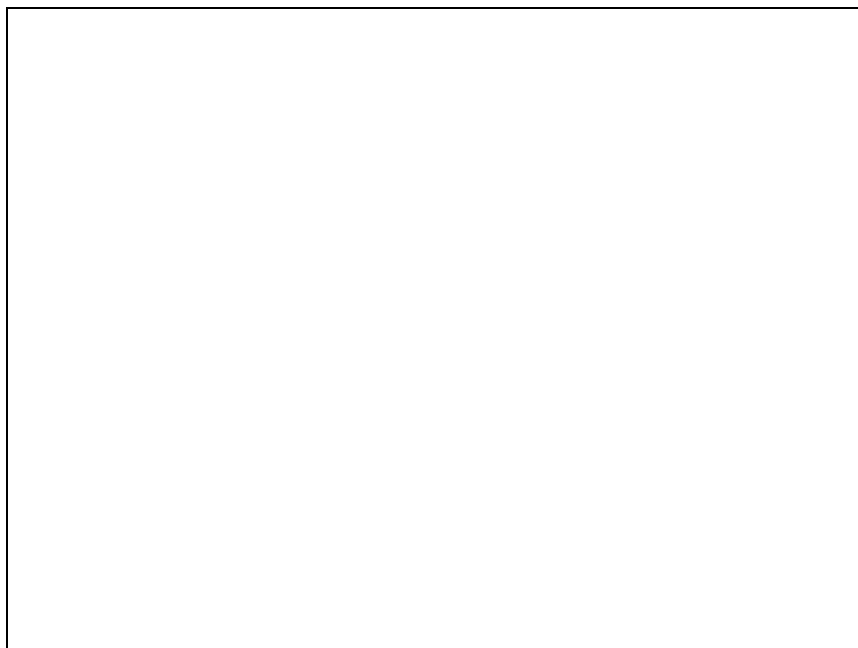


Slika 21.3. SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

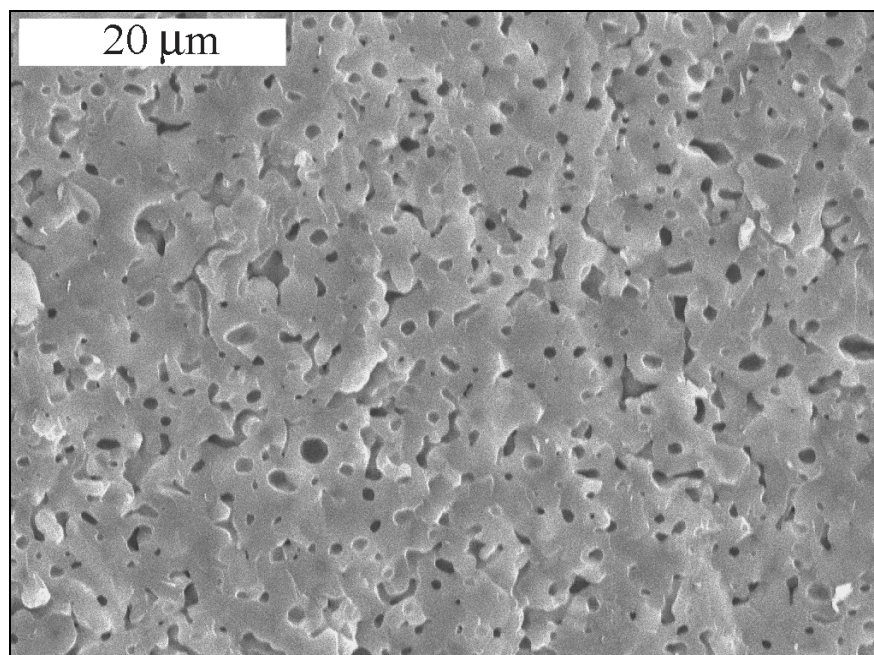


Slika 21.4. SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min

Analizom slika 21.5 i 21.6 može se zaključiti da je maksimalna vrednost veličine pora određena dimenzijom sfernih intraaglomeratnih pora, čija dimenzija u slučaju HAP3 iznosi približno 2 μm . Na osnovu navedenog može se zaključiti da je mikrotalasnim sinterovanjem praha HAP3 sastavljenog od čvrstih sfernih aglomerata moguće dobiti biokeramički materijal kontrolisane poroznosti, pri čemu maksimalna dimenzija pora zavisi od veličine intraaglomerisanih pora čestica polaznog praha.

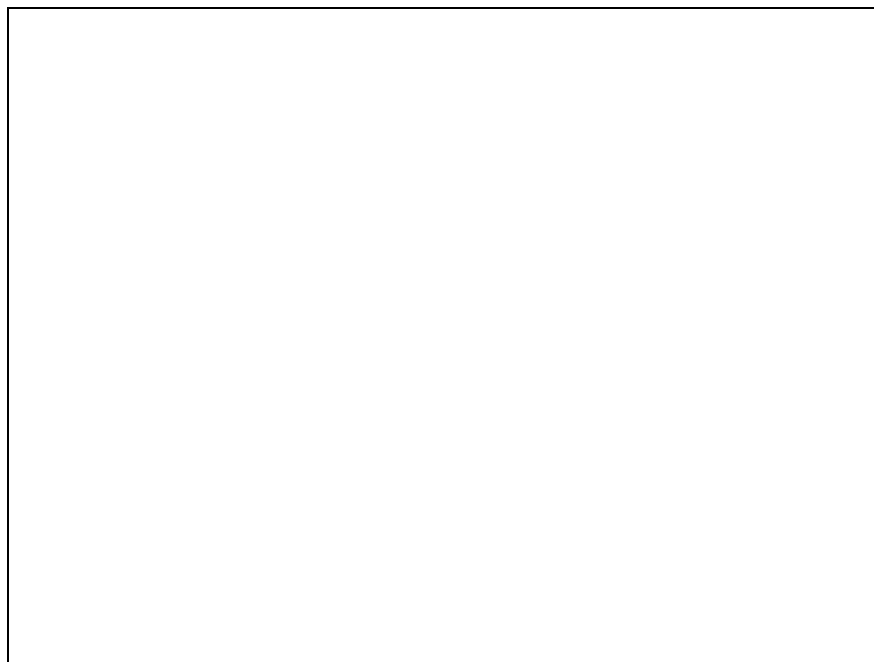


Slika 21.5. SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min



Slika 21.6. SEM mikrografija uzorka HAP3 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

Sa slika 21.7 i 21.8 se vidi da je i u slučaju praha HAP4 na temperaturi 1000 °C došlo do slabog povezivanja sfernih aglomerata, kao i da je došlo do formiranja sferičnih zrna nanometarskih dimenzija po površini sfernih aglomerata. Povećanjem temperature na 1100 °C došlo je do stvaranja čvrstih i stabilnih mostova između sfernih aglomerata (Slika 21.9).



Slika 21.7. SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C tokom 15 min

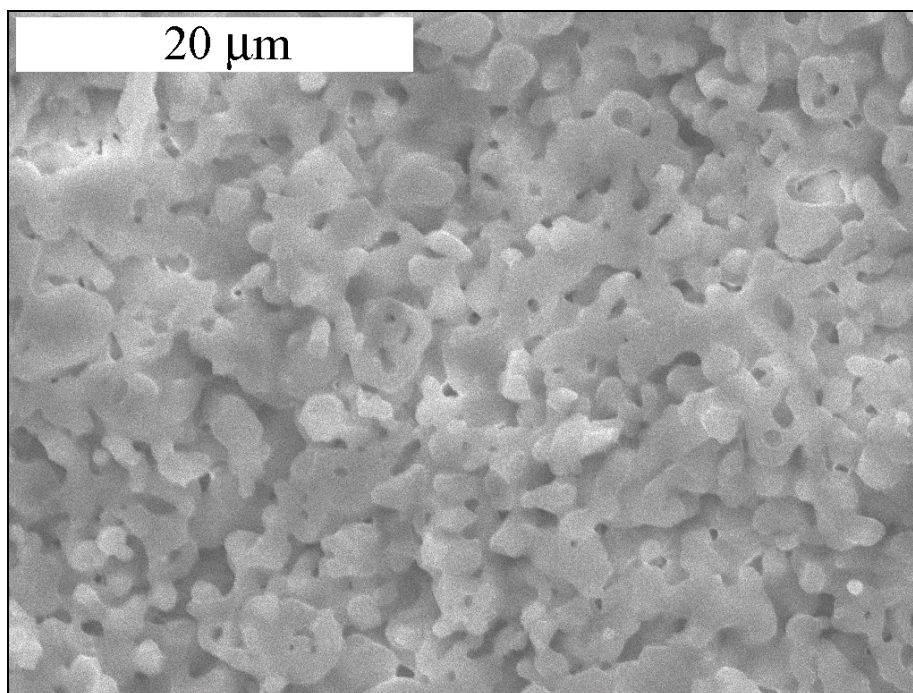


Slika 21.8. SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1000 °C tokom 15 min

Na mikrografiji prikazanoj na slici 21.10 se uočava, kao i u slučaju kompakata HAP3 postojanje sfernih intraaglomeratnih pora i interaglomeratnih pora nepravilnog oblika, čiji su broj i veličina znatno manji nakon sinterovanja na 1200 °C. Primetno je da se porozni kompakti HAP4 odlikuju nešto manjom dimenzijom pora, u odnosu na HAP3 kompakte, a razlog tome može da bude nešto manja dimenzija polaznih sfernih čestica praha HAP4.



Slika 21.9. SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min

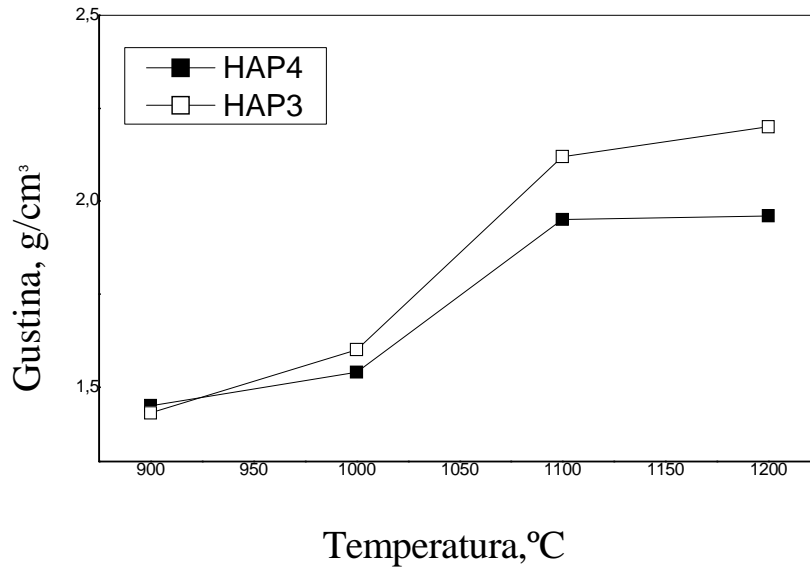


Slika 21.10. SEM mikrografija uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

21.3. Rezultati određivanja gustine i relativnog linearnog skupljanja

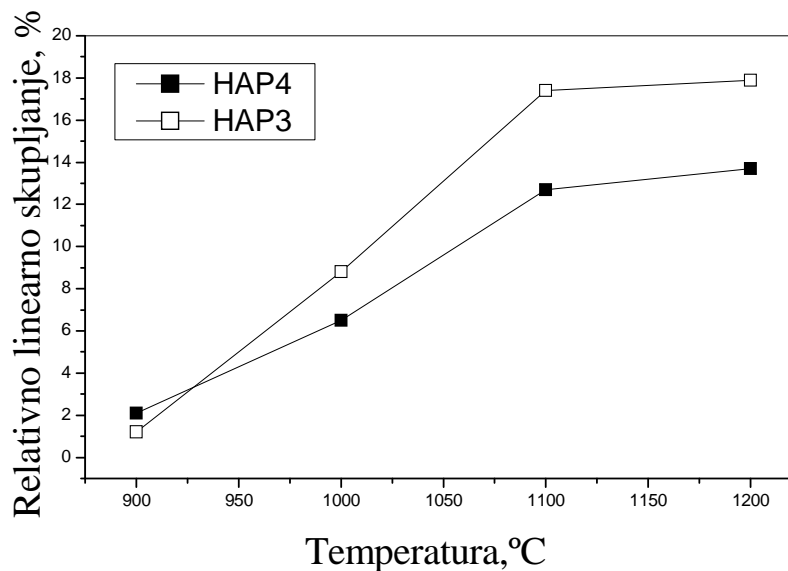
Gustina sinterovanih uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja prikazana je na slici 21.11. Sa povećanjem temperature sinterovanja sa 900 °C na 1200 °C, gustina kompakata HAP3 se povećava od vrednosti 1,43 g/cm³ do 2,20 g/cm³. Gustine uzoraka HAP4 sinterovanih na temperaturama u intervalu od 900 °C - 1200 °C su nešto manje i kreću se između 1,45 i 1,96 g/cm³. U slučaju oba praha najveća porast gustine je uočljiv pri porastu temperature sa 1000 °C na 1100 °C, jer upravo u ovom temperaturnom intervalu dolazi do nastajanja mostova između sfernih čestica. Povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C gustina se u slučaju oba kompakata neznatno povećava, a nastale veze između aglomerata se pojačavaju.

Generalno, razlog manjim vrednostima gustina kompakata HAP4 je mnogo intenzivnija fazna transformacija HAP (3,16 g/cm³) u β -TCP (3,07 g/cm³) i α -TCP (2,84 g/cm³), tj. faze sa manjim vrednostima gustine. Manje gustine uzoraka kod kojih je došlo do intenzivnije fazne transformacije su posledica uočene ekspanzije, što je potvrđeno merenjem linearnog skupljanja uzoraka.



Slika 21.11. Gustina HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

Relativno linearno skupljanje uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja prikazano je na slici 21.12. Sa porastom temperature sinterovanja sa 900 °C na 1100 °C, linearno skupljanje uzoraka HAP3 raste do vrednosti 17,4 % dok u slučaju HAP4 raste do 13,7 %. Dalje povećanje temperature sinterovanja na 1200 °C izaziva skoro zanemarljiv porast vrednosti skupljanja. Znatno intenzivnija fazna transformacij HAP u TCP, koja je praćena ekspanzijom, je glavni razlog manjeg skupljanja praha sa manjim Ca/P odnosom. Ovi rezultati potvrđuju, ranije objašnjenu, manje intenzivnu denzifikaciju pri sinterovanju prahova sa manjim Ca/P odnosom.

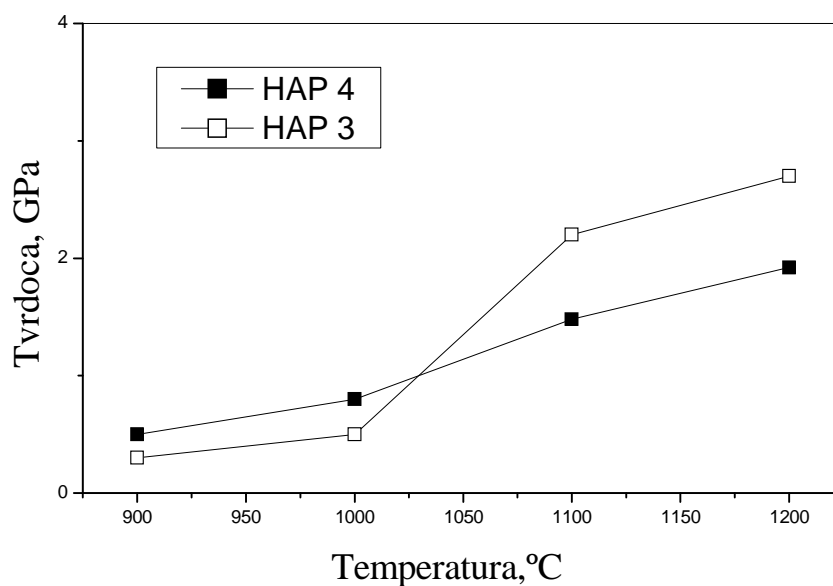


Slika 21.12. Relativno linearno skupljanje HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

21.4. Rezultati ispitivanja mehaničkih karakteristika poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem

Formiranje biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti na bazi HAP, β -TCP i α -TCP, za krajnji cilj imalo je poboljšanje mehaničkih karakteristika, delimično tvrdoće, a pre svega žilavosti.

Tvrdoća sinterovanih HAP3 i HAP4 biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja, prikazana je na slici 21.13. Povećanje temperature sinterovanja sa 900 °C na 1200 °C dovelo je do porasta tvrdoće do maksimalne vrednosti od 2,70 GPa u slučaju uzoraka HAP3, a do vrednosti 1,80 GPa u slučaju kompakata HAP4. Intenzivnija fazna transformacij HAP u TCP, koja je praćena i većom ekspanzijom u slučaju uzoraka HAP4, utiče na stvaranje zaostalih napreznja unutar keramičkih materijala, koji nastaju pri denzifikaciji, što je, pretpostavlja se, glavni uzrok navedene razlike vrednosti tvrdoća materijala gde je dominantna faza HAP u odnosu na materijal kod koga je dominantna faza α -TCP.

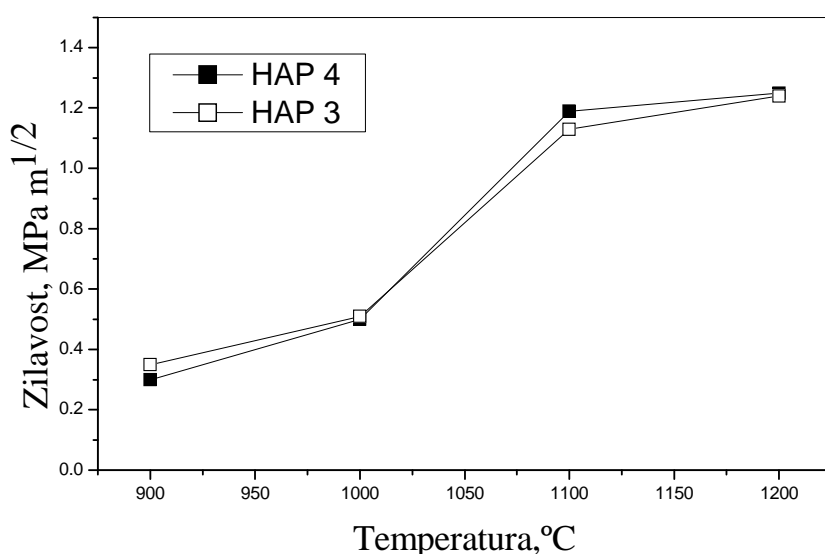


Slika 21.13. Tvrdoća uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

Kako je biokeramika na bazi HAP i TCP vrlo krta, osnovni razlog za dobijanje materijala kontrolisane poroznosti bio je povećanje žilavosti i uspostavljanje bolje veze sa tkivom. Na povećanje žilavosti materijala može da se utiče formiranjem mikrostrukture u pravcu stvaranja prepreka pukotini duž pravca njenog prostiranja, izazivajući povećanu adsorpciju energije pukotine, a samim tim utičući na njeno skraćivanje. Povećanje žilavosti kontrolisanjem parametara mikrostrukture materijala može da se postigne uz pomoć više

mehanizama, od kojih je jedan bio višestruko smanjenje veličine zrna, opisan u ranijim poglavljima. Dodavanjem čestica materijala veće žilavosti u sistem i na taj formiranje kompozitnih materijala je često korišćena metoda za povećanje žilavosti. U ovom delu rada povećanje žilavosti materijala na bazi HAP i TCP izazvano je kombinovanjem dva efekta. Prvi efekat se sastoji u nastajanju strukture sa prisustvom čvrstih vratova između sfernih čestica polaznog praha za čije narušivanje je potrebna velika energija, te je brzina prostiranja pukotine obrnuto proporcionalno energiji potrebnoj za stvaranje dve nove površine nastale „rušenjem“ formiranih vratova. Drugi efekat koji utiče na smanjenje dužine pukotine je sa jedne strane postojanje sfernih intraaglomeratnih pora a sa druge povećanje sferičnosti interaglomeratnih pora u materijalu tokom sinterovanja. Ovaj efekat se objašnjava činjenicom da je sfera idealan oblik pore, tj. kada pukotina tokom prostiranja naiđe na krute sferične aglomerate u čijem središtu se nalaze sferne intraaglomeratne pore, nastavlja svoj put obilazeći oko sfernih pora, pri čemu gubi znatnu količinu energije, što utiče na smanjenje njene dužine, a za krajnji cilj ima povećanje žilavosti materijala [56, 221].

Žilavost sinterovanih HAP3 i HAP4 biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti, prikazana je na slici 21.14, u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja. Vrednosti žilavosti uzoraka HAP3 i HAP4 sinterovanih na 900 °C i 1000 °C su vrlo niske, i nalaze se u intervalu od 0,35 MPa m^{1/2} do 0,50 MPa m^{1/2}. Ovako niske vrednosti ukazuju na činjenicu da se na ovim temperaturama sinterovanje navedenih prahova nije odvijalo u potpunosti, što potvrđuju SEM mikrografije na slikama 21.3., 21.4., 21.7., 21.8. Povećanje temperature sinterovanja sa 1000 °C na 1200 °C utiče na povećanje žilavosti do vrednosti od 1,25 MPa m^{1/2} u slučaju oba praha (Slika 21.14). Sa slike 21.14 se takođe uočava da uzorci sinterovani na 1100 °C imaju manju žilavost od uzoraka sinterovanih na 1200 °C, što je direktna posledica nastajanja čvršćih veza između sfera i povećanja sferičnosti interaglomeratnih pora.



Slika 21.14. Žilavost uzoraka HAP3 i HAP4 u funkciji temperature mikrotalasnog sinterovanja

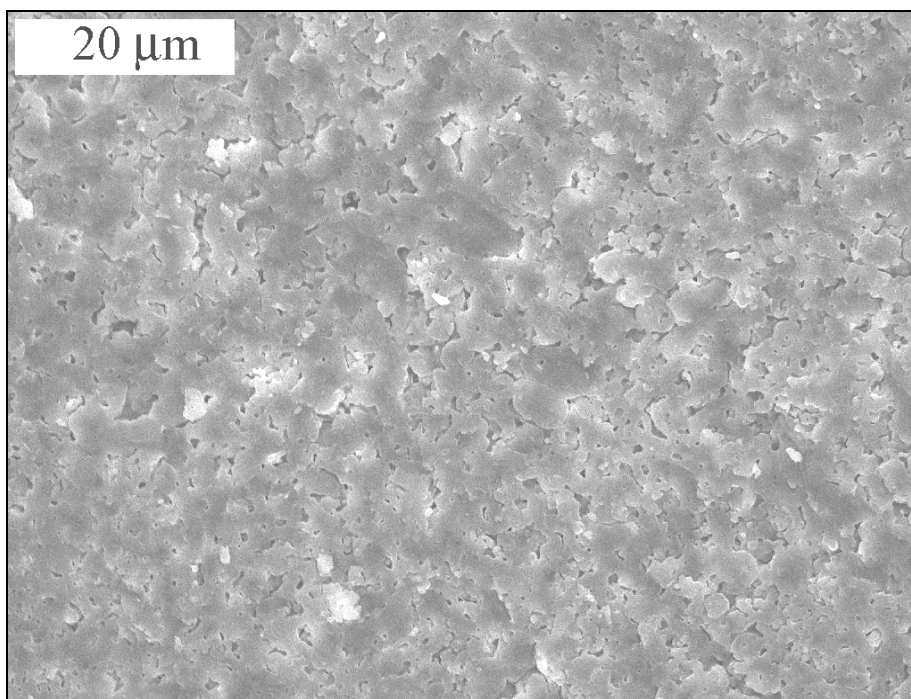
Vrednosti žilavosti mikrotalasno sinterovanih biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti dobijenih u ovom radu su iznad literaturnih vrednosti žilavosti kako poroznih tako i gustih materijala na bazi HAP i TCP, koje se kreću u intervalu 0,6 – 1,0 MPa m^{1/2}.

Na dijagramu prikazanom na slici 21.14 uočava se da uzorci HAP3 i HAP4 sinterovani na 1200 °C, imaju isti koeficijent žilavosti iako kod uzoraka HAP3 dominantnu kristalnu fazu predstavlja kalcijum-hidroksiapatit, dok je uzorak HAP4 sinterovan na istoj temperaturi po faznom sastavu u najvećem procentu α -TCP. Ova činjenica ide u prilog zaključku da fazni sastav ima inferioran uticaj na žilavost ovako dobijenih materijala u odnosu na njihovu specifičnu mikrostrukturu, koja se odlikuje prisustvom sfernih pora i jakih mostova između sfernih čestica.

