

# BIOKOMPATIBILIS ÉS ANTIBAKTERIÁLIS BIOKERÁMIA BEVONATOK EL ÁLLÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Ph.D. értekezés

Furkó Mónika

Témavezet : Dr. Balázs Csaba



Környezettudományi Doktori Iskola

Alkalmazott és Környezetkémiai Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged



Vékonyrétegfizika Laboratórium

M szaki Fizikai és Anyagtudományi  
Intézet

Energiatudományi Kutatóközpont

Magyar Tudományos Akadémia

Budapest

2018



## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK .....	6
1. BEVEZETÉS .....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
2.1. Biológiai és szintetikus apatitok jellemzése .....	10
2.1.1. Biológiai apatitok .....	10
2.1.2. Szintetikus apatitok .....	12
2.2. Hidroxiapatit (HAp) bevonatok szerepe az orvosbiológiában .....	12
2.3. El állítási módszerek .....	14
2.3.1. Alacsony h mérséklet technológiák .....	14
2.3.2. Magas h mérséklet technológiák .....	22
2.3.3. Alacsony- és magas h mérséklet technológiák együttes alkalmazása .....	26
2.4. Ionokkal módosított szintetikus HAp .....	30
2.4.1. Módosítás kationokkal .....	30
2.4.2. Módosítás anionokkal .....	33
3. CÉLKIT ZÉS .....	34
4. KÍSÉRLETI RÉSZ .....	35
4.1. A kísérleti munka során felhasznált vegyszerek és anyagok .....	35
4.2. Fémimplantátumok bevonatolása HAp és ionokkal módosított HAp (adHAp) rétegekkel .....	37
4.3. Szerkezetvizsgálati módszerek .....	41
4.3.1. Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) mérések .....	41
4.3.2. Energiadiszperzív röntgenspektroszkópia (EDX) .....	41
4.3.3. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) .....	41
4.3.4. Röntgendiffraktometria (XRD) .....	42
4.3.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) .....	42
4.4. Korrozíós tulajdonságok vizsgálata .....	43
4.5. Biokompatibilitási tesztek .....	45

4.5.1. Sejtéletképességi vizsgálatok.....	45
4.5.2. Laktát dehidrogenáz (LDH) teszt.....	46
4.5.3. Alkalikus foszfatáz (ALP) teszt .....	47
4.5.4. Statisztika.....	48
4.6. Sejtfestési vizsgálatok.....	48
4.6.1. Calcein (acetoximetil-észter) festés .....	48
4.6.2. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festés .....	48
4.6.3. LIVE/DEAD® (Calcein AM és EthD-1) sejtfestés .....	49
4.7. OsteoImage™ Mineralizációs vizsgálatok .....	49
4.8. Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) .....	49
4.9. Antibakteriális tesztvizsgálatok .....	50
5. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....	51
5.1. Elektrokémiai úton leválasztott HAp és adHAp biokerámia bevonatok morfológiai és szerkezeti jellemzése.....	51
5.2. Elemösszetétel meghatározása EDX analízissel .....	53
5.3. Röntgendiffrakciós fázisanalízis.....	57
5.4. Fourier-transzformációs Infravörös Spektroszkópia analízis .....	59
5.5. Elektrokémiai min sítés.....	60
5.5.1. Hosszú idej nyitott áramköri potenciál ( $E_{ocp}$ ) mérések .....	60
5.5.2. Potenciodynamikus polarizációs mérések .....	61
5.5.3. Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia (EIS) mérések.....	64
5.5.3.1. Impedancia mérések kiértékelése .....	67
5.5.3.2. Különböz minták impedancia görbéinek összehasonlítása és illesztése .....	72
5.6. Sejtéletképességi vizsgálatok.....	73
5.6.1. Sejtéletképességi tesztek kiértékelése vastag bevonatokon .....	73
5.6.2. Sejtéletképességi tesztek kiértékelése a nemfolytonos bevonatokon .....	74
5.7. Laktát dehidrogenáz teszt .....	76

5.7.1. LDH teszt a citotoxicitás vizsgálatára vastag bevonatokon.....	76
5.7.2. LDH teszt a sejtszám meghatározására nemfolytonos bevonatokon .....	77
5.8. Alkalikus foszfatáz (ALP) teszt .....	78
5.9. Sejtfestési vizsgálatok (Calcein, DAPI, LIVE/DEAD) .....	79
5.9.1. LIVE/DEAD sejtfestés vastag bevonatokon.....	79
5.9.2 Calcein/DAPI festés nemfolytonos bevonatokon .....	80
5.10. MG-63 sejtek morfológiai vizsgálata.....	82
5.11. OsteoImage™ Mineralizációs vizsgálatok kiértékelése .....	83
5.12. Antibakteriális hatás vizsgálata.....	85
5.13. Kioldódási vizsgálatok.....	86
6. ÖSSZEFOGLALÁS .....	88
7. SUMMARY .....	92
IRODALOMJEGYZÉK .....	96
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	120
MELLÉKLET .....	121

## RÖVIDÍTÉSEK

AC	Váltóáram
ACP	Amorf kalcium-foszfát
AF	Alacsony frekvenciás tartomány
adHAp	Ionokkal adalékolt hidroxiapatit
ALP	Alkáli foszfatáz enzim
CaP	Kalcium-foszfát fázisok
CHAp	Karbonátos hidroxiapatit
CPE	Konstans fáziselem
CPE <sub>coat</sub>	Bevonat konstans fáziseleme
CPE <sub>ct</sub>	Töltésátlépési konstans fáziselem
CPE <sub>cp</sub>	Korróziós termékek diffúziós folyamatainak konstans fáziseleme
cpTi	Kereskedelmi tisztaságú titán
CVD	Kémiai gázfázisú leválasztás
DC	Egyenáram
DCP	Dikalcium-foszfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Közeg
EC	Elektromos áramkör
EDX	Energiadiszperzív Röntgenspektroszkópia
EIS	Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia
E <sub>ocp</sub>	Nyitott áramköri potenciál
E <sub>corr</sub>	Korróziós potenciál
FBS	Magzati szarvasmarha szérum
FIB	Fókuszált ionsugár
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
HAp	Hidroxiapatit
HOB	Emberi oszteoblaszt csontsejt
ICP-OES	Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria
INT	2-(4-jodo-fenil)-3-(4-nitro-fenil)-5-fenil-2H-tetrazólium
JCPDS	Nemzetközi diffrakciós adatbázisközpont
j <sub>corr</sub>	Korróziós áram sűrűség
KF	Középfrekvenciás tartomány
LDH	Laktát dehidrogenáz enzim

MG-63	Osteoblaszt jelleg sejt vonal
MOCVD	Fémorganikus kémiai gáz fázisú leválasztás
MPD	Molekuláris plazmagerjesztés leválasztás
MTD	Minimális toxikus dózis
NF	Nagyfrekvenciás tartomány
nHAp	Nanoszerkezet hidroxiapatit
PBS	Foszfátpuffer
PC	Impulzusos áram
PE	Polietilén
PLA	Politejsav
PLD	Impulzuslézeres leválasztás
PLGA	Tejsav-glikolsav kopolimer
$R_{coat}$	Bevonat konstans ellenállása
$R_{ct}$	Töltésátlépési ellenállás
$R_{cp}$	Korróziós termékek diffúziós folyamatainak ellenállása
$R_p$	Polarizációs ellenállás
SCE	Telített kalomelelektrod
SBF	Mesterséges testfolyadék
SEM	Páztázó Elektronmikroszkóp
TCP	Trikálcium-foszfát
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkópia
Tris	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
XRD	Röntgendiffraktometria

### Név és jelmagyarázat

Calcein	Fluoreszcens komplex festék; Bisz[N,N-bisz(karboximetil)aminometil]
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid, $C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$
LIVE/DEAD®	kereskedelmi forgalomban kapható sejt festési teszt készlet az él és a halott sejtek jelölésére
OsteoImage	kereskedelmi forgalomban kapható teszt készlet a csontosodást jelző hidroxiapatit leválások fluoreszcens jelölésére
Tripszin	proteolitikus enzim

## 1. BEVEZETÉS

Napjainkban az ortopédiai sebészetben leggyakrabban használt implantátum anyagok a Ti ötvözetek (pl. Ti6Al4V, TiNb), mivel kiváló mechanikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Mindemellett a fémfelületen képződő stabil, kompakt oxidrétegnek köszönhetően a korrózióállóságuk is kiváló. Egyik legnagyobb hátrányuk azonban az, hogy a baktériumok könnyen megtapadnak és elszaporodnak a felületükön miközben ún. biofilm is képződik [1]. Ez könnyen okoz elfertőződéseket és az implantátum kilökődését is előidézheti a beültetést követően. Köztudott, hogy a titán ötvözetek bioinert tulajdonságúak, de nem tekinthetők biokompatibilisnek [2]. Ezért a biokompatibilitásuk javítása érdekében különféle felületkezelési módszerek, bevonatok alkalmazása ajánlott. Erre a célra az egyik lehetséges módszer a hidroxiapatit bevonatok kialakítása [3-6].

A hidroxiapatit (HAp) széleskörűen alkalmazható anyag mind a fogászatban, mind az ortopédiai sebészetben mivel nagyon jó oszteokonduktív tulajdonságokkal bír [7, 8].

A másik nagy előnye a HAp bevonatoknak, hogy az anyag kémiai és kristályszerkezete nagyon hasonló az emberi csontokat is alkotó ásványi anyagokhoz, így alkalmassá teszi az implantátumokat a csontszövet pótlására valamint a csont újjáépítésére [9-13].

Azonban a HAp bevonat is kedvezőtlenül táptalajt szolgáltat a baktériumok számára. Ez előfertőződést, valamint az implantáció sikertelenségét okozhatja és ezáltal újabb rekonstrukciós műtétekre is szükség lehet. A legújabb statisztikai adatok alapján, az ortopédiai műtéteknél az előfertőződési arány 0,5 és 3,0% között mozog [14], annak ellenére hogy az utóbbi két évtizedben szigorú fertőtlenítési eljárásokat vezettek be a műtétek során. Ezeket az adatokat figyelembe véve hasznos és célszerű olyan HAp bevonatok kialakítása az implantátumokon, amelyek tartalmaznak antibakteriális komponenseket is az egyéb bioaktív elemek, vegyületek mellett. Kutatások kimutatták, hogy különféle szerves antibakteriális anyagok, úgymint ezüst-, cink-, réz- és egyéb fémionok/részecskék beépítése a bevonatba sokkal hatékonyabb, mint bármilyen antibakteriális kezelés, mivel a baktériumok könnyen toleránssá válhatnak az antibiotikumokkal szemben. Ellenben, a szerves vegyületekkel szemben nem alakul ki tolerancia, mivel más a hatásmechanizmusuk. Elmondható, hogy az ezüst rendkívül széles spektrumú antibakteriális anyag. Toxikus hatása az élő sejtekre megfelelő koncentrációban alkalmazva csökkenthető [15, 16].

Összefoglalva, a biokompatibilis, antibakteriális valamint biológiailag lebomló bevonatok kialakítása az implantátum felületére nagy jelentőségű és fontos anyagtudományi és orvostechológiai fejlesztési terület.



Világszerte intenzív kutatások folynak a legjobb tulajdonságokkal rendelkező kalcium-foszfát alapú biokerámia bevonatok fejlesztésére, melyekben sokféle technikát, módszert, alapanyagot és adalékanyagot hasznosítanak. Ezekhez a kutatásokhoz kapcsolódva a doktori munkám célkitűzése olyan ionokkal adalékolts kalcium-foszfát biokerámia bevonatok kialakítása és átfogó jellemzése, amelyek nagymértékben javítják az alapfém biokompatibilitását, antibakteriális tulajdonságuknak köszönhetően csökkentik a beültetést követő fertőzés veszélyét. A kifejlesztett, újfajta rétegek elnyelése, hogy a porózus struktúrájuk miatt elősegítik a csontsejtek megtapadását az implantátumok felületén és beindítják a csontosodási folyamatokat az implantációt követő kezdeti szakaszban. A csontosodás beindulása után azonban kellő sebességgel lebomlanak a biológiai környezetben, így nem okoznak a későbbiekben rögzítendő részt vagy nem dúsulnak fel a szervezetben.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

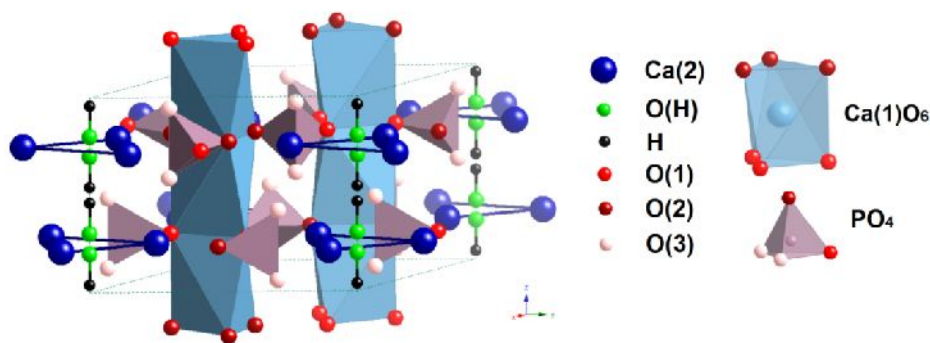
### 2.1. Biológiai és szintetikus apatitok jellemzése

#### 2.1.1. Biológiai apatitok

Az apatit általános elnevezése a különféle kalcium-foszfát ásványoknak, amelyek között a biológiai környezetben a hidroxiapatit a legstabilabb fázis. Elfordulásuk és természetük szerint az apatitok két nagy csoportba sorolhatóak: természetes apatitok és szintetikus apatitok.

A természetes apatitok, ahogy az elnevezésük is jelzi, a természetben megtalálhatóak rendkívül változatos formában. Az ásványok szerkezete és összetétele nagyon sokféle, kristálystruktúrájuk lehet amorf, valamint mikro- és nanokristályos. A sokrétű összetétel és struktúra változatos kémiai, fizikai és biológiai tulajdonságokat eredményez. Az apatitok hexagonális kristályszerkezettel rendelkeznek, aminek tércsoportja  $P6_3/m$  [17, 18].

A hidroxiapatit kristályrácsában a kalciumionok kétféle helyzetben fordulnak el:  $Ca(I)$  az oszlopos míg a  $Ca(II)$  a csavart tengelyben levő kalcium. A csavart tengelyben található  $Ca$  atomok háromszöget alkotnak. Ezek a háromszögek térben elforgatva, egymás felett helyezkednek el a 'c' tengely mentén, ami végül egy cs hálót eredményez. Ebben a cs hálóban helyezkednek el a  $OH^-$  ionok (2.1. ábra).



**2.1. ábra:** A hidroxiapatit vázlatos kristálystruktúrája.

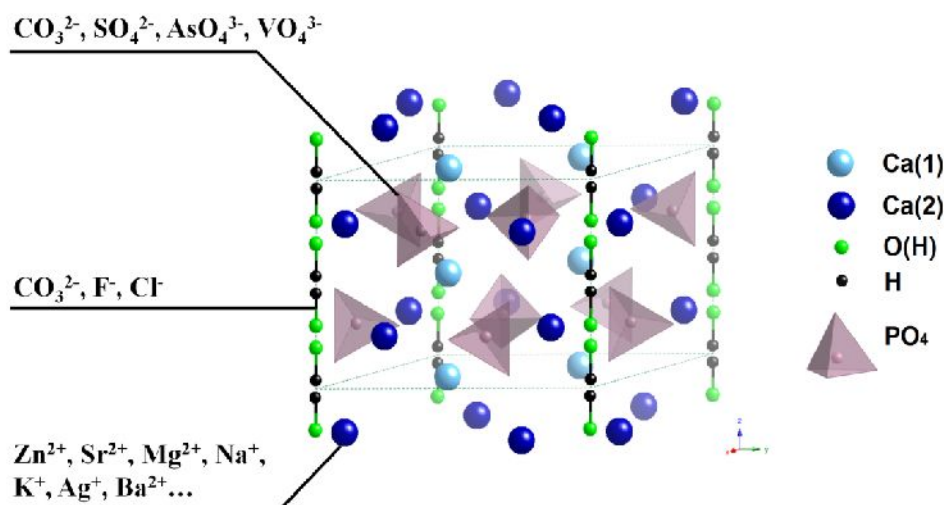
Ennek a szerkezetnek köszönhetően a  $Ca^{2+}$ , a  $PO_4^{3-}$  és a  $OH^-$  ionok könnyen helyettesíthetők más egyértékű, vagy akár kétértékű kationokkal és anionokkal (2.2. ábra). A természetes hidroxiapatitok vagy más néven biológiai apatitok elnevezés azokra az apatitokra értendő, amelyek valamilyen természetes forrásból (pl. puhatestek szilárd váza [19, 20], tojáshéjak [21-24], csontszármazékok [25-29] stb.) erednek. Számos kutatás bebizonyította, hogy ezek a biológiai apatitok nem sztöchiometrikus összetételűek [30-33]. A  $Ca/P$

elemarány eltérhet a hidroxiapatitnál számolt 1,67-es aránytól. Ha kisebb, akkor Ca hiányos apatitról, ha nagyobb, akkor kalciumban gazdag apatitról beszélhetünk. Ez az eltérés általában akkor fordul el, ha valamilyen idegen ion adszorbeálódik a kristály felületére, beépül a kristályrácsba, vagy másodlagos fázisok alakulnak ki a kristályszerkezetben.

Amikor idegen ionok épülnek be a kristályrácsba, az „a” és a „c” tengelyek valamint az a/c tengelyarány megváltozik [34].

A természetes apatitokban nagy arányban fordulnak el karbonát anion helyettesít k. El ször a kutatók félreértelmezték a karbonát ionok jelenlétét és az apatit fázisokat  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaP}$  és  $\text{CaO}$  fázisok keverékeként azonosították [35-40].

Kés bb azonban bebizonyították, hogy a természetes vagy biológiai apatit f ként Ca hiányos, karbonát tartalmú HAp [41, 42]. A biológiai apatitok kémiai összetétele nagyon változatos és különbözik minden él lényben helyt l és környezett l függ en [43, 44]. Valamint különbözik a tiszta HAp összetételét l és kristályossági fokától is, ennek eredményeként eltér ek a fizikai és mechanikai tulajdonságai [34, 45]. A karbonát ionok beépülhetnek az  $\text{OH}^-$  és a  $\text{PO}_4^{3-}$  ionok helyére is [46-49].



**2.2. ábra:** A hidroxiapatit kristályrácsban lev  $\text{Ca}^{2+}(\text{II})$ ,  $\text{OH}^-$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  ionok lehetséges ionos helyettesít i.

A biológiai HAp-ban  $\text{HPO}_4^{2-}$  csoportok is találhatóak, és egyes kutatások szerint [50, 51] a sztöchiometriai koncentrációnál jóval kevesebb mennyiség  $\text{OH}^-$  csoport van jelen. Ezt az idegen ionok miatti beépüléskor fellép töltéskiegyenlítő folyamatok lejátszódásával magyarázták. A  $\text{HPO}_4^{2-}$  csoport jelenléte az ionos szubsztitúciónak, valamint a  $\text{PO}_4^{3-}$  csoport szilárd fázisú hidrolízisének tulajdonítható. Mindmáig nehéz feladat azonban ezen anionos

csoportok mennyiségének pontos meghatározása, a megfelelő analitikai módszerek hiányában. Mennyiségük jelentősen függ a külső körülményektől, környezettől is, pl. hőmérséklet, pH, szervesetlen oldószerek jelenléte [52]. A csontokból előállított biológiai apatitok főként nanoméretű rúd-, illetve tömészerű kristályokból épülnek fel [53, 54]. Emellett, a különböző forrásból származó apatitok hasonló formájú, vékony lemezekből állnak, gyűrődött élekkel [52]. A rúd illetve tömészerű kristályok kialakulását valószínűleg az előállítás során alkalmazott hőkezelés eredményezhette [57]. A kristályok mérete és kristályossági foka nagyban befolyásolható az előállítás módszerével és körülményeivel. A méret tághatárok között változhat, néhány nanométertől egészen több száz nm-ig [52, 55-57]. Mint korábban említettük, a biológiai HAp fő forrásai a különféle állatok (tengeri és szárazföldi) csontjai [25-29, 53, 56-62], puhatestűek szilárd váza, valamint akár emberi fogak is [63]. A sertés- és kutya-félek csontjaiból nyert HAp makro- és mikroszerkezete nagy hasonlóságot mutat az emberi csontból származóéval [64]. A tengeri állatokból nyert HAp kristályossági foka alacsony és nagy koncentrációban tartalmaz különféle nyomelemeket (pl. Na, K, Mg, Sr, Zn, Mn, Si) [65].

### 2.1.2. Szintetikus apatitok

A szintetikus apatitok a biológiai apatitok helyettesítői, esetleg kiváltói lehetnek az orvosi biológiában. Az utóbbi 30 évben a kutatások főként ezen apatitok előállítására és különféle alkalmazhatósági területeire fókuszáltak. Ezek is kiváló csontépítő vagy csontpótló anyagok és elősegítik a csontregenerációt [66-75].

Alkalmazhatóak ezen kívül gyógyszer hatóanyagok célzott és ellenőrzött felszívódását elősegítő vázanyagokként is [76, 77]. Beépíthetők kompozitokba különféle természetes (kollagén és chitosan), illetve mesterséges polimerekkel, pl. polilaktosav (PLA), tejsav-glikolsav kopolimer (PLGA) illetve polietilén (PE).

Ezek az apatitok sem feltétlenül tiszta hidroxipatit fázisból állnak, hanem a HAp, és trikálcium-foszfát (TCP), dikalcium-foszfát (DCP) illetve amorf kalcium-foszfátok különböző arányú keverékei lehetnek [66, 78-80]. A magnézium-, illetve karbonátionok beépítése a HAp kristályokba a kisebb, jobb oldhatóságú kristallitok képződésének kedvezett [81-85].

## 2.2. Hidroxipatit (HAp) bevonatok szerepe az orvosi biológiában

A hidroxipatit, mint anyag pórusos szerkezete miatt nem alkalmazható olyan területeken, ahol nagy teherbírásnak van kitéve. Ez a hátrány kiküszöbölhető, ha fémes implantátum anyagok (általában titán és titán ötvözetek) felületére választják le bevonatok formájában.

Ezáltal a fémes implantátumok teherbírása és erőssége ötvözik a hidroxiapatit bevonat bioaktív tulajdonságával. A bevonatok porózus jellegének nagy jelentősége van a csontsejtek növekedése szempontjából, mivel a porózusabb és érdesebb felszín elősegíti a sejtek megtapadását és osztódását [75, 86].

A kutatások során a különféle bevonatokon elvégzett *in-vivo* illetve *in vitro* tesztek, melyek a csontsejtek életképességét (az implantátummal érintkező sejtek reagálását) vizsgálták, bebizonyították, hogy az anyagösszetétel és a felületi érdesség (azaz a felületi morfológia) hatással voltak a sejtek életfolyamataira. A hidroxiapatit rétegekkel bevont implantátumok bioaktívnak bizonyultak, az implantátumra ültetett sejtek jól megtapadtak és életképesek voltak [87-90]. Emellett oszteokonduktív tulajdonsággal is bírnak, ami azt jelenti, hogy elősegítik az új csontsejtek kialakulását, képződését [87, 91].

A hidroxiapatit bevonatok klinikai alkalmazását tekintve elmondható, hogy napjainkban még a plazmaszórásos előállítás a legelterjedtebben alkalmazott technológia. Számos cég alkalmazza ezt az eljárást már több, mint 20 éve, úgymint az APS Materials Inc., Fluidinova, SA, Premier Biomaterials, HiMed és Surface Dynamics. Ezen implantátumok ortopédiai alkalmazásához szigorú egészségügyi követelményeknek kell megfelelniük. Több tanulmányban és számos klinikai teszttel vizsgálták az implantátumok tulajdonságainak beültetést követő változását, élettartamát, degradációját, valamint esetleges szövdményeit [92-100]. Ezen klinikai tesztek eredményei azonban viszonylag ellentmondóak. Aebli [92], Delaunay [93], D'Antonio [96] és Furlong [98] pozitív eredményekről számoltak be, amiben a HAp bevonat elősegítette a csontosodást, és az implantátum jobb rögzülését eredményezte a bevonat nélküli implantátumokhoz képest a néhány naptól néhány hétig tartó vizsgálati és monitorozási időszakban. Található azonban olyan klinikai jelentés is, ahol a kutatók nem tapasztaltak statisztikailag releváns különbséget a bevonatolt és a bevonat nélküli implantátumok teljesítményében beültetés után [99, 100]. Ezekben az esetekben nagyon vastag (~155  $\mu\text{m}$ ) rétegeket vittek fel a felületre, melyeknek rosszak voltak a mechanikai tulajdonságai, könnyen leváltak a felületről. Annak ellenére, hogy a tiszta HAp bevonat alkalmazása már elterjedt, és kimerítetlen tanulmányozták a tulajdonságait *in vivo* és *in vitro* egyaránt, az ionokkal módosított hidroxiapatit gyakorlati alkalmazására még mindig alig található példa. Az egyetlen klinikai tesztet, aminek a jelentése elérhető a tudományos irodalomban Eto és mtsai [101] publikálták plazmaszórással előállított ezüst-oxid tartalmú HAp (AgHAp) bevonat alkalmazásáról. Tanulmányukban az AgHAp bevonat csíp implantátumokon történő alkalmazását és hatását vizsgálták. Az ezüst-oxid beépítése

csökkentette a fertőzésveszély kockázatát. Az általuk használt módszerrel az ezüst maximális mennyiségét 2,9 mg/implantátum értékre állították. A klinikai tesztek eredményei megmutatták, hogy az ezüsttartalmú implantátumok gyorsították a páciensek implantáció utáni gyógyulását és nem okoztak semmilyen ezüstnek tulajdonítható mellékhatást.

### 2.3. Elállítási módszerek

Ebben a fejezetben a HAp anyag fontosabb elállítási módszereit részletezem, elterjedt helyezve a leggyakoribb, legtöbbet alkalmazott és vizsgált eljárásokat.

A technológiákat három fő csoportra osztottam az alkalmazott hőmérsékletek szerint: alacsony hőmérséklet, magas hőmérséklet, valamint a kettő kombinációja.

#### 2.3.1. Alacsony hőmérséklet technológiák

Ezen technológiák egyik fő célja, hogy energiahatékonyabbak, ezáltal költségkímélőbbek, míg a hátrányuk, hogy a bevonatok eloszlása a felületen nem egyenletes és a tapadásuk is gyenge. Ide tartoznak az elektroforézis, elektrokémiai leválasztás és az elektroporlasztás.

##### *Elektroforézis*

Ennél a technológiánál elektromos mező segítségével viszik fel az elektromosan töltött részecskéket a céltárgy felületére megfelelő szuszpenzióból. A nagyfeszültség segítségével a szerves vagy szervetlen oldószerben szuszpendált nanoméretű részecskék elektromosan feltöltődnek és az ellenkező töltésű alapfém felé vándorolva leválnak annak felületére [102-109].

Kollath és mtsai [110] összehasonlították az egyenáram (DC) és váltóáram (AC) hatását a HAp elektroforézissel történő leválasztására. Alapfémként titánt használtak és kereskedelemben kapható HAp port szuszpendáltattak butanol oldószerben ultrahang segítségével. Az eredményeik azt mutatták, hogy az AC segítségével leválasztott réteg tömörebb és egyenletesebb lett.

A HAp diszpergálására többféle szerves oldószer alkalmazható. Farrokhi-Rad és mtsai [111] a különféle alkoholok (úgy mint metanol, etanol, izopropanol és butanol) hatását vizsgálták a diszperzió stabilitására nézve. Kimutatták, hogy a leválás gyorsabb volt kisebb molekulatömegű alkoholok esetén, mivel a HAp elektroforetikus mozgékonyasága abban nagyobb, míg a butanoltól leválasztott HAp bevonat bizonyult a legjobban tapadónak és korrózióálló SBF oldatban.

Ezen kívül ez a kutatócsoport vizsgálta a Tris (tris-(hidroximetil)-amino-metán), mint diszpergálószer hatását is a szuszpenzióra. Úgy találták, hogy a protonálódott Tris (H<sup>+</sup>Tris)

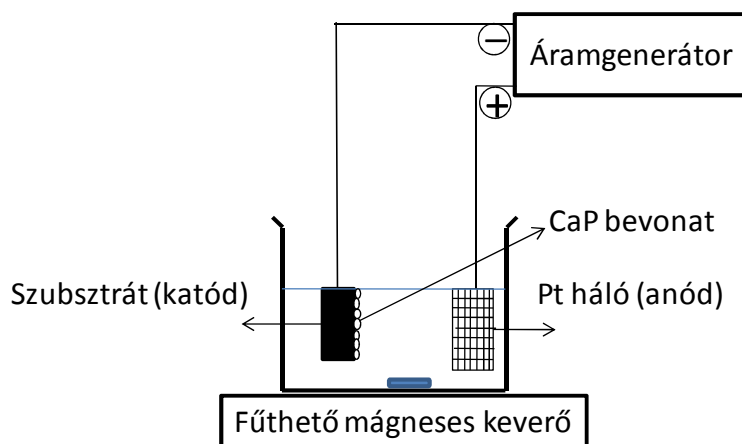
hidrogénkötésen keresztül ráadszorbeálódott a HAp részecskék felületi P–OH csoportjára, megnövelve a zeta potenciál értékét és növelve a kolloid/diszperzió stabilitását [112]. Más kutatócsoport dimetil formamidot használt oldószerként [113]. Munkájukban vizsgálták a HAp szuszpenzió zeta potenciáljának, elektromos mozgékonyságának illetve vezet képességének változását a pH-val, hogy megtalálják a legstabilabb szuszpenziót. Eredményeik alapján a szuszpenzió pozitív töltés volt a pH = 3-10 tartományban, valamint a legstabilabb szuszpenziót pH = 7-nél kapták.