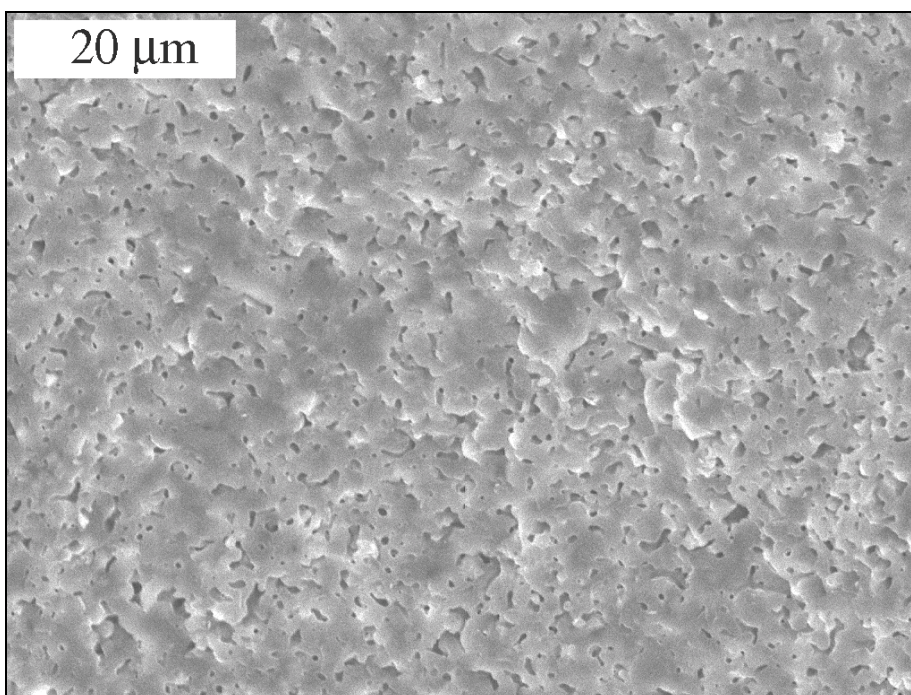
21. 5. Uporedna analiza karakteristika poroznih biokeramičkih materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem i konvencionalnim sinterovanjem

α -TCP kao dominantna faza u slučaju kompakata HAP4, karakteriše se odličnom bioaktivnošću i biokompatibilnošću. Zbog dobre resorbilnosti, α -TCP igra vrlo važnu ulogu u stomatološkoj i ortopedskoj praksi. Merenjem žilavosti uzorka HAP4 uniaksijalno presovanog na 100 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C utvrđeno da se ovaj biokeramički materijal odlikuje visokom vrednošću koeficijenta žilavosti. Sa ciljem da se žilavost još poveća, prah HAP4 je ispresovan na 400 MPa, a zatim mikrotalasno sinterovan na 1100 °C i 1200 °C tokom 15 min.

Mikrostrukture kompakata formiranih na ovaj način prikazane su na slikama 21.15 i 21.16, sa kojih se uočava da se dobijeni materijal odlikuje uniformnom mikrostrukturuom, kao i da su dimenzije sfernih intraaglomeratnih pora nešto manje nego u slučaju uzoraka presovanih na 100 MPa a zatim mikrotalasno sinterovanih na istim temperaturama (Slike 21.9 i 21.10). Primena višestruko većeg pritiska dovela je do stvaranja kompakata sa intimnijim kontaktom polaznih čestica, koji su rezultirali jačim vratovima formiranim među sfernim aglomeratima nakon sinterovanja i većom gustinom finalnog materijala. Gustina uzorka sinterovanog na 1100 °C ima vrednost 2,60 g/cm³, a sa povećanjem temperature na 1200 °C, gustina raste do vrednosti 2,70 g/cm³, što je za oko 30 % vrednosti teorijske gustine veće nego u slučaju uzoraka presovanih na 100 MPa, zatim mikrotalasno sinterovanih.



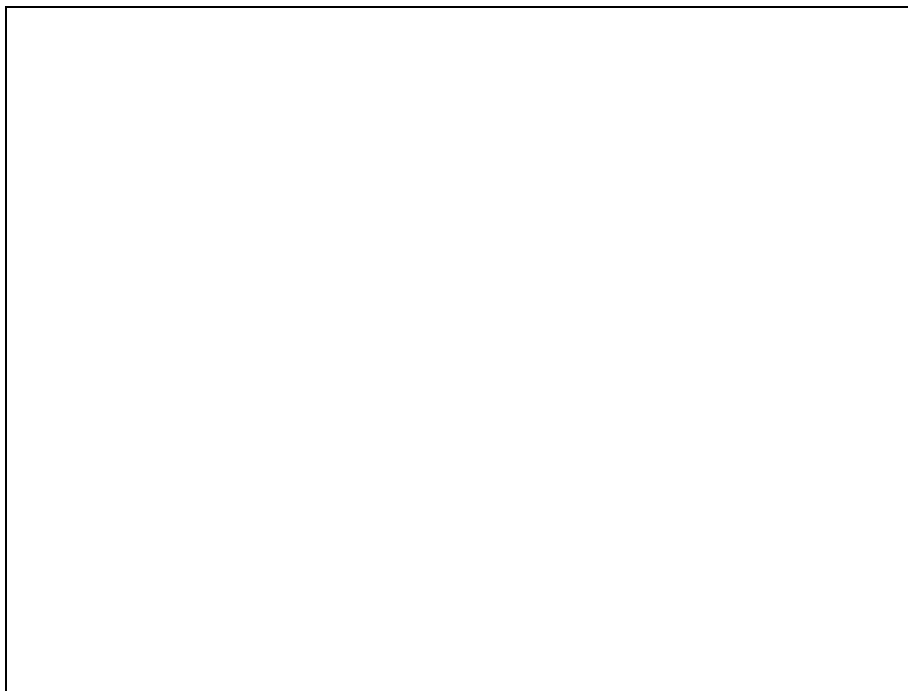
Slika 21.15. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C tokom 15 min



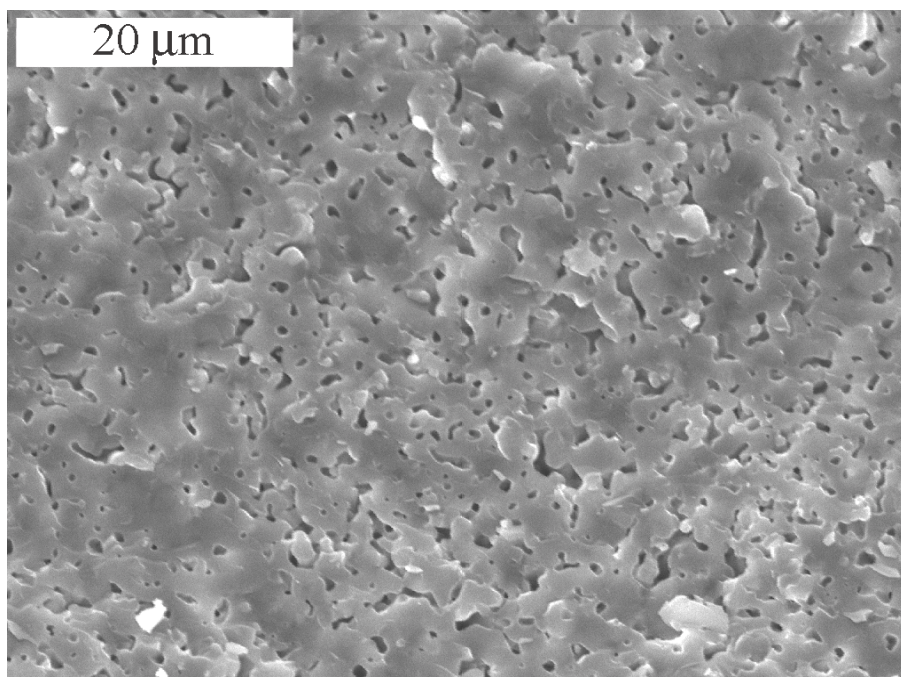
Slika 21.16. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min

Žilavost izostatski ispresovanog uzorka HAP4 na 400 MPa i mikrotalasno sinterovanog na 1100 °C iznosi 1,32 MPa m^{1/2}, dok je tvrdoća istog uzorka 2,45 GPa. Povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C, žilavost se povećava do vrednosti od 1,35 MPa m^{1/2}, a tvrdoća takođe raste do vrednosti od 2,55 GPa. Visok izostatski pritisak je uslovio jaču denzifikaciju materijala, smanjenje veličine pora, i formiranje finostrukture, što je uticalo na porast žilavosti i tvrdoće materijala. Na osnovu ovih rezultata može se reći da kombinacija izostatskog presovanja na 400 MPa i mikrotalasnog sinterovanja kompakata HAP4 rezultira biokeramičkim materijalima na bazi α -TCP, sa znatno poboljšanim mehaničkim svojstvima u poređenju sa materijalom dobijenim kombinacijom uniaksijalnog presovanja i mikrotalasnog sinterovanja.

Izostatski ispresovani kompakti HAP4 su i konvencionalno sinterovani na temperaturama 1100 °C i 1200 °C tokom 2 h, a mikrostrukture ovako sintetisanih uzoraka prikazani su na slikama 21.17 i 21.18, respektivno. Gustine ovako dobijenih kompakata su bile znatno manje od uzoraka mikrotalasno sinterovanih na istim temperaturama tokom 15 min, i iznosile su 2,54 g/cm³ i 2,62 g/cm³, respektivno.



Slika 21.17. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h



Slika 21.18. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h

U tabeli 21.1 prikazane su mehaničke karakteristike biokeramičkih materijala na bazi α -TCP dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem. Koeficijent žilavosti uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1100 °C iznosi $0,88 \text{ MPa m}^{1/2}$, a sa povećanjem temperature na 1200 °C, žilavost raste do vrednosti od $1,20 \text{ MPa m}^{1/2}$. Tvrdoća uzorka HAP4 konvencionalno sinterovanog na 1100 °C iznosi 2,25 GPa, i raste do vrednosti 2,35 GPa sa povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da se mikrotalasnim sinterovanjem kalcijum-hidroksiapatita HAP4 dobija biokeramički materijal kontrolisane poroznosti na bazi α -TCP, znatno boljih mehaničkih svojstava u odnosu na materijal dobijen konvencionalnim sinterovanjem tokom osam puta dužeg vremena zadržavanja na temperaturi sinterovanja. Ovo povećanje tvrdoće i žilavosti usled primene mikrotalasa ukazuje da pored oblika i broja pora, kao i čvrstih vratova između sfernih aglomerata, finozična struktura i veća gustina takođe utiču na mehanička svojstva ovog tipa biokeramike.

Tabela 21.1. Uslovi procesiranja i mehaničke karakteristike uzoraka HAP4 dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem

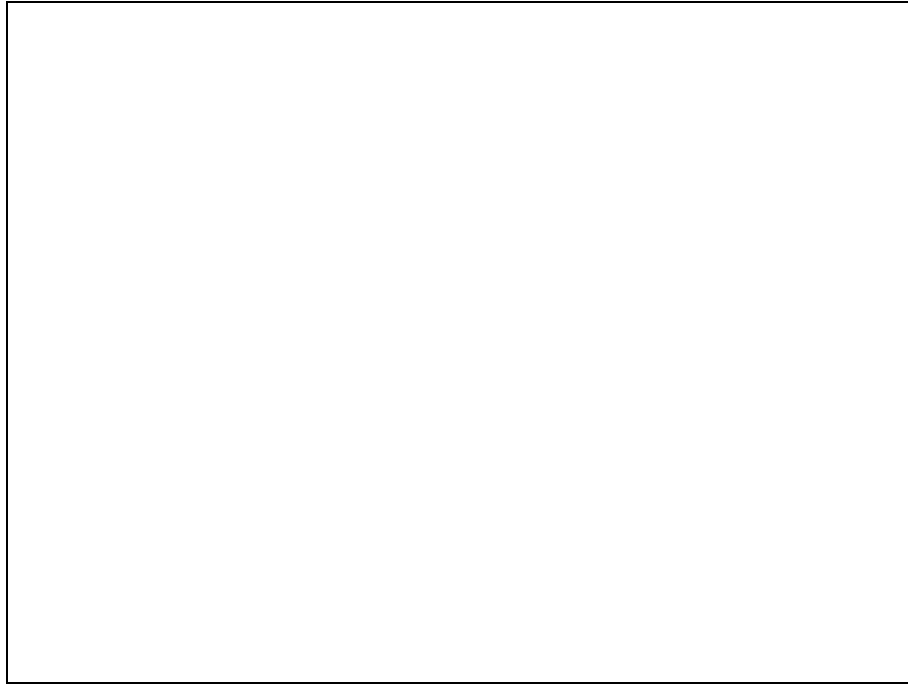
Temperatura sinterovanja, °C	1100	1100	1200	1200
Vrsta sinterovanja	konvencionalno	mikrotalasno	konvencionalno	mikrotalasno
Vreme, min	120	15	120	15
Tvrdoća, GPa	2.25	2.45	2.35	2.55
Žilavost, $\text{MPa m}^{1/2}$	0.88	1.32	1.20	1.35

21.6. Rezultati ispitivanja uticaja oblika, veličine i broja pora na mehaničke karakteristike poroznih biokeramičkih materijala

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja uticaja parametara procesiranja na oblik i veličinu pora, kao i uticaj oblika i veličine pora na mehaničke karakteristike dobijenih biokeramičkih materijala. U tom cilju prah HAP3 je izostatski ispresovan na 400 MPa, a ispresovani kompakti su nakon toga konvencionalno sinterovani na 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C tokom 2 h. Za analizu je odabran prah HAP3 zato što ima veće intraaglomeratne pore, što olakšava njihovo detektovanje i analizu slike, ali i zbog manjeg uticaj fazne transformacije na karakteristike sinterovanog materijala u slučaju praha HAP3, čijim sinterovanjem kalcijum-hidroksiapatit u vrlo malom procentu prelazi u TCP.

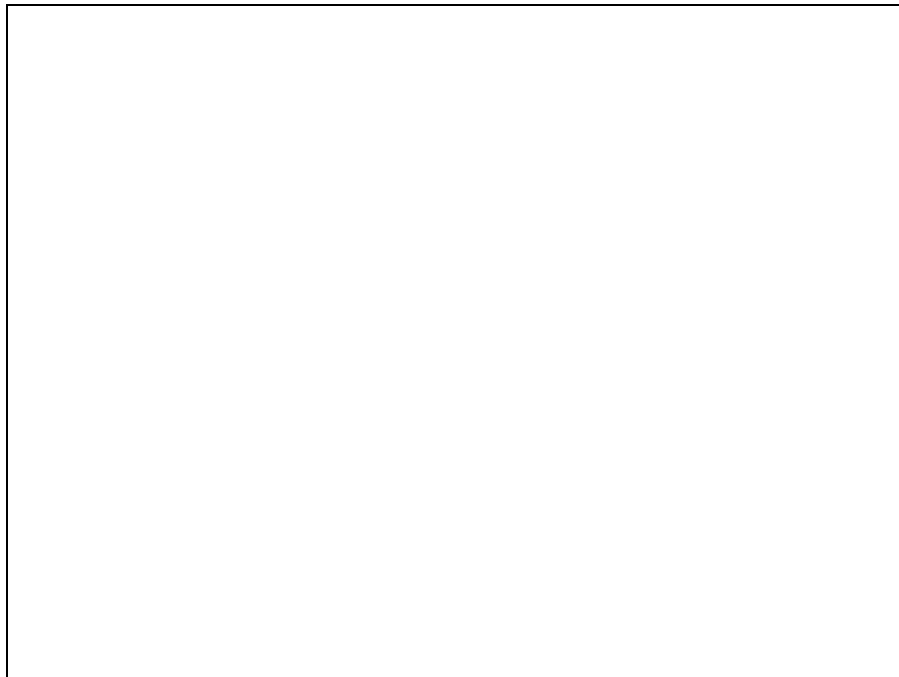
Na slici 21.19 prikazana je mikrostruktura uzorka HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h. Na slici se uočava postojanje sfernih intraaglomeratnih pora i interaglomeratnih pora nepravilnih dimenzija, kao i delimično formiranje vratova između sfernih aglomerata. Gustina ovog uzorka iznosi 2,58 g/cm³ (Tabela 21.2). Povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C gustina se povećava do vrednosti 2,64 g/cm³, a sa SEM mikrografije prikazane na slici 21.20 uočava se da je došlo do formiranja vrlo jakih veza između sfernih aglomerata. Uočava se i mnogo manji broj nepravilnih interaglomeratnih pora u mikrostrukturi.

Slika 21.19. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h



Slika 21.20. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1200 °C tokom 2 h

Daljim povećanjem temperature sinterovanja na 1250 °C i dalje se smanjuje broj nepravilnih interaglomeratnih pora (Slika 21.21), formiraju se još jače veze između sfernih aglomerata, a gustina uzorka iznosi 2,66 g/cm³ (Tabela 21.2).



Slika 21.21. SEM mikrografija izostatski ispresovanog uzorka HAP3 sinterovanog na 1250 °C tokom 2 h

Tabela 21.2. Vrednosti gustina mikrotalasno sinterovanih kompakata HAP3 na 1100 - 1250 °C

Temperatura sinterovanja, °C	Gustina kompakata, g/cm ³
1100	2.58
1200	2.64
1250	2.66

Vizuelna zapažanja karakteristika mikrostrukture uzoraka potvrđena su i kvantifikovana softverom za analizu slike. Najpre su polazeći od SEM mikrografija formirane binarne slike sa selektovanim (detektovanim) porama za morfološku analizu. Binarne slike uzoraka HAP3 sinterovanih na 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C tokom 2 h prikazane su na slikama 21.22-21.24. Sa ovako formiranih slika mnogo je lakše odrediti oblik i veličinu pora, a razlog je dosta izraženiji kontrast u poređenju sa originalnim SEM slikama. Dobijene slike predstavljaju dobru bazu za dalju morfološku analizu.

Slika 21.22. Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1100°C tokom 2h sa selektovanim porama

Slika 21.23. Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1200°C tokom 2h sa selektovanim porama

Slika 21.24. Deo SEM mikrografa uzorka HAP3 sinterovanog na 1250°C tokom 2h sa selektovanim porama

Analizom binarnih slika dobijeni su podaci o obliku i veličini pora, pri čemu se izračunata prosečne vrednosti dimenzija pora odnose na približno 100 detektovanih pora po uzorku. Statističkom analizom detektovanih pora dobijene su minimalne i srednje vrednosti dimenzija pora, a njihove vrednosti u zavisnosti od temperature sinterovanja prikazane su na slici 21.25. Sa slike se uočava porast minimalne vrednosti dimenzije pora sa porastom temperature, što je u skladu sa očekivanjem jer najmanje pore nestaju sa povećanjem temperature sinterovanja. Srednja vrednost veličine pora uzorka sinterovanog na 1100 °C iznosi 0,68 μm i raste do vrednosti 0,85 μm sa povećanjem temperature sinterovanja na 1250 °C.



Slika 21.25. Promene minimalne i srednje vrednosti dimenzije pora sa promenom temperature sinterovanja HAP3

Vrednosti sferičnosti pora u zavisnosti od temperature sinterovanja prikazane su na slici 21.26. Sferičnost je definisana kao:

$$\text{Sferičnost} = \frac{\text{prečnik}^2}{4 \cdot \pi \cdot \text{površina preseka pore}} \quad (21.1.)$$

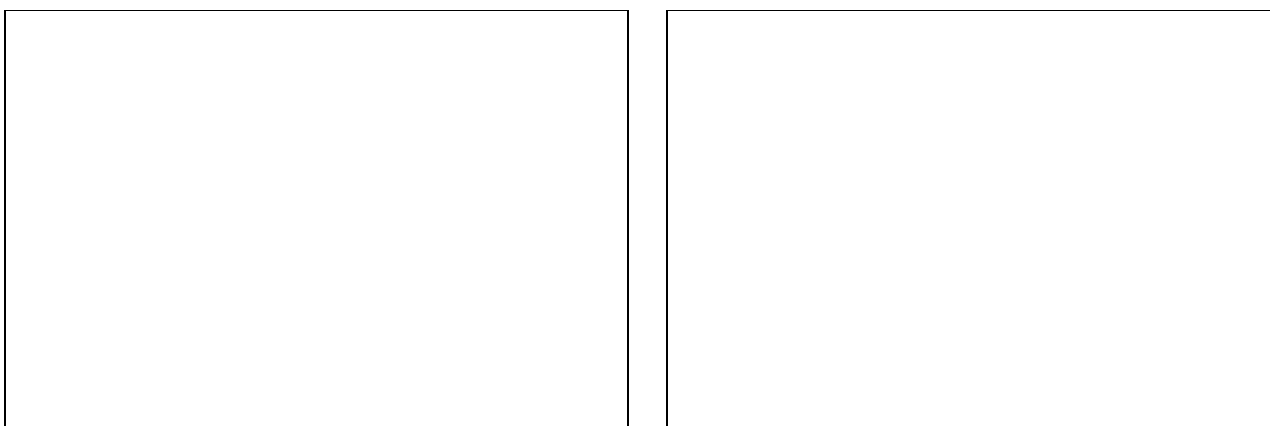
Njena minimalna vrednost iznosi 1 i ova vrednost je karakteristična za idealnu sferu.



Slika 21.26. Promene sferičnosti pora sa promenom temperature sinterovanja HAP3

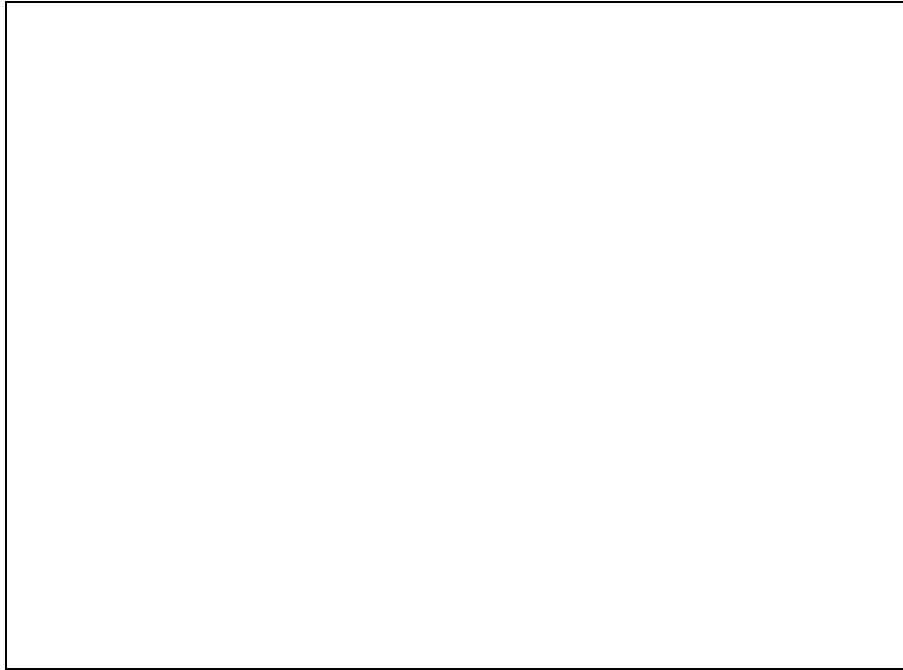
Sa slike 21.26 uočava se da su najmanje pore u svim slučajevima idealne sfere, dok srednja i maksimalna vrednost sferičnosti opadaju sa porastom temperature. Maksimalna vrednost sferičnosti pora značajno opada pri porastu temperature sinterovanja sa 1100 °C na 1200 °C, a manje pri porastu temperature na 1250 °C. Uočava se da su nepravilne pore nestabilne, kao i da teže da sa porastom temperature postignu sferičnu geometriju.

Kako je za svaki uzorak ista površina preseka uzeta u razmatranje, određen je i ukupan broj pora, kao i površina poprečnog preseka pore u zavisnosti od temperature sinterovanja, a rezultati su prikazani na slici 21.27. Očigledno je da se broj pora smanjuje sa povećanjem temperature sinterovanja, dok srednja vrednost površine poprečnog preseka pora raste iz razloga što raste i srednja vrednost prečnika pora (Slika 6.25).