Rojaee és mtsai [114] nanoszerkezet hidroxiapatitot választottak le magnézium ötvözet implantátum anyagra elektroforézissel. Az általuk el állított réteg vastagsága  $87,31 \pm 4,52 \mu\text{m}$  között változott, míg érdeessége a mérések alapján  $5,05 \pm 0,72 \mu\text{m}$  közötti volt.

Elektroforetikus úton ionokkal módosított HAp is leválasztható. Sun és mtsai [115] Zn szubsztituált HAp (ZnHAp) részecskéket vittek fel rozsdamentes acél alapra. A ZnHAp részecskéket kicsapással, csapadékképzéssel készítették  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -ot valamint különböző arányban  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ -ot tartalmazó oldatokból. A Zn/Ca arányt 1%-tól 10%-ig változtatták. Kimutatták, hogy tömör, egyenletes réteg érhető el elektroforézissel, ha a Zn/Ca arány eléri az 5%-ot.

#### *Elektrokémiai leválasztás*

Az elektrokémiai leválasztás lényege, hogy egy kételektrodos cellában, ahol a katód a negatív és az anód a pozitív elektród, áram, illetve feszültség segítségével filmréteget viszünk fel a katód felületére (2.3. ábra). Az elektrolitban lévő pozitív töltésű kationok a katód felé vándorolnak, ahol semlegesítődnek és a felületre atomokként illetve semleges részecskéként leválnak/kicsapódnak.



**2.3. ábra:** Elektrokémiai leválasztás sematikus ábrázolása standard két elektródos cellában.

A HAp rétegek és egyéb kalcium-foszfát rétegek elektrokémiai leválasztása elektromosan vezet felületekre elterjedt technológia. Ez főként annak köszönhető, hogy a technológia olcsó, könnyen kezelhető módszert biztosít a rétegek előállítására alacsony hőmérsékleten. Emlékeztetőül tartozik, hogy a paraméterek változtatásával a rétegek fizikai, kémiai és biológiai jellemzői is alakíthatók, bonyolult felület, komplex anyagok is könnyedén bevonhatók, könnyű a léptéknövelés és az ipari alkalmazás megvalósítása. Hátránya, hogy a levált CaP rétegek tapadása nem ideális, a vastagabb bevonatok porszerűek. A hidroxipatit elektrokémiai leválasztásához használt elektrolitnak tartalmaznia kell Ca forrást, ami nagyrészt  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  valamint foszfor forrást, ami lehet  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  komplex anionok  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  illetve  $\text{NH}_4^+$  sói.

A kalcium-foszfátok elektrolitikus leválasztásakor az elsőleges elektródfolyamat a víz elektrolízise, azaz hidrogén fejlődés a katódon és oxigén fejlődés az anódon.



Ezekén kívül lehetséges még a hidrogén-foszfát anionok elektrokémiai redukciója:



vagy a hidrogén-foszfát ionok kémiai reakciója a katódon képződött  $\text{OH}^-$  ionokkal:



Majd ezen anionok csapadékképzési reakciója a  $\text{Ca}^{2+}$  ionokkal az elektród felszínén:



A katódon képződő  $\text{OH}^-$  ionok miatt a pH értéke jelentősen megnövekedik az elektród közvetlen környezetében aminek hatására a katód felé vándorló pozitív töltésű  $\text{Ca}^{2+}$  ionok a foszfát anionokkal nagyon kis oldhatóságú csapadékot képezve leválnak a katód felületére.

A kutatások alapján az elsőleges leváló kalcium-foszfát fázis a  $\text{CaHPO}_4$ , azaz monetit, ezért különféle utólagos felületkezelésekre van szükség a fázisátalakításhoz hidroxipatittá. Blackwood és mtsai [116, 117] kimutatták, hogy a CaP rétegek katódos leválasztásakor alacsony kristályossági fokú hidroxipatit és amorf CaP fázisok keveréke vált le és a rétegek

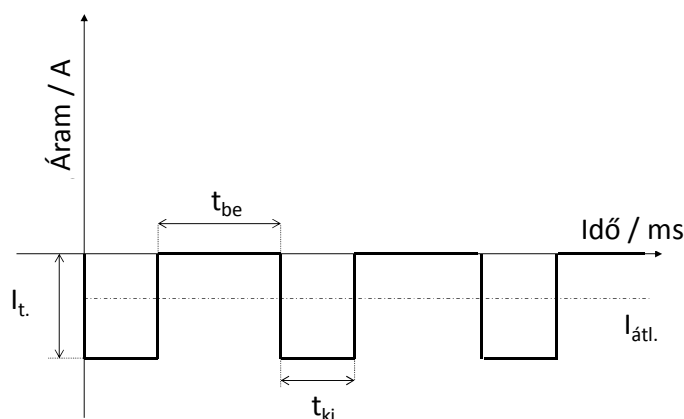


tapadása a Ti alapra gyenge. Bizonyították, hogy a levált HAp kristályossági foka javítható, valamint az egyéb CaP fázisok is átalakíthatóak kristályos hidroxiapatitá NaOH utókezelést alkalmazva. A rétegek tapadása tovább javítható a Ti alapfém felületének NaOH-os el kezelésével, majd 600 °C-on történő h kezelésével vagy hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) adagolásával az elektrolithoz. Mind a HAp kristályossága, mind a tapadása javítható a leválasztás h mérsékletének emelésével. Forgóelektród alkalmazása alacsony fordulatszámon szintén elnyös a tapadásra nézve, mivel a centrifugális erő elhajtja a fejlődő  $\text{H}_2$  buborékokat és az alapfém felé hajtja a  $\text{Ca}^{2+}$  és foszfátionokat. Magasabb fordulatszámon azonban a fejlődő hidroxidionok szintén eltávolodtak a katód felszínétől és a levált réteg egyenetlenebb és porszerűbb lett az egyenletes filmréteg helyett [118-120].

A monetit fázis átalakítása hidroxiapatitá lehetséges még a réteg magas h mérsékleten történő (900 °C – 1000 °C) h kezelésével is [121].

Az elektrokémiai rétegnövesztés megvalósítható impulzusos áram alkalmazásával. Ennek a módszernek az előnye az egyenáramú leválasztáshoz képest, hogy egyenletesebb, tömörebb, jobban tapadó rétegek állíthatók elő, jobb fizikai-kémiai tulajdonságokkal. Kisebb szemcseméretű részecskéket eredményez, mivel az impulzusos áramnál a gócképződés mechanizmusa kedvezményezettebb, mint a gócnövekedése.

A 2.4. ábrán az impulzusos áram négyszög hullámának sematikus ábrázolása látható:



**2.4. ábra:** Négyszögjeles áramimpulzus sematikus ábrázolása.

Gopi és mtsai [122] összehasonlító tanulmányt végeztek a hidroxiapatit egyen- és impulzusos árammal történő leválasztásával kapcsolatban. Eredményük, hogy az impulzusos áram pozitívan hat a HAp bevonat kristályszerkezetére és adhéziójára. Az árammentes idő szak alatt elég ideje van a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  ionoknak, hogy a katód felületéhez, a kiürült zónába

vándoroljanak, fenntartva a HAp leválasztásához szükséges optimális körülményeket. Esetükben az árammentes időszak és az áramimpulzusok időtartama másodperces nagyságrendűek voltak. A szerkezeti vizsgálatok szerint tömörebb, egyenletesebb rétegek képződtek kisebb átlagáram-sűrűség és hosszabb árammentes idő esetén.

Blackwood és mtsai [117] szintén hidroxiapatit rétegeket választottak le impulzusos árammal titán alapfémre és vizsgálták a rétegek adhéziós tulajdonságait. Azt találták, hogy kisebb áram-sűrűség alkalmazásával vastagabb rétegek állíthatók elő, valamint javul a bevonat kristályossági foka és tapadása is. A nagyobb áram-sűrűséggel, rövid ideig leválasztott rétegek hasonló tulajdonságokkal rendelkeztek, mint az kis egyenárammal és hosszabb ideig (másképpen ugyanannyi töltéssel) leválasztottak. Az impulzusos áram alkalmazásának előnyeit számos egyéb kutatómunka tárgyalta [123-127].

A hidroxiapatit rétegek mechanikai, korróziós és biológiai tulajdonságainak változtatására lehetséges megoldás még a különféle fémionokkal történő adalékolás, módosítás, együttleválasztás. Több kutatómunka bizonyítja, hogy az ionokkal történő adalékolás módosítja a HAp kristályszerkezetét, megváltoztatja a rácsparamétereket, amennyiben ezek az elemek beépülnek magába a kristályrácsba [128-132].

Az XRD vizsgálatok alapján a  $\text{Ca}^{2+}$  (0,99 Å) ionok részleges helyettesítése kisebb méretű  $\text{Zn}^{2+}$  (0,77 Å) vagy  $\text{Mg}^{2+}$  (0,69 Å) ionokkal a röntgendiffrakciós csúcsok nagyobb  $2\theta$  felé tolódását eredményezik [130-136].

Ziani és mtsai azt találták, hogy a  $\text{Mg}^{2+}$  ion beépülése a kristályrácsba a kristallitok méretének csökkenését és a rácsszerkezet hibahelyeinek növekedését okozza, ezáltal kiszélesedett csúcsok jelennek meg az XRD görbén. A stroncium- és ezüstionok beépülése a kristályrácsba a reflexiós csúcsok kisebb  $2\theta$  felé tolódását okozták, tehát a ráczállandók értékei növekedtek, ami a  $\text{Sr}^{2+}$  (1,13 Å) és  $\text{Ag}^{+}$  (1,15 Å) nagyobb méretének köszönhető [132].

Az egyen- és impulzusos árammal történő leválasztás mellett elterjedt módszer az egyen- és impulzusos feszültséggel történő rétegnövesztés [137-141].

Wang és mtsai [137] az elektrokémiai úton leválasztott HAp nanoszerkezetét vizsgálták, mivel állításuk szerint a bevonatok szerkezete nagyban befolyásolta azok fizikai és kémiai tulajdonságait valamint klinikai alkalmazhatóságukat. A bevonatokat potenciosztáttal állították elő, -1,4 V konstans katódos potenciálon kalomel (SCE,  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) referenciaelektródhoz képest. Eredményeik alapján azt állították, hogy az elektrokémiai úton előállított rétegek magas kristályossági fokkal rendelkeztek, valamint, hogy a bevonatok két

különálló rétegből épültek fel: a külső réteg lemezszerű kristályokból állt, melyek az alapfémre mer legesen növekedtek, míg a belső réteg sűrű, homogén, nanoszerkezetű HAP kristályokból épült fel.

Thanh és mtsai [138] a hidroxiapatit rétegeket szintén potenciosztáttal készítették. A leválasztás során a potenciált 0 V-tól - 1,6 V-ig növelték, telített kalomel elektródhoz viszonyítva, 5 mV/s polarizációs sebességgel. A rétegeket 316L rozsdamentes acélra választották le. Elektrolitként különböző koncentrációjú kalcium-nitrátot, ammónium-hidrogén-foszfátot valamint hidrogén-peroxidot tartalmazó oldatokat használtak és vizsgálták az elektrolit koncentrációjának, a hőmérsékletének, valamint a  $H_2O_2$ -tartalomnak a hatását a réteg morfológiájára, szerkezetére és összetételére. Saremi és mtsai [139] impulzusos potenciált alkalmaztak a rétegekészítéshez. Esetükben az elektrolit 0,042 mol/L  $Ca(NO_3)_2$ , 0,025 mol/L  $(NH_4)H_2PO_4$  és 10 ml/L  $H_2O_2$  tartalmú oldat volt és a hordozó AZ31 Mg ötvözet. A leválasztáshoz feszültséggenerátort használtak és a rétegeket -3 V potenciálon készítették 0,2 kitöltési tényezővel ( $t_{be}/t_{be}+t_{ki}$ ), szobahőmérsékleten. A rétegek fő szerepe a Mg ötvözet implantátum korróziójának csökkentése volt.

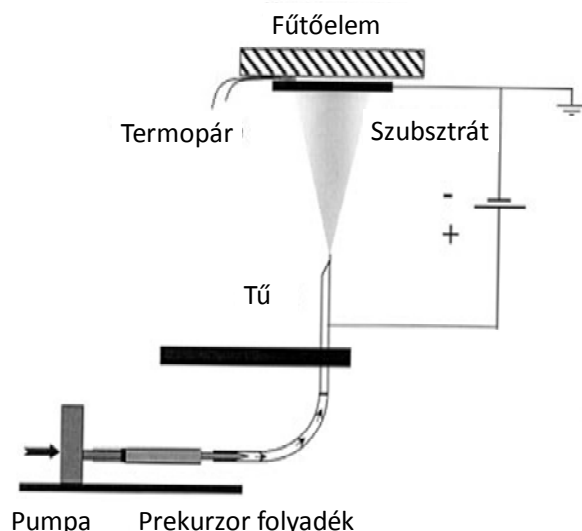
Monasterio és mtsai [141] szintén AZ31 Mg ötvözetre választottak le kalcium-foszfát rétegeket. Átfogó kutatómunkájukban négyféle módszert hasonlítottak össze: konstans potenciálú leválasztást, impulzusos potenciálú leválasztást valamint DC és PC leválasztást. Kimutatták, hogy egyenáramú és impulzus áramú leválasztásokkal hatékonyabban lehetett elállítani viszonylag jól tapadó rétegeket. Nem találtak számottevő különbségeket a két módszerrel leválasztott rétegek minőségében. Mindkét esetben sima, egyenletes kalcium-foszfát rétegeket kaptak, ami brushitnak ( $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ ) bizonyult. A brushit a hidroxiapatit fázis prekursorának tekinthető. Meghatározták az optimális áramsűrűség tartományt, ami a megfelelő minőségű rétegeket eredményezte. Esetükben ez 0,1 - 0,3 mAmm<sup>-2</sup> között mozgott. Ennél nagyobb áramsűrűség alkalmazása esetén azt találták, hogy a CaP részecskék morfológiája megváltozott, a lemezszerű forma helyett inkább gömb alakú részecskék váltak le, ami jelentősen csökkentette az alapfémhez tapadást. Impulzusos áramú leválasztás esetén azt a következtetést vonták le, hogy az alacsony frekvencián (50 Hz) történő leválasztás elősegíti a nagy, lemezszerű részecskék növekedését, valamint az 50–1000 Hz tartományban történő leválasztás ugyanolyan tapadású rétegeket eredményezett. Mindemellett, az 1000 Hz-en történő leválasztás, ami jóval nagyobb a szakirodalomban optimálisnak állított 500 Hz-nél, jól tapadó, lemez formájú részecskéket eredményezett. Állításuk szerint az 1000 Hz frekvenciával előállított réteg kisebb méretű részecskékből épült fel, mint az 50 Hz-en leválasztott, ami előnyös lehet a csontsejtek oszteointegrációjához az orvosbiológiai

alkalmazáskor. Megfigyelték azt is, hogy a bevonat vastagsága növekedett, mikor az áramsűrűséget és az áramkitöltési tényezőt növelték.

A konstans potenciállal és impulzusos potenciállal történő leválasztással elállított rétegek esetében az 5 V-on leválasztott rétegek rendelkeztek a legjobb morfológiával és homogenitással, azonban szárítás után a rétegek könnyen leváltak a felületről. Nagyobb feszültségeknél az elektrolit már flokkulálni kezdett, nagyméretű CaP részecskék váltak le az alapfém felületére, azonban a leválás nem volt egyenletes, mivel maradtak bevonat nélküli felületek is. Ezek a bevonatok is könnyen lejöttek a felület utókezelése, szárítása után. Az 5 V alatti feszültség alkalmazása szintén nagy kiterjedésű fedetlen felületeket eredményezett.

#### *Elektroporlasztásos (electrospray) rétegleválasztás*

Az elektroporlasztás egy viszonylag új technológia a CaP bevonatok elállítására. A módszer elnye, hogy egyszeres és költséghatékony, hátrányai közé tartozik azonban, hogy az így leválasztott rétegek nem egyenletesek és a tapadásuk sem tökéletes, ez azonban javítható adalékanyagok (különböző biopolimerek) alkalmazásával. A módszer lényege, hogy nagy feszültség (általában 6-15 V) hatására a CaP szuszpenzió cseppjei az adagoló tő végén úgynevezett Taylor kúpot képeznek, a részecskék elektromosan feltöltődnek, majd amikor a feszültség a két elektróda között eléri egy bizonyos értéket, folyadéksugárként, kúp alakban kilövell és a céltárgyon gyűlik össze film formájában. A szuszpenziót szivattyú segítségével juttatják az adagoló tő nyílásához (2.5. ábra). A céltárgy lehet maga az implantátum anyag. A CaP szuszpendálására sokféle oldószer (vizes és szerves) alkalmazható.



**2.5. ábra:** Az elektroporlasztó készülék összeállítása és sematikus működési elve.

Leeuwenburgh és mtsai [142] CaP vékonyréteget választottak le cpTi felületre elektroporlasztással. Kutatómunkájuk során  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -ot és  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -at (85 m/m%,)

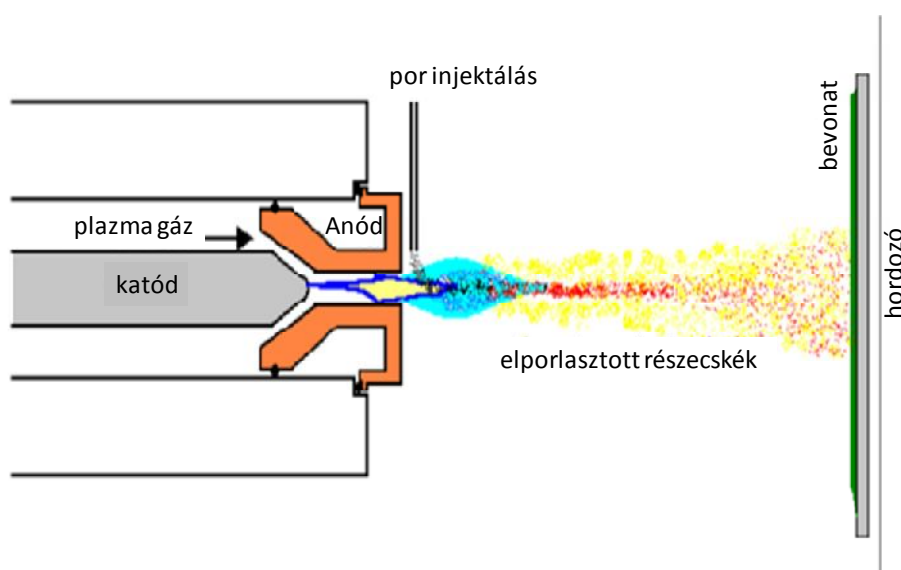
használtak, mint Ca és P prekuzort, valamint etanolt és butil-karbitolt diszpergáló oldószerként. Kimutatták, hogy a bevonat szerkezete, morfológiája alakítható a leválasztási paraméterek optimális kombinációjának megválasztásával. Kutatásuk fontos eredménye, hogy változatos morfológiájú bevonatok állíthatóak el, az egészen tömörtől a nagyon pórusos jellegig. Sikerült el állítaniuk ezen kívül egy egyedi morfológiával rendelkező, hálószerű bevonatot is, háromdimenziósan összekapcsolódó pórushálózattal. XRD és FT-IR mérésekkel bizonyították a karbonátos HAp képződést az elektroporlasztott bevonat h kezelésére után. Egy másik tanulmányban [143] vizsgálták az így leválasztott pórusos CaP rétegek *in vitro* és *in vivo* reaktivitását. Azt találták, hogy az apatit bevonatnak nem volt káros hatása a csontszövetekre, valamint implantáció után a szálak szövetek sűrűsége kezdtek növekedni az implantátumon.

Huang és mtsai [144] nanoszerkezetű HAp (nHAp) bevonatokat állítottak el. Munkájuk során kalcium-hidroxidot ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) és foszforsavat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) használtak, mint Ca és P prekuzorok a nHAp szuszpenzió el állítására. Az oldatban a Ca/P arányát 1,67-re állították be. Singh és mtsai [145] azt tapasztalták, hogy az elektroporlasztott nHAp bevonat növelte a Ti ötvözet felületi érdességét  $2,34\text{ }\mu\text{m}$ -ról  $2,77\text{ }\mu\text{m}$ -re, valamint javította a korrózióállóságát. Az XRD mérések a reflexiók csúcsok kiszélesedését mutatták, ami arra utalt, hogy a nHAp fázis amorf jellegű lett. Shouten és mtsai [146] hengeres implantátum csavarokra elektroporlasztottak CaP nanorészecskéket és vizsgálták a mechanikai és *in vivo* biokompatibilis jellegüket. A nanoméretű CaP port etanolban oszlatták el az elektroporlasztás el tt. Az eredményeik szerint a bevonat durva, pórusos jellegűt mutatott és a CaP részecskék sűrűsége befedték az implantátum egész felületét. A biokompatibilitási eredményeik szintén pozitívak voltak. Jonge és mtsai [147] kifejlesztettek egy alkáli foszfatáz enzim (ALP) valamint kalcium-foszfátot tartalmazó bevonatot. A bevonatot titán korong alapfémre vitték fel elektroporlasztás segítségével. Kimutatták, hogy ez a fajta bevonat képes indukálni enzim által, és fizikai-kémiai úton is szabályozott biomineralizációs folyamatokat. Az oszteoblaszt jellegű sejteken végzett sejtelétképeségi tesztek lelassult sejtosztódást, valamint felgyorsult mineralizációt mutattak az ALP/CaP kompozit bevonat esetében a csak CaP réteggel bevont illetve bevonat nélküli implantátumokhoz viszonyítva. Ezek az eredmények bebizonyították, hogy az ALP-t is tartalmazó bevonat javítja illetve fokozza a Ti implantátum csontképző tulajdonságát. Vizsgálták továbbá az elektroporlasztott nanoCaP/kollagén kompozit bevonat csontképző jellegét is. Bizonyították, hogy a bevonat kollagén tartalma nagyban javította a réteg adhézióját valamint el segítette az oszteoblaszt differenciálódást [148].

### 2.3.2. Magas hőmérséklet technológiák

#### Plazmaszórás

A plazmaszórás során nagy sebesség plazmalángot használnak rendkívül magas hőmérsékleteken ( $\sim 10000\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) különféle anyagok (pl. fémek, kerámiák, kompozitok) a céltárgy felületére szórására és a felületre történő ráégetésére. A bevonat anyagát porszerű formában injektálják a nagy hőmérséklet plazmalángba, ahol gyorsan felmelegszik és nagy sebességre gyorsul. Végül a felhevült anyag a hordozó felületébe csapódik és ott gyorsan lehűl, bevonatot képezve (2.6. ábra). A módszer előnye, hogy magas olvadáspontú anyagokat (kerámiákat) is alkalmazhatnak bevonatként, a bevonat tömör, egyenletes, jó adhéziós tulajdonságokkal rendelkezik, a bevonat nem szennyeződik, mivel tiszta technológia, nagy a leválasztási sebesség, a bevonat vastagságát és a leválasztási paramétereket könnyű hangolni. Hátrányai közé soroljuk, hogy drága, energiaigényes, bonyolult, komplex folyamat, a CaP fázisok kedvezőtlen elbomlása, fázisátalakulása mehet végbe, komplex, bonyolult formájú anyagok bevonása nehézkes, valamint a gyors lehűlési folyamat során repedések léphetnek fel a rétegben, ami rontja a fizikai-kémiai tulajdonságait.



**2.6. ábra:** A plazmaszóró készülék összeállítása és sematikus működési elve.

A kalcium-foszfát rétegek előállítása esetén a bevonat fő összetétele kristályos HAp, azonban tartalmaznak egyéb amorf CaP fázisokat is. Ezeknek a másodlagos fázisoknak a mennyisége, minősége és eloszlása nagyban függ az alkalmazott paraméterektől, úgymint a gázáramtól, plazma hőmérsékletétől, a vízgáz minőségétől, a hőkezelt paraméterektől valamint láng és a

hordozó közötti távolságtól. Ezen kívül függ még a felhasznált HAp nanorészecskék méretét is [149-152].

Wu és mtsai [153] kidolgoztak egy szabadalmat pórusos HAp réteg el állítására plazma porlasztással. HAp szuszpenziót használtak 16 – 45% szárazanyag tartalommal és a szuszpenzióhoz különféle ún. pórusképz adalékanyagokat (etanol, ammónium-karbonát, ammónium-bikarbonát, hidrogén-peroxid és desztillált víz) adtak különböző arányokban. Ez a pórusos szerkezet el nyösnek bizonyult az anyag biokompatibilitására, bioaktivitására nézve.

Gan és mtsai [154] szabadalmaztatott eljárásukban ezüst tartalmú HAp bevonat plazmaszórással történ kialakítását írták le. Az egyik általuk kifejlesztett bevonat a hordozó felületére felváltva porlasztott kereskedelmi HAp és Ag<sub>2</sub>O por. Azonban ez a módszer nem eredményezett egyenletes AgHAp réteget, a felület borítottsága nem volt homogén és az ionok kioldódása sem volt egyenletesen fenntartható implantáció után. Abban az esetben sem kaptak egyenletes eloszlású réteget, amikor a plazmaszórás el tt homogenizálták a HAp és Ag<sub>2</sub>O porokat, mivel az ezüst oxid nem lépett kémiai reakcióba a HAp porral és nem képz dött új, egységes AgHAp fázis még magas h mérsékleten sem. Egy másik eljárásuk szerint az el zetesen hidroxipatittal bevont implantátumokat AgNO<sub>3</sub> tartalmú oldatba merítették 24 órán keresztül majd szárították az implantátumot leveg n és inert atmoszféra alatt is. A bevonatok vastagságát 1 mikrométert l néhány száz mikrométerig változtatták.

Wang és mtsai [155] HAp bevonatokat állítottak el úgynevezett mikro-plazmaszórással. Bizonyították, hogy a bevonat fáziseloszlása változott a bevonat különböző vastagságában. Kristályos HAp, ACP és -TCP fázisokat mutattak ki a bevonat/alapfém határfelületen, a HAp tartalom növekedett a rétegben a határfelülett l távolodva, és a felszínen elérte a 90%-ot (40 µm vastagságú bevonat esetén). A HAp oszlopos kristályszerkezetét figyelték meg a felszíni régióban, ami a (002) orientációnak tulajdonítható.

Tsui és mtsai [156] Ti6Al4V, rozsdamentes acél és wolfrám hordozókra plazma-szórtak HAp rétegeket és vizsgálták a bemeneti feszültség és a különböző vív gáz kombinációk hatását a bevonat min ségére. A vizsgálati eredményeik alapján az általuk porlasztott rétegek alacsony porozitással, nagy kohéziós szilárdsággal és jó tapadással rendelkeztek. A bevonat nagyfokú kristályossággal rendelkezett és stabil, nagy kémiai tisztaságú fázissal. Kimutatták, hogy a bemeneti feszültség növelésével a kristályossági fok, illetve az OH<sup>-</sup> tartalom csökkent és a réteg nem hidroxipatitos CaP fázisainak aránya megnövekedett. Ezt a jelenséget a részecskék nagyobb fokú megolvadásával magyarázták, mivel a megolvadt részecskék amorf

fázisba alakultak át a lehűlés során. A plazma hőmérsékletének növelésével a rétegek porozitása is növekedett és mikrorepedések is megjelentek.

Egy másik módszer a plazmaszórás alkalmazására a molekuláris plazma leválasztás (MPL), melyet a Chameleon Scientific (Longmont, CO, USA) cég fejlesztett ki. Alkalmas HAp bevonatok kialakítására fémek, polimerek és kerámiaanyagok felületére néhány nanométertől egészen több 10 mikrométeres vastagságban. Az MPL technológia nagyfeszültség koronakisülést használ a rétegek különböző hordozók felületére történő egyenletes felvitelére. Balasundaram és mtsai [157] elsőként publikálták nanoszerkezetű HAp réteg felvitelét titán alapra ezzel a módszerrel. A hidroxipatit tartalmú oldatot ionizálták a koronakisülés segítségével majd a HAp részecskék leváltak az anodizált nanocsöves Ti alapra az ionizált folyadékból a vákuumkamrában. Bizonyították, hogy az így készített bevonat jól tapadt az alapfém felületére és szerkezetében nem tartalmazott nagyobb mikrorészecskéket, agglomerátumokat [158].

#### *Kémiai gázfázisú leválasztás (CVD)*

A gázfázisú kémiai leválasztással történő bevonatkészítésnél a különböző reaktánsok gázfázisú kémiai reakciója megy végbe a magas hőmérsékletre (500–1500 °C-ra) felfűtött hordozó felületén, illetve annak közvetlen közelében. A módszerrel leválaszthatóak egyrétegű, illetve többrétegű bevonatok, valamint kompozitok. A bevonatok nanorészecskékből épülnek fel, a réteg nanostruktúrája jól szabályozható, illetve alakítható. Segítségével egyedi struktúrájú szerkezetek kialakítása lehetséges akár atomi szinten, ami nagytisztaságú bevonatok előállítását eredményezi. Ezen kívül komplex felületek (orvosbiológiai implantátumok, nanoberendezések) bevonása nagy felületen is megvalósítható. Azonban a leválasztási paraméterek (hőmérséklet, nyomás, a reaktánsok koncentrációja, a gáz összetétele és a gázáramlás sebessége) nagyon pontos beállításokat, monitorozást és ellenőrzést igényelnek, ez hátránya a technológia alkalmazásának. A kémiai gázfázisú leválasztás alatt végbemenő főbb kémiai reakciók a pirolízis, oxidáció, redukció, hidrolízis, valamint ezek kombinációi. A hordozó akár katalizálhatja is ezeket a folyamatokat. Az adott kémiai reakciók határozzák meg az alkalmazandó optimális hőmérséklettartományt. A bevonat leválasztási hőmérséklete az egyik kritikus pont, mivel meghatározza mind a termodinamikai, mind a kinetikai folyamatokat a leválasztás során. Ezt a hőmérsékletet fenn kell tartani, hogy a kémiai reakció a hordozó felületén játszódjon le és ne a gázfázisban, valamint optimalizálni kell a paramétereket a réteg megfelelő szerkezetének (méret és forma)



kialakításához. A paraméterek legkisebb változtatása is megváltoztathatja a kémiai reakció kinetikáját, rosszabb minőség rétegeket eredményezve [159].

A CVD során fontos, hogy a gázfázisú reaktánsok elérjék a hordozó felületét valamint a megfelelő hőmérséklet beállítása, ahol a gázok kémiai reakciója diffúzió kontrollált, annak érdekében, hogy egyenletes bevonat keletkezzen [160].

Gao és mtsai [161] CaP rétegeket állítottak elő plazma fémorganikus gázfázisú kémiai leválasztással (MOCVD). Ebben a technológiában fémorganikus prekursorokat alkalmaztak a rétegek előállítására. Kimutatták, hogy az ideális hordozók a leválasztáshoz lehetnek fémek, kerámiák, üvegek és ezek kombinációi, szerkezetük lehet tömör vagy pórusos. Ca prekursoraként  $\text{Ca}(\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_2)_2$  (kalcium-bisz[2,2,6,6-tetrametil-3,5-heptándionát]),  $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{F}_{12}\text{O}_4\text{Ca}$  (kalcium-[hexafluoro-acetoacetonát]) valamint  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Ca}$  (kalcium-metoxi-etilát) használtak, míg a P prekursorok:  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$  (triethyl-foszfát),  $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$  (triizopropil-foszfát),  $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{P}(\text{O})$  trisz(2-klóretil)-foszfát. A prekursorok Ca/P arányát 1,35 és 1,65 között változtatták kísérleteikben. A bevonatokon elvégzett kvalitatív mikro-indentációs kísérletek kimutatták, hogy a réteg adhéziója megfelelő és egyenletes az egész felületre nézve, valamint az 500 °C felett leválasztott rétegek nem töredezték vagy váltak le a hordozó felületéről 1 h lelés közben.

#### *Impulzus lézeres leválasztás (PLD)*

A PLD módszer lényege, hogy egy impulzusos lézersugarat irányítanak a céltárgyra, amelyet vákuumkamrában forgatnak vízgáz közegben kontrollált körülmények között. A lézersugár által elpárologtatott anyag közvetlenül a vele párhuzamosan elhelyezett hordozóra válik le. Ezt a hordozót általában felmelegítik a megfelelő hőmérsékletre. Számos CaP fázis választható le a leválasztási paramétereknek, azaz a lézersugár intenzitásának, a vízgáz nyomásának, és a hordozó hőmérsékletének függvényében [162].

A módszer előnyei közé tartozik a jól tapadó, nagy kristályossági fokú, tömör és homogén bevonatok kialakítása, valamint a technológia hatékony és megbízható, a leválasztási paramétereket könnyű beállítani, ellenőrizni és változtatni [163].

Hátránya, hogy a berendezés, annak üzemeltetése és ezáltal a rétegek előállítása drága, bonyolult 3D-s tárgyak bevonása nem, vagy csak nehezen kivitelezhető és a leválasztás sebessége is kicsi.

Duta és mtsai [164] egy összehasonlító tanulmányt dolgoztak ki, melyben vizsgálták különböző természetes alapú HAp kompozitokból valamint kereskedelmi HAp porokból PLD módszerrel leválasztott rétegek tapadását a Ti alapfémre. Megfigyelték, hogy a rétegek

tapadása nagyon hasonló volt a szakirodalomban publikált értékekhez [165-167], valamint hogy a bevonat gömbszerű részecskékből állt, melyek átmérője megközelítőleg  $2\text{ }\mu\text{m}$ . Az általuk előállított rétegek vastagsága  $2,8\text{--}3,7\text{ }\mu\text{m}$  között változott.

Komath és mtsai [168] szintén azt tanulmányozták, hogyan lehet jól tapadó kristályos HAp réteget leválasztani Ti alapra. A rétegeket PLD módszerrel készítették  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, és utólagos hidrotermikus felületkezelést is végeztek alkáli közegben. Kísérleteik alapján ez az utókezelés jelentősen növelte a réteg tapadását az alapfémhez.

Man és mtsai [169] vizsgálták a különböző felület-elkezelési módszerek hatását a rétegek tapadására. Azt találták, hogy az adhéziós erősség növekedett a felület érdességének növelésével. A PLD módszerrel előállított HAp rétegek minőségének és tulajdonságainak vizsgálatával kapcsolatban számos irodalmi adat található [170-176].

Popescu-Pelin és mtsai [173] titán alapra növesztettek HAp bevonatokat és tanulmányozták a mechanikai, fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságaikat. Az általuk előállított rétegekben a részecskék morfológiája szabálytalan volt. Mikrométeres nagyságú, cseppszerű granulátumokat, valamint mikro- és nanoméretű üregeket figyeltek meg a PLD technikával előállított rétegben. A Ca/P elemarányt  $1,73 \pm 0,3$  értéknek mérték, amiből Ca-ban gazdag HAp fázis jelenlétére következtek.

### 2.3.3. Alacsony- és magas hőmérséklet technológiák együttes alkalmazása

#### *Vizes kémiai kicsapás és hidrotermikus eljárás*

Mindkét eljárás egyszerű, gyors és költséghatékony megoldás a HAp előállítására. Ezeket a módszereket széleskörűen alkalmazzák porok illetve kerámia bevonatok gyártására. Az eljárásokban megfelelő prekursorokat tartalmazó oldatokat, szuszpenziókat, kolloidokat használnak a bevonatok kialakítására. A módszerek főleg az egyszerűségükben és olcsóságukban rejlik, nem igényel bonyolult és drága berendezéseket. Bonyolult geometriájú felületek is egyenletesen bevonhatóak. A technológiák léptéknövelése könnyedén megoldható és iparosítható. Hátrányuk, hogy a bevonatok tapadása nem ideális és hőkezelés ( $900\text{--}1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) alkalmazása szükséges annak javítására [177-180]. Ezért is tekinthetők ezek a bevonatkészítési módszerek az alacsony- és magas hőmérséklet technológiák kombinációjának.

A hidrotermális eljárás hasonló a vizes kémiai kicsapáshoz azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a reakció magasabb hőmérsékleten játszódik le ( $>80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) és hosszabb ideig (több mint másfél óra) tart. A CaP csapadék kristályos, és a részecskék morfológiája könnyen

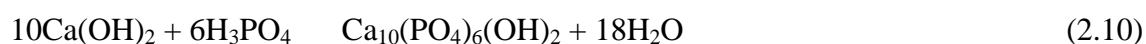
változtatható a reakció különböző paramétereivel, úgymint a prekursorok min ségével és koncentrációjával, elemarányukkal, a hőmérséklettel és az alkalmazott oldószerrel [181-186]. A CaP fázisok kicsapással történő leválasztására foszfor forrásként a foszfát anion ( $\text{PO}_4^{3-}$ )  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  vagy ammónium sói használhatók. Azonban vannak egyéb alternatív megoldások is, melyekben foszforsavat vagy  $\text{HPO}_4^{2-}$  illetve  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  anionokat alkalmaznak [187-188]. Ca forrásként különböző Ca sók használatosak, úgymint  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ , azonban a leggyakoribb a kalcium-nitrát, mint prekursor anyag [189, 190].

A reakció az alábbi sztöchiometriaiegyenlet szerint játszódik le, amennyiben P forrásként diammónium-hidrogén-foszfátot alkalmaznak:



Ebben az esetben maga a termék szennyez anyagoktól mentes, mivel az ammónium-nitrát melléktermék nem épül be a HAp kristályrácsába. A reakció lejátszódása után viszont a csapadékot mosni kell az ammóniumsók teljes eltávolítása érdekében. Ez a művelet sok vizet igényel aminek következtében nagy mennyiségű, utólagos feldolgozásra szoruló melléktermék, szennyezett víz is keletkezik. Ennek a kezelése, ártalmatlanítása ipari méretekben már nehézkes és költséges.

A probléma elkerülése érdekében egyes kutatók [191, 192] más prekursorokból indultak ki, amelyek melléktermék képződése nélkül reagálnak. Az egyik ilyen alternatíva a kalcium-hidroxid és foszforsav sztöchiometrikus arányú elegyítése az alábbi reakcióegyenlet szerint:



A 2.10-es reakció egyedüli mellékterméke a víz, így a mosási folyamat elkerülhet.

Több kutatómunka is foglalkozik kalcium-hidroxid és foszforsav prekursorok alkalmazásával. Nörenberg és mtsai [193] rúd alakú CaP kristályokat állítottak elő, melyekben a hossz/szélesség aránya nagyobb, mint öt. Saita és mtsai [194] kidolgoztak egy módszert HAp rétegek kialakítására olyan kolloidból, melyben a HAp részecskék mérete 0,01 és 0,2  $\mu\text{m}$  között változott. A részecskéket olyan szerves oldószerekben oszlatták el, melyek könnyen elpárologtathatóak, úgymint alkoholok (etanol) és ketonok (metil-etil-keton). Troczinski és mtsai [195] szabadalmaztattak egy eljárást, melyben olyan speciális formájú, gömbszerű, mikrométeres CaP részecskéket állítottak elő, amelyek képesek magukba zárni gyógyszerhatóanyagokat, fehérjéket, proteineket, géneket, vagy akár DNS-t. Ezáltal

alkalmasak célzott terápiás használatra, mint gyógyszerhatóanyagok kioldódását szabályozó vázanyagok.

A vizes kémiai kicsapás egyik nagy hátránya a nehéz reprodukálhatóság és a nem sztöchiometriai CaP fázisok, mint melléktermékek képződése. Ennek hatására a CaP kristályossága és morfológiája változik. Bizonyos CaP fázisok, úgymint a TCP, ACP, DCP képződése elkerülhet a pH megfelelő beállításával. Az oldatok pH-ját 11 körüli, vagy annál nagyobb értékre kell beállítani, ami biztosítja az ortofoszfát ionok keletkezését a  $\text{H}_3\text{PO}_4$  vizes oldatában [196].

Más kutatások bizonyították, hogy a 25 és 37 °C között végzett reakciók esetében a CaP részecskék morfológiája és mérete a csontokban találhatóéhoz hasonló, míg a 90 °C felett végzett reakciókban a részecskék struktúrája a fogakat felépítő kéhez hasonlatos [197].

Az ionokkal történő adalékolás szintén problémákat vet fel ennél a technológiánál. A Ca/P megfelelő aránya nehezen állítható be, és egyéb fázisokkal, kis oldhatóságú foszfát csapadékokkal is szennyeződik a kalcium-foszfát fázis. Abban az esetben, ha a karbonát szennyeződésként, illetve beépülés elkerülése a cél, a reakciót inert gáz atmoszféra alatt kell lefolytatni [198, 199].

A vizes kicsapással előállított különféle CaP fázisok rendkívül sokoldalúan felhasználhatóak. Felhasználási területeik közé tartozik a csontépítő [200-202], illetve csontpótló anyagok [23, 24, 203-205], ortopédiai és fogorvosi implantátumokon bevonatok [153, 154, 206-210], valamint gének és gyógyszerek célzott kioldódását segítő vázanyagok [195, 211-216].

Bonfield és mtsai [217] kidolgozták az egyfázisú,  $\text{Mg}^{2+}$  és  $\text{CO}_3^{2-}$  szubsztituált hidroxiapatit előállítását. Az általuk leírt folyamatban  $\text{PO}_4^{3-}$  és  $\text{CO}_3^{2-}$  anionokat tartalmazó oldatot, amelyek a  $\text{H}^+$  ionokon kívül nem tartalmaztak egyéb kationokat valamint  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  tartalmú oldatokat keverték össze, majd a kiváló csapadékot összegyűjtötték és szárították. A Ca+Mg/P arányt a keverék szuszpenzióban 1,67-es értéken tartották. Az eredményeik alapján a csapadék 0,5 m/m% körüli magnéziumot és 1 m/m% karbonátot tartalmazott és a csapadékban a mért Ca+Mg/P arány nagyobb volt 1,67-nél. Bingöl és mtsai [186] kalcium-szulfátból ( $\text{CaSO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ ), mint Ca prekursorból és ammónium-foszfátból ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ), mint P prekursorból állítottak elő HAp port mérsékelt hidrotermális körülmények között. Kimutatták, hogy a HAp képződése 50 °C alatt nagyon lassan ment végbe, 25 °C-on a HAp kialakulása 7 nap után kezdődött el. Alacsonyabb hőmérsékleten a reakcióidő növelése javította a HAp képződés hatékonyságát azonban más CaP fázisok (főként monetit,  $\text{CaHPO}_4$ ) képződését is segítette.

*Szol-gél eljárás*

A módszer lényege, hogy kolloid részecskéket, jellemzően 1-1000 nm mérettartományban, oszlatnak el valamilyen közegben, ami lehet vizes vagy szerves oldószer. A kolloid rendszer stabilitása növelhető a részecskék felületi töltésének csökkentésével, különféle diszpergálószeres adagolásával. Ezek a diszpergálószeres általában nagy moláris tömeg polimerek. A gélesedést kiválthatja a hőmérséklet, a pH változása, vagy az oldószer elpárologtatása. A képződött gél egy kompozitnak is tekinthető, mivel egy szilárd vázból és az általa bezárt oldószerből (folyadékfázisból) áll. A kialakult gél már képes megtartani az eredeti alakját [209].

A szol-gél módszerrel történő bevonatkészítés történhet bevonatkezeléssel (dip coating) nagyobb és bonyolultabb felületű minták esetén, valamint rétegfelpörgetéssel, úgynevezett „spin coating”-gal, ami elsősorban kis méretű, lapos felületű mintákon alkalmazható. Ez a technológia egy viszonylag olcsó és könnyen kivitelezhető módszert biztosít a biokerámia bevonatok előállítására. Az előállított rétegek homogének, egyenletesek, jó a szerkezetintegritásuk, tisztaságuk, fizikai-kémiai tulajdonságaik megfelelőek. Emellett az alapfém degradációja, hőindukált fázisátalakulása és mikroszerkezetének átalakulása is elkerülhető, ami az előzőekben tárgyalt nagy hőmérsékletű technológiáknál (plazmaszórásnál és kémiai porlasztásnál) problémát okozhat. A módszer hátránya, hogy a bevonat tapadási gyenge és javításához hőkezelés szükséges. A szol-gél eljárás alacsony hőmérsékleten megy végbe, azonban a réteg megfelelő tapadásához kiegészítő hőkezelés alkalmazására is szükség van.

Kristályos HAp bevonat szol-gél technológiával történő előállításakor egy foszfor tartalmú prekursor vegyület (foszfát) hidrolízise megy végbe vizes közegben, majd ezután Ca-só prekursor vegyületet adagolnak az oldathoz a gél kialakításához. Az utolsó lépés a gél kiégetése megfelelő (általában 500 °C-nál nagyobb) hőmérsékleten a megfelelő kristályossági fokú HAp bevonat eléréséhez. Az eljárás során Ca-prekursorként általában fém-alkoxidokat (pl. Ca-dietanolát) valamint foszfor-észtereket (pl. trialkil-foszfátokat, trialkil-foszfátokat) használnak [210].

Takahashi és mtsai [218] kifejlesztettek egy szol-gél eljárást, melyben kalcium-nitrátot és foszfonoecetsavat ( $\text{HOOCCH}_2\text{PO}(\text{OH})_2$ ) reagáltattak vizes közegben. Végeredményként tiszta HAp port kaptak 700 °C-on, melynek kristályossági foka növekedett a hőmérséklet 1100 °C-ra történő emelésével. Chai és mtsai [219] két Ca-prekuzort hasonlítottak össze: Ca-dietoxidot és Ca-propionátot. Foszfor-prekuzorként trietil-foszfátot használtak. Megfigyelték,

hogy a kristályos HAp fázis 500 °C körül jelent meg Ca-propionát reaktáns esetén, azonban Ca-dietoxid esetén nem keletkezett HAp. Egy másik kutatómunkában Haddow és mtsai [220] a HAp réteg el állításához Ca-acetátot használtak Ca forrásként és emellett kipróbáltak több foszfor prekuzort, úgymint foszforsavat, foszfor-pentoxidot ( $P_2O_5$ ) és trietil-foszfítot. Eredményeik alapján elmondható, hogy a legjobb tulajdonságú réteget a trietil-foszfít prekuzor alkalmazásakor kapták és a kristályos apatit fázis kialakulásához legalább 600 °C kellett.

A szol-gél eljárásokban elterjedten használt szerves prekuzor anyagok nagyon drágák, így költségessé teszik magát a technológiai eljárást és az ipari méret el állításukat.

## 2.4. Ionokkal módosított szintetikus HAp

A tiszta szintetikus HAp módosítható különféle ionokkal, elemekkel, annak érdekében, hogy összetétele jobban tükrözze a természetes HAp-ban megtalálható ásványi anyagokat, nyomelemeket. Az adalékionok lehetnek kationok, úgymint  $Ag^+$  [15, 16, 101, 221-227],  $Zn^{2+}$  [115, 129, 133-136, 229-233],  $Sr^{2+}$  [132, 234-237],  $Mg^{2+}$  [238, 239],  $Si^{4+}$  [240-243],  $Cu^{2+}$  [244-246],  $Fe^{2+}$  [20] és ezek tetsz leges kombinációi, valamint anionok, úgymint  $F^-$  [253, 257],  $Cl^-$  [256] és karbonát [251-252, 254, 255] ionok és különféle kombinációjuk [250, 256].

### 2.4.1. Módosítás kationokkal

Az egyik legelterjedtebben alkalmazott és legszéleskör bben tanulmányozott adalékion az ezüst ( $Ag^+$ ), antibakteriális tulajdonsága miatt. Az ezüst ionos formájában fejt ki széles spektrumú antibiotikus hatását, azáltal, hogy er sen köt dik az elektron donor csoportokhoz, (-SH) a biológiai molekulákban és megakadályozza a baktériumok metabolizmusát, reprodukcióját [227]. Egyik el nye, hogy a baktériumok nem válnak rezisztenssé vele szemben, ellentétben az általánosan alkalmazott antibiotikumokkal. Kose és mtsai [222] bebizonyították, hogy az  $Ag^+$  tartalmú CaP porral bevont implantátum csökkentette a fert z dést a referenciaként használt új-zélandi fehér nyulaknál. Erakovic és mtsai [224] impulzusos lézerrel készítettek ezüsttel adalékolt HAp vékonyréteget és tesztelték a biokompatibilitását és citotoxicitását HEp-2 sejtkultúrán. A tesztek igazolták, hogy a bevonat nem befolyásolta károsan a sejtek tapadását, életképességét és osztódásukat valamint a sejtek normális morfológiában növekedtek. Egy másik kutatócsoport [228] elektrokémiai úton el állított nanoszerkezet Ag részecskéket tartalmazó HAp bevonatot vizsgált. A mintákon elvégzett antibakteriális és biokompatibilitási tesztek pozitív eredményt mutattak, emellett

kimutatták, hogy a megfelelő ezüst koncentráció beállítása a rétegben kifejezetten fontos, mivel az ezüsttartalom növelésével csökkent a biokompatibilitás.

Másik gyakran használt adalékoló elem a cink (Zn). Köztudott, hogy a cink egy esszenciális nyomelem a csontrendszerben és nélkülözhetetlen a csont normál növekedéséhez és fejlődéséhez, a hiánya pedig a csontsűrűség csökkenéséhez vezet [229]. A Zn gátolja az oszteoklaszt sejtek kifejlődését, elősegíti az oszteoblaszt sejtek aktivitását, ezáltal elősegíti a csontkialakulást, csontosodást [230]. Néhány kutatómunka alapján a cinktartalmú kalcium-foszfát rétegek, úgymint a Zn-TCP gátolták a csontszövetek oszteoklaszt sejtek általi feloldódását. A cink már egészen kicsi, 0,5 és 1 mol%-nyi koncentrációban is gátolta az oszteoklaszt sejtek káros hatását [231, 232]. Emellett a cink még a sebgyógyulás folyamatában is jelentős szerepet játszik. Ortiz és mtsai [233] tanulmányozták a titán implantátumokra felvitt Zn-apatit bevonatok *in vitro* tulajdonságait. Munkájukban HAp és ZnHAp nanoszemcséket tartalmazó szuszpenziót állítottak elő hidrotermális módszerrel, majd ezt vitték fel az előzetesen felületkezelt titán alapfém felületére. Kimutatták, hogy mind a cinkkel adalékolt, mind a tiszta apatit esetében a Ca/P elemarány 1,61 volt. Ezt azzal magyarázták, hogy a hozzáadott cink ionok teljesen beépültek a CaP kristályszerkezetébe, helyettesítve a kalciumionokat. Esetükben a cink koncentrációja a rétegben 7 at% volt. Azt is felismerték, hogy a cink beépülése megváltoztatta a kristályszerkezetet, csökkentette a kristályok méretét, valamint csökkent a leválasztás sebessége is, mivel gátolta a HAp kristályok növekedését. A biokompatibilitási teszteket humán oszteoblaszt sejteknek (HOB) a minták felületére történő felvitelével végezték. Megfigyelték, hogy a ZnHAp bevonaton a sejtek sűrűbben nőtték, szétterjedtebbek és hosszúkás formájú morfológiát mutattak. A mennyiségi analízis alapján a sejtszám is jelentősen nagyobb volt, mint a tiszta HAp bevonat esetében. Ez azt bizonyította, hogy a cinktartalom kedvez az oszteoblaszt sejtek osztódásának és életképességének.

Fontos esszenciális nyomelem a szervezetben és a csontokban a stroncium (Sr) is. Fő szerepe a cinkhez hasonlóan a csontszövet degradálódásnak megakadályozása azáltal, hogy az oszteoklaszt sejtek kifejlődését gátolja, illetve aktivitásukat csökkenti. Emellett az oszteoblaszt sejtek életképességének és osztódási hajlamának növelésével elősegíti a csontsejtek kialakulását. Szintén sok kutatómunka foglalkozik stroncium tartalmú kalcium-foszfát bevonatok előállításával és jellemzésével. A hosszú távú stroncium kezelést tanulmányozó klinikai kísérletek pozitív eredményt mutattak [234].

Kutatások bizonyították, hogy a Sr sikeresen bevihető a CaP kristályszerkezetbe különböző technológiák alkalmazásával és a bevonat Sr tartalma természetesen hangolható a technológiai

paraméterek változtatásával. A Sr tartalom minden esetben javította a minták biokompatibilitását [132, 235, 236] valamint az implantátum beépülését, rögzülését oszteoporózis csontok esetében [237].

A magnézium (Mg) is fontos nyomelem a csontokban. Aktív szerepe van a sejtek működésében biológiai, kémiai és molekuláris szinten is. Kulcsszerepe van a csontsejtek metabolismusában, mivel befolyásolja mind az oszteoblaszt, mind az oszteoklaszt sejtek működését, emellett hatással van a csontnövekedésre [238].

A Mg bevitele a CaP rétegbe 0,5 - 2 at% közötti koncentrációtartományban nem okozott semmilyen káros mellékhatást [239]. A minták bioaktivitása függött a bevitt Mg mennyiségétől. A Mg tartalom növelése kedvezett az amorf CaP fázis kialakulásának [239].

A CaP rétegeket lehet még szilíciummal (Si) is módosítani, ami szintén esszenciális nyomelem és fontos szerepe van a csontkialakulásban. Egyes tanulmányok szerint a szilíciumként a fiatal csont aktív helyein lokalizálva található és fontos szerepe van a csontosodás kezdeti stádiumában [240, 241]. A metabolikusan aktív oszteoblaszt sejtekben viszonylag magas a Si koncentrációja és aktív szerepe van az extracelluláris mátrix kialakulásában a csontokban és a porcokban [242].

Qiu és mtsai [243] elektrokémiai úton állítottak elő Si-adalékolt CaP bevonatot AZ31 magnézium ötvözet alapfémre. Kétrétegű bevonatot készítettek, melyben a belső réteg porózus, lemezes szerkezetű, míg a külső réteg tömör, tömbszerű apatit. A bevonat kiváló biokompatibilitással rendelkezett az elvégzett tesztek alapján.

A tudományos irodalomban találhatók olyan tanulmányok, melyekben nem ezüst az antibakteriális komponens, hanem réz (Cu) [244]. Ez a komponens hatékonynak bizonyult bizonyos fókig *Escherichia coli* ellen. Azon kívül, hogy mutat némi antibakteriális hatást, egyéb szerepe is van a szervezetben, mint esszenciális nyomelemnek. Kutatások bizonyítják, hogy jelentős szerepet tölt be az oszteogenezisben és az angiogenezis folyamataiban is. A legnagyobb mennyiségben a májszövetekben fordul elő, és stimulálja az endothel sejteket a véredényképzésben [245]. Ezen kívül a réznek még szerepe van számos enzim működésében is [246].

Megfelel leválasztási technológia alkalmazásával egyszerre több adalékoló elem is bevihető a kalcium-foszfát rétegekbe, ezáltal lehet segíteni az egyes elemek elnyelési tulajdonságainak ötvözését és az implantátum biokompatibilitásának további növelését. A biológiai apatitokban megtalálható többféle nyomelem változó arányban, így a szintetikus apatitok megfelelő adalékolásával, illetve a megfelelő elemarány és elemösszetétel kiválasztásával a természetes apatithoz hasonló összetétel érhető el.



Az ezüst és cink együttes bevitele a CaP rétegbe könnyen megvalósítható többféle módszerrel. A vizes kémiai kicsapással el állított AgZnHAp por (2,5-5 m/m% Zn tartalommal és 0,3 m/m% Ag tartalommal) antibakteriálisnak bizonyult *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli* baktériumtörzsekkel szemben. Az SBF oldatban történő 28 napos áztatás során új apatit réteg kialakulását mutatták ki. A mintákon elvégzett biokompatibilitási tesztek igazolták, hogy a sejtek életképesek maradtak és jól tapadtak a felületre [247]. Történtek kísérletek ezüst- és cinktartalmú CaP bevonatok elektrokémiai leválasztására fémes implantátum felületére [248, 249], valamint a kalcium-foszfát rétegek kettőnél több ionnal történő adalékolására is [245, 250, 251].

#### **2.4.2. Módosítás anionokkal**

A hidroxiapatit anionokkal történő módosításának kutatása szintén kiterjedt és átfogó. A kristályban levő  $\text{OH}^-$  ionok több helyettesítési lehetnek:  $\text{F}^-$ ;  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ . Az anionos módosítás fő célja az anyag illetve a réteg oldhatóságának módosítása, hangolása [252]. Mivel a természetes apatitokban is található karbonát helyettesítés bizonyos százalékban, így a szerkezetük és biológiai tulajdonságaik még hasonlóbba tehetők [253]. A karbonát anion azonban gátolja a HAp kristály növekedését, beépülése csökkenti a kristályossági fokát, ezáltal megnöveli az oldhatóságát [254]. A fluoridos hidroxiapatit (F-HAp) megnövekedett stabilitást mutatott és javult az anyag kristályossági foka is. A részlegesen helyettesített F-HAp-nak kisebb az oldhatósága a tiszta HAp-énál és a fluorapatiténál is [255]. Az anionokkal módosított CaP bevonatok el állíthatóak vizes kémiai eljárásokkal [252-258] és elektrokémiai leválasztással [259]. Alkalmazásuk főként a szöveti sebészetben elterjedt.

### **3. CÉLKIT ZÉS**

A kutatómunkám célja (i) biokompatibilis és egyben antibakteriális biokerámia bevonatok kialakítása fémimplantátum alapra, (ii) egy újfajta el állítási technológia kifejlesztése és optimalizálása.