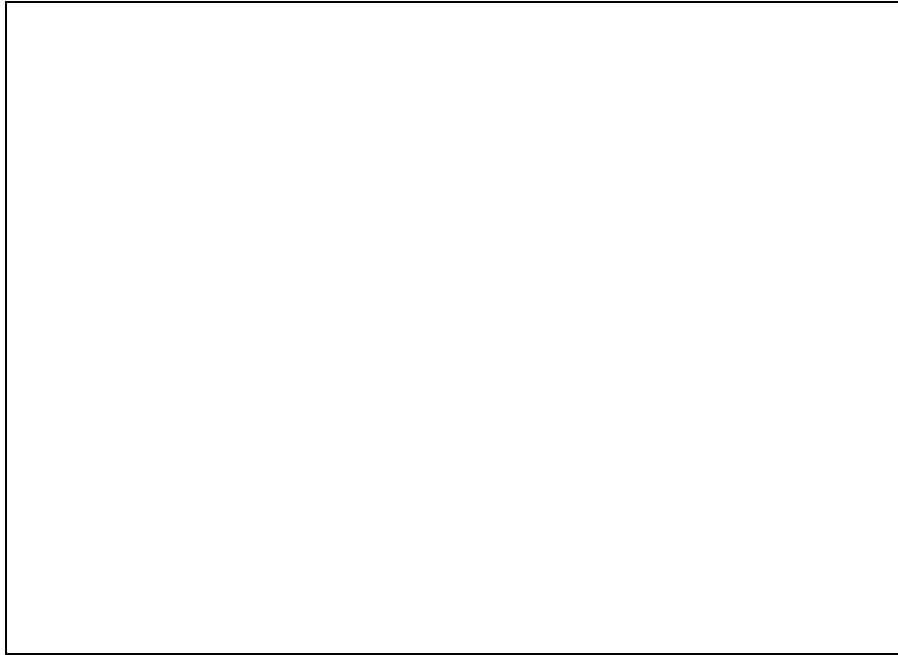
Slika 21.27. Promena broja pora na karakterističnoj površini i promena srednje površine poprečnog preseka pore sa promenom temperature sinterovanja HAP3

Sa ciljem da se još preciznije definiše morfologija dobijenih uzoraka, u zavisnosti od vrednosti dimenzija pora definisano je nekoliko klasa pora, i određena je njihova sferičnost na različitim temperatura sinterovanja, a vrednosti su prikazane na slici 21.28. Uočava se da najmanje pore ostaju sferične na svim temperaturama, dok se sferičnost pora smanjuje sa povećanjem njihovih dimenzija. Na temperaturi od 1100 °C uočljive su pore nepravilnog oblika dimenzija većih od 3 μm , dok se na većim temperaturama one smanjuju do dimenzija između 2-3 μm . Takođe je uočljivo da se sferičnost klasa pora od 0,5-1 μm i 1-2 μm znatno povećava sa porastom temperature sinterovanja, što u mnogome utiče na povećanje ukupne sferičnosti pora.



Slika 21.28. Srednja vrednost sferičnosti posmatranih klasa pora na temperaturama sinterovanja 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C.

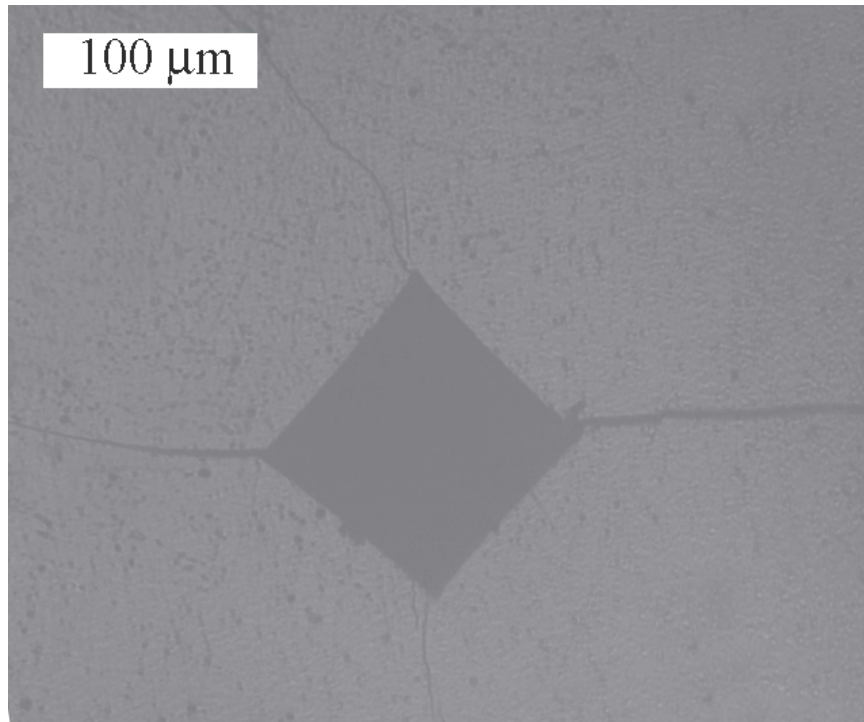
Na slici 21.29 prikazane su dimenzije klasa pora definisanih na osnovu njihove sferičnosti, u zavisnosti od temperature sinterovanja. Kod svih uzoraka, bez obzira na kojoj su temperaturi sinterovani najsfiričnije pore imaju najmanji prečnik. Dimenzije pora sa vrednostima sferičnosti od 1,2 do 3,0 su vrlo slične na različitim temperaturama sinterovanja. Ukoliko se posmatraju pore u okviru iste klase sferičnosti, a na različitim temperaturama sinterovanja, može se uočiti da se srednje vrednosti prečnika neznatno povećavaju. Zaključci vezani za oblik i veličinu pora dobiće svoj pravi značaj tek nakon analize njihovog uticaja na žilavost dobijenih biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti.



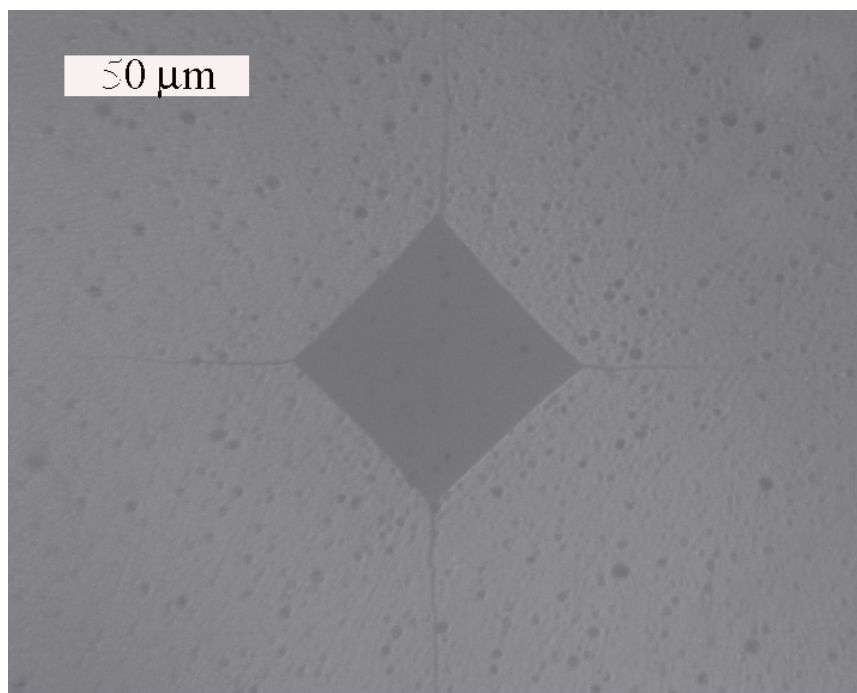
Slika 21.29. Prečnik pora u funkciji sferičnosti za posmatrane klase pora na temperaturama sinterovanja 1100 °C, 1200 °C i 1250 °C.

Kao što je ranije već navedeno povećanje broja sferičnih pora uz istovremeno smanjenje broja pora nepravilnih dimenzija, tj. povećanje ukupne sferičnosti pora ima pozitivan uticaj na povećanje žilavosti materijala. Merenjem vrednosti žilavosti uzoraka HAP3 podvrgnutih analizi slike i definisanju oblika i veličine pora, potvrđene su ove pretpostavke. Žilavost uzorka sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h iznosi 1,0 MPa m^{1/2}. Sa povećanjem temperature sinterovanja na 1200 °C žilavost uzorka raste do vrednosti od 1.30 MPa m^{1/2}, dok dalji porast temperature na 1250 °C ne utiče mnogo na promenu ove vrednosti žilavosti, koja ostaje konstantna. Ova visoka vrednost žilavosti za ovaj tip keramike je upravo direktna posledica povećanja sferičnosti pora, tj. procentualnim povećanjem udela sfernih pora u ukupnoj poroznosti, što je u ovom poglavlju i kvantitativno prikazano.

Ispolirane površine kompakta HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od 3 kg i 1 kg prikazane su na slikama 21.30 a i b. Uočava se da je opterećenje od 3 kg bilo preveliko za određivanje žilavosti uzorka, jer se pukotine ne prostiru u pravcu dijagonale otiska. Smanjenjem opterećenja na 1 kg dobijen je vrlo pravilan otisak sa uočenim pukotinama u pravcu dijagonala otisaka.



a)



b)

Slika 21.30. Fotografije ispoliranih površina kompakta HAP3 sinterovanog na 1100 °C tokom 2 h nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od: a) 3 kg i b) 1 kg

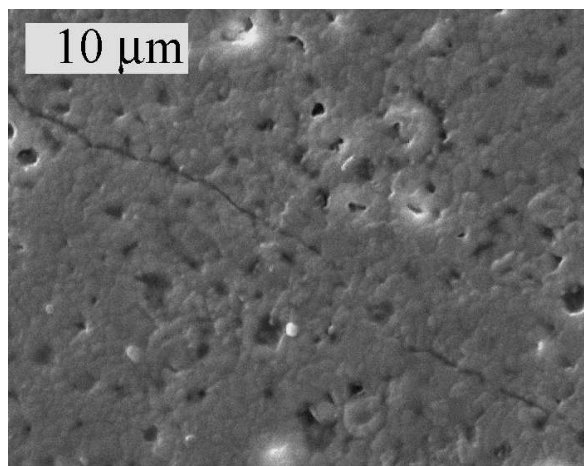
Na slikama 21.31 a i b prikazani su otisci nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od 3 kg u slučaju uzoraka sinterovanih na 1200 °C i 1250 °C, gde se primećuje izuzetno pravilan oblik otiska i pukotina u pravcu dijagonala, vidno kraća od pukotine na slici 21.30, što slikovito potvrđuje da je povećanjem temperature sinterovanja dobijen materijal sa boljim mehaničkim karakteristikama.

a)

b)

Slika 21.31. Fotografije ispoliranih površina kompakta HAP3 nakon Vickersovog testa sa opterećenjem od 3 kg sinterovanih na: a) 1200 °C i b) 1250 °C, tokom 2 h

Nakon ispitivanja Vickersovim testom uzorak sinterovan na 1200 °C, je termički nagrižen, a SEM slika pukotine prikazana je na slici 21.32. Sa slika je dobijena potvrda pretpostavke da pukotina zaobilazi sferne pore pri čemu nailazi na jake vratove formirane između postojanih sfernih aglomerata, što potkrepljuje teoriju da prisustvo sfernih intraaglomeratnih pora doprinosi povećanju vrednosti koeficijenta žilavosti biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti.



Slika 21.32. SEM mikrografije izgleda pukotine pri određivanju žilavosti kompakta HAP3 sinterovanog na 1200 °C

21.7. Analiza rezultata 3D modeliranja metodom konačnih elemenata

Model formiran metodom konačnih elemenata potvrdio je da kontrolisano porozna keramika na bazi HAP, sa dominantnim sfernim porama, ima bolja mehanička svojstva od poroznih biokeramičkih materijala sa porama nepravilnog oblika, tj. da je sfera poželjan oblik pore u poroznom biokeramičkom materijalu. Na slici 21.33 su prikazani rezultati koji idu u prilog ovom tvrđenju. Na toj slici su prikazane raspodele ekvivalentnog napona izračunatog na osnovu složenog naponskog stanja primenom hipoteze Von Missesa. Von Missesa-ova raspodela napreznja modelovanog keramičkog materijala nakon deformacije prikazana na slici 21.33., dobijena je opterećivanjem mreže konačnih elemenata sa definisanim pomeranjem čvorova pozicioniranih na gornjoj površini reprezentativnog zapreminskog elementa, RZE, ($y = 3 \mu\text{m}$), u pravcu y-ose.

Nominalno napreznje (σ_{nom}) je definisano kao ukupna reakcija na površinu suprotnu opterećenoj površini, podeljen vrednošću površine ($A = 9 \mu\text{m}^2$), a u praksi predstavlja fiktivni (zamišljeni) RZE bez pora, a opterećen na isti način kao i RZE sa slike 21.33. Vrednosti napreznja prikazane na slici 21.33, su rezultat opterećenja koje odgovara deformaciji od 1%. Okolina pora, gde se javlja maksimalno napreznje (σ_{max}), je pogodno mesto za lokalnu deformaciju, kao i za nastajanje i prostiranje pukotine.

Sferne pore	Pukotina iz pore paralelna pravcu dejstva sile	Pukotina iz pore ortogonalna pravcu dejstva sile
$\sigma_{\max} = 187,41 \text{ MPa}$	$\sigma_{\max} = 118,75 \text{ MPa}$	$\sigma_{\max} = 343,53 \text{ MPa}$
$\sigma_{\text{nom}} = 85,15 \text{ MPa}$	$\sigma_{\text{nom}} = 95,21 \text{ MPa}$	$\sigma_{\text{nom}} = 89,41 \text{ MPa}$
SCF = 2,21	SCF = 1,25	SCF = 3,84

Slika 21.33. Von Misses-ova raspodela naprezanja u HAP keramici pri zapreminskom udelu pora od 0,155; (vrednosti naprezanja su u $\mu\text{N}/\mu\text{m}^2 = \text{MPa}$) sa izračunatim SCF

Faktora pojačavanja naprezanja, SCF (stress concentration factor), predstavlja odnos maksimalnog i nominalnog naprezanja ($\text{SCF} = \sigma_{\max} / \sigma_{\text{nom}}$). SCF je koeficijent koji je obrnuto proporcionalan mehaničkoj čvrstoći materijala. Dobijene vrednosti SCF za kontrolisano porozne materijale na bazi HAP, sa poroznošću od približno 15 % se kreće od vrednosti 3,84, u slučaju kada su pore izduženog oblika i kada se prostiru u pravcu ortogonalnom na pravac opterećenja, do vrednosti 1,25 u slučaju pora izduženog oblika koje se prostiru u pravcu dejstva sile. Prvi slučaj predstavlja materijal sa teorijski posmatrano najboljim mehaničkim svojstvima, dok drugi predstavlja materijal sa najlošijim mogućim mehaničkim svojstvima. Oba posmatrana granična slučaja se u realnom materijalu praktično ne sreću, dok je u ovoj disertaciji pokazano da je moguće dobiti kontrolisano porozan materijal na bazi HAP sa dominantnim sfernim porama u mikrostrukturi.

Za materijal sa sfernim porama, izračunata vrednost SCF bila je 2,21. Ova vrednost ukazuje da se mehanička svojstva materijala kontrolisane poroznosti na bazi HAP, dobijenih u ovoj disertaciji nalaze između ova dva granična slučaja. Pošto je nezamislivo, praktično nemoguće, dobiti material sa izduženim porama u pravcu dejstva opterećenja, ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na činjenicu da je postojanje sfernih pora u materijalu kontrolisane poroznosti na bazi HAP dobra polazna osnova za relativno dobra mehanička svojstva, u odnosu na materiale sa nepravilnim oblikom pora. Povećanje broja sfernih pora u odnosu na nesferne, u jednom ovakvom kontrolisano poroznom materijalu, omogućuje poboljšanje njegovih mehaničkih svojstava.

22. Usporedna analiza svojstava biokeramičkih materijala dobijenih različitim tehnikama sinterovanja

Kako je konvencionalnim postupkom sinterovanja dobijen najveći broj komercijalno dostupnih implantnih materijala na bazi HAP i TCP i kako je ovo ujedno i najčešće eksploatisan postupak za dobijanje biokeramičkih materijala, polazna osnova za usporednu analizu rezultata u ovoj diskusiji biće upravo rezultati dobijeni konvencionalnim sinterovanjem stehiometrijskog HAP1. Kao optimalni parametri procesiranja pri dobijanju gustih monofaznih biokeramičkih formi konvencionalnim postupkom u slučaju praha HAP1 ustanovljeni su: izostatski pritisak pretpresovanja praha 400 MPa, temperatura sinterovanja 1200 °C i vreme zadržavanja na temperaturi sinterovanja 2 h. Konvencionalnim sinterovanjem praha HAP1 pri navedenim uslovima, dobijen je monofazni biokeramički materijal na bazi HAP gustine 3,00 g/cm³ sa prosečnom veličinom zrna od 3 μm. Dobijeni materijal je imao vrednost tvrdoće od 2,39 GPa i vrlo mali koeficijent žilavosti od svega 0,28 MPa m^{1/2}. Pokušaji da se dobije gust monofazni biokeramički materijal sa manjom prosečnom veličinom zrna konvencionalnim postupkom sinterovanja na nižim temperaturama i pri dužim vremenima sinterovanja, rezultirali su materijalima sa manjom prosečnom veličinom zrna, ali i značajno manjim gustinama i izrazito poroznim mikrostrukturama. Materijali dobijeni na nižim temperaturama od 1200 °C su imali nešto bolja mehanička svojstva, u poređenju sa gustim mikrostrukturnim materijalom sinterovanim na 1200 °C, usled drastičnog smanjenja prosečne veličine zrna, ali su vrednosti mehaničkih parametara bile i dalje veoma niske. Ideja da se primenom savremenih tehnika sinterovanja, polazeći od stehiometrijskog HAP1, i pronalaženjem optimalne kombinacije parametara procesiranja dobiju gusti monofazni nanostrukturni materijali poboljšanih mehaničkih svojstava, podrazumevala je: primenu pritiska tokom sinterovanja, kombinovani efekat pritiska i električne struje u okviru spark plazma sinterovanja ili mikrotalasno sinterovanje.

Primenom toplog presovanja u atmosferi argona, pri pritisku od 20 MPa u kombinaciji sa izostatskim pritiskom pretpresovanja od 400 MPa, snižena je temperatura sinterovanja praha HAP1 na 950 °C, pri relativno dugom vremenu zadržavanja na temperaturi sinterovanja od 2 h. Dobijeni monofazni hidroksiapatitni materijal odlikovao se znatno manjom prosečnom veličinom zrna od 50 nm, ali i nešto manjom gustinom u odnosu na napred opisan konvencionalno sinterovan monofazni biokeramički materijal na temperaturi 1200 °C. Smanjenje prosečne veličine zrna sa mikro na nano nivo u gustoj strukturi kod monofaznih biokeramičkih materijala rezultovalo je translucenčnošću materijala, kao i povećanjem tvrdoće do vrednosti 4,30 GPa, odnosno koeficijenta žilavosti do vrlo visoke vrednosti 1,52 MPa m^{1/2}. Mikrostrukture materijala dobijenih toplim presovanjem praha HAP1 na nižim temperaturama od 950 °C odlikovale su se uočljivom

poroznošću i dosta manjim gustinama. Na višim temperaturama, toplim presovanjem praha HAP1 dobijeni su takođe monofazni materijali izuzetno velikih gustina bliskih teorijskoj vrednosti, sa nešto većom prosečnom veličinom zrna ali i sa nešto lošijim mehaničkih svojstavima u poređenju sa materijalom dobijenim na 950 °C, ali takođe mnogo boljim mehaničkim svojstavima u odnosu na konvencionalno sinterovane materijale. Koristeći se rezultatima dobijenim pri izradi ove doktorske disertacije kombinovanjem dve do sada diskutovane tehnike, odnosno konvencijalnog sinterovanja i toplog presovanja, prvi put je pokazano da se sa dovoljno velikim smanjenjem veličine zrna, sa mikro na nano nivo, simultano mogu povećati i žilavost i tvrdoća biokeramičkih hidroksiapatitnih materijala [24, 198]. Vrlo važno je istaći da se smanjenjem prosečne veličine zrna na nano dimenzije promenila vrsta loma po svojoj prirodi relativno krte biokeramike na bazi HAP iz transgranularnog u intergranularni, imajući za posledicu veliki porast žilavosti materijala. Rendgenska difrakciona analiza toplo presovanih uzoraka HAP1 je pokazala da je pri formiranju monofaznih gustih materijala došlo do preferentne kristalizacije usled dejstva pritiska tokom sinterovanja, ali da je na svim temperaturama došlo do formiranja monofaznog hidroksiapatitnog materijala. Na osnovu poređenja prosečne veličine zrna i mehaničkih svojstava gustih monofaznih hidroksiapatitnih biokeramičkih materijala, može se uočiti da je mogućnost sniženja temperature sinterovanja primenom pritiska, tehniku toplog presovanja postavilo daleko iznad konvencijalnog postupka.

Spark plazma sinterovanje, kao još novija i naprednija tehnika koja slično toplom presovanju podrazumeva primenu pritiska tokom sinterovanja, tokom koje se električna struja koristi za pospešivanje procesa sinterovanja, omogućila je u slučaju praha HAP1 dobijanje monofaznih biokeramičkih materijala veće gustine u poređenju sa materijalima dobijenih konvencionalnim sinterovanjem i toplim presovanjem na još nižoj temperaturi. Naime pri spark plazma sinterovanju praha HAP1 na 900 °C uz drastično kraće vreme sinterovanja od svega 5 min, dobijen je monofazni biokeramički materijal izuzetno velike gustine koji je po ivicama bio translucentan. Ovaj postupak sinterovanja u slučaju HAP1 sa jedne strane doprinosi povećanju gustine na nižoj temperaturi i pri višestruko kraćem vremenu procesiranja u odnosu na tehniku toplog presovanja, dok sa druge strane dobijeni materijal ima takođe fino-zrnu strukturu ali i nešto veću vrednost prosečne veličine zrna, koja iznosi oko 150 nm. Nešto veća prosečna veličina zrna monofaznih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem u odnosu na toplo presovan materijal rezultira nešto manjom vrednošću koeficijenta žilavosti od $1,00 \text{ MPa m}^{1/2}$, dok je tvrdoća ovih materijala veća od materijala dobijenih prethodno opisanim postupcima usled intenzivnije denzifikacije i iznosi 4,75 GPa. Na temperaturama od 1000 °C do 1200 °C tokom 5 do 15 min, spark plazma sinterovanjem praha HAP1 dobijeni su takođe monofazni materijali velikih gustina, sa većom prosečnom veličinom zrna ali sa pojavom pukotina i sa dosta lošijim mehaničkim svojstvima u poređenju sa materijalom dobijenim na 900 °C. Vrsta loma u slučaju spark plazma sinterovanih materijala na temperaturama nižim od 1000 °C je intergranularan, dok je na višim temperaturama usled velikog rasta zrna priroda loma transgranularna. Može se konstatovati da je spark plazma sinterovanjem HAP1 potvrđeno

da se sa smanjenjem prosečne veličine zrna sa mikro na nano nivo istovremeno povećavaju i tvrdoća i žilavost biokeramičkih materijala. Rendgenska difrakciona analiza spark plazma sinterovanih uzoraka HAP1 je pokazala da je pri formiranju monofaznih gustih materijala, slično kao kod toplo presovanih uzoraka, došlo do preferentnog rasta zrna usled dejstva pritiska tokom sinterovanja. Svojstva gustih monofaznih hidroksiapatitnih biokeramičkih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem ukazuju na niz prednosti ove tehnike sinterovanja u odnosu na konvencijalni postupak. Znatno kraće vreme sinterovanja na nižoj temperaturi, kao i odsustvo pretpresovanja na visokim pritiscima, tehniku spark plazma sinterovanj pri procesiranju monofaznih hidroksiapatitnih biokeramičkih materijala izdiže u odnosu na konvencionalno sinterovanje i tolpo presovanje. Poređenjem svojstava monofaznih hidroksiapatitnih materijala dobijenih spark plazma sinterovanjem sa toplo presovanim materijalima, uočava se da obe tehnike imaju svoje prednosti i da u zavisnosti od željenih svojstava materijala i ekonomskih parametara jedna od njih dobija prednost u odnosu na drugu. Sa druge strane, generalni nedostatak obe tehnike sinterovanja potpomognute pritiskom predstavlja nemogućnost direktne izrade biokeramičkih kompakata sa nepravilnim oblicima, kakvi često imaju primenu u maksiofacijalnoj hirurgiji i ortopediji, već zahtevaju naknadnu obradu.