Az ortopédiai sebészetben napjainkban is világszerte nagyon súlyos probléma a beültetett implantátumok elfert z dése [260-264], amire egy megfelel en kifejlesztett bevonat kialakítása az implantátumok felületére megoldást jelentene.

Kutatómunkám során célul t ztem ki

- a HAp bevonatok el állítására egy olyan egyszer , olcsó és környezetbarát elektrokémiai leválasztáson alapuló technológia kidolgozását, amely az iparban könnyen alkalmazható.
- a leválasztási paraméterek optimalizálását, a rétegek szerkezetének, ezáltal a kémiai és biológiai tulajdonságainak javítása érdekében.
- nemfolytonos, porózus bevonat kialakítását az alapfémen, ami megnöveli a felület érdességét.
- biológiailag lebomló, bioaktív hidroxipatit és ionokkal adalékolt hidroxipatit rétegek kifejlesztését.

## 4. KÍSÉRLETI RÉSZ

### 4.1. A kísérleti munka során felhasznált vegyszerek és anyagok

#### Tiszta és ionokkal módosított HAp rétegek előállításához

Vegyszerek	Forgalmazó
Kalcium-nitrát 4-hidrát ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft
Ammónium-dihidrogén-foszfát ( $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ )	VWR International kft
Hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ (30%))	VWR International kft
Magnézium-nitrát 6-hidrát ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft
Sztrontium-nitrát 4-hidrát ( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft
Cink-nitrát 6-hidrát ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft
Ezüst-nitrát ( $\text{AgNO}_3$ )	VWR International kft
Nátrium-hidroxid ( $\text{NaOH}$ )	VWR International kft
Desztillált víz	-

#### Elektrokémiai leválasztáshoz

Anyagok	Forgalmazó
Ti4Al6V	Protetim kft
platina drót	Labor-Platina kft
elektrokémiai cellák	ELTE üvegtechnika

#### Korróziós vizsgálatoknál az SBF oldathoz [265]

Vegyszerek	Forgalmazó
Nátrium-klorid ( $\text{NaCl}$ )	VWR International kft
Nátrium-hidrogén-karbonát ( $\text{NaHCO}_3$ )	VWR International kft
Kálium-klorid ( $\text{KCl}$ )	VWR International kft
Dikálium-hidrogén-foszfát ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft

Magnézium-klorid 6-hidrát ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	VWR International kft
Sósav, 1 M HCl	VWR International kft
Kalcium-klorid ( $\text{CaCl}_2$ )	VWR International kft
Nátrium-szulfát ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	VWR International kft
TRIS ( $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ )	Sigma-Aldrich

### Biokompatibilitási tesztekhez

#### Vegyszerek/oldatok

#### Forgalmazó

DMEM (sejttenyésztő tápoldat)	Sigma-Aldrich
WST-1 ( $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2 \cdot \text{Na}$ )	Sigma-Aldrich
WST-8 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_2 \cdot \text{Na}$ )	Sigma-Aldrich
Tripszin	Thermo Fisher Scientific
PBS (foszfát puffer)	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil-foszfát	VWR International Kft
TRIS ( $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ )	Sigma-Aldrich
Triton X-100 reagens	Sigma-Aldrich
Magnézium-klorid 6-hidrát ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich
Cink-klorid ( $\text{ZnCl}_2$ )	Sigma-Aldrich
Lízis puffer	Sigma-Aldrich
Sósav (1M HCl)	Sigma-Aldrich
Calcein AM festék ( $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{23}$ )	Sigma-Aldrich
DAPI festék ( $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5 \cdot 2\text{HCl}$ )	Sigma-Aldrich

#### Sejtek / Kereskedelmi biokompatibilitási tesztkészletek

#### Forgalmazó

MG-63 oszteoblaszt sejtek	Sigma-Aldrich
ALP készlet	Abcam

LDH készlet	Sigma-Aldrich
TOX7 készlet	Sigma-Aldrich
LIVE/DEAD® Életképesség/Citotoxicitás tesztkészlet	Thermo Fisher Scientific
OsteoImage™ tesztkészlet	Lonza

#### 4.2. Fémimplantátumok bevonatolása HAp és ionokkal módosított HAp (adHAp) rétegekkel

A rétegek elektrokémiai el állításához impulzus áramú generátort (IGTV-4i/6t) használtam. A leválasztás standard, kételektrodos cellában történt, ahol az implantátum anyagot kapcsoltam katódként, míg anódként platina drótot használtam (2.3. ábra). Az alapfém 90 m/m% titánt, 4 m/m% vanádiumot, 6 m/m% alumíniumot, valamint nyomokban vasat és oxigént ( $\text{Fe} < 0,25 \text{ m/m\%}$ ,  $\text{O} < 0,20 \text{ m/m\%}$ ) tartalmazott, érdessége  $20 \pm 5 \mu\text{m}$ .

A CaP rétegek kialakításához az alapelektrolit  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_3$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  komponenseket tartalmazott. Az oldat pH-ját 4,5-ös értéken tartottam és az elektrolízist  $70^\circ\text{C}$ -on végeztem.

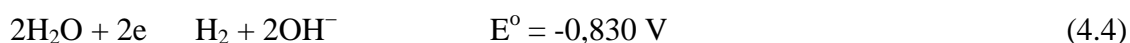
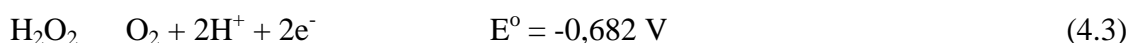
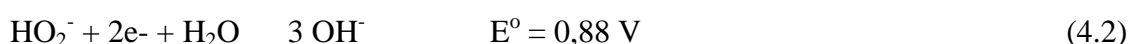
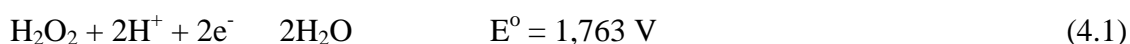
Az ionadalékolt minták esetében három f el állítási módszert alkalmaztam:

1. módszer: A rétegek leválasztása csak elektrokémiai úton történt. Ebben az esetben az alapelektrolithoz  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  illetve  $\text{AgNO}_3$  komponenseket is adtam többféle koncentrációarányban.
2. módszer: Az alapelektrolithoz  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  és  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  komponenseket adtam különböző arányban, majd a leválasztás után felület-utókezelés következett a minták oldatban történ hosszú idej (24 órás) áztatásával. Ebben az esetben az oldat  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  illetve  $\text{AgNO}_3$  komponenseket tartalmazott.
3. módszer: El ször a tiszta hidroxiapatit réteget alakítottam ki az implantátum felületén impulzusos áram segítségével, majd ezután felület-utókezelés a minták oldatban történ hosszú idej áztatásával. Az oldat  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  és  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  komponenseket tartalmazott.

A leválasztások után a mintákat minden esetben 1 M NaOH oldatban áztattam  $70^\circ\text{C}$ -on 2 órán keresztül a fázisátalakulások biztosításának érdekében.

Az elektrokémiai folyamatok során az elektrolitban lev pozitívan töltött kationok ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) a negatív töltés katód felé vándorolnak. Az alkalmazott nagy árams r ség ( $\sim 40$

- 450 mA/cm<sup>2</sup>) miatt azonban a f<sup>-</sup> elektródfolyamat a víz redukciója, ami nagy mennyiség hidroxidiont generál. Ennek hatására az elektród közvetlen környezetében a pH jelentősen megnövekszik, ami elősegíti a különféle nagyon kis oldhatóságú kalcium-, magnézium- és stroncium-foszfátok lecsapódását a katód felületére. Az elektrolithoz adott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalékanyag szerepe a hidrogénfejlődés csökkentése. A hidrogén-peroxid egy erősen oxidatív reagens és a standard redukciós potenciálja pozitívabb, mint a víz redukciós potenciálja, ezért a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redukciója előbb következik be a víz redukciójánál. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redukció vizet, vagy újabb hidroxidionokat eredményez, ami még tovább növeli a pH értéket.



Az irodalmi adatok szerint [120, 268, 269] az elektrokémiai úton történő rétegleválasztáskor az első legesen kialakuló CaP fázis a monetit (CaHPO<sub>4</sub>). Emiatt közvetlenül a leválasztás után fázisátalakítási lépés szükséges, aminek az egyik legelterjedtebb módszere az alkalikus (1M NaOH) közegben, magasabb hőmérsékleten (70 °C-on) történő hosszú idejű áztatás. Ez a felületi utókezelés megfelelő körülményeket biztosít a monetit fázis hidroxiapatit fázissá történő alakulásához. Ennek oka, hogy 11 feletti pH értéken a HAp a legkevésbé oldható a többi CaP fázishoz képest (úgy mint monokalcium-foszfát (Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, dikalcium-foszfát (CaHPO<sub>4</sub>), oktakalcium-foszfát (Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O) és az -, -trikalcium-foszfát (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>).

Munkám első részében előkísérleteket végeztem annak felmérésére, hogy az előállítás paraméterek milyen tartományaiban várható a 3. Céltűzés fejezetben leírtaknak megfelelő rétegek képződése.

Az optimalizálási folyamat során a következő kísérleti paramétereket változtattam: az alapelektrolit összetétele, az adalékionok koncentrációja az elektrolitban, az impulzusos áram kitöltési tényezője, áramsűrűség, rétegnövesztési idő. Az előkísérletek során növesztett rétegek szerkezetét SEM, XRD, FT-IR módszerekkel vizsgáltam, korróziós tulajdonságaikat potenciodynamikus görbék illetve EIS spektrumok felvételével, a biokompatibilitásukat pedig különféle sejtleletképeségi vizsgálatokkal teszteltem.

Tapasztalataim alapján a kialakított rétegek fizikai jellemzőit, morfológiáját, homogenitását nagyban befolyásolta az alapelektrolitban lévő komponensek ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) koncentrációja. A kalcium-nitrát koncentrációt 11,56 - 115,6 g/L, míg az ammónium-dihidrogén-foszfát koncentrációját 3,33 - 33,30 g/L között változtattam úgy, hogy a Ca/P elemarány mindig 1,67 legyen. A kísérletek kimutatták, hogy kisebb koncentrációknál a leválasztott rétegek egyenetlenek voltak, tapadásuk rendkívül gyenge, porszerűek, könnyen leperegtek a felületről. Nagyobb koncentrációtartományban azonban a rétegek egyenletesen növekedtek, tapadásuk és a reprodukálhatóságuk jelentősen javult.

Az adalékoló ionok koncentrációja illetve koncentrációarányuk szintén hatással voltak a réteget felépítő részecskék morfológiájára. Az  $\text{AgNO}_3$  koncentrációját 0,042 - 1,69 g/L között változtattam. Nagy koncentrációban (0,01 - 0,005 M) alkalmazva jelentősen rontotta a rétegek biokompatibilis jellegét. Az optimális ezüstkoncentráció 0,042 g/L volt.

A megfelelő Zn-koncentráció meghatározásához a fentebb említett koncentrációtartományban (1,48 - 5,94 g/L) változtattam a  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  mennyiségét az elektrolitban és a felület-utókezelő oldatban. Nagyon kis koncentrációban (0,005 M), a cink kimutatási határ alatti volt a rétegekben, míg túl nagy koncentrációban (0,02 M) károsan hatott a sejtek életképességére. A magnézium- és a stronciumionok ideális koncentrációjának a 0,01 M értéket találtam, mivel ebben az esetben mérhető arányban (0,5 - 3 at%) beépültek a rétegekbe (5.1. táblázat).

A következő paraméter, ami szintén hatással volt a rétegek tulajdonságaira, az impulzusos árammal történő leválasztásnál az áram kitöltési tényezője ( $t_{be}/t_{be} + t_{ki}$ ), amit 0,09 - 0,5 közötti tartományban változtattam, valamint az áramsűrűség, amit 40 - 450  $\text{mA}/\text{cm}^2$  határok között állítottam be. A kisebb kitöltési tényező alkalmazása jelentősen csökkentette a szemcseméretet, valamint növelte a Ca/P elemarányt és a réteg porozitását. A nagyobb áramsűrűség értéke szintén a kisebb szemcsék képződésének kedvezett. A rétegnövesztési időt 3 - 600 mp között változtattam. A leválasztási idő megfelelő mértékű csökkentésével elértem, hogy a réteg nemfolytonosan, göcsök formájában jelenjen az alapfém felületén. Az adHAp-II és adHAp-III rétegeknél alkalmazott felület-utókezelés megfelelő koncentrációjú  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ion tartalmú oldatban történő hosszú idejű áztatás lehetőséget adott, hogy az ionok nagyon kis oldhatóságú csapadékok formájában kiváljanak a rétegek pórusaiban.

A továbbiakban a kiválasztott öt legdemonstratívabb minta elállítási paramétereire és minősítésére térünk ki bővebben.

- HAp réteg el állítása

**4.1. táblázat:** HAp rétegek leválasztási paramétere

	HAp-I	HAp-II
Elektrolit	Koncentráció (g/L)	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	115,6	
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	33,30	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	11,2	
Leválasztási paraméterek		
t <sub>be</sub> / ms	5	1
t <sub>ki</sub> / ms	5	10
i <sub>t</sub> / A cm <sup>-2</sup>	0.4	5
Fürd h mérséklet / °C	70	70
pH	4,5	4,5
Leválasztási id / s.	600	3
rétegvastagság / μm	~ 25	nemfolytonos
Felület utókezelés leválasztás után	1M NaOH oldat, 70 °C, 2 óra	1M NaOH oldat, 70 °C, 2 óra

- Ionokkal adalékolt HAp (adHAp) réteg el állítása

**4.2. táblázat:** Ionokkal adalékolt (adHAp) rétegek leválasztási paramétere

	adHAp-I	adHAp-II	adHAp-III
Elektrolit	Koncentráció (g/L)		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	115,6	115,6	115,6
AgNO <sub>3</sub>	0,85	-	-
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,48	-	-
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	2,56	-
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	2,83	-
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	33,30	33,30	33,30
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	11,2	11,2	11,2
Leválasztási paraméterek			
t <sub>on</sub> / ms	5	1	1
t <sub>off</sub> / ms	5	10	10
i <sub>p</sub> / A cm <sup>-2</sup>	0,4	5	5
Fürd h mérséklet / °C	70	70	70
pH	4,5	4,5	4,5
Leválasztási idő / s.	30	3	3
rétegvastagság / μm	~ 25	nemfolytonos	nemfolytonos
Felület utókezelés leválasztás után	*	**	***

\* nincs felület utókezelés



\*\*2,97 g/L  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  és 0,042 g/L  $\text{AgNO}_3$  oldatban áztatás 24 órán keresztül, majd 40 g/L NaOH oldatban 70 °C-on kezelés 2 órán át, végül szárítás 150 °C-on 30 percig.

\*\*\*2,97 g/L  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2,56 g/L  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2,83 g/L  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  és 0,042 g/L  $\text{AgNO}_3$ -ot tartalmazó oldatban áztatás 24 órán keresztül, majd 40 g/L NaOH oldatos kezelés 70 °C-on, 2 órán át, végül szárítás 150 °C-on 30 percig.

### 4.3. Szerkezetvizsgálati módszerek

#### 4.3.1. Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) mérések

A pásztázó elektronmikroszkóp működésének lényege, hogy egy fókuszált elektronnyalábbal pásztázzuk végig a minta felszínét nagyvákuum alatt. A mintából kilépő és detektorral összegyűjtött elektronok révén képezzük le a felületet. Lehetőség van a minták 3D-s felületi térképezésére, és nincs szükség 5–30 keV-nál nagyobb gyorsító feszültségre.

A minták morfológiáját, szemcseméretét, struktúráját Hitachi SU8230 és LEO 1540XB típusú pásztázó elektronmikroszkóppal végeztük, 5 keV gyorsító feszültség mellett. Fókuszált ionsugár (FIB) segítségével meghatároztuk a minták keresztmetszeti szerkezetét és a rétegvastagságot oly módon, hogy a fókuszált ionsugárral néhány mikrométer mélységig árokat vágtunk ki a rétegekből egészen az alapfémig majd a mintát 54°-ban elfordítva az árok falát SEM-mel vizsgáltuk. A FIB megmunkáláshoz használt  $\text{Ga}^+$  ionsugarat 30 keV gyorsítófeszültségen és 5 nA gyorsító árammal hoztuk létre.

#### 4.3.2. Energiadisziperzív röntgenspektroszkópia (EDX)

Az EDX segítségével a minták kémiai, elemi összetételéről kapunk információt az elektrongerjesztéssel kiváltott karakterisztikus röntgensugárzás detektálása és kvantitatív kiértékelése révén. Az elektron-anyag kölcsönhatás során a vizsgált anyagra jellemző röntgensugárzás jön létre. Az EDX spektrum a detektorral felfogott fotonok számát mutatja azok energiájának függvényében. EDX-szel az elemek párhuzamos detektálása lehetséges, relatív pontossága 3 %, laterális és mélységi felbontása 0,5  $\mu\text{m}$ .

Kísérleteim során a méréseket a fent említett LEO 1540XB típusú SEM készülékbe szerelt Röntec UHV-Si (Li) detektorral végeztük 8 és 16 keV-os gyorsítófeszültség alkalmazásával és Bruker Esprit 1.9 software-t használtunk az adatok kiértékeléséhez.

#### 4.3.3. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A transzmissziós elektronmikroszkópia lehetőséget ad az anyagok szerkezetének nanométernél kisebb felbontáson történő vizsgálatára, így alkalmazható a kristályos anyagok pontos strukturális és kémiai jellemzésében. A TEM mérések során elektron-sugárnyalábot

használunk a megfigyelendő tárgy nagyítására. Mágneses térrel kialakított lencsékkel történik az elektronok fókuszálása. A mágneses tér hatására az elektronok spirál pályán mozognak. Az elektronok terjedéséhez légüres térre van szükség, így az elektronmikroszkóp belsejében nagyvákuumot kell létesíteni. Az el állított bevonat morfológiáját és méretét FEI TECNAI TF2, 200 kV-os gyorsítófeszültséggel üzemel transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A mérésekhez a mintákról a rétegeket lekapartuk és az így kapott porok nagy hígítású etanolos szuszpenziójából pár cseppet 3 mm átmérőjű, szénfilmmel bevont rézrácsra (grid-re) cseppentettünk, majd az adott mintára jellemző területekről felvételeket készítettünk.

#### 4.3.4. Röntgendiffraktometria (XRD)

A módszer alapja a röntgensugár és a kristályrács kölcsönhatása. Amikor a röntgensugarak kristályos anyagon haladnak diffrakció lép fel, vagyis a szórt sugarak interferencia miatt csak bizonyos irányokban erősítik egymást. Az így keletkező szórás kép egyértelmű információt szolgáltat a kristály szerkezetéről és anyagi minőségéről. A röntgendiffraktometriás mérés során tehát röntgenfotonokkal sugározzuk be a mintát és a röntgensugaraknak a különböző kristályokon történő diffrakciójából következtethetünk az anyag rácsszerkezetére, valamint a jellemző rácsállandókra. Ezekhez a vizsgálatokhoz csak a rövid hullámhossztartományba eső sugárzás alkalmas, amely hullámhossza a 100 pm-es ( $0,1 \text{ nm} = 1 \text{ Å}$ ) tartományba esik ugyanúgy, mint a legtöbb kristályos anyag rácsállandója. Ezek a nagyenergiájú röntgensugarak képesek mélyen behatolni az anyagba, így nemcsak a felület közeli 1 – 2 nm-es rétegre, hanem a tömbfázisra is jellemző információt hordoz néhány 10  $\mu\text{m}$  mélységig. A diffraktogramokon a röntgensugarak intenzitását ábrázoljuk az ún.  $2\theta$  szög függvényében, ahol a kristálysíkok és a beeső sugár által bezárt szög.

A különböző szintézisek során el állított biokerámia bevonatok anyagi minőségét röntgendiffrakciós módszerrel azonosítottuk. Méréseinket  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0,154 \text{ nm}$ ) sugárforrással felszerelt Rigaku Miniflex II készülékkel végeztük  $2\theta = 10\text{--}60^\circ$ -os szögtartományban. A mintákat porformában mértük, a kapott diffraktogramokat felhasználva a minták azonosítását JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) adatbázis és irodalmi adatok alapján végeztük el.

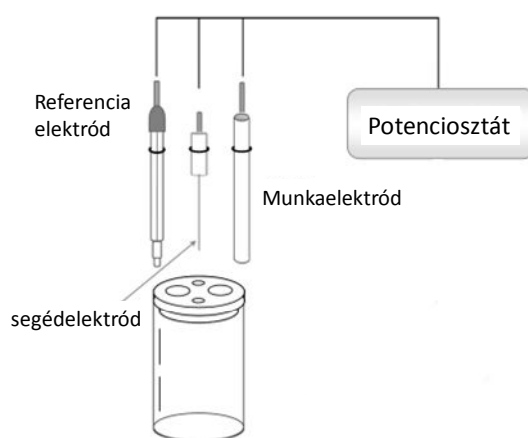
#### 4.3.5. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)

Az FT-IR mérések során infravörös hullámhossztartományba eső fénnel sugározzuk be a mintát, amely a molekulák különböző kvantált rezgéseivel kölcsönhatásba lép és bizonyos karakterisztikus hullámhosszokon elnyelődik. Az elnyelés hullámhossza jellemző az anyagban található kémiai kötésekre, így információt nyerhetünk a mintát felépítő elemekről, a közöttük

fennálló kötésekről, illetve kristályos anyagok esetén a kristályszerkezetben bekövetkező átrendeződésekről. Méréseinket transzmissziós módban, Bruker Vertex 70 spektrofotométerrel végeztük  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  hullámhossz tartományban,  $2\text{ cm}^{-1}$ -es spektrális felbontás mellett.

#### 4.4. Korróziós tulajdonságok vizsgálata

Az előállított biokerámia bevonatok korróziós tulajdonságait komplex elektrokémiai mérésekkel teszteltem Zahner IM6e potenciosztát/galvanosztát készülékkel. A mérések során hagyományos, három elektródos cellaösszeállítást használtam, melyben munkaelektrodként az implantátum alapfémét, segédelektrodként nagy felületű Pt hálót, míg referenciaelektrodként  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{tel}}$  elektródot kapcsoltam (4.1. ábra).



4.1. ábra: A háromelektrods cella sematikus összeállítása.

A minták korróziós tulajdonságainak időbeli változása potenciodynamikus görbék felvételével és EIS mérésekkel követhető nyomon a legpontosabban.

A potenciodynamikus méréseknél a görbék anódos és katódos ágának felvételekor a polarizációs sebesség  $1\text{ mV/s}$  volt minden esetben, a kapott görbéket pedig  $\log |j| - E$  vs.  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{tel}}$  formában ábrázoltam. A méréseket többször megismételtem különböző áztatási idő után, hogy a bevonatok lebomlását nyomon lehessen követni.

Az EIS méréseket  $100\text{ kHz}$  és  $10\text{ mHz}$  közötti frekvenciatartományban vettem fel nyitott áramköri potenciálra és a rendszerre  $10\text{ mV}$  amplitúdójú szinuszos AC perturbációt adtam. A mért impedancia adatokat Nyquist és Bode diagramok formájában ábrázoltam. A Nyquist diagramban az impedancia valós részét ábrázoljuk a képzetes rész abszolút értékének függvényében, míg Bode diagram esetében a teljes impedancia modulust  $|Z|$  és a fázisszöveget ( $\phi$ ) ábrázoljuk a frekvencia logaritmusának függvényében.

Az impedancia diagramokban az adott frekvencián, a rendszerre adott AC perturbancia hatására keletkező komplex impedancia válaszjeleket ábrázoljuk, az X tengelyen az impedancia valós részét ( $\text{Re}Z$ ), míg az y tengelyen a képzetes rész abszolútértékét ( $-\text{Im}Z$ ).

A Z impedancia kifejezhető a komplex feszültség és áram amplitúdójának arányával:

$$Z = (V_o/I_o)e^{i\Phi} \quad (4.5)$$

Valamint a következő alakban is:

$$Z = |Z| e^{i\Phi} \quad (4.6)$$

ahol az impedancia nagysága ( $|Z| = V_o/I_o$ ) az induktív ellenállás,  $\Phi$  pedig a fázisszög. A fázisszög megadja a áramjel ( $I_o \cos(\omega t - \Phi)$ ) fáziseltolódásának nagyságát a feszültségjelhez ( $E_o \cos(\omega t)$ ) képest.

Az impedancia valós része az 5.8-as egyenlettel írható fel.

$$\text{Re}(Z) = R_e + R_{ct} \left( 1 + \frac{\lambda}{\sqrt{2\omega}} \right) \quad (4.7)$$

Az impedancia képzetes része az 5.9-es egyenlettel fejezhető ki.

$$\text{Im}(Z) = \frac{R_{ct} \lambda}{\sqrt{2\omega}} \quad (4.8)$$

ahol  $R_e$  az elektrolit ellenállása,  $R_{ct}$  a töltésátlépési ellenállás, és  $\lambda = \frac{k}{\sqrt{D}}$ , melyben  $k$  a kémiai reakció sebessége és  $D$  a diffúziós állandó.

A totál impedancia nagysága felírható még az alábbi formában is:

$$Z = R_e + R_p / (1 + (j\omega\tau)^2) \quad (0 < \tau < 1) \quad (4.9)$$

ahol  $\tau$  a szögsebesség és  $\tau$  az idő állandó,  $R_e$  az oldatellenállás és  $R_p$  a polarizációs ellenállás.

Az adatok kiértékeléséhez Zview programot használtam, melynek segítségével és a megfelelő helyettesítő áramkör kiválasztásával megkapható a minták korróziós ellenállása és a rétegek kapacitása.

A korróziós méréseket 7,4-es pH-ra pufferolt mesterséges testfolyadékban (SBF), 37 °C-on végeztem, ami a biológiai környezet és az emberi szervezet tulajdonságait legjobban szimulálja. A mesterséges testfolyadék összetevői megfelelő módon visszaadják az emberi vérplazma összetételét, amint ezt a 4.3. táblázatban összefoglaltam.

**4.3. táblázat:** Vérplazma és különböző fejlesztés mesterséges testfolyadékok összetétele mM koncentrációban [266].

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	puffer
vérplazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	-
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0	TRIS
korrigált SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	TRIS
módosított SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	10,0	1,0	0,5	HEPES
ionozált SBF	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5	HEPES
Továbbfejlesztett SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5	TRIS

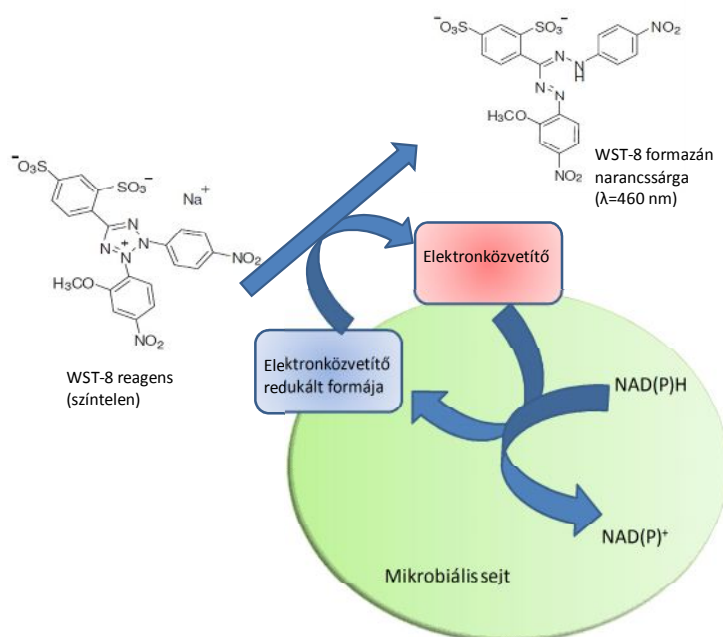
#### 4.5. Biokompatibilitási tesztek

A bevonatok orvosbiológiai hasznosíthatósága szempontjából kifejezetten fontos a biokompatibilitás, vagyis, hogy a szervezet ne lökje ki az implantátumot. Emellett fontos, hogy a csontsejtek életképességére, metabolizmusára se legyen káros hatással. A 4.2 alfejezetben leírt módszerrel el állított rétegek biokompatibilitását MG-63 oszteoblaszt sejtekkel szemben vizsgáltam.

A biotechnológiai mérések első lépése a sejtenyésztés, mely során az MG-63 sejteket 75 ml térfogatú sejtenyésztő edényekben növesztettük DMEM közegben (Dulbecco's Modified Eagles Medium) ami 10% FBS-t (ún. magzati szarvasmarhaszérum, növekedési faktorról és tápanyagokkal) valamint 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint is tartalmazott a fertőzések kockázatának csökkentése érdekében. A sejt kultúrát 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedves levegő inkubátorban (New Brunswick Galaxy 170S) tartottuk és három naponta cseréltük a sejtenyésztő folyadékot. A letapadt sejteket tripszinnel választottuk le az edény felületéről és a sejtek számlálása Neubauer kamrában történt.