Tehnika koja se tokom izrade ove doktorske disertacije po dosta kriterijuma pokazala kao optimalna za procesiranje biokeramičkih materijala na bazi HAP je mikrotalasno sinterovanje. Uspostavljanjem homogenog mikrotalasnog polja tokom sinterovanja omogućeno je procesiranje monofaznih materijala na bazi HAP gustine 96 % od teorijske gustine tokom 15 min na 900 °C. Izuzetno uniformna mikrostruktura ovako dobijenog gustog materijala je posledica odsustva temperaturnog gradijenta u samom materijalu tokom procesiranja zahvaljujući mikrotalasima koji obezbeđuju homogeno zagrevanje po čitavoj zapremini procesiranog materijala. Najmanja vrednost prosečne veličine zrna u gustoj nanostrukturi iznosi 100 nm, a postignuta je upravo pri prethodno navedenim uslovima procesiranja, polazeći od izostatski ispresovanog kompakta na pritisku od 400 MPa. Vrednost koeficijenta žilavosti materijala dobijenog na ovaj način je relativno visoka i iznosi 1,34 MPa m^{1/2}, dok je tvrdoća uzorka identična tvrdoći uzorka procesiranog spark plazma tehnikom na istoj temperaturi i iznosi 4,75 GPa. Koristeći ovu tehniku sinterovanja na temperaturama do 1200 °C, tokom 15 min su dobijeni materijali tvrdoće i do 5,0 GPa, što je izuzetno visoka vrednost za ovaj tip keramike, a treba istaći da se za razliku od prethodno navedenih tehnika materijali dobijeni na višim temperaturama odlikuju odsustvom pukotina i uniformnom raspodelom veličina zrna. Uniformne finostrukture materijala, dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem HAP1 mogu biti garancija i za ujednačene vrednosti mehaničkih parametara u svim pravcima, za razliku od nanostrukturnih i finostrukturnih materijala dobijenih tehnikama koje podrazumevaju primenu pritiska tokom sinterovanja.

Polazeći od nanočestičnog kalcijum deficitarnog HAP2, postupkom konvencionalnog sinterovanja, kao i u slučaju stehiometrijskog nanočestičnog HAP1, optimalni parametri procesiranja za dobijanje gustih bifaznih biokeramičkih materijala su: izostatski pritisak pretpresovanja praha 400 MPa, temperatura sinterovanja 1200 °C i vreme zadržavanja na temperaturi sinterovanja 2 h. Na ovaj način dobijen je gust bifazni biokeramički materijal na bazi HAP i β -TCP sa prosečnom veličinom zrna od 3 μ m. Na nižim temperaturama su kao i u slučaju sinterovanja HAP1 dobijeni su materijali velike poroznosti. Toplim presovanjem i spark plazma sinterovanjem HAP2, slično kao pri procesiranju monofaznih biokeramičkih materijala dobijeni su gusti bifazni biokeramički materijali na znatno nižim temperaturama od materijala dobijenih konvencionalnim postupkom. Najniža temperatura na kojoj je toplim presovanjem HAP2 dobijen gust materijal bila je kao i u slučaju HAP1 950 °C, na kojoj je tokom 2 h procesiranja dobijen nanostrukturni bifazni biokeramički materijal sa prosečnom veličinom zrna od 80 nm. Bifazni kompakt dobijen spark plazma sinterovanjem na 900 °C odlikovao se takođe velikom gustinom, ali je prosečna veličina zrna bila oko deset puta veća u odnosu na toplo presovan bifazni materijal. Na osnovu ovog rezultata se može uočiti da je velika brzina zagrevanja prilikom SPS prilikom formiranja bifaznih gustih materijala, kao i prilikom procesiranja monofaznih materijala inicirala veći rast zrna u odnosu na materijale procesirane toplim presovanjem. Mikrotalasnim sinterovanjem HAP2 dobijeni su takođe bifazni materijali uniformnih mikrostrukture sa veličinom zrna u intervalu 480 nm - 4,7 μ m. Može se zaključiti da je svim primenjenim tehnikama sinterovanja, polazeći od kalcijum deficitarnog hidroksiapatita dobijeni bifazni biokeramički materijali, kao i da je u svim slučajevima bifazni materijal na bazi HAP i TCP imao veću prosečnu veličinu zrna, upravo zbog nastanka TCP kao druge faze, u odnosu na monofazni biokeramički materijal dobijen pri identičnim uslovima procesiranja. Nehomogenost faznog sastava i brži rast zrna na nižim temperaturama sinterovanja, pri svim postupcima formiranja gustih bifaznih biokeramičkih materijala, generalno utiče na nešto lošija mehanička i nanomehanička svojstva ovih materijala u odnosu na monofazne biokeramičke materijale dobijene pri istim uslovima procesiranja. Ispitujući uticaj faznog sastava i veličine zrna monofaznih i bifaznih, nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala metodom nanoindentacije, uočeno je da nastajanje β -TCP faze tokom procesiranja ima dominantan uticaj na nanomehanička svojstva ovih materijala, kao i da smanjenje veličine zrna i kod monofaznih i kod bifaznih biokeramičkih materijala, utiče povećanje tvrdoće.

Materijali kontrolisane poroznosti na bazi HAP i TCP su u okviru ove doktorske disertacije dobijani tehnikama konvencionalnog sinterovanja i mikrotalasnog sinterovanja. Ispitujući uticaj uslova procesiranja na svojstva biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti, ustanovljeno je da fazni sastav ima inferioran uticaja na mehanička svojstva ovih materijala u poređenju sa uticajem koji ima mikrostrukture sa prisutnim sfernim porama i čvrstim vratovim uspostavljenim između izuzetno čvrstih sfernih aglomerata. Ovakva mikrostrukture je, kao dominantan faktor, pre svega uticala na visoke vrednosti koeficijenta žilavosti ovog tipa biokeramičkih materijala, dobijenih konvencionalnim i

mikrotalasnim sinterovanjem. Ali i pored dominantnog uticaja navedenih mikrostrukturnih karakteristika na svojstva ovog tipa materijala, prilikom procesiranja biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti tehnikom mikrotalasnog sinterovanja su za višestruko kraće vreme sinterivanja dobijeni bifazni biokeramički materijali osetno boljih mehaničkih svojstava, tj. za oko 10 % veće tvrdoće i za oko 15-50 %, u zavisnosti od temperature sinterovanja, veće vrednosti koeficijenta žilavosti u odnosu na konvencionalno sinterovane materijale. Razlog za poboljšanje mehaničkih svojstava usled primene mikrotalasa tokom procesiranja materijala kontrolisane poroznosti je sa jedne strane razlika u gustini materijala usled intenzivnije denzifikacije tokom mikrotalasnog sinterovanja, tokom znatno kraćeg vremena procesiranja. Sa druge strane finostrukturna i uniformnija mikrostruktura dobijenih materijala, koja je posledica znatno kraćeg zadržavanja na temperaturi sinterovanja, može da bude ključan faktor za poboljšana mehanička svojstva mikrotalaso sinterovanih materijala kontrolisane poroznosti.

Može se zaključiti da kratko vreme i niska temperatura, kako gustih tako i kontrolisano poroznih biokeramičkih materijala, pri procesiranju tehnikom mikrotalasnog sinterovanja idu u prilog njenoj ekonomskoj opravdanosti. Uniformnost mikrostrukture, mogućnost kontrolisanja prosečne veličine zrna na nano nivou, dobra mehanička svojstva i jednostavnost izrade biokeramičkih materijala komplikovanih oblika, samo su neke u nizu prednosti mikrotalasnog sinterovanja u odnosu na druge korišćene tehnike za dobijanje gustih i kontrolisano poroznih materijala polazeći od prahova HAP1-HAP4.

23. Rezultati *in vitro* i *in vivo* ispitivanja nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja bioaktivnosti i biokompatibilnosti materijala, dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, *in vitro* i *in vivo* metodama.

23.1. Rezultati *in vitro* ispitivanja bioaktivnosti materijala u simuliranom telesnom fluidu

Mikrostruktura konvencionalno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 2 h, koja se karakteriše prosečnom veličinom zrna od 3 μm, nakon 28 dana tretmana u simuliranom telesnom fluidu (STF) na telesnoj temperaturi prikazana je na slici 23.1. Sa SEM mikrografije se mogu uočiti kristalne skupine veličine oko 1 μm, sastavljene od vrlo tankih igličastih i lisnati kristala dužine nakoliko stotina nanometara. Formiranje uočenog novog sloja na površini biokeramičkih materijala je posledica izmene jona biomaterijala i rastvora STF. Igličasta mikrostruktura novonastalog sloja apatita na površini gustog biokeramičkog materijala nakon tretmana u STF, slična strukturi prikazanoj na slici 23.1, je uobičajena prilikom određivanja bioaktivnosti mikrostrukturnih materijala na bazi HAP i TCP u STF [188, 213, 251].

Slika 23.1. Mikrostrukture monofaznog konvencionalno sinterovanog uzorka HAP1 na 1200°C tokom 2h, nakon in vitro testa tokom 28 dana u simuliranom telesnom fluidu

Na površini monofaznog biokeramičkog kompakta dobijenog spark plazma sinterovanjem praha HAP1 na 900 °C tokom 5 min, sa prosečnom veličinom zrna od oko 100 nm, nakon *in vitro* testa u simulanom telesnom fluidu došlo je do formiranja kristala čija je mikrostruktura prikazana na slici 23.2. Sa slika se uočava nekoliko različitih oblika kristala u novonastalom sloju, od skoro sferičnih zrna dimenzija od 100-250 nm, do štapićastih oblika dužine oko 1 μm i debljine stotinak nanometara.

Slika 23. 2. Mikrostrukture monofaznog spark plazma sinterovanog uzorka HAP1 na 900°C tokom 5 min, nakon in vitro testa tokom 28 dana u simulanom telesnom fluidu

Površina mikrotalasno sinterovanog uzorka HAP1 na 900 °C tokom 5 min, nakon *in vitro* testa tokom 28 dana u simulanom telesnom fluidu prikazana je na slici 23.3. Na površini monofaznog biokeramičkog materijala dobijenog na ovaj način, čija je gusta mikrostruktura sačinjena od zrna dimenzija od 100 nm do 150 nm, nakon tretmana u STF došlo je do formiranja kristala dimenzija od 50 nm do 100 nm. Slične mikrostrukture novonastalog sloja HAP na površini sinterovanog biokeramičkog materijala, nakon tretmana u STF prikazali su Sun i Ribeiro sa saradnicima u svojim publikacijama [283, 284].

Slika 23. 3. Mikrostrukture monofaznog mikrotalasno sinterovanog uzorka HAP1 na 900°C tokom 15 min, nakon in vitro testa tokom 28 dana u simuliranom telesnom fluidu

In vitro testovima u simuliranom telesnom fluidu gustih monofaznih mikrostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita dobijenih konvencionalnim sinterovanjem, spark plazma sinterovanjem i mikrotalasnim sinterovanjem, pokazano je da se radi o bioaktivnim materijalima. U sva tri slučaja došlo je do formiranja kristala apatita na površini sinterovanog materijala, ali se u zavisnosti od

temperature sinterovanja, veličine zrna i primenjene tehnike sinterovanja razlikuju mikrostrukture nastalih kristalnih slojeva. Na osnovu mikrostrukture uzoraka nakon tretmana u STF može se zaključiti da je i u slučaju gustih monofaznih biokeramičkim materijala sa mikronskim i nano dimenzijama zrna potvrđena bioaktivnost, kao i da mikrostrukture formiranog sloja zavisi od veličine zrna.

23.2. Rezultati *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi L929 fibroblasta

Ni jedan od dva ispitivana mikrotalasno sinterovana uzoraka HAP1 nije ispoljavao citotoksični efekat, što se uočava na osnovu morfoloških analiza ćelijskih kultura (Slike 23. 5 a-d.), ispitivanja metaboličke aktivnosti ćelija L929 (Slika 23. 4 a.), vijabilnosti ćelija (Slika 23. 4 b.) i nekroze ćelija (Slika 23. 4 c.). Na osnovu broja ćelija u kulturi zapaža se stimulatorni efekat, posebno nanostrukturnih mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1, na proliferaciju ćelija koji je izraženiji nakon produžene inkubacije od 3 dana (Slika 23. 4 d.). Slične promene se uočavaju i pri morfološkoj analizi ćelijskih kultura koje su bile u kontaktu sa mikrotalasno sinterovanim mikro- i nanostrukturnim uzorcima HAP1, posebno kod nanostrukturnih uzoraka sinterovanih na 900 °C (Slika 23. 5 d.).

Slika 23. 4 a. Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na metaboličku aktivnost L929 ćelija (Ca-hidroksiaapatit (A) - mikrostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1, Ca-hidroksiapatit (B) nanostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1)

Slika 23. 4 b. Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na vijabilnost L929 ćelija

Slika 23. 4 c. Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na nekrozu L929 ćelija

*Slika 23. 4 d. Efekat mikrotalasno sinterovanih uzoraka HAP1 na proliferaciju L929 ćelija nakon 1 i 3 dana, *- $p < 0.5$ u odnosu na kontrolu.*

a)

b)

c)

d)

Slike 23. 5. *Morfološke karakteristike L929 ćelija u kulturi: a) posebna kontrola- test bez materijala, b) negativna kontrola, plastika-cover slip, c) mikrostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1, d) nanostrukturni mikrotalasno sinterovan uzorak HAP1*

Oba ispitivana uzorka mikrotalasno sinterovana uzoraka HAP1 ne ispoljavaju citotoksični efekat na L929 ćelije u kratkotrajnoj kulturi. Ćelije L929 brže rastu u blizini uzoraka kalcijum-hidroksiapatita u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu uzorak sa nanostrukturnom površinom snažnije stimuliše procese ćelijske proliferacije.

Histološka analiza ćelija

Na slikama 23. 6 a i b su prikazani delovi površine referentnog uzorka plastike (cover slips) na kojima se nalazi veliki broj fibroblastnih L929 ćelija, a analizom navedenih SEM mikrografija se može uočiti da ćelije generalno posmatrano dobro atheriraju na površinu referentnog uzorka, kao i da su ćelije različitih oblika, od trouglastog, preko vretenastog do okruglastog. Sa slika treba uočiti ćelije koje su celim

svojim obimom spregnute sa referentnim materijalom i čije je telo praktično paralelno sa površinom materijala, a upravo ovakve ćelije su prikazane uveličane na slici 23. 6 c. Ovakvi oblici ćelija ukazuju na njihovu odličnu spregnutost sa površinom materijala, a položaj njihovih citoplazmatičnih produžetaka ukazuje na težnju da se ostvari veza sa susednim fibroblastnim ćelijama, što se još bolje može uočiti na slici 23. 6 d, na kojoj su citoplazmatični produžetci dve ćelije u neposrednom kontaktu. Na slici 23.6 e je prikazan primer slabo razvijene ćelije koja je takođe priljubljena za referentni material i koja je okruglastog oblika bez razvijenih citoplazmatskih produžetaka. Njen oblik ukazuje na njenu smanjenu metaboličku aktivnost, a senka koja se javlja na njenom kontaktu sa referentnim materijalom ukazuje na relativno slabu vezu sa površinom materijala. Slika 23. 6 f prikazuje primer fibroblastne L929 ćelije koja je pomoću svojih citoplazmatičnih nastavaka relativno dobro pričvršćena za podlogu od referentnog materijala, osim dela obima ćelije gde je uočljiva senka koja ukazuje na lošilu atheziju tela ćelije u odnosu na delove sa citoplazmatičnim produžecima. Voluminoznost prikazane ćelije ukazuje na njenu potencijalnu metaboličku aktivnost.

a)

b)

c)

d)

Slika 23. 6. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini kontrolnog uzorka

e)

f)

Slika 23. 6. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini kontrolnog uzorka

Na slikama 23. 7 a-h su prikazani delovi površine uzorka HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C tokom 15 min u kontaktu sa fibroblastnim L929 ćelijama. Na SEM mikrografijama prikazanim na slikama 23. 7 a i b prikazane su fibroblastne ćelije vrlo pravilnog trouglastog i nešto zaobljenijeg oblika koje atheriraju obimom tela i pomoću citoplazmatičnih produžetaka na površinu mikrostrukturnog monofaznog hidroksiapatitnog materijala. Poređenjem ove dve slike može se uočiti da je nešto čvršću vezu sa mikrostrukturnim HAP1 materijalom ostvarila fibroblastna ćelija na slici 23.7 a, na šta nam ukazuje manja površina senke na kontaktu ćelija-sinterovan materijal. Uočava se da su ćelije potencijalno metabolički aktivne, na šta ukazuje njihova voluminozna priroda.

Skeniranjem čitave površine materijala uočeno je da su upravo ćelije prikazane na slikama 23. 7 a i b u većini, dok su oblici ćelija prikazani na slikama 23. 7 c i d u velikoj manjini prisutni na površini mikrotalasno sinterovanog mikrostrukturnog HAP1 materijala. Oblik ćelije prikazane na slici 23. 7 c ukazuje na njenu devitaliziranost i smanjenu metaboličku aktivnost, kao i na relativno lošu ateziju. Dijametralno suprotna pojava predstavljena je na slici 23. 7 d, na kojoj je prikazana izrazito voluminozna fibroblastna ćelija koja se u potpunosti prostire po površini mikrostrukturnog HAP1 materijala. Odsustvo senke na kontaktu material-ćelija, na slici 23. 7 d, ukazuje na dobru ateziju na ovaj način spregnute fibroblastne ćelije.

Na slikama 23. 7e-h prikazani su različiti položaji i oblici citoplazmatičnih nastavaka, koji u svim prikazanim slučajevima pospešuju ateziju ćelija na gustom mikrostrukturnom hidroksiapatitnom materijalu. Na svim slikama je uočljiva voluminozna skrama preko zrna mikronskih veličina gusto pakovanih u mikrostrukturu materijala. Položaji citoplazmatičnih produžetaka ukazuje na težnju da se ostvari veza sa ne samo sa materijalom već i sa drugim fibroblastnim ćelijama, što ide u prilog njihovom proliferacionom potencijalu.

a)

b)

c)

d)

e)

f)

Slika 23. 7. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min

g)

h)

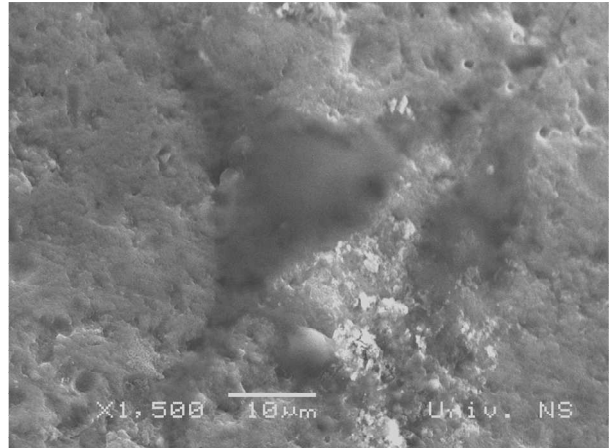
Slika 23. 7. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min

Na slikama 23. 8 a-j su prikazani delovi površine mikrotalasno sinterovanog nanostrukturnog HAP1 u kontaktu sa L929 fibroblastnim ćelijama. Na slici 23. 8 a je prikazana površina nanostrukturnog HAP1 materijala na kojoj se nalazi veliki broj fibroblastnih ćelija različitih oblika, u položaju koji evidentno pokazuje da su čvrsto priljubljene za površinu materijala. Potpuno odsustvo senke između tela ćelije i delova površine materijala, prikazanih na slikama 23. 8 b i c, ukazuje na izuzetno dobru ateziju fibroblasta i guste apatitne nanostrukture. Na navedenim mikrografijama uočene su potpuno raširene fibroblastne ćelije sa vretenastom i sferičnom osnovom. Telo fibroblasta je u svim slučajevima voluminozno (Slike 23. 8 a-j), što govori u prilog činjenici da se radi o mladim sintetski i metabolički aktivnim ćelijama.

a)

b)

Slika 23. 8. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min



c)

d)

e)

f)

Slika 23. 8. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min

Na slikama 23. 8 d-h fibroblastne ćelije trouglastog, vretenastog i kružnog pljosnatog oblika su potpuno raširene i celim obimom naležu na površinu materijala, bez postojanja međuprostora. Sa ovih slika se uočava da su ćelije celim obimom priljubljene za sinterovan material, kao i da su potpuno raširene po materijalu, u toj meri da se mikrostruktura materijala nazire ispod površine ćelija. Sa mikrografija prikazanim na slikama 23. 8 e i h se primećuje težnja ćelija, koje su potpuno spregnute sa materijalom, za uspostavljanjem međusobnog kontakta i formiranjem kontinualne mreže, što ukazuje na njihove proliferaciona svojstva. Na slikama 23. 8 i, j potvrđuje se dobra athezija L929 fibroblastnih ćelija na površini nanostrukturnog HAP1 materijala, a mogu se uočiti citoplazmatični produžeci i tanak kontinualan film na krajevima ćelije, koji prijanjaju na zrna nano dimenzija, koji idu u prilog čvrstoj vezi ćelije sa gustim mikrotalasno sinterovanim monofaznim nanostrukturnim materijalom na bazi kalcijum-hidroksiapatita.

g)

h)

i)

j)

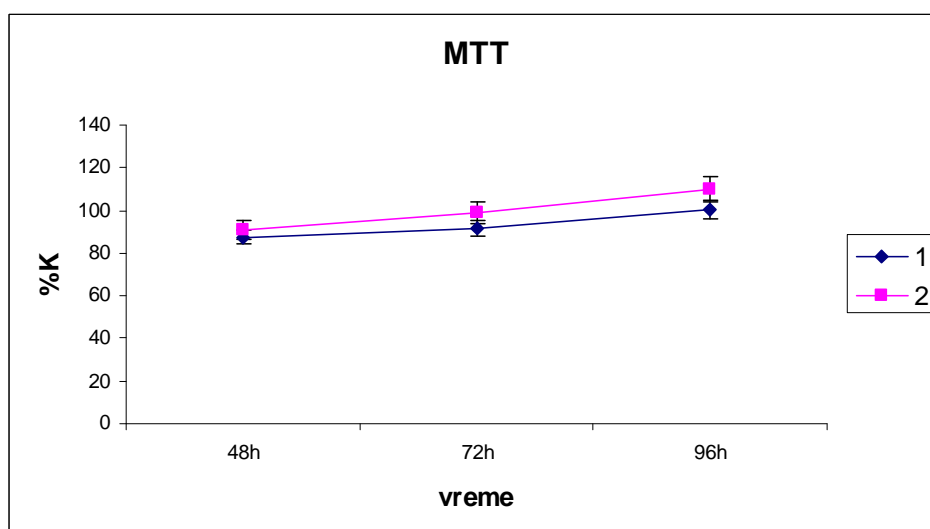
Slika 23. 8. SEM mikrografije fibroblastnih L929 ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min

23.3. Rezultati *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala u kulturi humanih fibroblasta

Nakon 48 h ispitivanja citotoksičnog efekta uzoraka HAP1, mikrotalasno sinterovanih na 900 °C i 1200 °C tokom 15 min, MTT testom u kulturi MRC-5 ćelija, konstatovano je da je nivo citotoksičnosti dosta nizak i da iznosi 12,57 % i 9,20 %, respektivno. Period oporavka od 72 h bio je u slučaju ćelija zasejanih na oba ispitivana materijala dovoljan da nivo citotoksičnosti značajno opadne, dok je nakon perioda oporavka od 96 h indeks citotoksičnosti imao negativne vrednosti. Negativan predznak ukazuje da ne postoji citotoksični efekat, već da je došlo do proliferacije ćelija (reparativna regeneracija). Negativne vrednosti indeksa citotoksičnosti nakon oporavka ćelija tokom 96 h, u slučaju oba ispitivana biokeramička materijala, ukazuju na činjeniču da se uočeno blago citotoksično dejstvo nakon ispitivanog perioda potpuno gubi [285, 286].

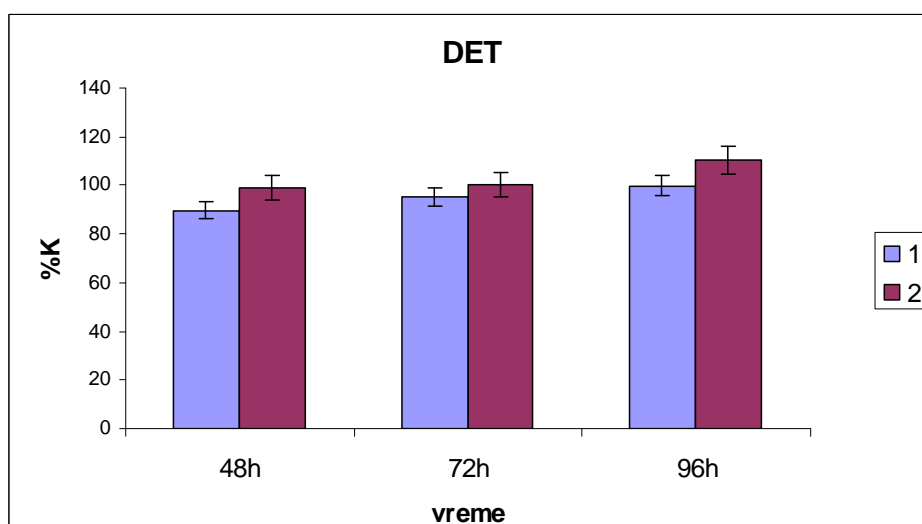
Kako ni jedan od materijala nije ispoljio citotoksični efekat nakon perioda oporavka od 96 h, brzinu i stepen regeneracije ćelija je podesno predstaviti i brojem vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak. Slika 23. 9. upravo prikazuje stepen oporavka ćelija tj. broj vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak u zavisnosti od vremena oporavka.