##### 4.5.1. Sejtéletképességi vizsgálatok

A biokompatibilis jellegű jellemzői a sejtéletképességi értékek. Ezen mérések kivitelezésére általában kereskedelmi forgalomban kapható speciális reagensek, ún. WST-1 (4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzén-diszulfonát) illetve újabban a WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazólium nátriumsója) reagensek segítségével történik. A mérés elve szerint a WST-8 reagens a celluláris dihidrogenázok hatására redukálódik és a reakció során narancssárga színű formazán festék keletkezik, ami oldható a tápoldatban (4.2. ábra).



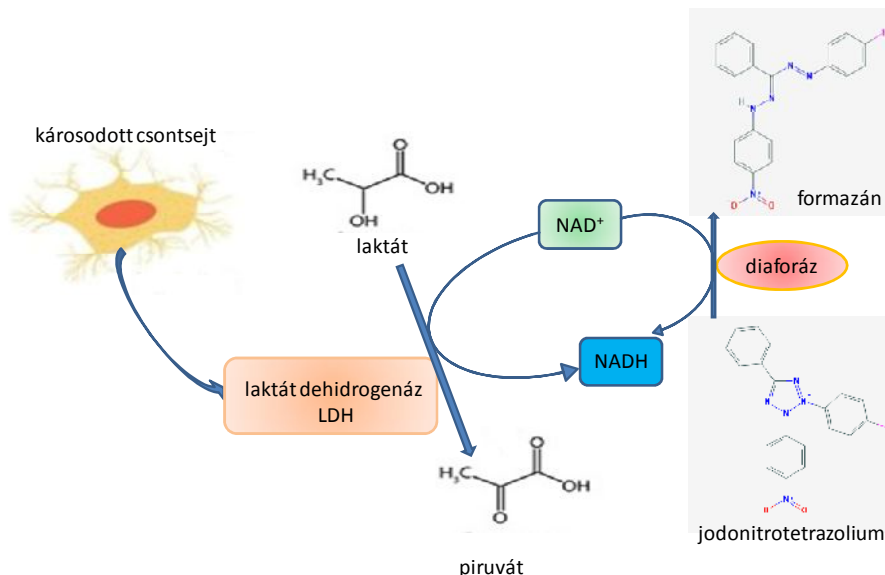
**4.2. ábra:** A sejtelétképességi tesztek működési mechanizmusa.

A mérések során a mintákat 24 lyukú mikrotiter lemezbe helyeztem majd 1 ml, 10000 sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót csepegtettem a minták felületére. Kontrollként ugyanannyi mennyiség sejtet használtam, de minta nélkül. Ezután 2, 6 és 14 nap sejtenyésztés után a sejtenyészt folyadékot kipipettáztam a mikrotiter lemezekből és a sejteket steril foszfátos pufferoldattal (PBS) mostam. Mosás után 1 ml, 1% WST-8 reagenst is tartalmazó DMEM folyadékot adtunk a sejtekre és 3,5 órán keresztül inkubáltam. Végezetül a képződött sárga formazán festéket spektrofotometriásan mértem ELISA plate reader (PHomo Autobio) segítségével. A formazán festék 450 nm hullámhosszon specifikus abszorpcióval rendelkezik és a mért abszorbancia egyenesen arányos az élő sejtek mennyiségével.

#### 4.5.2. Laktát dehidrogenáz (LDH) teszt

A mintákon megapadt sejtek mennyiségi meghatározása lehetséges LDH aktivitás teszt (TOX7) elvégzésével. A teszt az LDH enzim aktivitását méri a sejtlizátumban. Az LDH egy oxidoreduktáz enzim, amely katalizálja a laktát átalakulását piruváttá. A sejtek akkor eresztenek ki LDH enzimet, amikor a sejtmembránjuk megsérül, ezért a citotoxicitás mérésére is használható. A mérések során az MG-63 sejteket 24 lyukú mikrotiter lemezen tenyésztettem. A minták felületére 1 ml, 10000 sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót csepegtettem, majd 6 illetve 14 nap sejtnövesztés után a sejteket steril PBS-sel mostam, végül 1 ml lízis pufferrel kezeltem 30 percig. A lizátumokat centrifugáltam és a felülúszóból 100  $\mu$ l-t 1 ml-es küvétákba pipettáztam majd 100  $\mu$ l Master-mix oldatot (LDH alapoldat, LDH

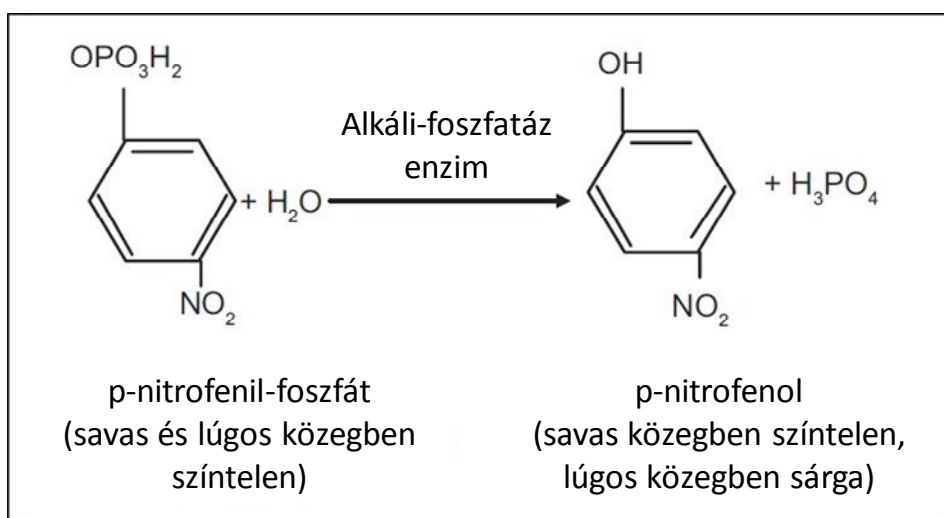
festékoldat, LDH kofaktor) adtam minden egyes küvétárhoz. A lemezeket 30 percig sötétben tartottam, hogy a reakció tökéletesen lejátsszódhasson, majd a reakciót 300 µl 1 M HCl oldattal megállítottam. Végül a keletkezett fotometriásan aktív festékanyag koncentrációját spektrofotométerrel mértem 490 nm hullámhosszon.



4.3. ábra: Az LDH detektálási teszt működése.

#### 4.5.3. Alkalikus foszfatáz (ALP) teszt

Az ALP enzim mennyisége szintén egy fontos indikátor a sejtek oszteoblaszt aktivitásának megítélésében (4.4. ábra). A méréseket kereskedelmi forgalomban kapható APL teszt készlettel végeztem, követve a megadott protokoll leírását. A készlet p-nitrofenil-foszfát (pNPP) reagenst tartalmaz, amely sárga szín festékké alakul, amint az ALP hatására defoszforizálódik. A sárga festékanyag specifikus abszorpcióval rendelkezik 405 nm hullámhosszon, ami spektrofotometriásan mérhető (Specord 40).



4.4. ábra: ALP mérések mechanizmusa.

Az MG-63 sejtek ALP aktivitását 6 és 14 nap inkubálási idő után mértem. A mérési folyamat szerint először a sejteket lízispufferrel kezeltem, amely 20 mM TRIS pufferoldatot, 0,1 tömeg% Triton X-100 reagenst, 1 mM  $MgCl_2$ -ot és 0,1 mM  $ZnCl_2$ -ot tartalmazott. A sejtlyázátumokat 1M Tris puffert, 2 mM  $MgCl_2$ -ot és 9 mM p-nitrofenil-foszfátot tartalmazó reagens oldattal inkubáltattam 120 percen keresztül, majd mértem az oldat abszorbanciáját 405 nm-en.

#### **4.5.4. Statisztika**

A biokompatibilitási tesztek eredményeit hat párhuzamos mérés átlagértékeként ábrázoltam, a szórásokkal együtt minden egyes minta és mérési módszer esetében. Az összes vizsgált minta mért paramétereinek közötti statisztikai különbséget ANOVA egyutas varianciánálízzal értékeltem ki. Az értékek statisztikailag szignifikáns különbségének szintjét a  $P < 0.05$  (Origin 8.6, Origin Lab Corporations, USA). értékekhatárral határoztam meg. A grafikonokon megadott statisztikai szignifikanciaszintek: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  és \*\*\* $P < 0,001$ . Az átlagértékek összehasonlításához a Tukey tesztet használtam.

### **4.6. Sejtfestési vizsgálatok**

#### **4.6.1. Calcein (acetoximetil-észter) festés**

Az élő sejtek megjelölésére speciális festékanyagok használhatóak. Az egyik ilyen elterjedten alkalmazott festék a acetoximetil-észter (Calcein), ami egy intenzív zöld szín fluoreszcens indikátor. A mérések kivitelezéséhez 1 ml, 10000 sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót csepegtettem a minták felületére majd két nap tenyésztés után a mintákon növekedett és megtapadt sejteket és a kontroll sejteket 3,7 térf.%-os paraformaldehid oldattal fixáltam 10 percig végül 0,1 térf.%-os Triton X-100 reagenssel kezeltem 10 percig szobahőmérsékleten. A sejtek eloszlását optikai fluoreszcens mikroszkóppal (FM, Scope. A1, Carl Zeiss) vizsgáltam.

#### **4.6.2. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festés**

A DAPI festés kivitelezésekor az előzőekben ismertetett protokoll szerint növesztett és fixált sejtek sejtmagját 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) intenzív kék szín fluoreszcens festékkel színeztem, 15 percig sötétben inkubáltam majd optikai fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettem kék filter használatával.



#### 4.6.3. LIVE/DEAD® (Calcein AM és EthD-1) sejtfestés

A mérések során kereskedelmi forgalomban kapható sejtfestési tesztet használtunk (LIVE/DEAD). A készletben lev festékoldat két fluoreszcens festékanyag keveréke, amelyek különböző módon jelzik az él és az elhalt sejteket. Az él sejtek azonosítására szolgáló festékanyag a sértetlen, életképes sejteket fluoreszcens zöld színre festi. A sejtmembrán átjárható a festék számára és csak akkor válik fluoreszcenssé, amikor a mindenütt jelen lev intracelluláris észterázok hatására az észtercsoport leválik a molekuláról. A festék gerjesztési hullámhossza 494 nm, az emissziós hullámhossz pedig 515 nm. A halott sejtek azonosítására szolgáló festékanyag a sérült sejtmembránú, elhalt sejteket festi fluoreszcens piros színre. A sejt DNS-éhez kötődik, ami a fluoreszcenciáját 30-szorosára növeli. Ez a festékanyag nem tud áthaladni a sejtmembránon. A festék gerjesztési hullámhossza 528 nm, az emissziós hullámhossz pedig 617 nm. A sejtfestést 3 nap sejtenyésztés után végeztük. A festés előtt a mintákra tapadt sejteket steril PBS-sel leöblítettem majd 2  $\mu$ M Calcein AM és 4  $\mu$ M EthD-1 reagenseket tartalmazó oldatban inkubáltam 45 percig sötétben, szobahőmérsékleten. Az életképes sejtek citoplazmája fluoreszcens zöld színre, míg a nem életképes sejtek sejtmagjai piros színre színeződtek. A sejteket optikai fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse Ti-U, Nikon) vizsgáltuk.

#### 4.7. OsteoImage™ Mineralizációs vizsgálatok

Az OsteoImage™ tesztkészlet (Lonza) az oszteogén sejtek, elsősorban oszteoblaszt sejtek valamint az oszteoblaszt jellegű sejtvonalak által elindított mineralizációs folyamatok *in vitro* mennyiségi meghatározására szolgál. Megfelelően jelzi a differenciálódó sejt kultúráknál a mineralizáció elhaladását az idővel. Az oszteoblaszt sejtek differenciálódásuk alatt szervesetlen HAp-ból és különféle szerves komponensekből (pl. kollagénből) álló lerakódásokat termelnek, amit mineralizációs folyamatnak nevezünk. A tesztkészletben található festékanyag specifikusan a hidroxipapatitot színezi meg erős fluoreszcens zöld színre. A kereskedelmi tesztkészlet 500  $\mu$ l OsteoImage™ festék komponenst, 50 ml hígítási pufferoldatot és 50 ml OsteoImage™ mosópuffert (10x) tartalmaz. A méréseket szigorúan a protokoll által leírtak alapján végeztem. A megfestett hidroxipapatit lerakásokat fluoreszcens optikai mikroszkóppal (FM, Scope. A1, Carl Zeiss) tanulmányoztam.

#### 4.8. Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES)

A rétegekben található elemek koncentrációarányát, valamint hosszú idejű SBF oldatba történő beáztatás után kioldódott elemeket ICP-OES módszerrel analitikai módszerrel vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy egy induktív csatolású plazma gerjesztett atomokat és

ionokat generál, melyek aztán az adott kémiai elemre jellemző hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást bocsátanak ki. Az emittált sugárzás intenzitása arányos a mintában előforduló elemek koncentrációjával. Az ICP-OES módszer kimutatási határa jellemzően a ppb tartományba esik, továbbá a periódusos rendszer legtöbb eleme érzékenyen mérhető vele. A módszer egy tengelyirányú plazmával és CCD detektor rendszerrel (175–775 nm) felszerelt egyidejű Spectro Genesis típusú berendezés. Az elemek azonosítására CPACHEM multi-element és CPACHEM mono-element standardokat (100 és 1000 mg/L) használtunk a következő hígításokban: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 és 100 mg/L.

#### 4.9. Antibakteriális tesztvizsgálatok

Vizsgált törzsek

*Escherichia coli* NCTC 11560 (Gram -)

*Pseudomonas aureus* NCTC 12493 (Gram +)

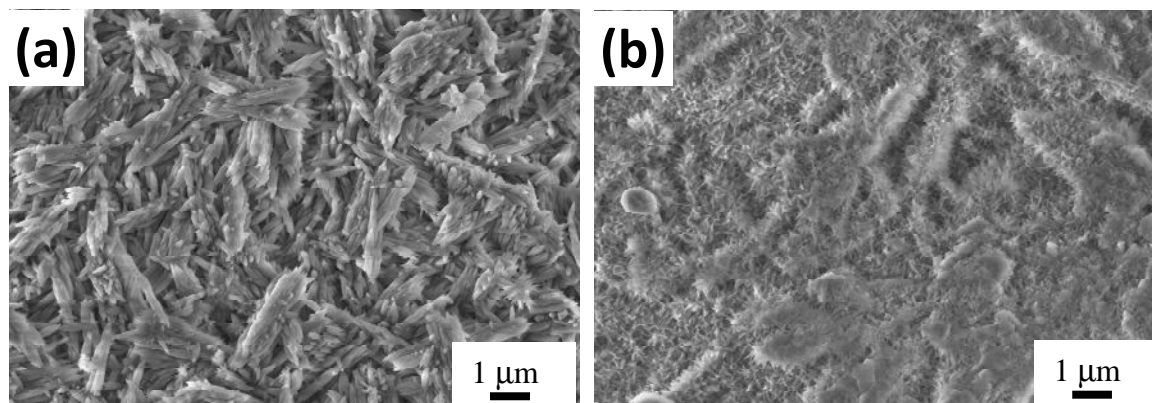
Agar-diffúziós módszert használtam a minták antibakteriális jellegének tanulmányozására.

Az ionokkal adalékolt HAp bevonatok antibakteriális hatását két baktériumtörzsön teszteltük, egy Gram negatív és egy Gram pozitív. A baktériumok tenyésztését a BSAC standard protokoll szerint végeztük. Az eljárás teljes és pontos leírása a [298] hivatkozásban található. A táptalajban a baktériumok koncentrációja 0,01 OD (optikai sűrűség) volt 500 nm-en. A baktérium törzseket 24 órán át, 28 °C-on, rázatás közben szaporítottuk 20 ml húslé tápoldatban (inokulum). A kísérleteket 30x30 cm-es steril üvegtálcában végeztük, melybe 100 ml 50 °C-os húslé agarhoz kevert 20 ml inokulumot öntünk. Az agar megszilárdulása után helyeztük a mintakorongokat a tápagar felületére, majd 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk majd mértük a kialakult gátlási zónák nagyságát.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. Elektrokémiai úton leválasztott HAp és adHAp biokerámia bevonatok morfológiai és szerkezeti jellemzése

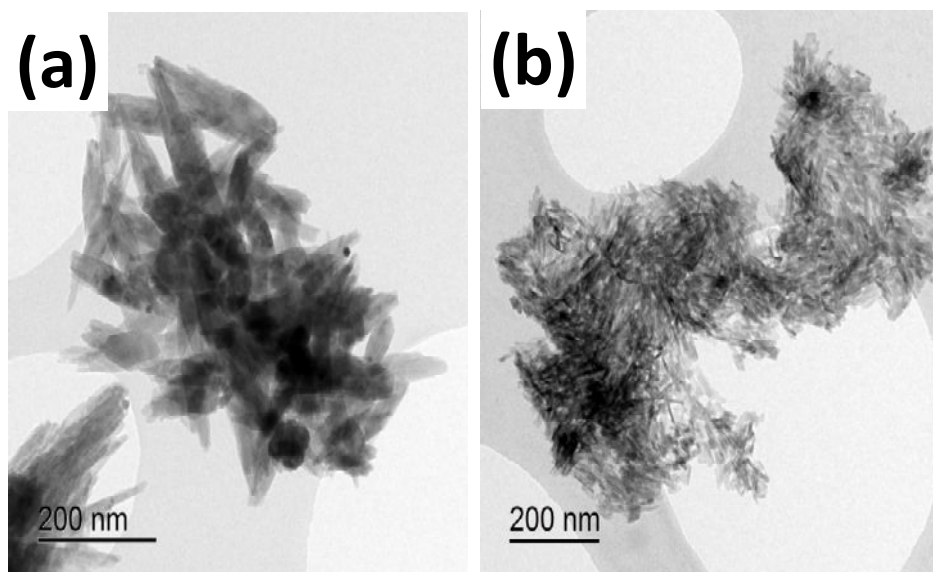
Az 5.1. ábrán két különböző paraméterrel leválasztott HAp réteg (HAp-I és HAp-II) szerkezete látható.



**5.1. ábra:** SEM felvételek két különböző módszerrel el állított HAp bevonatról (a) nagyfrekvenciás (HAp-I) és (b) kisfrekvenciás áramimpulzusokkal (HAp-II) történ leválasztás esetén.

A morfológiai vizsgálat bizonyította, hogy a tiszta HAp rétegek f ként t szer , hosszúkás kristályokból épülnek fel. Ez a szerkezet jellemz a HAp fázis kristályszerkezetére [267]. A nagyfrekvenciájú áramimpulzusokkal (500 Hz) leválasztott bevonatban néhány nagyobb, szabálytalanul összen tt részecske is megfigyelhet (5.1. a). A részecskék méreteloszlása nem egyenletes, tág határok között változik (100 nm – ~2 µm). A kisfrekvenciával (90 Hz) leválasztott rétegben már látható, hogy a t szer kristályok mérete kisebb, a méreteloszlásuk egyenletesebb és tüskeszer en növekednek (5.1. b).

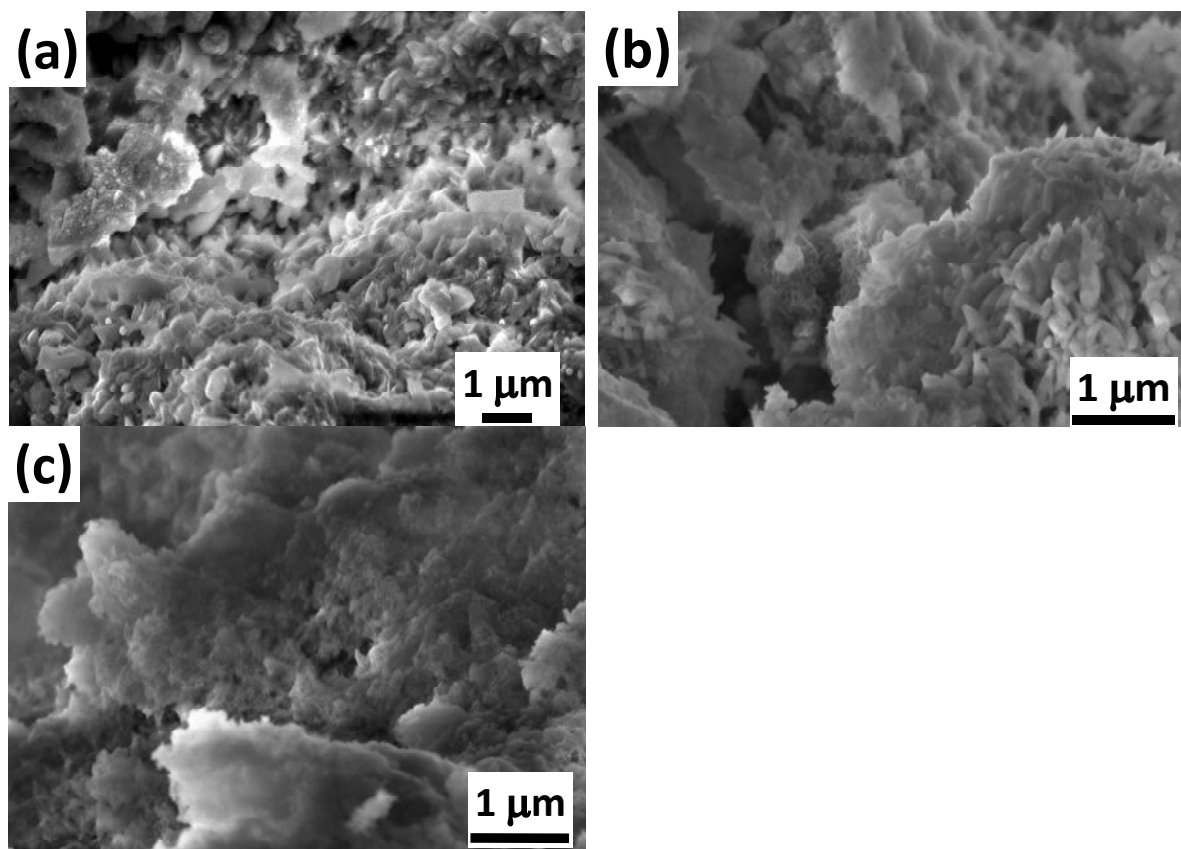
Az 5.2. ábrán bemutatott TEM felvételek még jobban demonstrálják a réteget alkotó egyes részecskék formáját és méreteit. A mérés el tt a rétegeket lekapartuk a felületr l és az így levált szemcséket vizsgáltuk.



**5.2. ábra:** TEM felvételek két különböző módszerrel leválasztott HAp bevonatról (a) nagyfrekvencián (HAp-I) és (b) kisfrekvencián (HAp-II) történő leválasztás esetén.

A HAp szerkezeti vizsgálatai igazolták, hogy a nagy áramfrekvenciával leválasztott HAp részecskék rúd alakúak, melyek hossza 200-250 nm között, vastagsága pedig 20-50 nm között változik. Ezzel szemben a kisfrekvencián leválasztott réteget felépítő részecskék már sokkal kisebbek és alakjuk inkább tiszta, 50-100 nm között változó hosszúságban és 5-20 nm vastagságban.

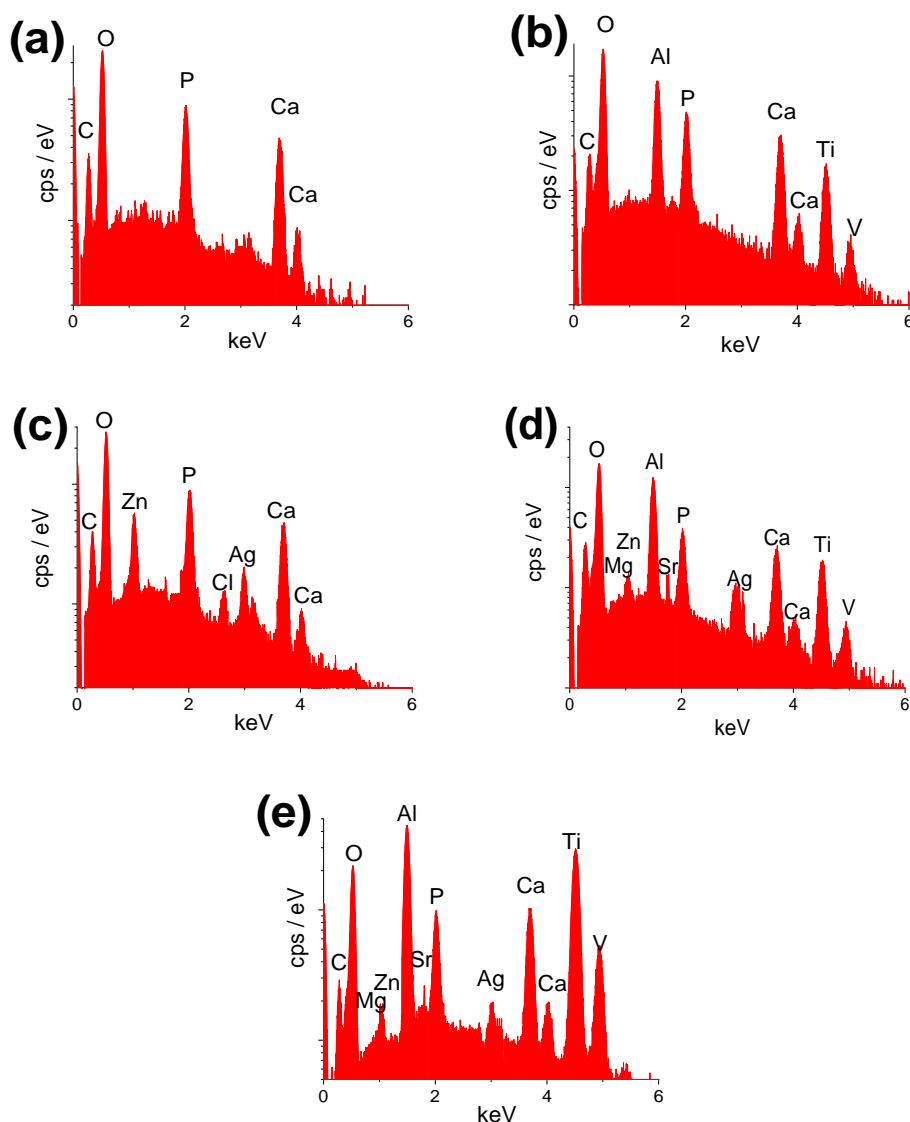
Az 5.3. ábrán a különböző módszerrel előállított, ionokkal adalékolt HAp rétegek morfológiája látható. A morfológiai vizsgálatokból kivehető, hogy a bevonatok struktúrája különbözik a tiszta HAp rétegekben megfigyeltétől, valamint az is, hogy az alkalmazott előállítási módszer szintén hatással van a réteget alkotó részecskék méretére és formájára valamint a bevonat szerkezetére. Az adHAp-I réteg nagy, mikrométeres, szabálytalan formájú részecskékből, agglomerátumokból épül fel, melyek mérete tájékoztató határok között változik (~300 nm - ~1 µm). Az adHAp-II bevonat szerkezete közelíti a tiszta HAp bevonat szerkezetét: ebben is megfigyelhetők a hosszúka, tiszta kristályok, azonban a réteg porózusabb és kevésbé egyenletes. Az adHAp-III réteg morfológiája, szerkezete hasonló az adHAp-II rétegéhez, azonban ebben az esetben néhány helyen agglomerátum is megjelenik a bevonatban.



**5.3. ábra:** SEM felvételek ionokkal adalékolt hidroxiapatiton (a) adHAp-I (Ag, Zn)·(b) adHAp-II (Ag, Zn, Sr, Mg)· és (c) adHAp-III (Ag, Zn, Sr, Mg).

## 5.2. Elemösszetétel meghatározása EDX analízissel

A bevonatokban jelenlevő elemek kvalitatív azonosítására megfelelő módszer az EDX analízis. Mivel azonban ez a módszer félkvantitatív eljárásnak tekinthető, az általa kapott elemarány csak hozzávetőleges, és a minta különböző helyein eltérő értékeket ad. Ez jelezheti az egyenetlen elemeloszlást, valamint hogy a HAp, mint fázis mellett egyéb CaP fázisok is megjelenhetnek kis mennyiségben. A spektrumokat a minták 3-5 különböző helyén vettük fel. Az 5.4. ábrán bemutatott spektrumok demonstratív jellegűek, főként a mintákban előforduló egyes elemek jelenlétét igazolják.



**5.4. ábra:** EDX elemösszetétel analízis tiszta és ionokkal adalékolt HAp mintákon (a) HAp-I, (b) HAp-II, (c) adHAp-I (d) adHAp-II és (e) adHAP-III.

Látható, hogy az EDX spektrumokon a C csúcs is megjelenik, ami karbonátos szennyező k, karbonátos HAp (CHAp) fázis jelenlétére illetve adszorbeált  $\text{CO}_2$ -ra is utalhat. A bevonatokban található elemek pontos százalékos aránya ezzel a módszerrel nem adható meg, csak az egyes elemek jelenléte detektálható. Az ionokkal adalékolt HAp bevonatok esetében a Mg, Sr, Zn és Ag csúcsai is megjelennek. A nemfolytonos HAp klaszterekkel bevont implantátumok esetében az alapfém csúcsai (Ti, Al, V) is megjelennek a spektrumon, mivel az alkalmazott elektronsugár az alapot is gerjesztette a bevonat inhomogenitása miatt.