Sa dijagrama se uočava da je u slučaju oba ispitivana materijala značajan efekat oporavka nakon 96 h, u poređenju sa efektima nakon 48 h i 72 h. Treba naglasiti da rezultati MTT-testa ne pokazuju da postoji statistički značajna razlika oporavka ćelija tokom vremena između dva ispitivana materijala. Može se zaključiti da izlaganje MRC-5 ćelija dejstvu mikrotalasno sinterovanih mikro- i nanostrukturnih minofaznih hidroksiapatitni materijali, tokom perioda oporavka u trajanju od 96 h, u oba slučaja izaziva stimulaciju metaboličke aktivnosti tj. primećuje se da se broj vijabilnih ćelija povećava iznad broja vijabilnih ćelija kontrolnog uzorka.



Slika 23. 9. Rezultati MTT-testa nakon inkubacije ćelijskih linija MRC-5 sa mikrotalasno sinterovanim materijalima (1-900 °C, 2-1200 °C) i oporavka tokom 48 h, 72 h i 96 h, izraženi kao procenat od kontrole

Uticaj uzoraka HAP1, mikrotalasno sinterovanih na 900 °C i 1200 °C tokom 15 min, na rast ćelija meren je i DET metodom [285, 286] neposredno po završetku inkubacije kolorimetrijskim testom 48, 72, odnosno 96 h nakon isteka inkubacije. Uticaj ispitivanog materijala na vijabilnost ćelija je i u ovom slučaju izražen procentom od kontrole, a rezultati testa su prikazani na slici 23. 10. Nakon kontinuiranog delovanja materijala tokom 48h, vrednosti – izražene procentom od kontrole – za oba ispitivana materijala međusobno se statistički značajno ne razlikuju, bez obzira na vreme ostavljeno u svežem medijumu. Sa dijagrama se uočava da je u slučaju oba ispitivana materijala značajan efekat oporavka ćelija nakon 96 h, što potvrđuje rezultate MTT-testa.



Slika 23. 10. Rezultati DET-testa prikazani kao rast ćelija MRC-5 izloženih dejstvu mikrotalasno sinterovanih materijala (1-900 °C, 2-1200 °C) tokom 48 h, 72 h i 96 h, izraženi kao procenat od kontrole

Nakon izvođenja agar difuzionog testa po isteku perioda inkubacije od 24 h, u slučaju uzoraka HAP1 mikrotalasno sinterovanih na 900 °C i 1200 °C, indeks obezbojavanja bio je jednak nuli, tj. nije došlo do promene boje podloge. Nakon testiranja oba materijala sa podlogom od agra indeks liziranja je takođe bio jednak nuli, tj. ni u jednom slučaju nisu detektovane lizirane (uginule) ćelije. Na osnovu vrednosti odgovora ćelija (indeks obezbojavanja/indeks liziranja) koji je u slučaju oba testirana materijala bio je jednak nuli, agar difuzionim testom je potvrđeno da mikrotalasno sinterovani mikro- i nanostrukturni monofazni hidroksiapatitni materijali nisu citotoksični.

Histološka analiza ćelija

Po isteku perioda inkubacije ćelija s implantacionim materijalima, nakon 48 h izvršena je histološka analiza ćelija pomoću svetlosnog mikroskopa. S obzirom na netransparentnost ispitivanog materijala, jedina mogućnost fotodokumentacije histoloških rezultata svetlosnim mikroskopom jeste prikaz graničnog područja implantacionog materijala koje je osvetljeno i sadrži fibroblaste. U okviru oglednih grupa opisana je kontaktna površina između fibroblasta i implantacionog materijala, kao i morfologija samih fibroblasta [287].

Kontrolnu grupu predstavlja kontinuirana ćelijska linija humanih fibroblasta MRC-5, koji su prikazani na slici 23. 11 a i b, a koji rastu zalepljeni za dno laboratorijskog suda.

a)

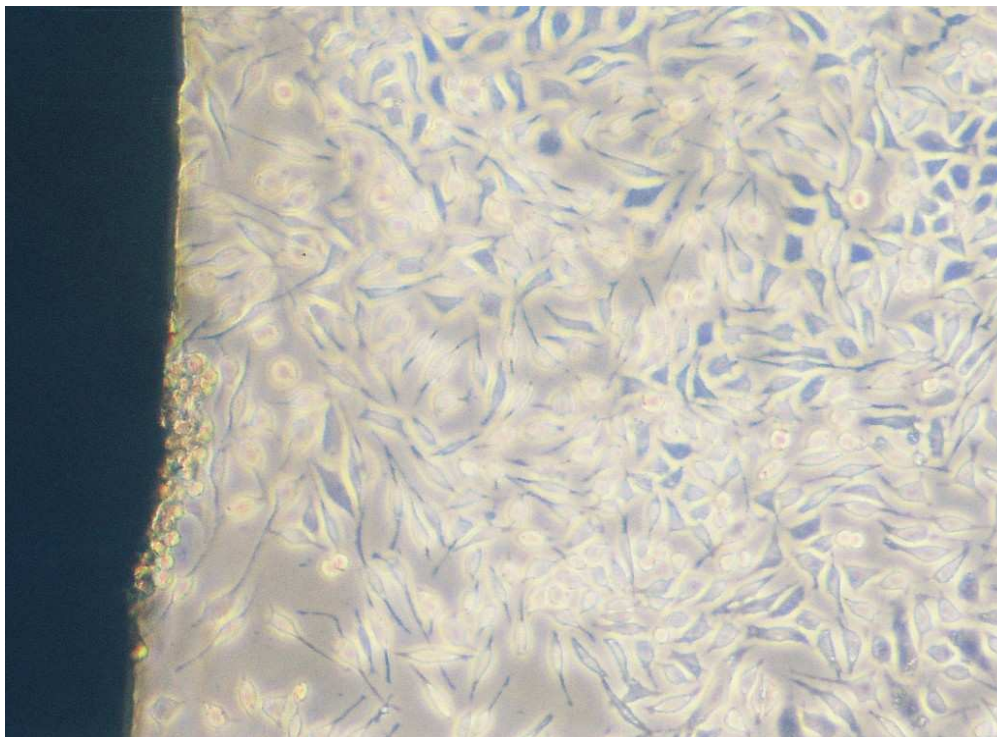
b)

*Slika 23.11. Čelijska linija fibroblasta MRC-5, kontrolni uzorak:
a)osvetljen uzorak, b)uzorak slikan sa faznim kontrastom*

Sve ćelije imaju izgled vitalnih mladih fibroblasta s vretenastim i trouglastim ćelijskim telom. Veoma retke ćelije su vretenasto izdužene, istanjenog ćelijskog tela, što

odgovara morfološkim karakteristikama zrelih fibroblasta – fibrocita. Čelijski produžetci se odvajaju od čelijskog tela, dajući ćelijama često zvezdast izgled.

Na mestu kontakta fibroblastne kulture MRC-5 sa nanostrukturnim mikrotalasno sinterovanim biokeramičkim materijalom nalaze se vitalni fibroblasti s mehurastim i trouglastim čelijskim telom. Fibroblasti su u neposrednom dodiru sa površinom materijala u različitoj meri, te se tako u ivičnoj zoni mogu naći fibroblasti koji čelijskim telom naležu na podlogu i oni koji uranjaju jednim produžetkom u podlogu a čelijsko telo i ostali produžetci pripadaju dnu posude (Slika 23. 12 a, b). Interesantno je primetiti da određen broj tankih citoplazmatskih produžetaka je uočljiv uz sam materijal, što je dokaz da je čelijsko telo sa čelijskim produžecima u neposrednom kontaktu sa materijalom, pri čemu je ćelija je i dalje vitalna. Na pojedinim mestima zapažaju se pojedinačne okruglaste ćelije bez produžetaka, čiji broj je mali koje mogu predstavljati avitalne ćelije. Sa slika se uočava da fibroblasti koji su u kontaktu sa materijalom i fibroblasti sa dna posude, koji nisu u kontaktu s implantacionom podlogom, imaju sve karakteristike mladih vitalnih fibroblasta s produžecima, koji grade mrežu i istovetni su s kontrolnim ćelijama [287, 288].



a)

Slika 23.12. Čelijska linija fibroblasta MRC-5, zasejana na podlozi “ uzorak HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min“

b)

Slika 23.12. Čelijska linija fibroblasta MRC-5, zasejana na podlozi “ uzorak HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min“

Histološkom analizom skenirajućom elektronskom mikroskopijom opisana je kontaktna površina između humanih fibroblasta i mikrotalasno sinterovanih mikro- i nanostrukturnih monofaznih hidroksiapatitnih materijala kao i morfologija i međusobni odnos fibroblasta. Na slikama 23. 13 a i b je predstavljen deo površine mikrostrukturnog HAP1 na kome se nalazi veliki broj MRC-5 fibroblastnih ćelija. Čelije su evidentno spregnute sa površinom materijala, a generalno su različitih oblika, od vretenastog, blago zaobljenog do trouglastog oblika. Između pojedinih ćelija i materijala se u tragovima javlja senka, što pokazuje da mali broj ćelija delom svog obima nije savršeno priljubljen za površinu materijala. Ali treba naglasiti da je većina ćelija u položaju koji ide u prilog njihovoj čvrstoj vezi sa površinom materijala. Na ćelijama su uočljivi citoplazmatični produžetci različitih dužina, a pri većim uvećanjima (Slike 23. 13 c i d) uočava se da i telo ćelije i citoplazmatični produžetci u velikoj meri adheriraju na podlogu od mikrostrukturnog HAP1. Položaj tela ćelija i njihovih nastavaka na slici 23. 13 c pokazuje da pojedinačni fibroblasti pokušavaju da organizuju kontinualnu mrežu pomoću citoplazmatskih produžetaka koji su različitog oblika i broja. Na slikama 23. 13 e i f prikazane su fibroblastne ćelije trouglastog oblika koje su svojim produžetcima čvrsto vezane za mikrostrukturni materijal.

a)

b)

c)

d)

e)

f)

Slika 23. 13. SEM mikrografije humanih fibroblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min

Na slikama 23. 14 a i b je prikazan deo površine mikrotalasno sinterovanog nanostrukturnog HAP1 na kome se uočavaju MRC-5 fibroblastne ćelija u položaju koji evidentno pokazuje da su čvrsto priljubljene za površinu materijala. Na slici 23. 14 a fibroblastna ćelija je potpuno raširena i celim obimom naleže na površinu materijala, bez

postojanja međuprostora. Telo fibroblasta je voluminozno, što govori u prilog činjenici da se radi o mladim sintetski aktivnim ćelijama. Odsustvo senke između tela i nastavaka ćelije i površine materijala na slikama 23. 14. a i b, kao i na slikama snimanim pri većim uvećanjima 23. 9 c i d, potvrđuje dobru ateziju ćelija na površinu materijala. Slike 23. 14 c-f pokazuju na različitim uvećanjima vrlo dobro prijanjenje obima fibroblastnih ćelija za površinu nanostrukturnog HAP1 materijala. Sa ovih slika se uočava da su ćelije celim obimom priljubljene za material, kao i da su u toj meri raširene po površini materijala da se zrna nano dimenzija naziru ispod citoplazmatičnih produžetaka.

a)

b)

c)

d)

Slika 23. 14. SEM mikrografije humanih fibroblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min

e)

f)

g)

h)

Slika 23. 14. SEM mikrografije humanih fibroblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 900 °C tokom 15 min

23.4. Rezultati *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1

Ispitivanjem biokompatibilnosti mikrotalasno sinterovanog monofaznog hidroksiapatitnog materijala HAP1, određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1, utvrđeno je da su ćelije sa površinom ispitivanog implantnog materijala uspostavile čvrstu vezu [289, 290]. Na slikama 23.15. prikazane su SEM mikrografije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1 na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min. Na slikama se uočavaju osteoblastne ćelije u položaju koji potvrđuje njihovu dobru adheziju na površini ispitivanog materijala. Položaj citoplazmatičnih produžetaka ukazuje na težnju osteoblastnih ćelija da formiraju kontinualnu mrežu po površini mikrotalasno

sinterovanog HAP1. Na dnu slike 23.15 a se može videti način povezivanja dve osteoblastne ćelije na površini ispitivanog hidroksiapatitnog materijala.

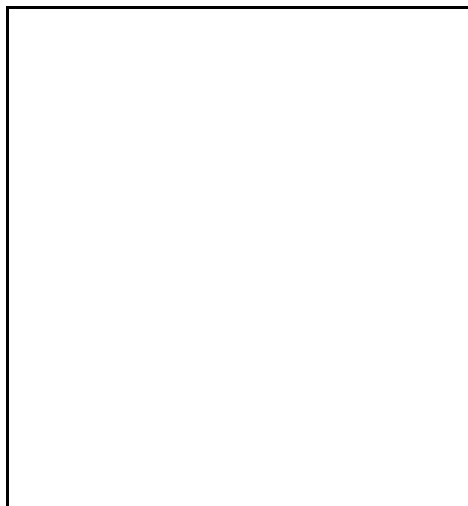
a)

b)

Slika 23. 15. SEM mikrografije osteoblastnih ćelija na površini mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min

Slika 23. 16. prikazuje kvantitativno adheziju osteoblastnih ćelija vezanih za površinu mikrotalasno sinterovanog HAP1 na pre i posle modifikacije naelektrisanja

površine. Nakon modifikacije naelektrisanje površine jedne grupe monofaznih hidroksiapatitnih uzoraka, naelektrisanje površine postalo je negativnije. Druga grupa ne modifikovanih uzoraka je bila pozitivnije naelektrisana. Sa dijagrama na slici 23. 16 se može uočiti da je broj osteoblastnih ćelija koje su uspostavile vezu sa površinom ispitivanog materijala neznatno veći u slučaju uzoraka čije je naelektrisanje površine negativnije, te se može zaključiti da modifikacija naelektrisanja površine, u slučaju mikrostrukturnog mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C, nije osetnije uticala na adheziju osteoblastnih ćelija za površinu materijala.



Slika 23. 16. Ukupan broj osteoblastnih ćelija vezanih za površinu mikrotalasno sinterovanog HAP1 na 1200 °C tokom 15 min (N - nemodifikovan, M - modifikovan)

Slika 23. 17 slikovito prikazuje stadijume athezije osteoblastnih ćelija na površini ispitivanog materijala, a stadijumi se definišu na sledeći način:

Faza 1: Ćelije na površini materijala su skupljene i okrugle sa filopodijom

Faza 2: Ćelije na površini materijala su sa lamelipodijama

Faza 3: Ćelije su celim obimom u kontaktu sa površinom materijalom

Faza 4: Ćelije se u potpunosti prostiru po površini materijala



1



2



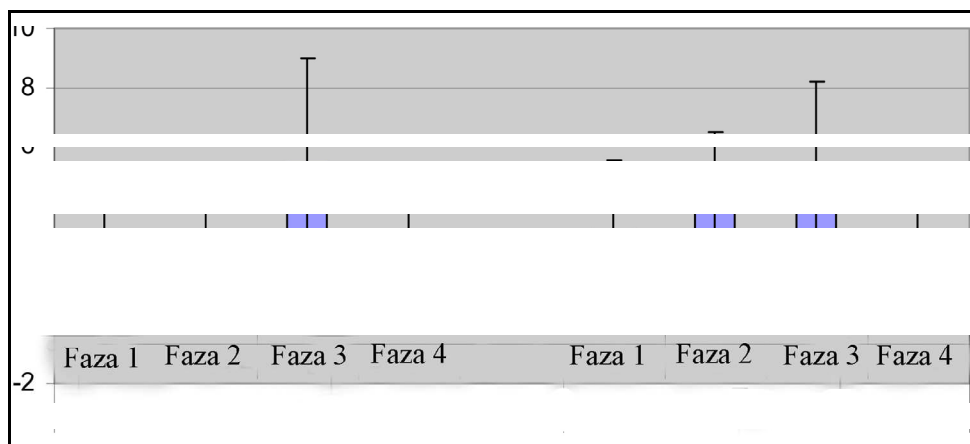
3

4

Slika 23. 17. Stadijumi athezije osteoblastnih ćelija

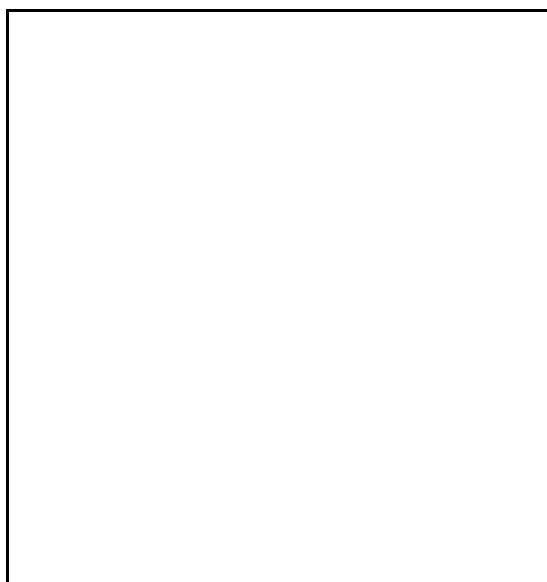
Na slici 23. 18. prikazan je broj ćelija u svakom od četiri stadijuma athezije na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini mikrotalasno sinterovanog materijala na bazi

HAP. Uočava se da je u oba slučaja najveći broj ćelija u trećoj fazi atezije, tj. ćelije su celim svojim obimom u kontaktu sa površinom ispitivanog materijala, dok je potpuno prostran (4. stadijum atezije) po površini materijala nešto manji broj ćelija.



Slika 23. 18. Broj ćelija u svakom stadijumu atezije na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini materijala

Slika 23. 19. prikazuje procenat ćelija u četvrtom stadijumu atezije u odnosu na ukupan broj ćelija na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini ispitivanog materijala. Uočava se da je neznatno veći udeo potpuno spregnutih ćelija prisutan na pozitivnijoj tj. nemodifikovanoj površini mikrotalasno sinterovanih hidroksiapatinih materijala.



Slika 23. 19. Procenat ćelija u četvrtom stadijumu atezije na modifikovanoj i nemodifikovanoj površini materijala

23.5. Rezultati *in vivo* ispitivanja biokompatibilnosti materijala metodom primarne kutane iritacije

Sistemska reakcija podnošljivost – tolerancija

Nakon jednokratnog aplikovanja test materijala svi kunići su se dobro oporavili i nisu pokazivali znake bolesti u narednih 72 sata.

Lokalna reakcija

Efekat monofaznog HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min

Eritem i edem nisu bili prisutni posle 24, 48 i 72 sata na tretiranim mestima ni kod jedne od ispitivanih životinja. Skor primarne kutane iritacije pojedinačnih životinja prikazan je u Tabeli 23. 1. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti SPI između tretiranih mesta i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p>0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C bio je 0 na skali od 0,00 do 8,00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C nema iritirajuće osobine.

Tabela 23. 1. Skor eritema i edema posle primene HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 900 °C

Kunić (red.broj)		24 s.		48 s.		72 s.		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
2	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	0
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
3	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

Efekat monofaznog HAP1 mikrotalasno sinterovan na 1200 °C tokom 15 min

Eritem i edem nisu bili prisutni posle 24, 48 i 72 sata na tretiranim i kontrolnim mestima ni kod jedne od tretiranih životinja. Skor primarne kutane iritacije pojedinačnih životinja prikazan je u Tabeli 23. 2. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti SPI između tretiranih mesta i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p>0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za pHAP + celuloza bio je 0 na skali od 0,00 do 8,00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, HAP1 mikrotalasno sinterovan na 1200 °C tokom 15 min nema iritirajuće osobine.

Tabela 23. 2. Skor eritema i edema posle primene HAP1 mikrotalasno sinterovanog na 1200 °C

Kunić (red.broj)		24 c		48 c		72 c		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
2	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	0
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
3	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

Efekat mlečne kiseline (98%) – pozitivna kontrola

U prvom vremenskom periodu analize reakcije kože (24 sata nakon uklanjanja flastera sa mlečnom kiselinom, 98%) dobro definisan eritem (skor 2) uočen je kod dve od tri testirane životinje. Kod treće životinje uočen je slab eritem (skor 1). Takođe, u ovom vremenskom periodu uočen je slab edem kod dve životinje (skor 1). U drugom vremenskom periodu analize reakcije kože (48 sati nakon uklanjanja flastera sa mlečnom kiselinom, 98 %) uočen je slab eritem (skor 1) kod sve tri životinje i slab edem (skor 1) kod dve od tri životinje. U trećem vremenskom periodu analize reakcije kože (72 sata

nakon uklanjanja flastera sa mlečnom kiselinom, 98%) iritacija kože je bila povučena, smanjena i slab eritem (skor 1) ostao je kod jedne životinje, a kod druge dve životinje nije uočeno prisustvo eritema (skor 0). U ovom vremenskom periodu edem je uočen kod jedne od tri životinje.

Skor primarne kutane iritacije pojedinačnih životinja prikazan je u Tabeli 23. 3. Postojala je statistički značajna razlika u vrednosti SPI između mesta tretiranih mlečnom kiselinom (98 %) i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p < 0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za mlečnu kiselinu (98 %), koja je korišćena kao pozitivna kontrola bio je 0,84 na skali od 0,00 do 8,00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, mlečna kiselina (98%) ima blago iritirajuće osobine.

Tabela 23. 3. Skor eritema i edema posle primene mlečne kiseline 98% (pozitivna kontrola)

Kunić (red.broj)		24 c		48 c		72 c		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	2	0	1	0	0	0	6/6-0/6=1.00	
	Edem	1	0	1	0	1	0		
2	Eritem	2	0	1	0	0	0	6/6-0/6=1.00	0.84
	Edem	1	0	1	0	1	0		
3	Eritem	1	0	1	0	1	0	3/6-0/6=0.50	
	Edem	0	0	0	0	0	0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

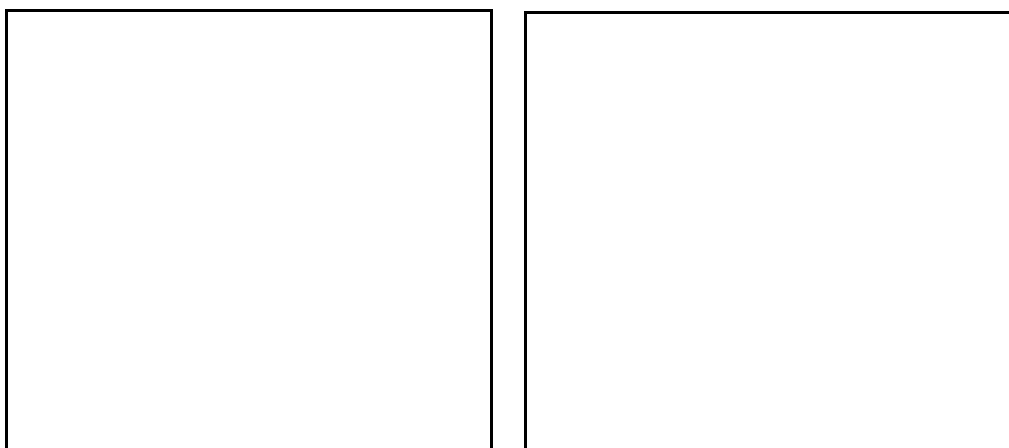
SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

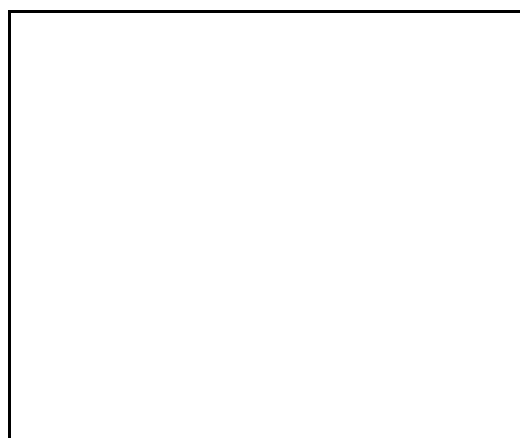
U testu primarne kutane iritacije za oba ispitivana test materijala (monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min i monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min) srednja vrednost indeksa primarne kutane iritacije je bila nula.

U direktnom, jednokratnom kontaktu sa kožom ni jedan od dva ispitivana test materijala nije ispoljio iritirajuća svojstva.

PRILOG POGLAVLJU 23.5.



Slika 23.20. Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije nakon postavljanja test uzoraka



Slika 23. 21. Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije 4 h nakon postavljanja test uzoraka

Slika 23. 22. Fotografije prikazuju test primarne kutane iritacije 72 h nakon postavljanja uzoraka

IV. ZAKLJUČCI

Stehiometrijski i kalcijum deficitarni nanočestični prahovi kalcijum-hidroksiapatita, sačinjeni od igličastih primarnih čestica dužine do 100 nm i širine oko 20-30 nm, sintetisani su modifikovanim precipitacionim metodama i korišćeni kao polazni materijal za proučavanje procesa formiranja gustih biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata različitim tehnikama sinterovanja. Ispitivanjem uticaja veličine izostatskog pritiska na presovanje nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita, zaključeno je da se presovanjem na pritisku od 400 MPa dobijaju polazni kompakti najvećih gustina ($1,89 \text{ g/cm}^3$ ili 60 % TG), najmanje ukupne zapremine pora, najuže raspodele veličina pora i najmanje zapremine mezopora. Konvencionalnim sinterovanjem kompakata, dobijenih presovanjem stehiometrijskog praha kalcijum-hidroksiapatita na 400 MPa, na 1200 °C tokom 2 h dobijen je monofazni biokeramički materijal na bazi kalcijum-hidroksiapatita, uniformne mikrostrukture sa prosečnom veličinom zrna od 3 μm i gustinom od $3,00 \text{ g/cm}^3$ tj. 95 % TG.

Mikrotalasnim sinterovanjem stehiometrijskog praha kalcijum-hidroksiapatita dobijeni su monofazni hidroksiapatitni biokeramički materijali, dok su u slučaju kalcijum deficitarnog hidroksiapatita dobijeni bifazni materijali na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata. U oba slučaja dobijeni materijali se odlikuju uniformnim mikrostrukturama, ravnomernim skupljanjem u svim pravcima i velikim gustinama, što je potvrda veoma dobre sinterabilnosti nanočestičnih prahova HAP u uslovima mikrotalasnog sinterovanja. Uniformne mikrostrukture monofaznih materijala na bazi HAP sinterovanih na temperaturama u intervalu od 900 °C - 1200 °C tokom 15 min, sačinjene su od zrna prosečne veličine od 130 nm do 1,59 μm . Povećanje temperature sinterovanja sa 900 °C na 1200 °C tokom formiranja bifazne HAP/TCP biokeramike, inicira znatno veći rast zrna nego u slučaju dobijanja monofazne biokeramike. Kalcijum deficitarni hidroksiapatit tokom procesa mikrotalasnog sinterovanja na 900 °C i 1000 °C transformiše u finozrni HAP/ β -TCP materijal, dok se povećanjem temperature iznad 1100 °C inicira fazna transformacija β -TCP-a u α -TCP koja je praćena značajnom ekspanzijom.

Dobijeni monofazni biokeramički materijali se odlikuju znatno većim vrednostima koeficijenata žilavosti od bifazne HAP/TCP biokeramike. Sa smanjenjem prosečne veličine zrna povećava se razlika vrednosti koeficijenata žilavosti ove dve vrste mikrotalasnog sinterovanih biokeramičkih materijala. Smanjenje veličine zrna u slučaju mikrotalasnog sinterovane monofazne biokeramike na bazi HAP sa 1,59 μm na 240 nm, rezultira povećanjem žilavosti sa $0,85 \text{ MPa m}^{1/2}$ to $1,04 \text{ MPa m}^{1/2}$, a najveća vrednost žilavosti od $1,30 \text{ MPa m}^{1/2}$ je dostignuta u slučaju monofazne biokeramike sa prosečnom veličinom zrna od 130 nm. Mehanizam loma u slučaju mikrotalasnog sinterovanih monofaznih materijala je intergranularan, tj. redukovanjem temperature i vremena sinterovanja primenom mikrotalasa tokom sinterovanja značajno je smanjena prosečna veličina zrna, čime je povećana absorpcija energije pukotine na granicama zrna duž njenog prostiranja, što je glavni uzrok većih

vrednosti žilavosti nanostrukturnih materijala. Tvrdoća mikrotalasno sinterovanih materijala na bazi HAP sa povećanjem temperature sinterovanja sa 900 °C na 1200 °C raste od vrednosti 3,45 GPa do 4,85 GPa, što je posledica povećanja gustine materijala.

Kombinacijom izostatskog presovanja na pritisku od 400 MPa i mikrotalasnog sinterovanja na 900 °C tokom 15 min, dobijen je nanostrukturni monofazni biokeramički materijal na bazi HAP gustine 96 % TG i poboljšanih mehaničkih svojstava, sa vrednošću koeficijenta žilavosti od 1,34 MPa m^{1/2} i tvrdoće 4,75 GPa, što je najoptimalnija kombinacija mehaničkih svojstva kod materijala dobijenih mikrotalasnim sinterovanjem. Mikrotalasnim sinterovanjem nanočestičnih prahova HAP tokom 15 min, postignute su znatno veće gustine, uniformnije mikrostrukture i superiornija mehanička svojstva u odnosu na konvencionalno sinterovane uzorake na istoj temperaturi tokom višestruko dužeg vremena procesiranja.

Sinterovanjem nanočestičnih prahova kalcijum-hidroksiapatita metodama potpomognutim pritiskom, tj. spark plazma sinterovanjem i toplim presovanjem, dobijeni su materijali sa izuzetno velikim gustinama i uniformnim mikrostrukturama sa prosečnom veličinom zrna od mikro do nano nivoa. Kao i u slučaju mikrotalasnog sinterovanja, spark plazma sinterovanjem i toplim presovanjem praha kalcijum-hidroksiapatita sa stehiometrijskim Ca/P odnosom dobijena je monofazna biokeramika, dok su bifazni biokeramički materijali dobijeni sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita.

U slučaju uzoraka dobijenih spark plazma sinterovanjem, najveća vrednost gustine 3,12 g/cm³ (98,5 % TG) je postignuta sinterovanjem na 1000 °C tokom 10 min. Snižavanjem temperature sinterovanja na 900 °C i skraćivanjem vremena na 5 min dobijaju se nešto manje gustine, ali se prosečna veličina zrna približava nano nivou i iznosi približno 150 nm. Upravo pri ovim uslovima, spark plazma sinterovanjem dobijen je monofazni uzorak sa najmanjim zrnom i najvećom vrednošću koeficijenta žilavosti od 1,00 MPa m^{1/2}, dok je vrednost tvrdoće iznosila 4,75 GPa.

Toplim presovanjem stehiometrijskog praha kalcijum-hidroksiapatita dobijeni su translucentni monofazni biokeramički materijali na bazi HAP sa prosečnom veličinom zrna u intervalu od 50 nm, u slučaju uzorka toplo presovanog na 950 °C tokom 2 h, do veličine od 380 nm u slučaju uzorka procesiranog na 1000 °C tokom 2 h. Translucentnost dobijenih uzoraka je potvrda izuzetno velike gustine i dimenzije zrna merljive na nano skali.

Ispitivanje uticaja smanjenja prosečne veličine zrna na mehanička svojstva, dovelo je do zaključka da smanjenje zrna sa mikro na nano nivo inicira istovremeno povećanje i žilavosti i tvrdoće gustih monofaznih biomaterijala. U poređnom analizom konvencionalno sinterovanih i toplo presovanih monofaznih biomaterijala, zaključuje se da sa smanjenjem veličine zrna sa 3 μm na 50 nm, koeficijent žilavosti povećava sa 0,28 MPa m^{1/2} do vrednosti od 1,52 MPa m^{1/2}, dok se tvrdoća povećava od vrednosti 2,39 GPa do 4,30 GPa.

Ispitujući uticaj faznog sastava i veličine zrna toplo presovanih i konvencionalno sinterovanih monofaznih i bifaznih, nano- i mikrostrukturnih biokeramičkih materijala metodom nanoidentacije, zaključeno je da nastajanje β-TCP faze tokom procesiranja ima

dominantan uticaj na nanomehaničke karakteristike biokeramike na bazi HAP i TCP. Nanoindentacijom je utvrđeno da u slučaju monofazne biokeramike smanjenje veličine zrna sa mikro na nano nivo izaziva povećanje tvrdoće i smanjenje Jungovog modula elastičnosti. Analizirajući rezultate nanoindentacije bifazne HAP/ β -TCP biokeramike, smanjenjem veličine zrna povećavaju se vrednosti i tvrdoće i modula elastičnosti. Zaključeno je da smanjenje veličine zrna i kod monofaznih i kod bifaznih biokeramičkih materijala, izaziva povećanje tvrdoće, što je u skladu sa očekivanjima proizašlih iz Hall-Petch-ove jednačine.

Biokeramički materijali kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata, dobijeni su polazaći od hidrotetalno dobijenih prahova, sačinjenih od aglomerata sfernog oblika sa sfernim intraaglomeratnim porama u središtu. Nakon dejstva izostatskog pritiska od 400 MPa sferna struktura čestica nije narušena, te je zaključeno da je mikrotalasnim sinterovanjem polaznih kompakata moguće dobiti kontrolisano porozni materijal, čija je maksimalna dimenzija pora određena dimenzijom sfernih intraaglomeratnih pora. Prilikom sinterovanja polaznih kompakata na 1200 °C tokom 15 min u slučaju hidroksiapatita sa većim Ca/P odnosom pored dominantne hidroksiapatitne faze javlja se mali udeo α -TCP, koji je dominantna kristalna faza u slučaju materijala dobijenog sinterovanjem hidrotetalno dobijenog kalcijum-hidroksiapatita sa manjim Ca/P odnosom. U oba slučaja povećanje temperature mikrotalasnog sinterovanja utiče na povećanje gustine i udela sfernih pora u materijalu, što za posledicu ima poboljšanje mehaničkih svojstava poroznih materijala na bazi HAP i TCP. Nakon mikrotalasnog sinterovanja na 1200 °C žilavosti dobijenih materijala imala je vrednost 1,25 MPa m^{1/2} u slučaju oba praha, što navodi na zaključak da fazni sastav ima inferioran uticaj na žilavost ovih materijala u odnosu na njihovu specifičnu mikrostrukturu koja se odlikuje prisustvom sfernih intraaglomeratnih pora i uspostavljenih snažnih kontinualnih vratova između vrlo postojanih sfernih aglomerata.

Primena izostatskog pritiska od 400 MPa pri presovanju sfernih čestica, uticala je na intenzivniju densifikaciju pri sinterovanju i formiranja jačih vratova između sfernih aglomerata. Kao posledica usledilo je povećanje žilavosti biokeramičkog materijala u kome je dominantna kristalna faza α -TCP do vrednosti 1,35 MPa m^{1/2}, što je izuzetno visoka vrednost za ovaj tip biokeramičkih materijala. Mikrotalasnim sinterovanjem su dobijeni biokeramički materijali kontrolisane poroznosti na bazi HAP i α -TCP znatno boljih mehaničkih svojstava u odnosu na biomaterijale dobijene konvencionalnim sinterovanjem tokom osam puta dužeg vremena zadržavanja na temperaturi sinterovanja.

Definisanjem morfologije pora analizom slike, zaključeno je da se sa povećanjem temperature sinterovanja ukupan broj pora smanjuje dok se njihova sferičnost povećava, pri čemu sferične pore ne menjaju oblik, dok nepravilne pore postaju sferičnije. Povećanje broja sferičnih pora uz istovremeno smanjenje broja pora nepravilnih dimenzija, tj. povećanje ukupne sferičnosti pora ima pozitivan uticaj na povećanje žilavosti biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti. Metodom konačnih elemenata je zaključeno da je prisustvo sfernih

pora u kontrolisano poroznom materijalu na bazi HAP i TCP, jedan od preduslova za dobra mehanička svojstva biokeramičkih materijala kontrolisane poroznosti.

In vitro ispitivanjima nano- i mikrostrukturnih gustih sinterovanih monofaznih materijala na bazi HAP u STF potvrđena je njihova bioaktivnost. Pokazano je da smanjenje prosečne veličine zrna sa mikro na nano nivo utiče na mikrostrukturu novonastalog kalcijum-fosfatnog sloja na površini biokeramičkog materijala tokom ispitivanja bioaktivnosti u simuliranom telesnom fluidu.

In vitro ispitivanjima nano- i mikrostrukturnih monofaznih hidroksiapatitnih materijala u kulturi ćelija L929 pokayano je da nijedan od dva ispitivana materijala nije ispoljavao citotoksični efekat, što se uočava na osnovu morfoloških analiza ćelijskih kutura, ispitivanja metaboličke aktivnosti, vijabilnosti ćelija i nekroze ćelija. Ćelije L929 brže rastu u blizini uzoraka kalcijum-hidroksiapatita u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu uzorak sa nanostrukturnom površinom snažnije stimuliše procese ćelijske proliferacije.

Na osnovu rezultata MTT, DET, agar difuzionih *in vitro* testova sa humanim fibroblastnim ćelijama zaključeno je da mikrotalasno sinterovani mikro- i nanostrukturnih monofazni hidroksiapatitni materijali ne pokazuju citotoksični efekat. Tokom perioda oporavka MRC-5 ćelija mikro- i nanostrukturnih monofazni hidroksiapatitni materijali izazivaju stimulaciju metaboličke aktivnosti, tj. primećuje se da se broj vijabilnih ćelija povećava iznad broja vijabilnih ćelija kontrolnog uzorka, što je dokaz dobre proliferacije fibroblastnih ćelija na ispitivanim materijalima. Histološkom analizom ćelija je zaključeno da fibroblasti koji su u kontaktu sa mikrotalasno sinterovanim HAP imaju sve karakteristike mladih vitalnih fibroblasta s produžecima, koji grade mrežu i istovetni su sa kontrolnim ćelijama.

Rezultati histološke SEM analize upućuju na zaključak da su u slučaju oba ispitana materijala: L929 i MRC-5 ćelije čvrsto vezane za površinu materijala, da se radi o mladim sintetski aktivnim ćelijama, da i telo ćelije i citoplazmatični produžetci u velikoj meri atheriraju na podlogu, ali i da je u slučaju nanostrukturnog HAP1 znatno veća prionljivost ćelija na površinu u odnosu na mikrostrukturne materijale, tj. ćelije su potpuno raširene i celim obimom naležu na površinu materijala.

Ispitivanjem biokompatibilnosti mikrotalasno sinterovanog monofaznog hidroksiapatitnog materijala HAP1 *in vitro*, određivanjem adhezije osteoblastnih ćelija MC3T3-E1, utvrđeno je da su ćelije sa površinom ispitivanog potencijalno implantnog materijala uspostavile čvrstu vezu. Modifikacija naelektrisanja površine u slučaju mikrotalasno sinterovanog HAP1, nije osetnije uticala na adheziju osteoblastnih ćelija za površinu materijala. Zaključeno je i da je najveći broj ćelija u trećoj fazi adhezije, tj. ćelije su celim svojim obimom u kontaktu sa površinom mikrotalasno sinterovanog materijala.

Prilikom *in vivo* ispitivanja biokompatibilnosti, testom primarne kutane iritacije za oba ispitivana materijala (monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min i monofazni HAP1 mikrotalasno sinterovan na 900 °C tokom 15 min) srednja vrednost indeksa

primarne kutane iritacije je bila nula. U direktnom, jednokratnom kontaktu sa kožom ni jedan od dva ispitivana test materijala nije ispoljio iritirajuća svojstva.

DALJI PRAVCI ISTRAŽIVANJA

Predmet budućih istraživanja mogu biti:

- ispitivanje mogućnosti uvođenja u sistem čestica sa superiornijim mehaničkim svojstvima npr. itrijum ili cerijum stabilisanog cirkonijum-dioksida prilikom mikrotalasnog i spark plazma sinterovanja, sa ciljem da se dobiju bioaktivni materijali sa još boljim mehaničkim svojstvima;
- ispitivanje mogućnosti dobijanja kompozitnog materijala sačinjenog od kalcijum-hidroksiapatita i karbonskih nanotuba sa ciljem da se poveća provodnost matriksa tokom spark plazma sinterovanja i poboljšaju mehanička svojstva dobijenih biokeramičkih materijala;
- nastavak in vitro i in vivo ispitivanja uticaja mikrostrukturnih parametara na bioaktivnost i biokompatibilnost gustih i kontrolisano poroznih biokeramičkih materijala na bazi HAP i TCP;
- ispitivanje mogućnosti aplikacije materijala dobijenih tokom izrade ove doktorske disertacije u stomatologiji, ortopediji i maksiofacijalnoj hirurgiji.

LITERATURA

1. M. Wang, "Biomaterials and Tissue Engineering", Springer, New York (2004).
2. J. B. Park, "Biomaterials An Introduction", Plenum Press, New York (1992).
3. L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic", *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487-1510.
4. L. R. Barrack, "Bone Graft Extenders, Substitutes, and Osteogenic Proteins", *J. Orthop.* 20 (2005) 94-97.
5. S. Radulović-Pantelić, "Stomatološka protetika nadoknade na implantatima", Jugoslovenska knjiga, Beograd (1998).
6. L. L. Hench, "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomater.* 19 (1998) 1419-1423.
7. C. T. Laurencin, M. A. Ambrosio, M. D. Borden, J. A. Cooper, "Tissue engineering: orthopedic applications", *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 1 (1999) 19-46.
8. C. Schwartz, C. R. Bordei, "Biphasic phospho-calcium ceramics used as bone substitutes are efficient in the management of severe acetabular bone loss in revision total hip arthroplasties", *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 15 (2005) 191-196.
9. F. H. Albee, "Studies in bone growth. Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis", *Ann. Surg.* 71 (1920) 32-36.
10. G. E. Levitt, P. H. Crayton, E. A. Monroe, R. A. Condrate, "Forming methods for apatite prosthesis", *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (1969) 683-685.
11. Z. A. Monroe, W. Votawa, D. B. Bass, J. McMullen, "New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants", *J. Dent. Res.* 50 (1971) 860-862.
12. W. J. Clark, T. D. Driskell, C.R. Hassler, V. J. Tennery, L. McCoy, "Calcium phosphate resorbable ceramics, a potential alternative to bone grafting", *IADR Prog. Abst.* 52 (1973) 259.
13. W. Hubbard, "Physiological calcium phosphate as orthopedic implant material", Ph.D. Thesis, Marquette University (1974).
14. E. B. Nery, K. L. Lynch, W. M. Hirthe, K. H. Mueller, "Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects", *J. Periodont.* 46 (1975) 328-339.
15. R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, "Dense hydroxyapatite" u "An introduction to bioceramics", ed. L. L. Hench, J. Wilson, World Scientific Publishing Co. Pti. Ltd 1 (1993) 139-180.
16. M. Jarho, J. F. Kay, H. P. Drobeck, R. H. Doremus, "Tissue cellular and subcellular events at bone-ceramic hydroxyapatite interface", *J. Bioeng.* 1 (1976) 79-92.
17. M. Jarho, C. H. Bolen, M. B. Thomas, J. Bobick, J. F. Kay, R. H. Doremus, "Synthesis and characterization in dense polycrystalline forms", *J. Mater. Sci.* 11 (1976) 2027-2035.
18. K. de Groot, "Ceramic of calcium phosphates: preparation and properties" u "Bioceramics of calcium phosphate", ed. K. de Groot, CRC Press, Boca Ration, FL. (1983) 100-114.
19. J. G. C. Peelen, B. V. Rejda, K. de Groot, "Preparation and properties of sintered hydroxyapatite", *Ceramurgia Int.* 4 (1980) 71-73.
20. H. Denissen, "Dental root implants of apatite ceramics", Ph.D. Thesis, Vrije Universiteit te Amsterdam (1979).

21. H. Akao, J. Aoki, K. Kato, "Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic application", *J. Mater. Sci.* 16 (1981) 809-812.
22. H. Akao, K. Kato, M. Ogiso, "Sintered hydroxyapatite as a new dental implant material", *J. Dent. Outlook* 49 (1977) 567-575.
23. Dj. Veljović, B. Jokić, I. Janković-Častvan, I. Smičiklas, R. Petrović, Dj. Janačković, "Sintering Behaviour of Nanosized HAP Powder" *Key Engin. Mater.* 330-332 (2007) 259-262.
24. Dj. Veljović, B. Jokić, R. Petrović, E. Palcevskis, A. Dindune, I. N. Mihailescu, Dj. Janačković, "Processing of dense nanostructured HAP ceramics by sintering and hot pressing", *Ceram. Int.* 35 (2009) 1407-1413.
25. C. Y. Tang, P. S. Uskoković, C. P. Tsui, Dj. Veljović, R. Petrović, Dj. Janačković, "Influence of microstructure and phase composition on the nanoindentation characterization of bioceramic materials based on hydroxyapatite", *Ceram. Int.* 35 (2009) 2171-2178.
26. Dj. Veljović, I. Zalite, E. Palcevskis, I. Smičiklas, R. Petrović, Dj. Janačković, "Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics", *Ceram. Int.* 36 (2010) 595-603.
27. Dj. Veljović, E. Palcevskis, A. Dindune, S. Putić, I. Balać, R. Petrović, Dj. Janačković, "Microwave sintering improves the mechanical properties of biphasic calcium phosphates from hydroxyapatite microspheres produced from hydrothermal processing", *J. Mater. Sci.* 45 (12) (2010) 3175-3183.
28. B. Jokić, I. Janković-Častvan, Dj. Veljović, R. Petrović, S. Drmanić, Dj. Janačković, "Preparation of α -TCP cements from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method", *Key Engin. Mater.* 309-311 (2006) 821-824.
29. B. Jokić, I. Janković-Častvan, Dj. Veljović, D. Bučevac, K. Obradović-Djuričić, R. Petrović, Dj. Janačković, "Synthesis and settings behaviour of α -TCP from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method", *J. Opt. Adv. Mater.* 9 (2007) 1904-1910.
30. D. Stojanović, B. Jokić, Dj. Veljović, R. Petrović, P. S. Uskoković, Dj. Janačković, "Bioactive glass apatite coating for titanium implant synthesized by electrophoretic deposition", *J. Europ. Ceram. Soc.* 27 (2007) 1595-1599.
31. D. Tanasković, Dj. Veljović, R. Petrović, C. Cojanu, C. Ritoscu, I. N. Mihailescu, Dj. Janačković, "Double-layer bioactive glass coatings obtained by pulsed laser deposition", *Key Engin. Mater.* 361-363 (2008) 277-280.
32. S. Eraković, Dj. Veljović, P. N. Diouf, T. Stevanović, M. Mitrić, S. Milonjić, V. Mišković-Stanković, "Electrophoretic deposition of biocomposite lignin/hydroxyapatite coatings on titanium", *Int. J. Chem. React. Eng.* 7 (2009) 62.
33. D. Tanasković, B. Jokić, G. Socol, A. Popescu, I. N. Mihailescu, R. Petrović, Dj. Janačković, "Synthesis of functionally graded bioactive glass-apatite multistructures on Ti substrates by pulsed laser deposition", *App. Surf. Sci.*, 254 (2007) 1279-1282.
34. H. Denissen, C. Mangano, G. Cenini, "Hydroxyapatite implants", *Piccin Nuova Libreria, S.P.A.* (1985).
35. J. Chevalier, L. Gremillard, "Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years", *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1245-1255.
36. M. Descamps, J. C. Hornez, A. Leriche, "Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications", *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 369-375.

37. C. A. Van Blitterswijk, "Calcium phosphate middle ear implants", Ph. D. Thesis, Rijksuniversiteit te Leiden (1985).
38. C. A. Van Blitterswijk, S. C. Hasseling, J. J. Grote, H. K. Korerte, K. de Groot, "The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: A study of retrieved human middle ear implants", *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 433-453.
39. J. H. Quinn, J. N. Kent, "Alveolar ridge maintenance with solid nonporous hydroxyapatite root implants", *Oral. Surg.* 58 (1984) 511-516.
40. A. N. Cranin, G. P. Tobin, J. Gelbman, "Applications of hydroxyapatite in oral and maxillofacial surgery, part II: Ridge augmentation and repair of major oral defects", *Compend. Contin. Educ. Dent.* 8 (1987) 334-345.
41. M. I. Kay, R. A. Young, A. S. Posner, "Crystal structure of hydroxyapatite", *Nature* 204 (1964) 1050-1053.
42. H. Oonishi, E. Tsuji, H. Ishimaru, M. Yamamoto, J. Delecrin, "Clinical significance of chemical bonds between bioactive ceramics and bone in orthopaedic surgery", "Bioceramics", ed. G. Heimke, German Ceramic Society 2 (1990) 286-293.
43. E. Nery, R. Z. LeGeros, G. Daculsi, "Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/TCP in periodontal osseous defects", *J. Periodontol* 63 (1992) 729-735.
44. S. J. Froum, J. Kushner, L. Scopp, S. S. Stahl, "Human clinical and histologic response to durapatite implants in intraosseous lesion, case reports", *J. Periodontol* 53 (1986) 719-725.
45. P. N. Galgut, I. M. Waite, S. M. B. Tinkler, "Histological investigation of the tissue response to hydroxyapatite used as an implant material in periodontal treatment", *Clin. Mater.* 6 (1990) 105-121.
46. J. Wilson, G. E. Merwin, "Biomaterials for facial bone augmentation: comparative studies", *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomat.* 22 (1988) 159-177.
47. J. Wilson, S. B. Low, "Bioactive ceramics for periodontal treatment", *J. Appl. Biomat.* 3 (1992) 123-129.
48. L. Linkow, "Bone transplants using the symphysis, the iliac crest and synthetic bone materials", *J. Oral. Implantol.* 11 (1984) 211-217.
49. W. Bonfield, "Hydroxyapatite reinforced polyethylene as an analogous material for bone replacement" u "Bioceramics: Materials characteristics versus in vivo behaviour" ed. P. Ducheyne, J. E. Lemons, *Ann. NY Acad. Sci.*, New York 523(1988) 173-177.
50. R. Z. LeGeros, B. Penugonda, "Potential use of calcium phosphate as fillers in composite restorative biomaterials", *Second world congress on biomaterials, Washington* (1984).
51. A. Jean, B. Kerebel, R. Z. LeGeros, "Effects of various calcium phosphatematerials on the reparative dentin bridge", *J. Endo.* 14 (1988) 83-87.
52. R. M. Frank, P. Widemann, J. Hemmerle, "Pulp capping with synthetic hydroxyapatite in human premolars", *J. Appl. Biomat.* 2 (1991) 243-250.
53. R. A. Young, J. C. Elliot, "Scale bases for several properties of apatites", *Archs. Oral. Biol.* 11 (1966) 699-707.
54. E. C. Shors, R. E. Holmes, "Porous hydroxyapatite" u "An introduction to bioceramics", ed. L. L. Hench, J. Wilson, *World Scientific Publishing Co. Pti. Ltd* 1 (1993) 181-190.