A pontos elemösszetétel feltárására ICP-OES mérést használtunk. A mérések kivitelezéséhez a bevonatokat leoldottam a mintákról 0,5 M  $\text{HNO}_3$  oldattal, majd az oldatokat további

kezelés, feltárás alkalmazása nélkül vizsgáltuk. Minden egyes mintánál 3 párhuzamos mérést végeztünk. A kapott eredmények alapján az átlag elemösszetételeket az 5.1. táblázatban foglaltam össze (at%-ban kifejezve).

**5.1. táblázat:** Különböző paraméterekkel készített HAp és adHAp bevonatok elemösszetétele (at%).

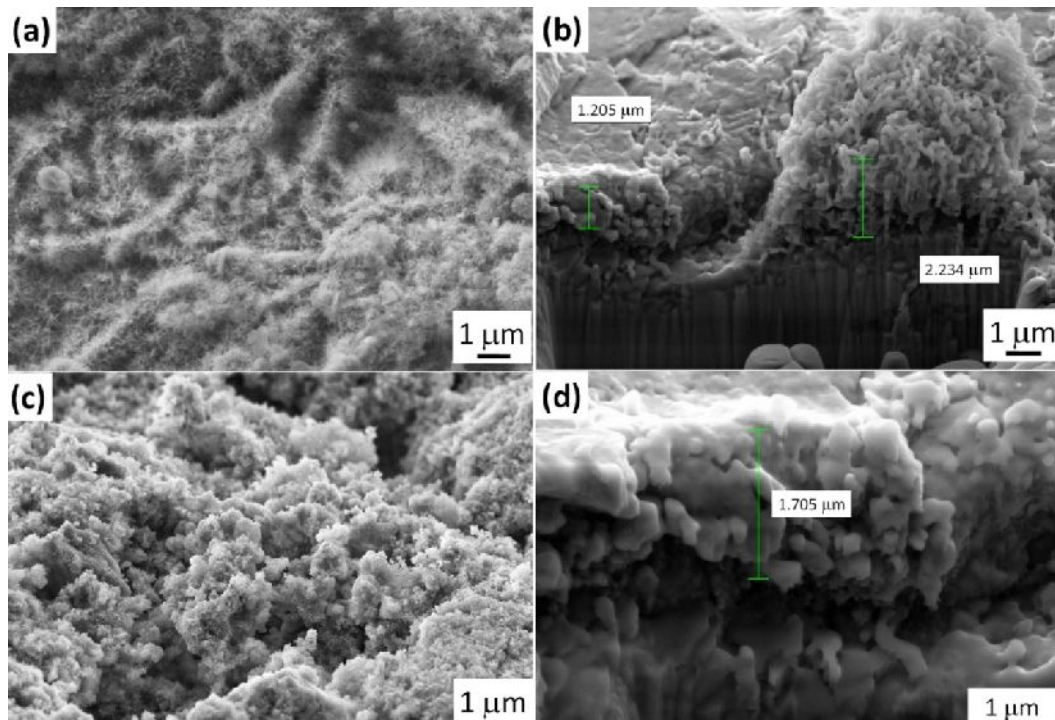
Bevonat	Ca	P	Mg	Sr	Zn	Ag	Ca/P
HAp-I	61,41	38,59	-	-	-	-	1,59
HAp-II	70,54	30,46	-	-	-	-	1,78
adHAp-I	45,26	29,10	-	-	19,66	5,98	1,56
adHAp-II	62,09	32,93	2,80	0,45	1,64	0,12	1,88
adHAp-III	59,96	35,29	1,83	1,68	1,06	0,18	1,69

A mérési eredmények azt mutatták, hogy a Ca/P elemarány több esetben nagyobb a hidroxiapatit sztöchiometriai 1,67-es elemarányánál, ami bizonyítja Ca-ban gazdag apatit jelenlétét is a bevonatban. Néhány kutatócsoport hasonló eredményekről számolt be [270, 271]. Publikációikban megállapították, hogy azok a bevonatok, melyekben a Ca/P elemarány 1,67 és 1,90 között változik, Ca-ban gazdag apatit és HAp keverékének tekinthet. Az ionokkal módosított HAp bevonatoknál az adHAp-I esetében az adalékoló elemek aránya viszonylag nagy (26%), míg az adHAp-II és adHAp-III bevonatoknál mindössze 5 at% alatti.

A minták felszínéből néhány mikrométer mély vajat fókuszált ionsugárral (FIB) történő kimarásával tovább vizsgáltuk a nemfolytonos HAp-II és adHAp-II klaszterek morfológiáját, szerkezetét és a klaszterek vastagságát (5.5. ábra).

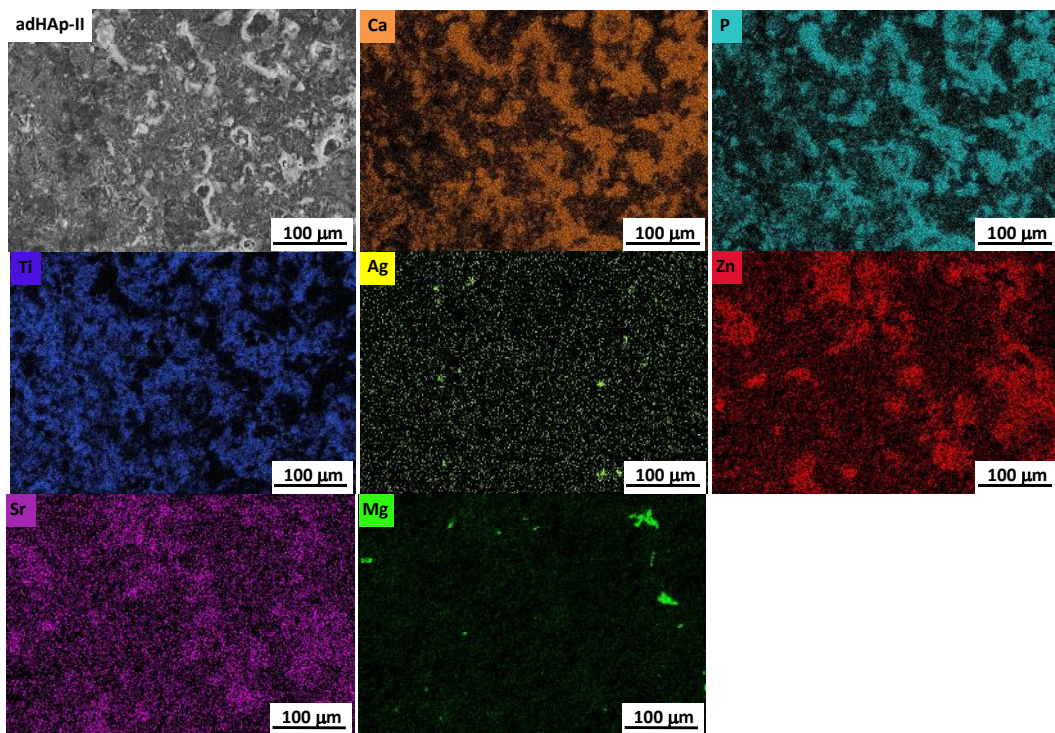
A felvételekből jól látszik, hogy a tiszta és az ionokkal adalékolt HAp bevonat egyaránt pórusos, porózus szerkezettel rendelkezik, ami nagyon hasonlatossá teszi az emberi csont szerkezetéhez. Ezenkívül a pórusos mikroszerkezet lehetővé teszi, hogy az adalékoló ionok (Zn, Ag, Sr, Mg) bediffundáljanak a mikro-repedésekbe a megfelelő összetételű oldatokban történő áztatás alatt és ott különféle foszfát vagy oxid/hidroxid csapadék formájában kiváljanak a NaOH-os utókezelés során. A keresztmetszeti felvételeken az is látható, hogy az egyes HAp klaszterek vastagsága 1-2  $\mu\text{m}$  között változik (5.5. b és d ábra).





**5.5. ábra:** SEM-FIB mérések HAp és ionokkal adalékolt HAp rétegeken (a) és (b) HAp-II, (c) és (d) adHAp-II.

Az 5.6. ábra a nemfolytonosan növesztett, ionokkal módosított HAp (adHAp-II) klaszterekről készült elemtérképet mutatja.



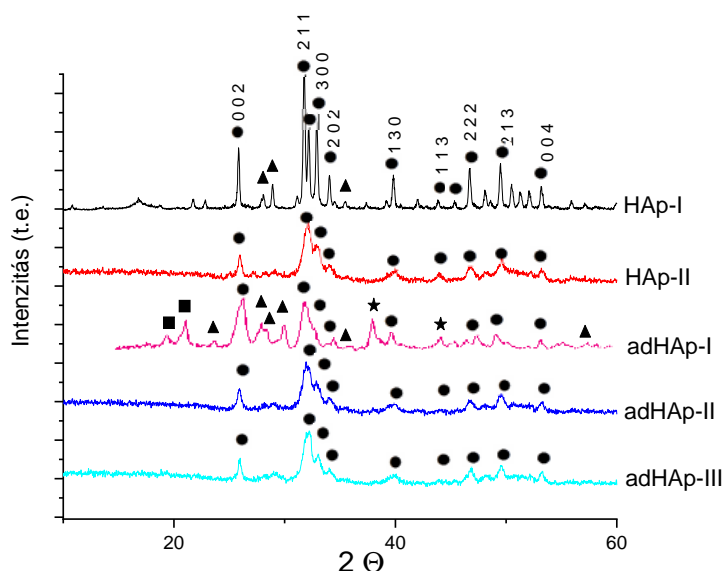
**5.6. ábra:** Nemfolytonosan, ionokkal adalékolt HAp klaszterek elemtérképe (adHAp-II minta).



A Ca és P teljesen korrelációban jelennek meg, hozzájuk képest a Ti éppen ellenkezőleg, ott van többségben, ahol a Ca és P kevés. Ebből látszik a réteg nemfolytonos jellege. Az adalékelemek jelenléte a mintában tisztán látható, de érdekes, hogy az eloszlásuk eléggé eltér. A Zn és a Sr egymással korrelációban viszonylag egyenletesen eloszolva inkább a nemfolytonos réteg szemcséinek megfelelő foltokban van jelen, az Ag és a Mg ezzel szemben kisebb, ritkábban elhelyezkedő, de nagyobb koncentrációjú szemcsékben található.

### 5.3. Röntgendiffrakciós fázisanalízis

A mintákban megtalálható fázisok feltérképezésére és pontos azonosítására XRD méréseket végeztünk.



**5.7. ábra:** HAp és adHAp rétegek XRD mintázata. jelölések: ● HAp, ▲ Monetit ( $\text{CaHPO}_4$ ), ■ Parascholzite ( $\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), ★ fémes ezüst

Az XRD eredményekből (5.7. ábra) jól látható, hogy mindegyik minta esetében a fő fázis a hidroxiapatit (HAp, JCPDS 76-0694), melynek főbb karakterisztikus csúcsai a  $2\theta = 31,770$ ,  $32,190$  és  $32,905^\circ$ -nál találhatóak és a (211), (112), (300) Miller indexszel jelölt síkoknak felelnek meg. Az 5.7. ábrából látszik, hogy a HAp-II reflexiók csúcsai jóval szélesebbek, mint a HAp-I bevonaté. Ez bizonyítja, hogy a leválasztási paraméterek megváltoztatják a kristályszerkezetet, a kisebb frekvenciával előállított bevonat kisméretű, nanoszerkezet részecskékből épül fel, míg a nagyobb frekvencián leválasztott rétegen mért keskenyebb reflexiók csúcsok nagyobb szemcseméretre utalnak.

Az elektrokémiai úton el állított adHAp-I bevonat XRD görbéje eltér a többi mintáétól. Ebben az esetben más fázisok is megjelennek a bevonatban a hidroxiapatiton kívül. Ezek az új fázisok a monetit vagy dikalcium-foszfát (DCP, JCPDS 89-5969),  $\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (parascholzite, JCPDS 86-2372) valamint a fémes ezüst Ag (111) (JCPDS 89-3722). A DCP f karakterisztikus csúcsai a  $2\theta = 26,59$  és  $26,39^\circ$ -nál jelennek meg. Ebben az esetben az el állítás során a cink beépül a CaP kristályrácsba és egy új fázist, a parascholzitot eredményez, mely karakterisztikus csúcsai a  $2\theta = 19,62$  és  $21,36^\circ$ -nál találhatóak. A fémes ezüst (Ag (111)) legintenzívebb reflexiója pedig a  $2\theta = 38,12^\circ$ -nál látható.

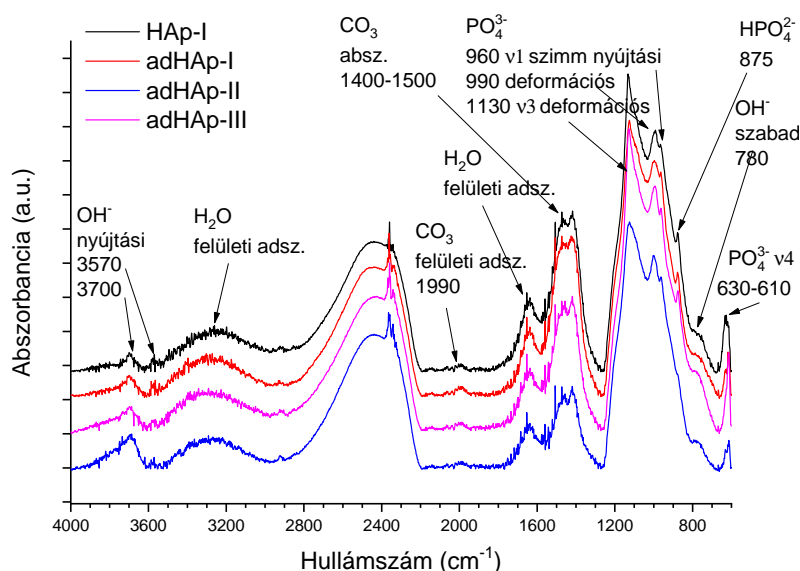
A Difffrac.Eva szoftverrel végzett analízis alapján a HAp-I bevonat fázisaránya (tömegszázalékban)  $\text{HAp:DCP} = 97,1:2,9$ ; az adHAp-I bevonaté pedig:  $\text{HAp:DCP:Parascholzite:Ag} = 39,7:20,1:36,8:3,4$ ; a többi elem és fázis koncentrációja a bevonatban kimutatási határ alatti.

Prado da Silva és mtsai [133] cinktartalmú hidroxiapatit porokat készítettek hidrotermális úton, majd titán és nióbium alapfémekre vitték fel. A mintákon elvégzett XRD mérések esetükben is többféle fázis jelenlétét mutatták ki, úgymint, hidroxiapatit, monetit, brushit és parascholzit. Más vizsgálatok is kimutatták, hogy a cink parascholzit fázis képzése közben épül be a kalcium-foszfátba [135, 136]. Miyaji és mtsai [134] emellett tanulmányozták a cink fokozatos beépülését a HAp fázisba. Kutatásaik során kimutatták, hogy a Zn tartalom növelésével a termék Zn szubsztituált apatitból fokozatosan amorf apatit-szerű fázissá majd végül amorf parascholzittá alakul. Az általuk mért maximális Zn szubsztitúciós határ 15 mol% volt.

Az 5.7. ábra alapján látható, hogy a hasonló elektrokémiai paraméterekkel leválasztott HAp-II, adHAp-II és adHAp-III minták röntgendiffrakciós jellege hasonló, széles diffrakciós csúcsokkal, ami a minták nanokristályos szerkezetét jelzi. A kis mennyiségben jelenlév adalékoló ionok nem befolyásolták számottevően a HAp kristályszerkezetét és szemcseméretét. Mintáinkban nem tapasztalható a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok más ionokkal történő helyettesítésének tulajdonítható csúcseltolódás sem. Azonban vannak kutatások, ahol csúcseltolódásokat tapasztaltak. Amikor a  $\text{Ca}^{2+}$  (0,99 Å) ionokat kisebb méretű  $\text{Mg}^{2+}$  (0,69 Å) és  $\text{Zn}^{2+}$  (0,77 Å) ionokkal helyettesítették, akkor a reflexiós csúcsok a nagyobb  $2\theta$  értékek felé tolódtak [128-131], míg a nagyobb méretű  $\text{Sr}^{2+}$  (1,13 Å) és  $\text{Ag}^+$  (1,15 Å) ionok esetében kisebb  $2\theta$  értékek felé mozdultak el és a rácsparaméterekben is növekedést okoztak [132, 236].

#### 5.4. Fourier-transzformációs Infravörös Spektroszkópia analízis

A bevonatok szerkezetének további felderítésére és minőségének ellenőrzésére FT-IR méréseket is végeztünk. Ez a módszer kiválóan alkalmas a kalcium-foszfát ásványban levő összetett anionos csoportok ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) karakterisztikus abszorpciós csúcsainak azonosítására.



**5.8. ábra:** FT-IR mérések a HAp rétegen és a különböző módszerekkel előállított adHAp rétegeken.

Az 5.8. ábrán látható, hogy az FT-IR spektrumok minden egyes minta esetében hasonlóak. A spektrumokon a kalcium-foszfátokban található anionos csoportok azonosíthatóak. A  $\text{PO}_4^{3-}$  csoport karakterisztikus sávjai a 627, 960, 990 és 1130  $\text{cm}^{-1}$  hullámszámoknál láthatók. A spektrumokon megtalálható még a  $\text{HPO}_4^{2-}$  csoport gyenge, átlapoltsávja 875  $\text{cm}^{-1}$ -nél és az  $\text{OH}^-$  csoportoké a 3700-3500  $\text{cm}^{-1}$  tartományban. Megfigyelhető, hogy a hidroxilcsoportok vegyértékrezgési sávjai szignifikánsabbak az ionokkal adalékolt HAp rétegekben, mint a tiszta HAp réteg esetében.

A 3600 és 2600  $\text{cm}^{-1}$  közötti tartományban valamint 3570  $\text{cm}^{-1}$ -nél az adszorbeált víz sávjai jelennek meg. Elnyelési sáv figyelhető meg továbbá a 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$  tartományban, ami az adszorbeált  $\text{CO}_3^{2-}$  tartalmat mutatja, míg a gyengébb sávok az 1870 és 1880  $\text{cm}^{-1}$  közötti tartományban a felületen adszorbeálódott  $\text{CO}_2$ -ot jelzik [272]. Tapasztalatok alapján a szintetikus HAp  $\text{CO}_2$ -ot tud megkötni a levegőben illetve vizes közegben. Hosszú idejű állás során ez a karbonát helyettesítés fokozatosan történik a minta felszínétől a belseje felé haladva [273]. Az általunk kapott spektrumok szintén igazolják a karbonátos HAp fázis

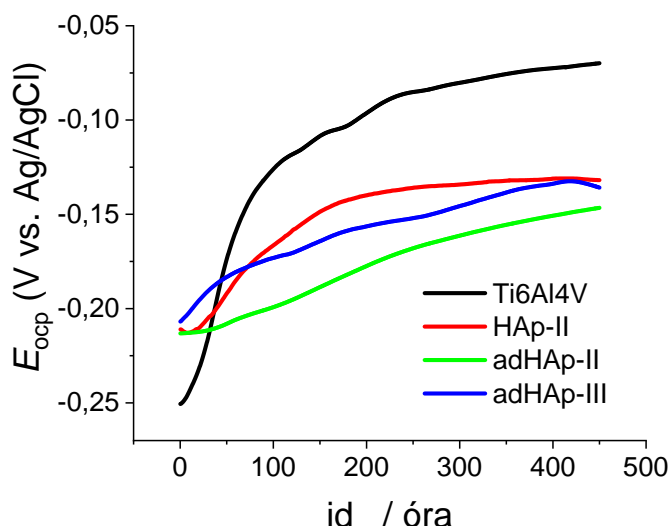
jelenlétét a rétegekben. A minták analízise esetünkben több hónapos levegőn tárolás után történt. A spektrumokon megfigyelhető még, hogy a tiszta HAp esetében megjelenő  $\text{OH}^-$  sávok gyengébbek, az abszorbeált  $\text{CO}_3^{2-}$  sávok pedig erőteljesebbek, mint az adHAp rétegeknél láthatóak, ami azt jelzi, hogy a tiszta HAp több karbonátos fázist tartalmaz.

### 5.5. Elektrokémiai minősítés

Ebben a fejezetben a nemfolytonosan leválasztott HAp-II és adHAp-II, adHAp-III rétegek elektrokémiai jellemzésének leírására és tárgyalására térünk ki bővebben.

#### 5.5.1. Hosszú idejű nyitott áramköri potenciál ( $E_{\text{ocp}}$ ) mérések

A nyitott áramköri potenciálmérések során a nyugalmi potenciált mérjük. Ilyen állapotban nem folyik áram a rendszerben.

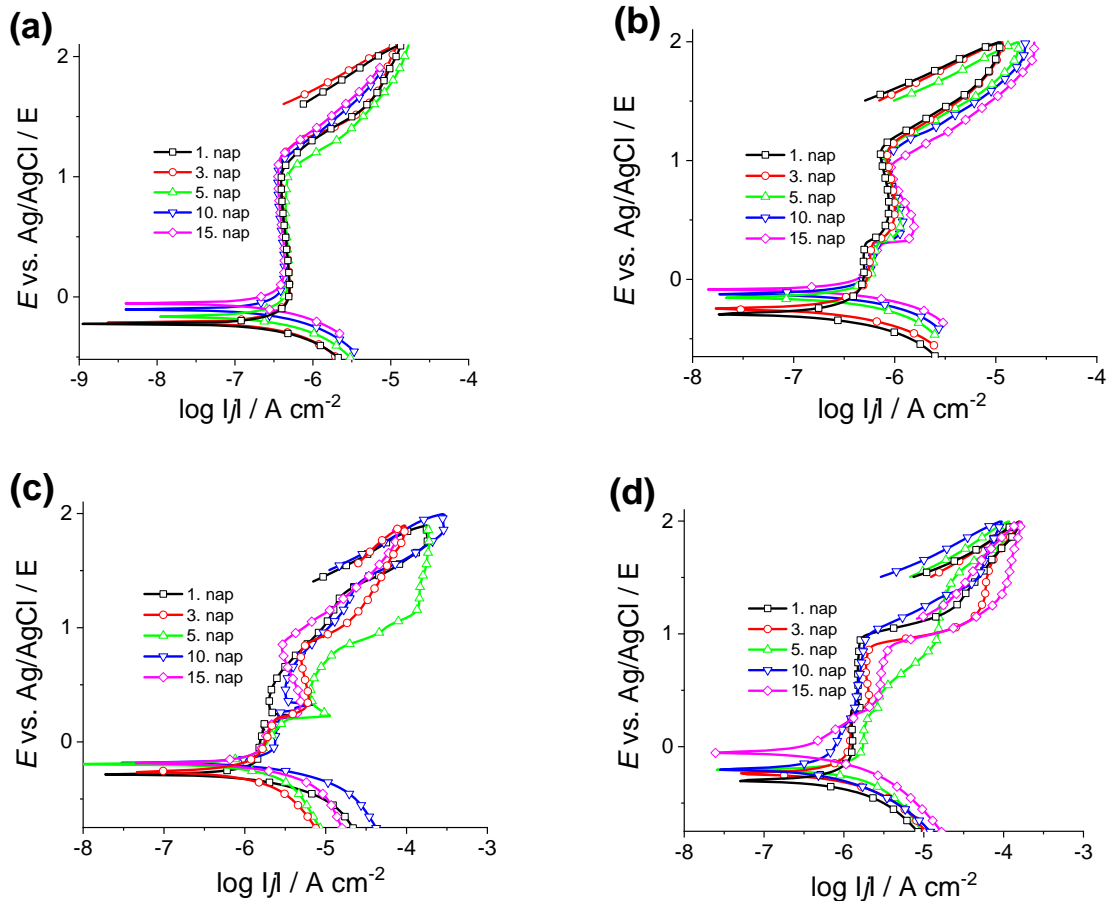


**5.9. ábra:** Hosszú idejű nyitott áramköri potenciálmérések Ti ötvözet alapfémén, valamint nemfolytonos HAp és adHAp rétegeken.

Az 5.9. ábrából kivehető, hogy a potenciálok a kezdeti bemerítési időben növekednek, majd körülbelül 8 nap bemerítési idő után minden esetben beáll egy állandó érték. Ez a minták stabilizálódását jelzi. Az is megfigyelhető, hogy a Ti ötvözet rendelkezik a legpozitívabb potenciállal már két nap bemerítési idő után. Galvánkorrozio esetén, amikor két fém érintkezik egymással, szükségszerűen a negatívabb potenciálú oldódik. Tehát a negatívabb potenciálú anyag viselkedik anódként a kapcsolódó galvánpárban, míg a pozitívabb fém katódként. Az alapfém és a bevonat érintkezésekor, a kialakuló potenciálkülönbség miatt a bevonat oldódása következik be nagyobb valószínűséggel.

### 5.5.2. Potenciodynamikus polarizációs mérések

Az 5.10. ábrán a implantátum alapfémén valamint a nemfolytonos rétegeken felvett potenciodynamikus görbék láthatóak. A potenciálokat Ag/AgCl referencia elektróddal szemben mértem és a potenciált 1 mV/s sebességgel léptettem. A méréseket különböző áztatási idő k után többször megismételtem, két héten keresztül.



**5.10. ábra:** Ti6Al4V ötvözetén (a) valamint HAp-II (b), adHAp-II (c) és adHAp-III nemfolytonos bevonatokon felvett potenciodynamikus polarizációs görbék. A görbéket SBF oldatban, 37 °C-on vettem fel különböző áztatási idő k után, két héten keresztül. A polarizációs sebesség: 1 mV/s.

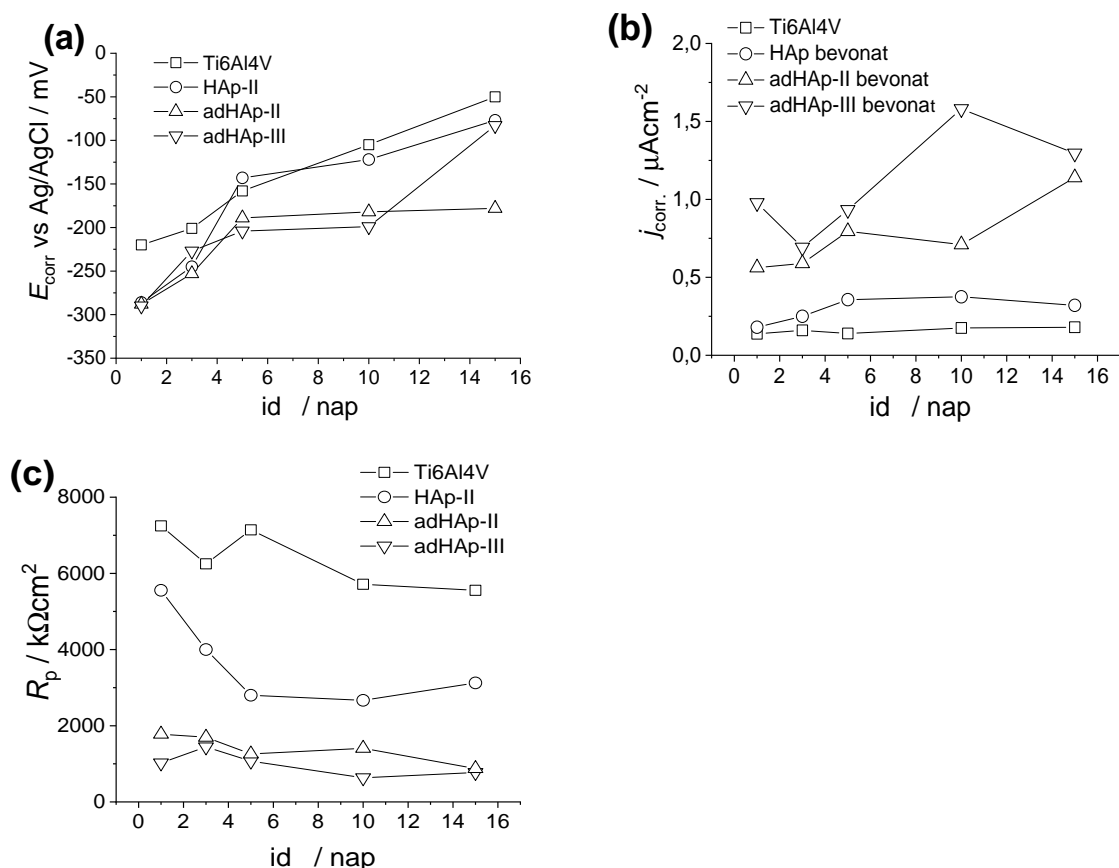
A polarizációs görbék anódos ágán széles passzív tartomány látható mindegyik minta esetében, viszonylag kis passzív áramsűrűségekkel ( $j_p$ ). A bevonat nélküli implantátum esetében az anódos passzív tartomány széles minden mérési idő pontban és a bemelegítési idővel tovább szélesedik +1,0 V-ról +1,2 V-ra. Az úgynevezett letörési potenciál ( $E_{lt}$ ) jelzi a passzív réteg sérülését, oxigénfejlődést, amikor az áramválasz újra növekedni kezd. A passzív

áram nagysága alig változik széles potenciáltartományban és átlagosan  $0,50 \mu\text{A cm}^{-2}$  körül mozog.