55. R. Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J. P LeGeros, "Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14 (2003) 201–209.
56. F. Tancret, J. M. Bouler, J. Chamouset, L. M. Minois, "Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics", *J. Eur. Ceram. Soc.* 26, (2006), 3647–3656.
57. M. Descamps, J. C. Hornez, A. Leriche, "Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications", *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 369–375.
58. R. Vani, E. K. Girija, K. Elayaraja, S. P. Parthiban, R. Kesavamoorthy, S. N. Kalkura, "Hydrothermal synthesis of porous triphasic hydroxyapatite(α and β) tricalcium phosphate", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* Doi 10.1007/s10856-008-3480-8.
59. R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, K. A. Khor, "Microstructure and mechanical properties of spark plasma sintered zirconia-hydroxyapatite nano-composite powders", *Acta Mater.* 53 (2005) 2327–2335.
60. M. Kawata, H. Uchida, K. Itatani, I. Okada, S. Koda, M. Aizawa, "Development of porous ceramics with well-controlled porosities and pore sizes from apatite fibers and their evaluations", *J. Mater. Sci.:Mater. Med.* 15 (2004) 817–823.
61. J. S. Temenoff, A. G. Mikos, "Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering", *Biomater.* 21 (2000) 2405-2412.
62. E. W. White, J. N. Webber, D. M. Roy, E. L. Owen, R. T. Cchirolf, R. A. White "Replamineform Porous Biomaterials for Hard Tissue Implant Applications", *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 6 (1975) 23-27.
63. C. Klein, P. Patka, W. Den Hollander, "Macroporous calcium phosphate bioceramics in dog femora: A histological study of interface and biodegradation" 10 (1989) 59-62.
64. W. E. Brown, L. C. Chow, "A new calcium phosphate, water setting cement", *Cements Research Progrss A. C. S., Ohio* (1986) 352-379.
65. P. J. Capano, "The chemical synthesis and biomedical and dental applications of the first truly successful, in vivo replacement for bones, teeth and similar materials", PhD. Thesis, University of Texas, Austin (1987).
66. B. Constanc, S. W. Young, "Pilot investigations of a calcium phosphate cement in a rabbit femoral canal model and a canine humeral plug model", *Transaction of the 17th annual meeting, Societe for Biomaterials, Scottsdale, ariyona*, (1991) 92.
67. P. D. Costantino, C. D. Friedman, K. Jones, L. C. Chow, H. J. Pelzer, G. A. Sisson, "Hydroxyapatie cement: I. Basic chemistry and histological properties", *Arch Otolar. Head neck Surg.* 117 (1991) 92.
68. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, "Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites", *J. Eur. Ceram. Soc.*, 20 (2000) 2377-2387.
69. R. M. Novaković, M. Giordani, "Biomaterials", *Center for Multidisciplinary Studies of Belgrade University, Beograd* (1996).
70. S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials", *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 2343–2387.
71. J. B. Park, R. S. Lakes, "Ceramic Implant Materials", Springer, New York, (2007).
72. H. Kim, "Synthesis and control of microstructure, mechanical properties and bioactivity in biphasic and preferentially oriented calcium phosphate bioceramics", PhD. Thesis, University of Alabama, Birmingham (2007).
73. M. Mathew, S. Takagy, "Structures of Biological Minerals in Dental Research", *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 106 (2001) 1035–1044.

74. S. V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine", *J. Mater. Sci.* 2 (2009) 399-498.
75. P. Becker, "Phosphates and phosphoric acid: raw materials technology and economics of the wet process", ed. M. Dekker, "In Fertilizer science and technology series", New York, USA (1989).
76. P. J. Cook, J. H. Shergold, "Phosphate deposits of the world: phosphate rock resources", ed. D. F. Davidson, Cambridge University Press, Cambridge, USA 2 (2005) 600.
77. E. Cantelar, G. Lifante, T. Calderon, R. Melendrez, A. Millan, M. A. Alvarez, M. Barboza-Flores, "Optical characterisation of rare earths in natural fluorapatite", *J. Alloys Compd.* 323-324 (2001) 851-854.
78. H. B. Ribeiro, K. J. Guedes, M. V. B. Pinheiro, S. Greulich-Weber, K. Krambrock, "About the blue and green colours in natural fluorapatite", *Phys. Status Solid C* 2 (2005) 720-723.
79. D. E. C. Corbridge, "Phosphorus", Elsevier, Amsterdam (1985).
80. R. Z. Le Geros, O. R. Trautz, J. P. Le Geros, "Crystallographic Studies of the Carbonate Substitution in the Apatite Structure", PhD Thesis, New York University (1967).
81. R. Z. Le Geros, G. Bonel, J. P. Le Geros, "Apatites in Biological Systems", *Prog. Cristal. Growth. Charact.* 4 (1981) 1-45.
82. R. Z. Le Geros, "Calcium phosphates in oral biology and medicine", u "Monograph in oral science" ed. H. Myers, S. Karger, Basel (1991).
83. R. Z. Le Geros, "Incorporation of magnesium in synthetic and biological apatite", u "Tooth enamel IV", ed. R. W. Fearnhead, S. Suga, Elsevier science publisher, Amsterdam (1984) 32-36.
84. R. Z. Le Geros, M. S. Tung, "Chemical stability of carbonate and fluoride containing apatites", *Caries. Res.* 17 (1983) 419-429.
85. R. Z. Le Geros, "Crystallographic studies of the carbonate substitution in the apatite structure", PhD. Thesis, New York University (1967).
86. D. Trpinac, "Histologija", Colibri, Beograd (1994).
87. S. R. Simon "Orthopedic Basic Science", u ed. I. L. Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons (1994).
88. A. L. Boskey, A. S. Posner, "Bone structure, composition and mineralization", *Orthopaedic Clinics of North America* 15 (1984) 597-612.
89. S. Popović, "Embriologija čoveka", Svetozar Marković, Beograd, (1983) 96-103.
90. K. de Groot, C. P. A. T. Klein, J. G. C. Wolke, J. M. A. De Bliet, "Chemistry of calcium phosphate bioceramics", u "Handbook of bioactive ceramics, vol 2", ed. T. Yamamuro, L. L. Hench, J. Wilson, CRC Press, Boca Ration, Florida (1990) 3-16.
91. F. Micelli, A. Maffezzoli, R. Terezi, V. A. M. Luprano, "Characterization of the kinetic behavior of resin modified glass-ionomer cements by DSC, TMA and ultrasonic wave propagation", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 12 (2001) 151-156.
92. F. C. M. Driessens, M. G. Boltong, O. Bermudez, J. A. Planell, M. P. Ginebra, E. Fernandez, "Effective formulations for the preparation of calcium phosphate", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5 (1994) 164-170.
93. W. C. O'Neill, "The fallacy of the calcium-phosphorus product", *Kidney Int.* 72 (2007) 792-796.

94. R. Z Le Geros, "Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification", *Kardiol., Suppl.* 3 (2001) 90.
95. A. Becker, M. Epple, K. M. Müller, I. Schmitz, "A comparative study of clinically wellcharacterized human atherosclerotic plaques with histological, chemical, and ultrastructural methods", *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2032-2038.
96. B. Wopenka, J. D. Pasteris, "A mineralogical perspective on the apatite in bone", *Mater. Sci. Eng.,C* 25 (2005) 131-143.
97. T. Kodaka, K. Debari, S. Higashi, "Magnesium-containing crystals in human dental calculus", *J. Electron Microsc.* 37 (1988) 73-80.
98. A. A. Mirtchi, J. Lemaitre, E. Munting, "Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate – dicalcium phosphate – calcite cements", *Biomater.* 11 (1990) 83-88.
99. A. A. Mirtchi, J. Lemaitre, E. Munting, "Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of β -tricalcium phosphate – dicalcium phosphate – calcite cements", *Biomater.* 12 (1991) 505-510.
100. J. Lemaitre, E. Munting, A. A. Mirtchi, "Setting, hardening and resorption of calcium phosphate ionic cements", *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 93 (1992) 163-165.
101. K. Ohura, M. Bohner, P. Hardouin, J. Lemaitre, G. Pasquier, B. Flautre, "Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study", *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 193-200.
102. A. Lecomte, H. Gautier, J. M. Bouler, A. Gouyette, Y. Pegon, G. Daculsi, C. Merle, "Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics", *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 84B (2008)1-6.
103. J. M. Bouler, M. Trecant, J. Delecrin, J. Royer, N. Passuti, G. Daculsi, "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of five synthesis parameters on compressive strength", *J. Biomed. Mater. Res.*, 32 (1996) 603-609.
104. J. Wang, W. Chen, Y. Li, S. Fan, J. Weng, X. Zhang, "Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae", *Biomater.* 19 (1998) 1387-1392.
105. G. Daculsi, "Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute", *Biomater.* 19 (1998) 1473-1478.
106. G. Daculsi, P. Weiss, J. M. Bouler, O. Gauthier, F. Millot, E. Aguado, "Biphasic calcium phosphate/hydro soluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials", *Bone Mater.* 2 (2009) 456.
107. G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, P. Weiss, "Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 14, (2003) 195-200.
108. I. Alam, I. Asahina, K. Ohmamiuda, S. Enomoto, "Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitutes", *J. Biomed. Mater. Res.* 54 (2001) 129-138.
109. G. Daculsi, "Biphasic calcium phosphate granules concept for injectable and moldable bone substitute", *Adv. Sci. Technol.* 49 (2006) 9-13.
110. O. Bermudez, M. G. Boltong, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, "Development of some calcium phosphate cements from combinations of α -TCP, MCPM and CaO", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 160-163.

111. K. Kurashina, H. Kurita, M. Hirano, A. Kotani, C. P. Klein, K. de Groot, "In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste", *Biomater.* 18 (1997) 539-543.
112. F. C. M. Driessens, J. A. Planell, M. G. Boltong, I. Khairoun, M. P. Ginebra, "Osteotransductive bone cements", *Proc. Inst. Mech. Eng., H: J. Eng. Med.* 212 (1998) 427-435.
113. S. Takagi, L. C. Chow, K. Ishikawa, "Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements", *Biomater.* 19 (1998) 1593-1599.
114. H. Yamamoto, S. Niwa, M. Hori, T. Hattori, K. Sawai, S. Aoki, M. Hirano, H. Takeuchi, "Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro", *Biomater.* 19 (1998) 1587-1591.
115. E. Fernandez, M. P. Ginebra, M. G. Boltong, F. C. M. Driessens, J. Ginebra, E. A. de Maeyer, R. M. H. Verbeeck, J. A. Planell, "Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement", *J. Biomed. Mater. Res.* 32 (1996) 367-374.
116. E. Fernandez, F. J. Gil, S. M. Best, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, "The cement setting reaction in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: an X-ray diffraction study", *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 403-406.
117. E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, "Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 223-230.
118. B. R. Constantz, I. C. Ison, M. T. Fulmer, R. D. Poser, S. T. Smith, M. Vanwagoner, "Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone", *Science*, 267 (1995) 1796-1799.
119. K. C. B. Yeong, J. Wang, S. C. Ng, "Fabricating Densified Hydroxyapatite Ceramics from a Precipitated Precursor", *Mater. Letters*, 38 (1999) 208-213.
120. A. Osaka, Y. Miura, K. Takeuchi, M. Asada, K. Takahashi, "Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2 (1991) 51-55.
121. E. Palcevskis, A. Dindune, L. Kuznecova, A. Lipe, Z. Kanepes, "Granulated composite powders on basis of hydroxyapatite and plasma-processed zirconia and alumina nanopowders", *Latvian J. Chem.* 2 (2005) 128-138.
122. I. Smičiklas, A. Onjia, S. Raičević, "Experimental design approach in the synthesis of hydroxyapatite by neutralization method", *Sep. Purif. Technol.* 44 (2005) 97-102.
123. Dj. Janackovic, I. Petrovic-Prelevic, Lj. Kostic-Gvozdenovic, R. Petrovic, V. Jokanovic, D. Uskokovic, "Influence of synthesis parameters on the particle sizes of nanostructured calcium-hydroxyapatite", *Key Engin. Mater.* 192-195 (2001) 203-206.
124. Dj. Janackovic, I. Jankovic, R. Petrovic, Lj. Kostic-Gvozdenovic, S. Milonjic, D. Uskokovic, "Surface properties of HAP particles obtained by hydrothermal decomposition of urea and calcium-EDTA chelates", *Key Engin. Mater.* 240-242 (2003) 437-440.
125. T. Hattori, Y. Iwadate, "Hydrothermal preparation of calcium hydroxyapatite powders", *J. Am. Ceram. Soc.* 73(6) (1990) 1803-1805.
126. F. Wakai, Y. Kodama, S. Sakaquchi, "Superplasticity of hot isostatically hydroxyapatite", *J. Am. Ceram. Soc.* 73 (1990) 457-460.

127. Y. Fujishiro, T. Sato, A. Okuwaki, "Coating of hydroxyapatite on titanium plates by the hydrothermal reactions of $\text{Ca}(\text{EDTA})^{2-}$ in phosphate solutions", u Proceedings of the Second International Meeting of Pacific Rim Ceramic Societies, Carns, Australia (1996) 18-21.
128. R. Rao, H. N. Roopa, T. S. Kanan, "Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP – β -TCP composite ceramic powders", J. Mater. Sci.: Mater. Med. 8 (1997) 511.
129. R. Rao, H. Nroopa, T. S. Kannan, "Powders of pure β -tricalcium phosphate (β -TCP), hydroxyapatite (HAP) and a biphasic composite mixture of HAP+ β -TCP", J. Mater. Sci.: Mater. Med. 8 (1997) 511-518.
130. P. Layrolle, A. Ito, T. Tateishi, "Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics", J. Am. Ceram. Soc. 81 (1998) 1421.
131. Y. Masuda, K. Matsubara, S. Sakka, "Synthesis of HAP from metal alkoxides trough sol-gel technique", J. Ceram. Soc. Jpn. 98 (1990) 1255-1266.
132. S. Bose, S. K. Saha, "Synthesis of hydroxyapatite nanopowders via sucrose-templated Sol-Gel method", J. Am. Ceram. Soc. 86 (6) (2003) 1055-1057.
133. T. A. Cuneyt, "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids", Biomater. 21 (2000) 1429-38.
134. B. Jokic, D. Tanaskovic, I. Jankovic-Castvan, S. Drmanic, R. Petrovic, Dj. Janackovic, "Synthesis of nanosized calcium hydroxyapatite particles by the catalytic decomposition of urea with urease", J. Mater. Res. 22 (2007) 1156-1161.
135. M. A. Verges, C. F. Gonzalez, M. M. Gallego, M. Solier, I. Cachadina, E. Matijevic, "A new route for the synthesis of calcium-deficient hydroxyapatites with low Ca/P ratio: Both spectroscopic and electric characterization", J. Mater. Res., 15 (2000) 2534-2539.
136. T. Nakajima, M. Kandori, K. Ishikawa, T. Yasukawa, A. Matsuura, "Preparation of nonstoichiometric calcium hydroxyapatite using formamide", Mater. Res. Bull. 34 (1999) 589-601.
137. M. Aizava, T. Hanazava, K. Itatani, F. S. Howell, A. Kishioka, "Characterization of hydroxyapatite powders prepared by ultrasonic spray-pyrolysis technique", J. Mater. Sci. 34 (1999) 2865-2871.
138. Y. Fang, D. K. Agrawal, D. M. Roy, R. Roy, "Fabrication of porous hydroxyapatite ceramics by microwave processing", J. Mater. Res. 7 (1992) 490-495.
139. Y. Fang, D. K. Agrawal, D. M. Roy, R. Roy, P. W. Brown, "Ultrasonically accelerated synthesis of hydroxyapatite", J. Mater. Res. 7 (1992) 2294-2298.
140. M.V. Regi, L.M.R. Lorenzo, A.J. Salinas, "Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite", Sol. State Ionics 101-103 (1997) 1279-1285.
141. M. Okazaki, Y. Miake, H. Tohda, T. Yanagisawa, J. Takahashi, "Fluoridated apatite synthesized using a multi-step fluoride supply system", Biomater. 20 (1999) 1303-1307.
142. D. Tadic, F. Peters, M. Epple, "Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites", Biomater. 23 (2002) 2553-2559.
143. R. A. Young, D. W. Holcomb, "Variability of Hydroxyapatite Preparations", Calcif. Tissue Int. 34 (1982) S17-S32.

144. H. Wang, "Hydroxyapatite degradation and biocompatibility", PhD. Thesis, The Ohio State University, Ohio (2004).
145. J. C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates", (1994).
146. J. L. Meyer, B.O. Fowler, "Lattice Defects in Nonstoichiometric Calcium Hydroxyapatite", *Inorg. Chem.* 21 (1982) 3029-3035.
147. T. Honda, M. Takagi, N. Uchida, K. Saito, K. Uematsu, "Post-compositional control of hydroxylapatite in an aqueous medium", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1 (1990) 114-117.
148. L. M. Rodriguez-Lorenzo, M. Vallet-Regi., "Controlled crystallization of calcium phosphate apatites", *Chem. Mater.* 12 (2000) 2460-2465.
149. D. E. C. Corbridge, "Phosphorus: An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology" (1990).
150. H. Monma, T. Kamiya, "Preparation of Hydroxyapatite by the Hydrolysis of Brushite", *J. Mater. Sci.* 22 (1987) 4247-4250.
151. S. R. Silverman, R. K. Fuyat, J. D. Weiser, "Quantitative Determination of Calcite Associated with Carbonate-Bearing Apatites", *Am. Miner.* 37 (1952) 211-222.
152. I. Mayer, S. Wahnou, S. Cohen, "Preparation of Hydroxyapatites via the MSO_4 Sulphates (M=Ca, Sr, Pb and Eu)", *Mater. Res. Bull.* 14 (1979) 1479-1483.
153. R. Z. Le Geros, M. H. Taheri, G. Quiroigico, J. P. Le Geros, "Formation and stability of apatites: Effects of some cationic substituents", *Proc. 2nd International congress of phosphorus compounds, Boston* 89-103 (1980) 41-53.
154. R. Z. Le Geros, R. Kijkowska, J. P. Le Geros, "Formation and transformation of octacalcium phosphate OCP: Preliminary report", *Scanning Electron Micro.* 4 (1984) 1771-1777.
155. V. V. Srdić, "Procesiranje novih keramičkih materijala", Tehnološki Fakultet, Novi Sad (2004).
156. M. J. Mayo, "Nanocrystalline ceramics for structural applications: processing and properties". *Nanostructured Materials science and technology*, ed. G. M. Chow, and N. I. Noskova, , NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Russia (1997) 361-385.
157. J. R. Groza, "Nanosintering", *Nanostruct. Mater.* 12 (1999) 987.
158. M. Tecilazić–Stevanović, "Osnovi tehnologije keramike", Tehnološko–Metalurški Fakultet, Beograd (1990).
159. S. L. Kang "Sintering Densification, Grain Growth And Microstructure", Elsevir, Amsterdam (2005).
160. R. M. German, "Sintering theory and practice", The Pennsylvania state University, Pennsylvania, (1996).
161. W. D. Kingery, H. K. Bowen, D. R. Uhlman, "Introduction to Ceramics", John Wiley and Sons, New York (1976).
162. E. P. Frankenburg, S. A. Goldstein, T. W. Bauer, S. A. Harris, R. D. Poser, "Biomechanical and histological evolution of calcium phosphate cement", *J. Bone Joint Surg.* 80 (1998) 1112-1124.
163. Dj. Veljović, "Proučavanje procesa formiranja nanostrukturnih biokeramičkih materijala na bazi hidroksiapatita", Magistarski rad, TMF, Beograd (2007).
164. M. G. S. Murray, J. Wang, C. B. Ponton, P. M. Marquis, "An improvement in processing of hydroxyapatite ceramics", *J. Mater. Sci.* 30 (1995) 3061-3074.

165. J. E. Barralet, S. Best, W. Bonfield, "Effect of sintering parameters on the density and microstructure of carbonate hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 11 (2000) 719-724.
166. K. A. Gross, K. A. Bhadang, "Sintered hydroxyfluorapatites. Part III: Sintering and resultant mechanical properties of sintered blends of hydroxyapatite and fluorapatite", *Biomater.* 25 (2004) 1395-1405.
167. K. A. Gross, L. M. Rodríguez-Lorenzo, "Sintered hydroxyfluorapatites. Part II: Mechanical properties of solid solutions determined by microindentation", *Biomater.* 25 (2004) 1385-1394.
168. G. Muralithran, S. Ramesh, "The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite", *Ceram. Int.* 26 (2000) 221-230.
169. I. R. Gibson, I. Rehman, S. M. Best, W. Bonfield, "Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 12 (2000) 799-804.
170. N. Patel, I. R. Gibson, S. Ke, S. M. Best, W. Bonfield, "Calcining influence on the powder properties of hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 12 (2001) 181-188.
171. N. Thangamani, K. Chinnakali, F. D. Gnanama, "The effect of powder processing on densification, microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite", *Ceram. Int.* 28 (2002) 355-362.
172. R. Z. Legeros, S. Lin, R. Rohanizaden, D. Mijares, J. P. Legeros, "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14 (2003) 201-209.
173. S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering", *Biomater.* 23 (2002) 1073-1080.
174. D. Bernache-Assollant, A. Ababou, E. Champion, M. Heughebaert, "Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I. Calcination and particle growth", *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 229-241.
175. N. Patel, E. L. Follon, I. R. Gibson, S. M. Best, W. Bonfield, "Comparison of Sintering and Mechanical Properties of Hydroxyapatite and Silicon-Substituted Hydroxyapatite", *Key Engin. Mater.* 240-242 (2003) 919-922.
176. J. E. Barralet, G. J. P. Fleming, C. Campion, J. J. Harris, "Formation of translucent hydroxyapatite ceramics by sintering in carbon dioxide atmospheres", *J. Mater. Sci.* 38 (2003) 3979-3993.
177. Y. M. Sung, J. C. Lee, J. W. Yang, "Crystallization and sintering characteristics of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowder", *J. Cryst. Growth.* 262 (2004) 467-472.
178. C. Kothapalli, M. Wei, A. Vasiliev, M. T. Shaw, "Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite", *Acta Mater.* 52 (2004) 5655-5663.
179. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi, M. Sandri, "Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite", *Biomater.* 25 (2004) 1763-1770.
180. F. Mezahi, A. Harabi, S. Achour, "Effect of Stabilised ZrO_2 on Sintering of Hydroxyapatite", *Key Engin. Mater.* 264-268 (2004) 2031-2034.