A HAp réteg és az ionokkal adalékolt HAp esetében azonban a potenciodynamikus görbék már más lefutást mutatnak. Ezekben az esetekben a passzív tartomány lépcsős jellegű, az első lépcső  $-60 \text{ mV}$  körül kezdődik, majd körülbelül  $+300 \text{ mV}$ -tól újra növekedni kezd a mért áramválasz. A második passzív tartomány  $+300 \text{ mV}$  és  $+900$ - $1100 \text{ mV}$  között látható, itt újra viszonylag potenciálfüggetlenné válik az áramsűrűség a HAp és az ionokkal adalékolt HAp rétegek esetében egyaránt. Ez a jelenség a képződött passzív réteg károsodására, elektródfolyamatok, anódos oldódások lejátszódására utalnak. Az is megfigyelhető, hogy a HAp réteg letörési potenciálja negatív irányba változik a bemelegítési idővel,  $+1,15 \text{ V}$ -ról  $+0,97 \text{ V}$ -ra, vagyis csökken az anódos passzív tartomány. Az adHAp rétegeknél azonban nem figyelhető meg szisztematikus változás a bemelegítési idővel sem a passzív tartomány nagysága sem a mért passzív áramok esetében.

Kimutattam, hogy az alapfém és a HAp bevonat potenciodynamikus görbéinek alakja alig változik a bemelegítési idővel. Az adHAp rétegek esetében azonban nagyobb passzív áramokat mértem, melyek jobban változnak az idő múlásával, mint az alapfém és a HAp réteg esetében, valamint a különböző bemelegítési idő után felvett görbék alakja is változik.

Az 5.11. ábrán a potenciodynamikus görbékből kapott korróziós potenciálok ( $E_{\text{corr.}}$ ), korróziós áramsűrűségek ( $j_{\text{corr.}}$ ) valamint a számolt polarizációs ellenállás értékeinek időbeli változása látható.



**5.11. ábra:** A 20. ábrán látható potenciodynamikus görbék 1 meghatározott elektrokémiai paraméterek: (a)  $E_{\text{corr}}$  (b)  $j_{\text{corr}}$ , valamint (c) a számolt polarizációs ellenállás értékek ( $R_p$ ).

Vizsgálataim megmutatták, hogy a korróziós potenciál értékek id vel kissé a pozitívabb potenciálok felé tolódtak mindegyik minta esetében, ami a felület passzíválódását jelezte az anódos polarizáció során (5.11. (a) ábra). Ezen kívül azt is megfigyeltem, hogy a HAp bevonatok korróziós potenciáljai nagyobb mértékben változtak a mérési id tartam alatt. A korróziós áramokat a potenciodynamikus görbék Tafel tartományában ( $\pm 50$  mV a nyitott áramköri potenciáltól), az anódos és katódos ágakra illesztett egyenesek metszéspontjából lehet meghatározni. Az 5.11 (b) ábra mutatja, hogy az alapfém korróziós árams r sége a legkisebb, átlagosan  $150 \text{ nAcm}^{-2}$  és id vel szinte alig változik. A HAp bevonat korróziós árama a bemerítés kezdeti id szakában enyhe növekedést mutat, majd az 5. nap után beáll egy viszonylag állandó értékre. Az ionokkal adalékolt rétegek esetében a mért korróziós áramok már jóval nagyobbak, mintegy 6-7-szeresei az alapfém esetében mérteknek és id ben növekv tendenciát mutatnak. Két hét SBF oldatban történt állás után mért korróziós áram értékek igazolják, hogy a rétegben oldódási folyamatok mennek végbe. A nemfolytonos HAp rétegen mért  $j_{\text{corr}} = 350 \text{ nAcm}^{-2}$ , mintegy kétszerese az alapfémen mértnek. Az adHAp-II

nemfolytonos rétegen a korróziós áram már mintegy  $1,15 \mu\text{Acm}^{-2}$ , az adHAp-III rétegen pedig  $1,3 \mu\text{Acm}^{-2}$ . Ezek az értékek igazolják a bevonatok megnövekedett korróziós hajlamát, időbeli lebomlását, feloldódását biológiai körülmények között.

A minták polarizációs ellenállása a Stern-Geary egyenletből számolható.

$$R_p = \frac{B}{i_{\text{corr}}}, \quad B = \frac{b_a b_c}{2.3(b_a - b_c)} \quad (5.1)$$

Az 5.1 egyenletben szereplő  $b_a$  és  $b_c$  értékek a potenciodynamikus görbék meredekségét adják meg a Tafel tartományban. Általánosságban elmondható, hogy a korróziós sebesség az anódos (oxidációs) illetve a katódos (redukciós) részfolyamatok kinetikájától függ. A mért görbék esetében a meredekség mind az anódos, mind a katódos ágon nagy, tehát az elektródfolyamatokon egyszerre érvényesül kinetikai és diffúzió kontroll.

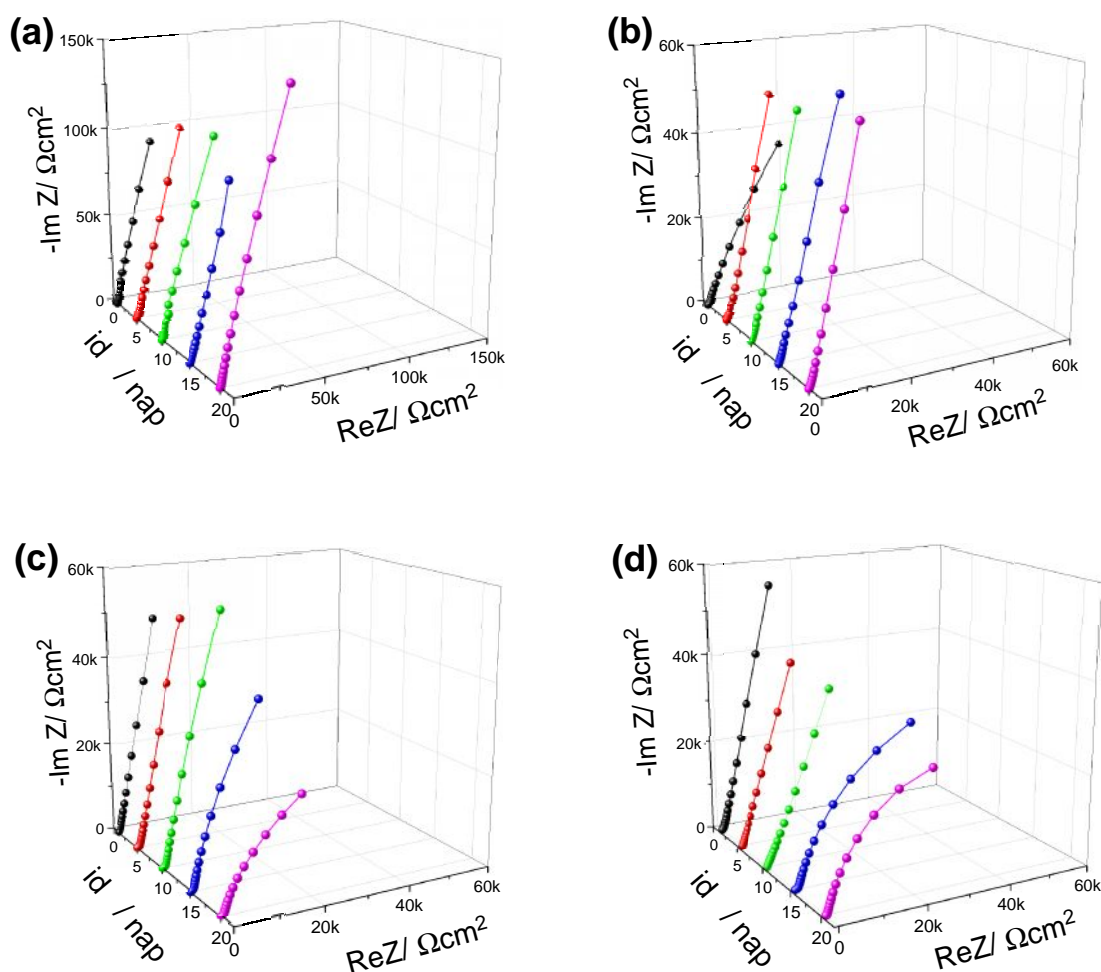
A lineáris polarizációs görbe meredeksége független a  $j_{\text{corr}}$  által kontrollált és független a  $b_a$  és  $b_c$  értékek változásaitól, ezért elfogadott, hogy a  $B = 1$  egyszer sítés alkalmazásával a polarizációs ellenállást a korróziós áram reciprokaként vegyük. A fenti egyenlet alapján számolt  $R_p$  értékek az 5.11 (c) ábrán láthatóak.

### 5.5.3. Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia (EIS) mérések

EIS mérések segítségével a különféle anyagok (fémek, bevonatok) korróziós tulajdonságairól, jellemzőiről, valamint az elektródok felületén lejátszódó elektródfolyamatok jellegéről nyerhetünk hasznos információkat. Munkám során a 4.2 fejezetben leírt módszerekkel elvégzett nemfolytonos HAp rétegek és az alapfém korróziós tulajdonságait vizsgáltam különböző áztatási idő után. Ez a mérési módszer megfelelő kiegészítéssel az 5.5.2) fejezetben tárgyalt potenciodynamikus polarizációs méréseknek.

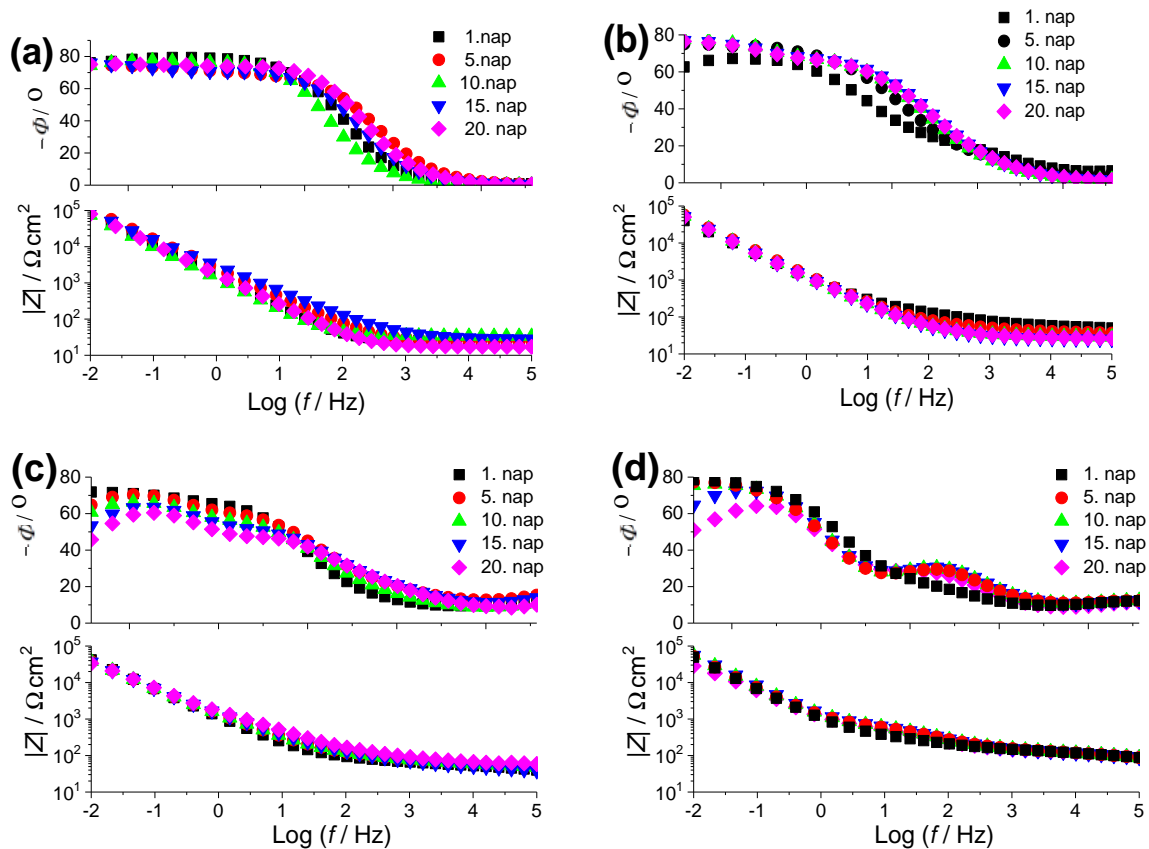
Az 5.12. ábra a vizsgált minták különböző időpontokban felvett Nyquist diagramjait ábrázolja. Az alapfémen és a HAp bevonaton mért Nyquist görbék nagy átmérőjű kapacitív hurokot mutatnak. Ez a forma jellemző a vékony passzív filmrétegeken mért görbékre. Az alapfém esetében a görbék átmérője alig változik az idő múlásával.





**5.12. ábra:** Ti6Al4V alapfém (a) HAp-II (b), adHAp-II (c) és adHAp-III bevonatok Nyquist diagramjai, nyitott áramköri potenciálon, SBF oldatban, 37 °C-on.

A HAp rétegnél azonban megfigyelhet, hogy az első nap után a görbe átmérje növekszik, ami a réteg passziválódását mutatja, majd ezután már enyhe csökkenés tendencia figyelhető meg (a görbék idővel az impedancia valós tengelye felé hajlanak), ami arra utalhat, hogy a réteg korrózióállósága romlik, oldódási folyamatok mennek végbe. Az adHAp rétegeknél a diagramok átmérje valamivel nagyobb mértékben csökken az idővel. A kétféle módszerrel előállított módosított HAp rétegek (adHAp-II és adHAp-III) esetében hasonló a görbék alakja, ami azt jelzi, hogy hasonló sebességű elektródfolyamatok játszódnak le a minták felületén.



**5.13. ábra:** Ti6Al4V alapfém (a) HAp-II (b), adHAp-II (c) és adHAp-III (d) bevonatok Bode diagramjai, nyitott áramköri potenciálon, SBF oldatban, 37 °C-on.

A mért Bode diagramok (5.13. ábra) jól demonstrálják, hogy a Ti6Al4V alapfém közel kapacitív válaszfüggvényt mutat, amit a széles frekvenciatartományban (32 Hz-t 1 0,01 Hz-ig) mért,  $-80^\circ$ -ot megközelítő fázisszög értékek bizonyítanak. A széles fázisszög plató keletkezhet a középfrekvenciás (KF) és alacsony frekvenciás (AF) régióban található két fázisszög maximum összeolvadásával. A  $\log Z$  vs.  $\log f$  görbe meredeksége  $-0,8$  széles frekvenciatartományban, 1000 Hz frekvenciától egészen a 10 mHz-es alsó határig. Az is megfigyelhető, hogy a fázisszög és a totál impedancia görbék lefutása szinte nem változik az idővel.

A HAp bevonat esetében a fázisszög értékének fokozatos növekedése figyelhető meg a teljes frekvenciatartományban két majdnem egybeolvadó, de azért elkülöníthető időállandóval a KF és a AF tartományban. A fázisszög maximális értéke eléri a  $-78^\circ$ -ot 100 kHz-en és a  $\log Z$  vs.  $\log f$  görbe meredeksége  $-0,76$ . Ezek az értékek nem ideális kapacitív jelleget jeleznek.

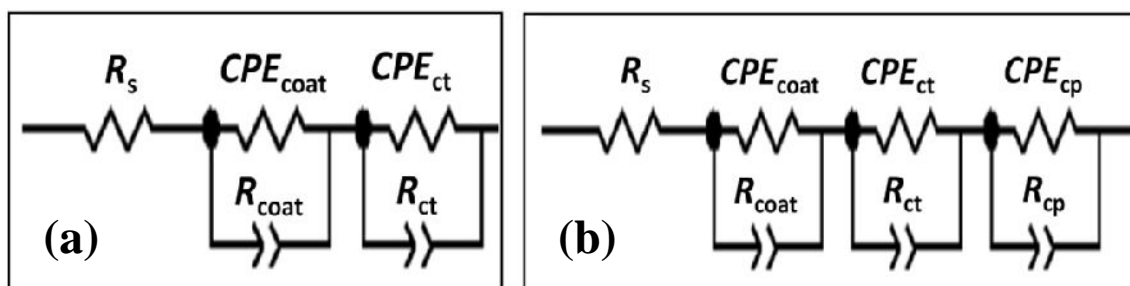
A módosított HAp rétegek esetében a két időállandó még jobban észrevehető két jól elkülöníthető fázisszög maximummal. Ezek a fázisszög maximumok idővel nem változnak, az

adHAp-II réteg esetén elérik a  $-70^\circ$ -ot, míg az adHAp-III esetén a  $-76^\circ$ -ot az AF tartományban. Az adHAp-III réteg esetében a legszembetűnőbb a két fázisszög maximum jelenléte: az egyik 75 Hz körül a középfrekvenciás tartományban, a másik 25 mHz körül az AF tartományban. A közöttük lévő fázisszög minimum 10 Hz környékén található. A kisebb fázisszögek jelzik az ideális kapacitortól való eltérést és az elektródfolyamatok nem ideális jellegét. A jól elkülönült fázisszög maximumok legalább két vagy több időállandó jelenlétére utalnak, melyek különböző, egymástól függetlenül végbemenő elektródfolyamatokat jeleznek. Az adHAp rétegek  $\log Z$  vs.  $\log f$  görbéinek lefutása különbözik a HAp és az alapfém esetében kapottaktól. Ezeknél két különböző meredekséget figyeltem meg. Az adHAp-II rétegnél a görbe meredeksége  $-0,67$  az alacsony frekvenciás tartományban (10 mHz – 1 Hz), míg a középfrekvenciás (1 Hz – 100 Hz) részen mindössze  $-0,51$ . Az adHAp-III rétegnél az alacsony frekvenciás tartományban  $-0,83$  a meredekség, ami kapacitív jellegre utal, a középfrekvenciás tartományban pedig csak  $-0,30$ , jelezve, hogy az impedancia válasz az ebben a tartományban lejátszódó reakciókra már közelít a rezisztor karakterisztikához.

#### 5.5.3.1. Impedancia mérések kiértékelése

A mért adatok kiértékeléséhez szükséges, hogy megtaláljuk a megfelelő helyettesítő áramköröket (EC), amelyek kellően visszaadják az elektródok felszínén lejátszódó reakciók elektronikus felépítését. Ezek az áramkörök ellenállásokból és kapacitásokból épülnek fel. A kiértékeléshez a Zview2 szoftvert használtam. A mért görbékre a helyettesítő áramkörök segítségével illesztéseket végeztem. Az illesztett adatokból kapjuk meg a minta korróziós tulajdonságaira jellemző paramétereket, úgymint a töltésátlépési ellenállásokat és kettős réteg kapacitásokat.

Az 5.14. ábrán a kiválasztott helyettesítő áramköröket mutatom be.



**5.14. ábra:** Helyettesítő áramkörök (EC) a Ti6Al4V alapfém (a) valamint a HAp-II, adHAp-II és adHAp-III bevonatokon (b) mért impedancia adatok szimulálására.

Az adatok kiértékeléséhez a helyettesít áramkörökben konstans fáziselemekkel (*CPE*) helyettesítettem a kapacitor elemeket, annak érdekében hogy a mért és illesztett eredmények minél jobban egyezzenek. A *CPE* elemek figyelembe veszik a felületi inhomogenitásokat és a felület érdességét, valamint a frekvenciafüggetlen elektroaktív komponenseket az elektrolitban. Az 5.2 egyenlettel lehet definiálni a konstans fáziselem impedanciáját:

$$Z_{CPE} = 1 / (Q(j\omega)^n) \quad (5.2)$$

ahol  $Q$  a *CPE* konstans ( $\Omega^{-1}s^n\text{cm}^{-2}$ ),  $j$  a képzetes egység (-1 négyzetgyöke), és  $\omega$  a szinuszhullám körfrekvenciája.

A bevonat nélküli Ti ötvözet alapfémnél a legjobb illesztést a két sorosan kapcsolt *R-CPE* al-áramkörrel értem el (5.14. (a) ábra). Ezt a modellt általánosan alkalmazzák kétréteg bevonatok elektromos jellemzésére, ami egy kompakt belső rétegből és egy porózus külső oxidrétegből épül fel [274], ami magyarázza az alapfém felületén spontán kialakuló  $\text{TiO}_2$  réteget.

A hidroxipatit bevonatoknál azonban ez az EC már nem szolgáltatott megfelelően jó illesztéseket. Ezekben az esetekben módosítottam a helyettesít áramkört három sorosan kapcsolt *R-CPE* al-áramkörre (5.14. (b) ábra).

Az EC-ben a párhuzamosan kapcsolt  $R_{ct}$ - $CPE_{ct}$  elem jelöli az elektród felületén végbemenő töltésslépcszerű folyamatokat (elektron transzfer) ellenállását és a nem homogén külső rétegből álló réteg kapacitását.

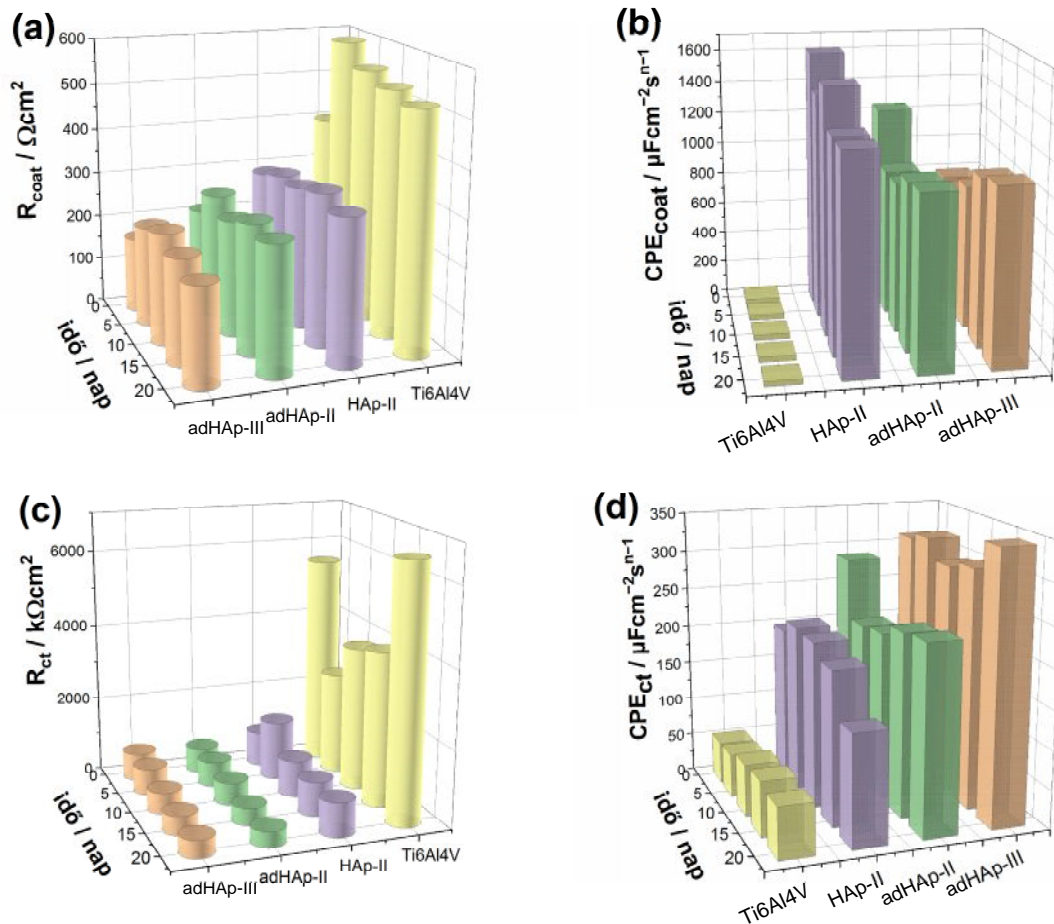
A következő, sorosan kapcsolt (*R-CPE*) al-áramkörben az  $R_{coat}$  az ellenállása, a  $CPE_{coat}$  pedig a konstans fáziseleme a bevonatnak. A harmadik (*R-CPE*) al-áramkörrel pedig figyelembe vettem a nehezen oldódó korróziós termékek, csapadékok (oxidok, hidroxidok, foszfátok) diffúziós és kicsapódási folyamatait a réteg pórusaiban. Ebben az esetben  $R_{cp}$  az ellenállása míg  $CPE_{cp}$  a konstans fáziseleme a korróziós termékek keletkezésének illetve diffúziójának a bevonat pórusaiba valamint az elektrolitba. Az impedancia válasz ezekre a folyamatokra a kisfrekvenciás tartományba esik. A kisfrekvenciás tartományokban általánosságban az anódos részfolyamat az összes oldódási folyamat, ami elektronátmenettel jár, míg a kapcsolódó katódos részfolyamat az oxigén redukciója az elektród felületén. Az  $R_s$  elem az EC-ben a nem kompenzált oldatellenállás a munkaelektrod és a referencia elektród között. A illesztett és mért görbék egyezésének mértékét a  $\chi^2$  (khí-négyzet) értékekkel lehet megadni, ami minden esetben  $10^{-5} - 10^{-6}$  nagyságrendben mozgott, tehát kiváló egyezést mutatott a számolt és a mért értékek között. Ez a paraméter jelzi, hogy a választott EC-k megfelelően visszaadják az elektródon lejátszódó folyamatok jellegét. A három sorosan kapcsolt (*R-CPE*)

áramkör bonyolult és egymástól függetlenül, egyidejűleg végbemeni elektródfolyamatokra (oldódás, kicsapódás, diffúzió) utal. Ezek a folyamatok a réteg lebomlását illetve fémionoknak a rétegből az elektrolitba történő kioldódását jelzik [265, 275, 276].

Az 5.15. ábra és a mellékletben szereplő M.1. táblázat mutatja, hogy mindegyik minta esetében a töltésátlépési ellenállásoknak van a legnagyobb értéke, tehát a korróziós sebességet meghatározó részfolyamat minden esetben az elektronátlépés a bevonatból az elektrolitba. Kimutattam, hogy a legnagyobb korrózióállósága (legnagyobb  $R_{ct}$  értékek) az alapfémnek van, ez jelzi a felszínén spontán kialakuló kompakt passzív oxidréteget. A bevonatok  $R_{ct}$  értékei viszont jóval kisebbek: a HAp-II bevonaté mintegy ötször, míg az ionokkal adalékolt HAp bevonatoké megközelíti legfeljebb egy nagyságrenddel, az alapfémhez képest. Ez az ellenállás tükrözi a réteg degradációja során végbemeni oldódási folyamatokat, miközben fiziológiai oldatba kerülnek. A legkisebb töltésátlépési ellenállásai az adHAp bevonatoknak vannak, és a kétféle módszerrel előállított adHAp minták ellenállásai hasonlóak.

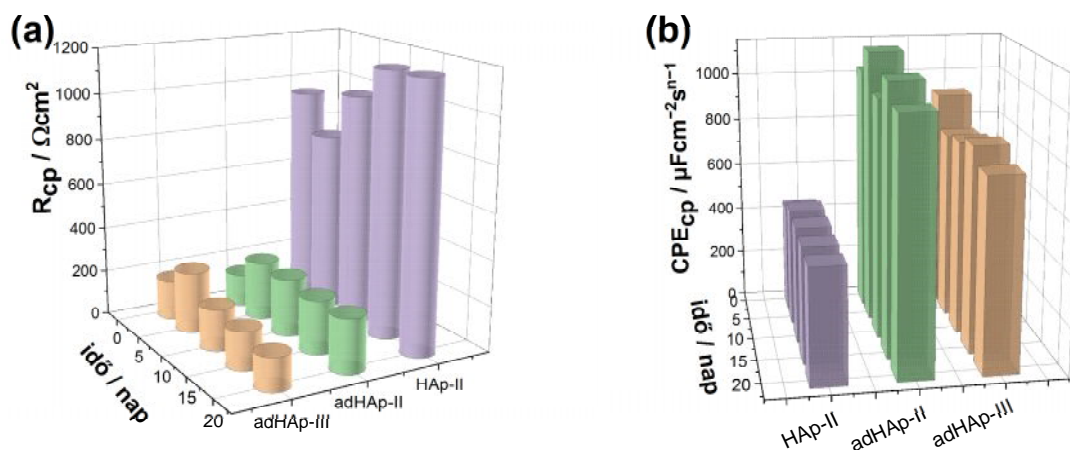
Hasonló módon, az  $R_{coat}$  értékek is a hordozó esetében valamivel nagyobbak, mint a HAp és az adHAp bevonatok esetében, azonban ugyanabban a nagyságrendben mozognak. A rétegegenállások kisebbek mintegy 3 nagyságrenddel, mint az  $R_{ct}$ -k, jelezve, hogy a pórusos bevonatok ellenállása sokkal kisebb, mint az oldódási folyamatoké.