181. J. Shi, U. Bismayer, A. Klocke, S. Gierlotka, B. Palosz, "High-Pressure and -Temperature Sintering of Nanosized Hydroxyapatite Powders ", *Key Engin. Mater.* 288-289 (2005) 175-178.
182. Z. He, J. Ma, C. Wang, "Constitutive modeling of the densification and the grain growth of hydroxyapatite ceramics", *Biomater.* 26 (2005) 1613-1621.
183. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, R. Langenati, M. Sandri, S. Sprio, "Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: dense and porous scaffold development", *Biomater.* 26 (2005) 2835-2845.
184. W. R. Weinand, F. F. R. Goncalves, W. M. Lima, "Effect of Sintering Temperature in Physical-Mechanical Behaviour and in Titanium-Hydroxyapatite Composite Sinterability", *Mater. Sci. Forum* 530-531 (2006) 249-254.
185. F. N. Oktar, H. Aydin, G. Goller, S. Agathopoulos, G. Rocha, S. Sennaroglu, S. Kayali, "Influence of Sintering Temperature on Mechanical Properties of Biologically Derived Hydroxyapatite Bodies", *Key Engin. Mater.* 309-311 (2006) 45-48.
186. F. N. Oktar, "Microstructure and mechanical properties of sintered enamel hydroxyapatite", *Ceram. Int.* 33 (2007) 1309-1314.
187. O. Prokopiev, I. Sevostianov, "Dependence of the mechanical properties of sintered hydroxyapatite on the sintering temperature", *Mater. Sci. and Engin.* 431 (2006) 218-227.
188. A. Banerjee, A. Bandyopadhyay, S. Bose, "Hydroxyapatite nanopowders: synthesis, densification and cell-materials interaction", *Mater. Sci. and Engin.* 27 (2007) 729-735.
189. D. Pattanayak, R. Dash, R. C. Prasad, B. T. Rao, T. R. Rama Mohan, "Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics", *Mater. Sci. and Engin. C* 27 (2007) 684-690.
190. C. Y. Tan, S. Ramesh, A. S. Hamdi, I. Sopyan, "Sinterability Of Hydroxyapatite Compacts Prepared By Cold Isostatic Pressing For Clinical Applications", *Biomed 06, IFMBE Proceedings* 15 (2007) 137-140.
191. A. Bianco, I. Cacciotti, M. Lombardi, L. Montanaro, G. Gusmano, "Thermal stability and sintering behaviour of hydroxyapatite nanopowders", *J. Therm. Anal. Calor.* 88 (2007) 237-243.
192. C. Balazsi, F. Weber, Z. Kover, E. Horvath, C. Nemeth, "Preparation of calcium-phosphate bioceramics from natural resources", *J. Eur. Ceram. Soc.* 27 (2007) 1601-1606.
193. W. Chen, Y. Kinemuchi, T. Tamura, K. Miwa, K. Watari, "Grain-oriented calcium hydroxyapatite ceramic and film prepared by magnetic alignment", *Mater. Lett.* 61 (2007) 6-9.
194. H. M. Ledo, E. A. C. Thackray, I. P. Jones, P. M. Marquis, L. E. Macaskie, E. R. Sammons, "Microstructure and composition of biosynthetically synthesised hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 19 (2008) 3419-3427.
195. A. S. Fomin, S. M. Barinov, V. M. Ievlev, V. V. Smirnov, B. P. Mikhailov, E. K. Belonogov, N. A. Drozdova, "Nanocrystalline hydroxyapatite ceramics produced by low-temperature sintering after high-pressure treatment", *Dok. Chem.* 418 (2008) 22-25.
196. A. S. Fomin, S. M. Barinov, V. M. Ievlev, V. V. Smirnov, B. P. Mikhailov, E. K. Belonogov, N. A. Drozdova, "Nanocrystalline Hydroxyapatite Ceramics", *Inorg. Mater.* 45 (2008) 1193-1196.

197. Y. Nayak, R. P. Rana S. K. Pratihari S. Bhattacharyya, "Pressureless sintering of dense hydroxyapatite-zirconia composites ", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 19 (2008) 2437-2444.
198. J. Wang, L. L. Shaw, " Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness", *Biomater.* 30 (2009) 6565-6572.
199. M. Quilitz, K. Steingrover, M. Veith, "Effect of the Ca/P ratio on the dielectric properties of nanoscaled substoichiometric hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21 (2010) 399-405.
200. A. Raksujarit, K. Pengpat, G. Rujjanagul, T. Tunkasiri, "Processing and properties of nanoporous hydroxyapatite ceramics", *Mater. Design* 31 (2010) 1658-1660.
201. A. I. Mitsionis, T. C. Vaimakis, C. C. Trapalis, "The effect of citric acid on the sintering of calcium phosphate bioceramics", *Ceram. Int.* 36 (2010) 623-634.
202. M. Kawata, H. Uchida, K. Itatani, I. Okada, S. Koda, M. Aizawa, "Development of porous ceramics with well-controlled porosities and pore sizes from apatite fibers and their evaluations", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 15 (2004) 817-823.
203. V.S. Komlev, S. M. Barinov, E. Girardin, S. Oscarsson, A. Rosengren, F. Rustichelli, V. P. Orlovski, "Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules: processing and characterization", *Sci. Technol. Adv. Mater.* 4 (2003) 503-508.
204. C. C. Ribeiro, C. C. Barrias, M. A. Barbosa, "Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17 (2006) 455-463.
205. O. L. Kubarev, V. S. Komlev, M. Maitz, S. M. Barinov, "Bioactive composite ceramics in the hydroxyapatite-tricalcium phosphate system", *Dok. Chem.* 413 (2007) 72-74.
206. A. Tampieri, G. Celotti, F. Szontagh, E. Landi, "Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity" , *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 8 (1997) 29-37.
207. P. van Landuyt, F. Li, J. P. Keustermans, J. M. Streydio, F. Delannay, E. Muting, "The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxyapatite" , *J. Mater.Sci.: Mater.Med.* 6 (1995) 8-13.
208. B. R. Lawn, T. Jensen, A. Arora, "Brittleness as an indentation size effect", *J.Mater. Sci.Lett.* 11 (1976) 573-575.
209. Y. M. Chiang, D. P. Birnie, W. D. Kingery, "Physical ceramics", John Wiley and Sons, New York (1997) 477-485.
210. B. R. Lawn, D. B. Marshall, "Hardness, toughness and brittleness: an indentation analysis" , *J. Am. Ceram. Soc.* 62 (1979) 347-350.
211. M. J. Mayo, "Nanocrystalline ceramics for structural applications: processing and properties", in: G. M. Chow, N. I. Noskova, *Nanostructured* (Ed.), *Materials science technology*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Russia, (1997) 361-385.
212. J. R. Groza, "Nanosintering", *Nanostruct. Mater.* 12 (1999) 987-992.
213. Y. W. Gua, K. A. Khora, P. Cheang, "Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS) ", *Biomater.* 25 (2004) 4127-4134.

214. S. Vijayan, H. Varma, "Microwave sintering of nanosized hydroxyapatite powder compacts" , Mater. Letters 56 (2002) 827-831.
215. Y. Fang, D. K. Agrawal, D. M. Roy, R. Roy, "Microwave sintering of hydroxyapatite" , J. Mater. Res. 9 (1994) 180-187.
216. W. H. Sutton, "Microwave processing of ceramic materials" , Am. Ceram. Soc. Bull. 68 (1989) 376-386.
217. X. Wang, H. Fan, Y. Xiao, X. Zhang, "Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering", Mater. Letters 60 (2006) 455-458.
218. S. Ramesh, C. Y. Tan, S. B. Bhaduri, W. D. Teng, I. Sopyan, "Densification behaviour of nanocrystalline hydroxyapatite bioceramics", J. Mater. Process. Techn. 206 (2008) 221-230.
219. Y. Fang, D. K. Agrawal, D. M. Roy, R. Roy, "Fabrication of transparent hydroxyapatite ceramics by ambient-pressure sintering", Mater. Letters 23 (1995) 147-151.
220. Y. Yang, J. L. Ong, "Rapid sintering of hydroxyapatite by microwave processing", J. Mater. Sci. Letters 21, 2002, 67-69.
221. S. Katakam, D. S. R. Krishna, T. S. S. Kumar, "Microwave processing of functionally graded bioactive materials" , Mater. Letters 57 (2003) 2716-2721.
222. X. L. Wang, Z. Wang, H. S. Fan, Y. M. Xiao, X. D. Zhang, "Fabrication of Porous Hydroxyapatite Ceramics by Microwave Sintering Method" ,Key Engin. Mater. 288-289 (2005) 529-532.
223. X. Wang, H. Fan, Y. Xiao, X. Zhang, "Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite β -tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering", Mater. Letters 60 (2006) 455-458.
224. S. Ramesh, C. Y. Tan, S. B. Bhaduri, W. D. Teng, "Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications" , Ceram. Int. 33 (2007) 1363-1367.
225. S. Ramesh, C. Y. Tan, S. B. Bhaduri, W. D. Teng, I. Sopyand, "2008 Densification behaviour of nanocrystalline hydroxyapatite bioceramics " , J. Mater. Process. Technol. 206 (2008) 221-230.
226. F. A. C. Oliveira, P. Pascaud, J. Domingues, T. Marcelo, J. C. Fernandes, L. G. Rosa, "Elastic properties of microwave sintered hydroxyapatite", 4th International Materials Symposium Materiais (2007).
227. D. S. Seo, H. Kim, K. H. Hwang, J. K. Lee, "Surface Dissolution of Hydroxyapatite Prepared by Microwave Sintering", Key Engin. Mater. 330-332 (2007) 227-230.
228. D. S. Seo, J. K. Lee, "AFM analysis of anisotropic dissolution in dense hydroxyapatite", Ultramicro. 108 (2008) 1157-1162.
229. A. Chanda, S. Dasgupta, S. Bose, A. Bandyopadhyay, "Microwave sintering of calcium phosphate ceramics", Mater. Sci. Engine.C 29 (2009) 1144-1149.
230. R. Halouani, D. Bernache-Assollant, E. Champion, A. Ababou, "Microstructure and related mechanical properties of hot pressed hydroxyapatite ceramics", J. Mater. Sci: Mater. Med. 5 (1994) 563-568.
231. W. Suchanek, M. Yashima, M. Kakihana, M. Yoshimura, "Processing and mechanical properties of hydroxyapatite reinforced with hydroxyapatite whiskers", Biomater. 17 (1996) 1715-1723.

232. S. Raynaud, E. Champion, J. P. Lafon, D. Bernache-Assollant, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics", *Biomater.* 23 (2002) 1081-1089.
233. J. Li, T. Hashida, "Preparation of hydroxyapatite ceramics by hydrothermal hot-pressing method at 300 °C", *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 5013-5019.
234. E. S. Ahn, N. J. Gleason, A. Nakahira, J. Y. Ying, "Nanostructure Processing of Hydroxyapatite-based Bioceramics", *Nano Letters* 1 (2001) 149-153.
235. A. Rapacz-Kmita, C. Paluszkiewicz, A. Slosarczyka, Z. Paszkiewicz, "FTIR and XRD investigations on the thermal stability of hydroxyapatite during hot pressing and pressureless sintering processes", *J. Mol. Struct.* 744-747 (2005) 653-656.
236. Z. A. Munir, U. Anselmi-Tamburini, "The effect of electric field and pressure on the synthesis and consolidation of materials: A review of the spark plasma sintering method", *J. Mater. Sci.* 41 (2006) 763-777.
237. G. F. Taylor, US Patent No. 1,896,854 (1933).
238. R. W. Boesel, M. I. Jacobson, I. S. Yoshioka, *Proc. Fall Powder Met. Conf. Metal Powder Industries Federation, New York* (1970) 75-99.
239. C. G. Goetzel, V. S. Demarchi, "Electrically activated pressure sintering (spark sintering) of titanium powders", *Powder Met. Int.* 3 (1971) 80.
240. K. Inoue, US Patent 3,340,052 (1967).
241. Idem., US Patent 3,656,946 (1972).
242. D. E. Clark, W. H. Sutton, "Microwave processing of materials", *Annu. Rev. Mater. Sci.* 26 (1996) 299.
243. M. Tokita, "Development of large-size ceramic/metal bulk FGM fabricated by spark plasma sintering", *Mater. Sci. Forum* 308-311 (1999) 83.
244. Z. Shen, M. Johnson, Z. Zhao, M. Nygren, "Spark plasma sintering of alumina", *J. Amer. Ceram. Soc.* 85 (2002) 1921.
245. M. Omori, "Sintering, consolidation, reaction and crystal growth by the spark plasma system (SPS)", *Mater. Sci. Eng.* A287 (2000) 183.
246. D. Zhang, Z. Fu, R. Yuan, J. Guo, "Spark Plasma Sintering : A Promising New Technique and its Mechanism", in "Multiphased Ceramic Materials", ed. W. H. Tuan and J. K. Guo, Springer, Berlin, (2004) 65.
247. M. Tokita, "Preparation of Functionally Graded Materials by Spark Plasma Sintering", *New Ceram.* 7 (1994) 63.
248. K. Ozaki, K. Kobayashi, T. Nishio, A. Matsumoto, A. Sugiyama, "Sintering Phenomena on Initial Stage in Pulsed Current Sintering", *J. Jpn. Soc. Powder Metall.* 47 (2000) 293.
249. O. Yanagashiwa, H. Kuramoto, K. Matsugi, M. Komatsu, *Mater. Sci. Eng.* A350 (2003) 184.
250. Y. W. Gua, N. H. Loha, K. A. Khor, S. B. Tora, P. Cheang, "Spark plasma sintering of hydroxyapatite powders", *Biomater.* 23 (2002) 37-43.
251. A. Nakahira, M. Tamai, H. Aritani, S. Nakamura, K. Yamashita, "Biocompatibility of dense hydroxyapatite prepared using an SPS process", *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 550-557.
252. R. Kumar, P. Cheang, K. A. Khor, "Spark plasma sintering and in vitro study of ultra-fine HA and ZrO₂-HA powders", *J. Mater. Process. Technol.* 140 (2003) 420-425.

253. K. A. Khor, Y. W. Gu, P. Cheang, F. Y. C. Boey, "The Characteristics and properties of Hydroxyapatite Prepared by Spark Plasma Sintering (SPS)", *Key Engin. Mater.* 240-242 (2003) 497-500.
254. N. Yamaguchi, H. Tanaka, O. Ohashi, "Gas Analysis in Spark Plasma Sintering of Hydroxyapatite", *Mater. Sci. Forum* 449-452 (2004) 793-796.
255. J. L. Xu, K. A. Khor, Y. W. Gu, R. Kumar, P. Cheang, "Radio frequency (rf) plasma spheroidized HA powders: powder characterization and spark plasma sintering behavior", *Biomater.* 26 (2005) 2197-2207.
256. J. L. Xu, K. A. Khor, R. Kumar, "Physicochemical differences after densifying radio frequency plasma sprayed hydroxyapatite powders using spark plasma and conventional sintering techniques", *Mater. Sci. Engin. A* 457 (2007) 24-32.
257. B. T. Lee, N. Y. Shin, J. K. Han, H. Y. Song, "Microstructures and fracture characteristics of spark plasma-sintered HAp-5 vol.% Ag composites", *Mater. Sci. Engin. A* 429 (2006) 348-352.
258. J. L. Xu, K. A. Khor, "Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method", *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 187-195.
259. C. Drouet, F. Bosc, M. Banu, C. Largeot, C. Combes, G. Dechambre, C. Estournes, G. Raimbeaux, C. Rey, "Nanocrystalline apatites From powders to biomaterials", *Powder Technol.* 190 (2009) 118-122.
260. D. Grossin, S. Rollin-Martinet, C. Estournes, F. Rossignol, E. Champion, C. Combes, C. Rey, C. Geoffroy, C. Drouet, "Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering", *Acta Biomater.* 6 (2010) 577-585.
261. J. L. Xu, K. A. Khor, J. J. Sui, W. N. Chen, "Preparation and characterization of a novel hydroxyapatite carbon nanotubes composite and its interaction with osteoblast like cells", *Mater. Sci. Engin. C* 29 (2009) 44-49.
262. A. G. Evans, E. A. Charles, "Fracture toughness determinations by indentation", *J. Am. Ceram. Soc.* 59 (1976) 371-372.
263. W. C. Oliver, G. M. Pharr, "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments", *J. Mater. Res.* 7 (1992) 1564-1583.
264. I. Balać, P. S. Uskoković, N. Ignjatović, R. Aleksić, D. Uskoković, "Stress analysis in hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials", *Comput. Mater. Sci.* 20 (2001) 275-283.
265. I. Balać, P. S. Uskoković, R. Aleksić, D. Uskoković, "Predictive modeling of the mechanical properties of particulate hydroxyapatite reinforced polymer composites", *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (2002) 793-799.
266. I. Balać, M. Milovančević, C. Y. Tang, P. S. Uskoković, D. Uskoković, "Estimation of the elastic properties of a particulate polymer composite using a face-centered cubic FE model", *Mater. Lett.* 8 (2004) 2437-2441.
267. T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, T. Yamamuro, "Fatigue and life-time of bioactive glass-ceramic A-W containing apatite and wollastonite", *J. Mater. Sci.* 22 (1987) 4067-4070.
268. T. Kokubo, H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity", *Biomater.* 27 (2006) 2907-2915.

269. E. Matijević, "Preparation and Characterization of Well defined Powders and Their Applications in Technology", *J.Europ.Ceram.Soc.* 18 (1998) 1357-1364.
270. V. Privman, D. V. Goia, J. Park, E. Matijević, "Mechanism of Formation of Monodispersed Colloids by Aggregation of nanosize Precursors", *J.Colloid Interface Sci.* 213 (1999) 36-45.
271. D. V. Goia, E. Matijević, "Tailoring the Particle Size of monodispersed Colloidal Gold", *Colloids . Surf. A* 146 (1999) 139-152.
272. J. Park, V. Privman, E. Matijević, "Model of Formation of Monodispersed Colloids", *J. Phys. Chem. B*, 105 (2001) 11630-11635.
273. S. Libert, V. Gorshov, V. Privman, D. Gioa, E. Matijević, "Formation of monodispersed Cadmium Sulfide Particles by Aggregation of nanosize Precursors", *Adv. Colloid . Interface Sci.* 100-102 (2003) 169-183.
274. I. Sondi, E. Matijević, "Homogeneous Precipitation by Enzyme-Catalyzed reaction. 2. Strontium and Barium Carbonates" *Chem. Mater.* 15 (2003) 1322-1326.
275. B. Viswanath, R. Raghavan, N. P. Gurao, U. Ramamurty, N. Ravishankar, "Mechanical properties of tricalcium phosphate single crystals grown by molten salt synthesis", *Acta Biomater.* 4 (2008) 1448-1454.
276. B. Viswanath, R. Raghavan, U. Ramamurty, N. Ravishankar, "Mechanical properties and anisotropy in hydroxyapatite single crystals", *Scripta Mater.* 57 (2007) 361-364.
277. L. H. He, O. C. Standard, T. T. Y. Huang, B. A. Latella, M. W. Swain, "Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite", *Acta Biomater.* 4 (3) (2008) 577-586.
278. R. A. Masumura, P. M. Hazzledine, C. S. Pande, "Yield stress of fine grained materials", *Acta Mater.* 46 (1998) 4527-4534.
279. S. Guicciardi, T. Shimozono, G. Pezzotti, "Nanoindentation Characterization of Sub-Micrometric Y-TZP Ceramics", *Adv. Eng. Mater.* 8 (2006) 994-997.
280. P. S. Uskokovic, C. Y. Tang, C. P. Tsui, N. Ignjatovic, D. P. Uskokovic, "Micromechanical properties of a hydroxyapatite/poly-l-lactide biocomposite using nanoindentation and modulus mapping", *J. Eur. Ceram. Soc.* 27 (2007) 1559-1564.
281. R. R. Kumar, M. Wang, "Modulus and hardness evaluations of sintered bioceramic powders and functionally graded bioactive composites by nanoindentation technique", *Mater. Sci. Eng. A* 338 (2002) 230-236.
282. E. Ho, M. Marcolongo, "Effect of coupling agents on the local mechanical properties of bioactive dental composites by the nano-indentation technique", *Dent. Mater.* 21 (2005) 656-664.
283. R. Sun, M. Li, Y. Lu, A. Wang, "Immersion behavior of hydroxyapatite (HA) powders before and after sintering", *Mater. Charact.* 56 (2006) 250-254.
284. C. Ribeiro, E. C. S. Rigo, P. Sepu, J. C. Bressiani, A. H. A. Bressiani, "Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities", *Mater. Sci. .Engin. C* 24 (2004) 631-636.
285. G. Bogdanović, J. Raletić-Savić, N. Marković, "*In vitro* assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay", *Onkološki arhiv* 2(4) (1994) 181-184.

286. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods* 65(1983) 55-63.
287. N. Ignjatović, P. Ninkov, V. Kojić, M. Bokurov, V. Srdić, D. Krnojelac, S. Selaković, D. Uskoković, „Cytotoxicity and fibroblast properties during in vitro test of biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials“, *Microsc. Res. Tech.* 69 (2006) 976–982.
288. B. Alliot-Light, A. Jean, M. Gregoire, "Comparative effect of calcium hydroxide and calcium hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro", *Archs Oral Bid.* 39 (1994) 481-489.
289. E. A. dos Santos, M. Farina, G. A. Soares, K. Anselme, "Surface energy of hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion", *J Mater Sci: Mater Med* 19 (2008) 2307–2316.
290. K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomater.* 21 (2000) 667-681.

BIOGRAFIJA

Đorđe Veljović je rođen 03.08.1977. godine u Kragijevcu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu je upisao 1996. godine. Na ovom fakultetu je diplomirao 2002. godine sa temom: "Ispitivanje mogućnosti alkaline i kiselinske aktivacije bentonita i sepiolita".

Poslediplomske studije upisao je školske 2002/03. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru za neorgansku hemijsku tehnologiju. Na poslediplomskim studijama je uspešno položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,88.

Magistarsku tezu pod nazivom "PROUČAVANJE PROCESA FORMIRANJA NANOSTRUKTURNIH BOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI HIDROKSIAPATITA", rađenu pod mentorstvom profesora Đorđa Janačkovića, uspešno je odbranio 18.09.2007 godine.

Od jula 2002. godine do jula 2003. godine radio je u Institutu za ispitivanje materijala Srbije kao inženjer u Laboratoriji za veziva i hidroizolaciju. Od 2003. do 2007. godine radio je na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu kao istraživač pripravnik, a od decembra 2007. godine u svojstvu istraživača saradnika.

Đorđe Veljović je učestvovao ili učestvuje na istraživanjima u okviru pet domaćih i dva međunarodna naučno-istraživačka projekta. Do sada je objavio sedam radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), pet radova u časopisima međunarodnog značaja (M23), dva rada u časopisima nacionalnog značaja, jedan rad saopštena na skupu međunarodnog značaja štampan u celini, dva rada saopštena na skupu nacionalnog značaja štampana u celini, trinaest radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu, šest radova saopštenih na skupu nacionalnog značaja štampanih u izvodu. Učestvovao je u realizaciji deset elaborata i studija. Učestvovao je u izvođenju vežbi i izradi više diplomskih radova iz oblasti neorganske hemijske tehnologije i oblasti materijala. Član je Srpskog hemijskog društva.

III. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze

Radovi u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21)

1. **Dj. Veljović**, B. Jokić, R. Petrović, E. Palcevskis, A. Dindune, I. N. Mihailescu, Dj. Janačković, "Processing of Dense Nanostructured HAP Ceramics by Sintering and Hot Pressing", *Ceram.Int.*, 35 (2009) 1407–1413 (ISSN 0272-8842, IF 1,686).
2. C. Y. Tang, P. S. Uskoković, C. P. Tsui, **Dj. Veljović**, R. Petrović, Dj. Janačković, "Influence of microstructure and phase composition on the nanoindentation characterization of bioceramic materials based on hydroxyapatite", *Ceram. Int.*, 35, (2009) 2171–2178 (ISSN 0272-8842, IF 1,686).
3. **Dj. Veljović**, I. Zalite, E. Palcevskis, I. Smičiklas, R. Petrović, Dj. Janačković, "Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics", *Ceram. Int.*, 36 (2010) 595–603 (ISSN 0272-8842, IF 1,686).
4. **Dj. Veljović**, R. Jančić-Hajneman, I. Balać, B. Jokić, S. Putić, R. Petrović, Dj. Janačković, "The effect of the shape and size of the pores on the mechanical properties of porous HAP-based bioceramics", *Ceram. Int.*, Doi: 10.1016/j.ceramint.2010.09.014 (2010) (ISSN 0272-8842, IF 1,686).

Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. **Dj. Veljović**, E. Palcevskis, A. Dindune, S. Putić, I. Balać, R. Petrović, Dj. Janačković, "Microwave sintering improves the mechanical properties of biphasic calcium phosphates from hydroxyapatite microspheres produced from hydrothermal processing", *J. Mater. Sci.*, 45 (12) (2010) 3175-3183 (ISSN 0022-2461, IF 1,471).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

**ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПАРАМЕТАРА ПРОЦЕСИРАЊА НА СВОЈСТВА БИОКЕРАМИЧКИХ
МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ КАЛЦИЈУМ-ХИДРОКСИПАТИТА И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА
ДОБИЈЕНИХ РАЗЛИЧИТИМ ТЕХНИКАМА СИНТЕРОВАЊА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 1.3.2014.



Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПАРАМЕТАРА ПРОЦЕСИРАЊА НА СВОЈСТВА БИОКЕРАМИЧКИХ МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ КАЛЦИЈУМ-ХИДРОКСИАПАТИТА И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА ДОБИЈЕНИХ РАЗЛИЧИТИМ ТЕХНИКАМА СИНТЕРОВАЊА

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис


У Београду, 1.3.2014.