Az M.1. táblázatban és a 5.15 (b) ábrán látható, hogy az alapfémnek vannak a legkisebb  $CPE_{coat}$  értékei, ami a felületi oxidréteg kompakt jellegét és stabilitását jelzi. Az alapfém  $CPE_{coat}$  értékeinek kitevője 0,85 és 0,89 között változik, ami a kapacitív tulajdonságát mutatja. A HAp és az adHAp rétegek  $CPE_{coat}$  értékei mintegy 40-szer nagyobbak, mint az alapfémé, ami mutatja pórusosabb jellegüket, nagyobb átjárhatósággal az elektrolit számára. A rétegek  $CPE_{coat}$  kitevője 0,53 és 0,63 között változik, ez az adott áramkörrel szimulált elektródfolyamat diffúziós karakterisztikáját bizonyítja. Hasonló tendencia mondható el a  $CPE_{ct}$  értékekről is, azzal a különbséggel, hogy ezeknél az alapfém és a bevonatokon kapott értékek különbsége kisebb, mindössze 4-5-szörös, és a kitevők az adott elektródfolyamatok nem ideális kapacitív jellegét mutatják mindegyik minta esetében.



5.15. ábra: Ti6Al4V alapfém valamint a nemfolytonos HAp-II, adHAp-II és adHAp-III bevonatok impedancia adatainak fittelt eredményei.  $R_{coat}$  (a)  $CPE_{coat}$  (b)  $R_{ct}$  (c)  $CPE_{ct}$  (d). A mérések nyitott áramköri potenciálon történtek, SBF oldatban, 37 °C-on különböző bemerítési idő k után.

A HAp-II bevonat  $R_{cp}$  értékei nagyobbak, mint az ionokkal adalékolt HAp rétegeké (5.16 ábra). Ez jól mutatja, hogy a bemerítés során képződött korróziós termékek ennél a mintánál jobban eltömítik a pórusokat, gátolva azok átjárhatóságát. Ezek az ellenállásértékek a pórusokban felgyülemlett nagyon kis oldhatóságú csapadékok jelenlétének tulajdoníthatók, melyek gátolják az anyagtranszport folyamatokat. A folyamat diffúziós jellegét a  $CPE_{cp}$  áramköri elem  $n$  kitevője mutatja, ami 0,52 és 0,64 között változik.



5.16. ábra: Ti6Al4V alapfém valamint a nemfolytonos HAp-II, adHAp-II és adHAp-III bevonatok impedancia adatainak fittelt eredményei.  $R_{cp}$  (a) és  $CPE_{cp}$  (b). A mérések nyitott áramköri potenciálon történtek, SBF oldatban, 37 °C-on különböző bemerítési idő után.

Az impedancia adatok idő függését vizsgálva megfigyelhetjük, hogy az  $R_{coat}$  értékek a kezdeti bemerítési idő szakban növekedést mutatnak, majd beáll egy viszonylag állandó érték az alapfém és a HAp bevonat esetében. Ez azt mutatja, hogy a passzív réteg már a kezdeti bemerítési idő szakban kialakul. Azonban az adHAp rétegeknél az  $R_{coat}$  ellenállásokban a kezdeti növekedést enyhe csökkenés követi, ami jelzi a nagyobb korróziós hajlamukat. A  $CPE_{coat}$  értékek csökkenési tendenciát mutatnak az idővel az alapfém és a HAp bevonat esetében. Ez a pórusok eltömődését jelzi, ezzel lelassítva a korróziós folyamatokat. Az adHAp bevonatoknál azonban a  $CPE_{coat}$  értékek a bemerítési idővel kissé növekedtek, ami azt mutatja, hogy a bevonat pórusosabb, inhomogénebb és kevésbé stabilis, mint az alapfém és a HAp bevonat. Mivel az adHAp bevonatok porózusabbak, az oldószer könnyebben be tud szivárogni a résekbe, repedésekbe, így eléri az alapfémeket és felgyorsítja a korróziót.

Az alapfém töltésátlépési ellenállása alig változik a bemerítési idővel. A bevonatolt minták esetében viszont időben enyhén csökkenési tendencia figyelhető meg.

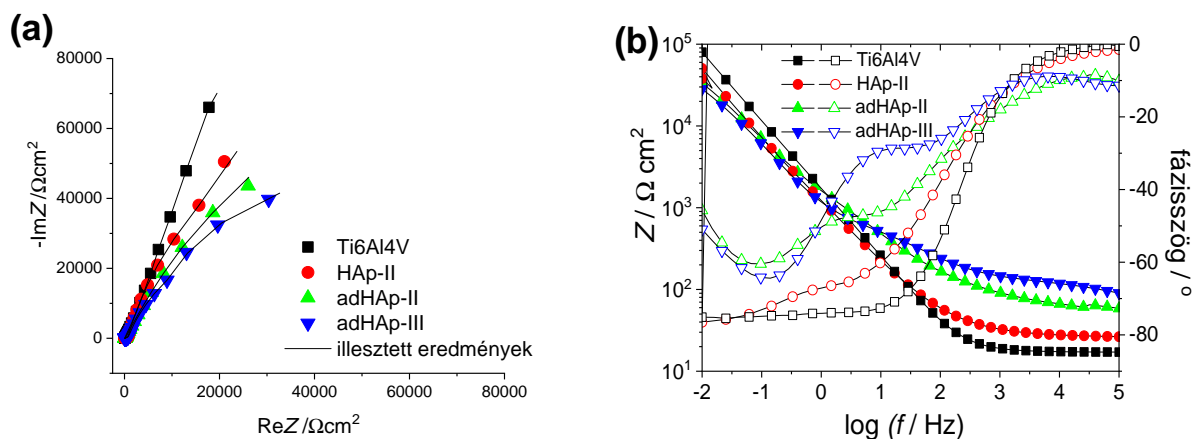
A HAp-II bevonat  $R_{cp}$  értékei nagyobbak, mint az adHAp bevonatokéi. Az M.1. táblázatból és az 5.16 (a) ábrán az is látható, hogy a HAp-II mintán mért diffúziós folyamatok ellenállása növekszik a bemerítési idővel. Az adHAp bevonatoknál a kezdeti bemerítési időben növekedés figyelhető meg, ami a korróziós termékek felhalmozódására utalhat a pórusokban, ezáltal akadályozva a diffúziós folyamatokat. Azonban 5 nap bemerítési idő után már enyhe csökkenési tendenciát mutatnak, ami a védőréteg sérülésére utal.

A szakirodalomban léteznek kutatási jelentések, publikációk melyekben különféle módszerekkel készített hidroxipatit bevonatok korróziós tulajdonságait vizsgálják [138, 274,

277, 278]. Ezekben a publikációkban azt írták, hogy a bevonat pórusosságának mértéke (pórusok mérete és száma) nagyban befolyásolja a bevonat oldódási sebességét, degradációját. A kevesebb, és kisebb pórusokkal rendelkező bevonatok jóval korrózióállóbbnak bizonyultak, mint a nagyobb pórusossági fokkal rendelkező bevonatok, mivel jobb szigetelő tulajdonságot biztosítanak. A pórusos bevonatokba könnyebben be tud diffundálni a korrózív, klorid tartalmú oldószer, eléri az alapfém felületét és elektrokémiai reakciókat indukál a HAp és a Ti6Al4V érintkezési felületén, ezáltal felgyorsítva az oldódási folyamatokat [138, 274, 277]. Zhang és mtsai [278] kifejtették, hogy a pórusos HAp bevonat korróziója során hidrogénion fejlődik a határfelületen, ahol a reakció történik, ami lecsökkenti a helyi pH értéket és így láncreakciószerűen felgyorsítja a HAp oldódását. Ezek a kutatási adatok összhangban vannak az általunk kapott mérési eredményekkel, melyekben a HAp bevonatok és az ionokkal adalékolt HAp bevonatok porózus jellegük következtében nagyobb korróziós hajlamot mutattak, mint maga az alapfém.

### 5.5.3.2. Különböző minták impedancia görbéinek összehasonlítása és illesztése

Az 5.17. ábra a Ti ötvözet alapfém felületén valamint a bevonatokon mért és a Zview szoftverrel illesztett eredményeit mutatja be.



**5.17. ábra:** Különböző minták Nyquist (a) és Bode (b) diagramjai. A méréseket nyitott áramköri potenciálon végeztük 37 °C-on, SBF oldatba történt kéthetes beáztatás után.

A különböző minták görbéinek alakjából kivehető a minták eltérő korróziós viselkedése. Jól látszik, hogy a legjobban korrózióálló, kapacitív jellegű az alapfém, míg a legkevésbé az ionokkal adalékolt hidroxiapatit rétegek.



## 5.6. Sejtéletképességi vizsgálatok

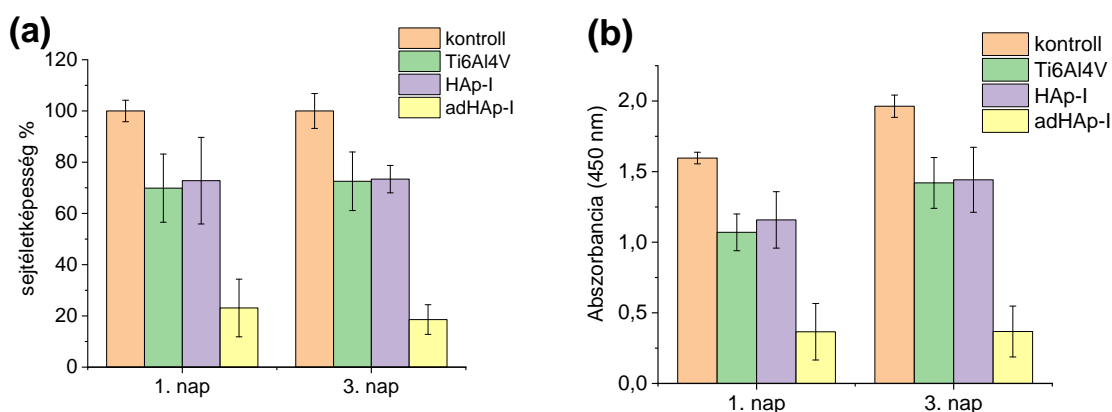
A következő alfejezetekben a különféle módszerrel előállított mintákon végzett sejtéletképességi vizsgálatokat mutatom be. A biológiai tesztek két külön kísérletsorozatban végeztem, az elsőben a vastag bevonatokat, míg a második sorozatban a nemfolytonosan kialakított rétegeket vizsgáltam. Mindkét kísérletsorozatban MG-63 csontsejteket használtam, a sejtenyésztés paramétereit (sejtenyésztési folyadék, hőmérséklet, a mintákra ültetett sejtszám) megegyeztettem, ezért a kapott eredmények összevethetők.

Viszonyítási alapként az MG-63 oszteoblaszt sejtet tartalmazó sejtenyészetet használtam. A sejtenyésztés során ugyanolyan körülményeket és tápoldatot biztosítottam minden minta és a kontroll esetében is. A vizsgálatok során minden esetben hat párhuzamos, egymástól független mérést végeztem. Grafikusan a kapott átlagértéket ábrázoltam a szórással együtt.

### 5.6.1. Sejtéletképességi tesztek kiértékelése vastag bevonatokon

Vastag (25-50 µm) bevonatok sejtéletképességi vizsgálataihoz a WST-1 reagenst használtam 1 és 3 nap sejtenyésztési idő után.

A sejtéletképességi tesztek (5.18. ábra) alapján a tiszta HAp-I bevonaton a sejttúlélés az első nap után 72% és 3 nap után 74% a kontroll csoporthoz képest, ami enyhe növekedést mutatott. Hasonló eredményeket kaptunk a bevonat nélküli implantátumoknál is. Minden olyan esetben, amikor a sejtéletképesség meghaladja a 70%-ot, a bevonat elfogadható biokompatibilis anyagként [279-282].

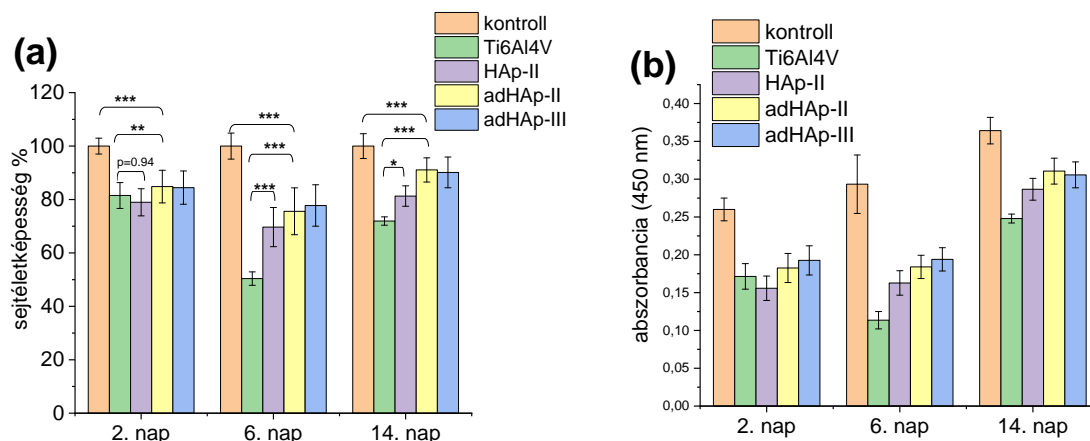


**5.18. ábra:** Alapfémen (Ti6Al4V), HAp és adHAp vastag bevonatokon mért sejtéletképességi tesztek MG-63 sejtekkel. (a) Sejttúlélési százalékok a kontrollmintához viszonyítva, (kontrollként csak MG-63 sejtek növekedtek a tápoldatban) és (b) a mért átlagabszorbancia értékek (átlagérték ± szórás).

Az ionokkal adalékolt, elektrokémiai úton leválasztott vastag adHAp-I rétegnél a mért sejtleletkéességi százalék már csak 23% volt az els nap után és 18,5% a harmadik napon, ami csökken tendenciát és alacsony sejttúlélést jelent. Ez az alacsony érték a bevonat összetételével és szerkezetével magyarázható. Számos kutatómunka bizonyította, hogy a túlzott Ag mennyiség a rétegben ugyan megfelel antibakteriális hatást biztosít, azonban károsan befolyásolja a sejtek életképességét és metabolizmusát [283-285]. Ezen kívül vizsgálták a hidroxipatitba ágyazott Zn biológiai hatását is [233, 286]. Kawamura és mtsai [287] kimutatták, hogy az *in vivo* csontképzés el segítéséhez az optimális Zn mennyiség a -ZnTCP és ZnHAp esetében 0,316 és 0,630 m/m% közötti. Az adHAp-I bevonat esetében azonban a cinktartalom 36,8 m/m% volt parascholzite formájában, ami majdnem hatvanszorosa a Kawamura és mtsai által meghatározott maximális elfogadható koncentrációnak. A szakirodalomban még nem találhatóak kiterjedt vizsgálatok a parascholzit fázisnak a sejtek növekedésére és életképességére gyakorolt hatására vonatkozóan, és még a biológiai aktivitása sem tisztázott teljesen, így feltételezhetjük, hogy az ezüsthöz hasonlóan a túlzott cinkmennyiség is káros lehet [231, 288].

### 5.6.2. Sejtéletkéességi tesztek kiértékelése a nemfolytonos bevonatokon

A nemfolytonos bevonatok és az alapfém sejtleletkéességi vizsgálataihoz a WST-8 reagenst használtam 2, 6 és 14 nap sejtenyésztési id k után.



**5.19. ábra:** Alapfémen (Ti6Al4V), HAp és adHAp nemfolytonos bevonatokon mért sejtleletkéességi tesztek MG-63 sejtekkel. (a) Sejttúlélési százalékok a kontrollmintához viszonyítva, (kontrollként csak MG-63 sejtek növekedtek a tápoldatban) valamint (b) a mért átlagabszorbancia értékek (átlagérték  $\pm$  szórás). A statisztikai különbség szintjét p-értékek adják a kontrollhoz és titán ötvözet alapfémhez képest. (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01 és \*\*\*P < 0,001)

A sejttúlélési arány minden egyes vizsgálati időpontban az ionokkal módosított, nemfolytonos HAp rétegeken a legnagyobb (5.19. (a) ábra). A sejtleletképeségi értékek a két különböző módszerrel készített adHAp-II és adHAp-III rétegeknél nem mutatnak statisztikailag szignifikáns különbséget. Az adHAp-II esetében 85% 2 nap sejtenyésztés után, ami 90%-ra növekszik a kéthetes tenyésztés alatt, a kontrollmintához viszonyítva. Az adHAp-III esetében pedig 84% 2 nap után és 92% a kéthetes sejtenövesztést követően. Ezek az értékek kivételesen jó biokompatibilitásról tanúskodnak. A HAp-II rétegen mért sejtleletképesesség 2 hét tenyésztés után 81%, ami valamennyivel alacsonyabb érték ugyan, de még mindig jó biokompatibilitásra utal. A titán ötvözet alapfémnél két nap sejtenövesztés után a sejttúlélés 81,5%-os, míg 2 hét után csak 72% körüli. Ez időben csökkenő tendenciát mutat, ellentétben a hidroxipatit rétegek esetében tapasztalt növekvő értékekkel. Az alapfémen és a tiszta HAp rétegeken kapott sejtleletképeségi értékek különbségei statisztikailag nem szignifikánsak ( $p = 0,94$ ), azonban az alapfém és az ionokkal módosított HAp rétegek esetében ez a különbség már statisztikailag szignifikáns ( $P < 0,01$ ). Kimutattam, hogy a 6. nap utáni sejtleletképeségi értékek minden egyes minta esetében kisebb százalékos értékeket adtak, mint a 2. nap utániak. Ezt a jelenséget a sejtdifferenciálódásnak tulajdonítottam. Kutatások bizonyították, hogy amikor a sejtek a differenciálódás állapotában vannak, vagyis amikor a sejtek szerkezetében és működésében változás következik be a fejlődésük és növekedésük alatt, kisebb metabolikus aktivitást mutatnak. Mivel a sejtleletképesesség méréséhez használt WST reagensek működési alapja a sejtek metabolizmusának mérése, ezért az életképes, de differenciálódó sejteknél szükségszerűen kisebb értéket mutatnak [289-291]. Esetünkben ezért elképzelhető, hogy a 6. napon történt mintavételkor a sejtek jelentős része éppen a differenciálódás szakaszában volt.

Kimutattam, hogy 2 hetes sejtenyésztés után a tiszta HAp-II mintán valamint az adHAp-II és adHAp-III mintákon mért sejttúlélési százalékok közötti különbségek statisztikailag még szignifikánsabbá váltak az alapfémhez képest ( $P < 0,001$ ). A mérésekkel igazoltam, hogy a rétegek javították az alapfém biokompatibilitását, valamint, hogy a különböző bioaktív ionokkal megfelelő arányban és mennyiségben történő beágyazás szintén előnyösen javítja a sejtleletképeséget.

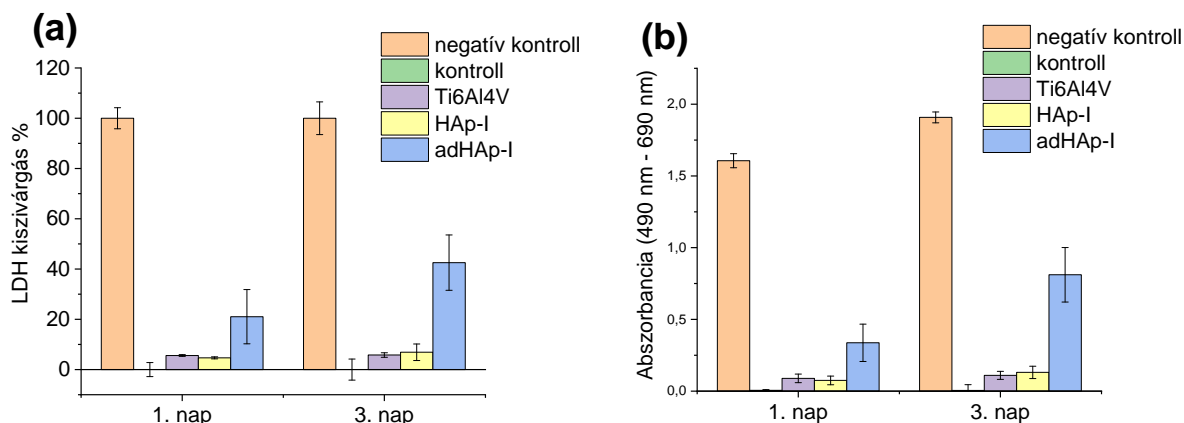
A hidroxipatit bevonat elősegíti a csontsejtek megtapadását és növekedését, mivel erőteljesen hidrofíliát jellemez [292, 293]. A bevonat morfológiája szintén befolyásolja a sejtek tapadását, azaz minél nagyobb a felület érdessége, annál jobban meg tudnak tapadni a sejtek. A kifejlesztett bevonatok fel kellene derítenie, hogy a HAp klaszterek formájában, nemfolytonosan van jelen az alapfémen, megnöveli annak érdességét és az érintkezési felület nagyságát. A

bevonat szerkezete rendkívül porózus, hasonlóan a csontokéhoz, ami még jobban el segíti a sejtek megtapadását és növekedését.

## 5.7. Laktát dehidrogenáz teszt

### 5.7.1. LDH teszt a citotoxicitás vizsgálatára vastag bevonatokon

A mérések során a rétegek citotoxikus jellegét határoztam meg. A mérés elve azon alapul, hogy a sejtek plazmamembránjának károsodása miatt megváltozik annak átjárhatósága és bizonyos komponensek a membránon belülre kiszivároghatnak a tápoldatba. A laktát dehidrogenáz egy stabil citoplazma enzim, ami megtalálható minden sejtben. A plazmamembrán károsodásakor ezek az enzimek gyorsan kiszivárognak a sejttényeszt folyadékba, így az LDH enzim jelzi a sejtmembrán integritásának sérülését. A nem életképes sejtek mennyiségének meghatározására kereskedelmi forgalomban kapható LDH aktivitásmérő tesztet, a „Cytotoxicity Detection Kit”-et használtam. Ez a teszt kolorimetriásan méri a károsodott sejtekből kiszivárgó LDH enzimet azáltal, hogy a reaktáns tetrazólium só (INT) formázán festékké alakítja. A keletkezett festékanyag koncentrációja egyenesen arányos a halott sejtek számával.



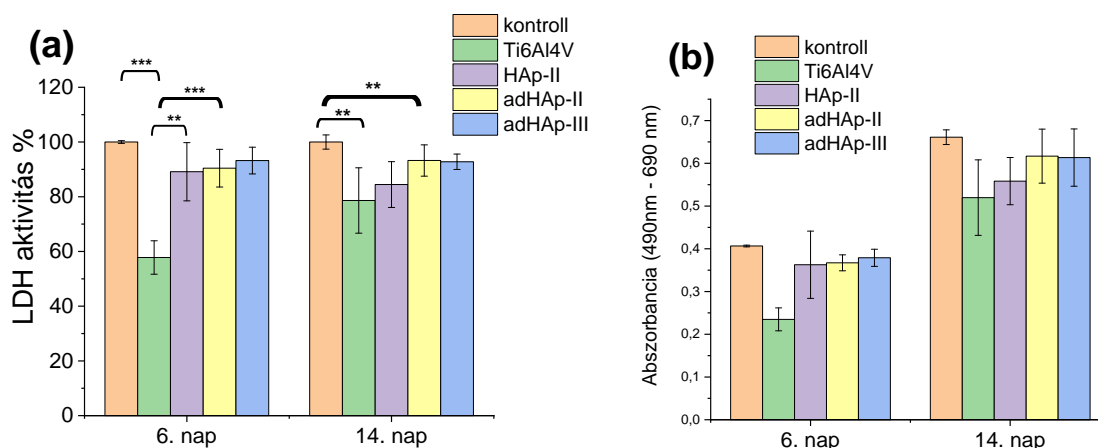
**5.20. ábra:** Laktát dehidrogenáz koncentráció alapfémen (Ti6Al4V) valamint HAp-I és adHAp-I vastag bevonatokon 1 és 3 nap sejttényesztés után. (a) Százalékos arányban a kontrollmintához viszonyítva és (b) a mért átlagabszorbancia értékek (átlagérték  $\pm$  szórás). Kontroll: csak MG-63 sejtek növekedtek a tápoldatban. Negatív kontroll: csak halott sejtek.

Az LDH mérésekkel kimutattam, hogy a halott sejtek száma az alapfémen és a HAp-I rétegen egyaránt alacsony, mindössze 4-5% és nem növekszik a sejttényesztési idővel. Azonban az adHAp-I rétegnél már nagyobb mennyiségű halott sejtet mértünk, 21% 1 nap és 42,5% 3 nap

sejtenyésztés után. Ez mutatja a réteg rosszabb biokompatibilitását, ami a sejtenyésztési idővel sem javult.

### 5.7.2. LDH teszt a sejtszám meghatározására nemfolytonos bevonatokon

Az LDH aktivitás a minták felületére tapadt sejtek mennyiségéről ad felvilágosítást. Kereskedelmi forgalomban kapható tesztkészletet (TOX7, Sigma Aldrich) használtam a vizsgálatokhoz. A mérések során mesterséges sejthalált idéztem elő lízis puffer segítségével, ami a mintákra tapadt sejtek membránjának roncsolásával elősegítette az LDH enzim kijutását a citoplazmába illetve a sejtenyésztési folyadékba. A sejtszámot az LDH enzim aktivitásának mérésével határoztam meg, ami egyenesen arányos a formázón festékanyag abszorbanciájának nagyságával 490 nm-en, amit UV-VIS spektrofotométerrel (Specord 40) mértem.



**5.21. ábra:** LDH aktivitás a vizsgált mintákon 6 és 14 nap sejtenyésztés után. (a) Százalékos arányban a kontrollmintához viszonyítva, (kontrollként csak MG-63 sejtek növekedtek a tápoldatban) és (b) a mért átlagabszorbancia értékek (átlagérték  $\pm$  szórás). A statisztikai különbség szintjét p-értékek adják a kontrollhoz és titán ötvözet alapfémhez képest. A grafikonokban megadott statisztikai szignifikanciaszintek: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  és \*\*\* $P < 0,001$ .

Az LDH aktivitás teszt szerint az adHAp rétegeken növekedett a legtöbb MG-63 sejt, míg a legkevesebb az alapfémeken, mindössze 57,7% egy hét után és 78 % két hét után a kontrollhoz képest (5.21. ábra). A sejtek száma növekedett a tenyésztési idővel. Egy hét tenyésztési idő után a HAp-II rétegek esetében némileg kisebb abszorbancia volt mérhető az adHAp bevonatokéhoz képest, azonban ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Kéthetes sejtenyésztés után ez a különbség már növekedett, az LDH értékek statisztikailag

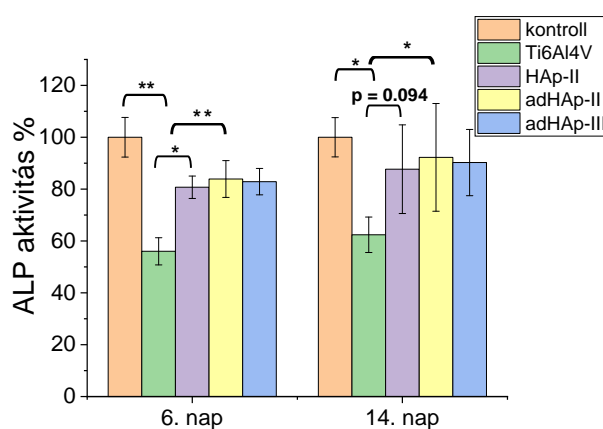
szignifikánsan nagyobbak voltak mind a tiszta HAp, mind a adHAp bevonatok esetében a bevonat nélküli alapfémhez képest ( $p < 0,01$ ).

Százalékosan kifejezve, a sejtszám 32,8%-kal nagyobb a HAp bevonatnál, 33%-kal az adHAp-II bevonatnál és 38,3%-kal az adHAp-III bevonat esetében az alapféméhez képest egy hét sejtnövesztés után. Két hét után azonban a mért különbségek csökkentek. A kontrollminta LDH értékei és az adHAp bevonatoknál mért értékek nem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget. A mérések igazolták, hogy az ionokkal adalékolt HAp rétegek megközelít leg olyan jó eredményeket adtak, mint a kontrollminta, amikor a sejtek ideális körülmények között növekedhettek.

Összefoglalva, a legnagyobb LDH aktivitást, így a legnagyobb sejtszámot az adHAp-II és adHAp-III rétegeken kaptam.

### 5.8. Alkalikus foszfatáz (ALP) teszt

Az ALP az egyik legfontosabb oszteogén, csontképző markervegyület, amit az MG-63 csontsejtek képesek termelni. Kísérleteim során az ALP teszteket nemfolytonos HAp és ionokkal módosított HAp rétegeken végeztem.



**5.22. ábra:** Különböző minták felületére ültetett MG-63 csontsejtek ALP termelése 6 és 14 nap sejtenyésztés után (átlagérték  $\pm$  szórás). Pozitív kontrollként csak az MG-63 sejtek növekedtek a sejtenyésztés tálcájában. A statisztikai különbség szintjét p-értékek adják a kontrollhoz és titán ötvözet alapfémhez képest. A grafikonokban megadott statisztikai szignifikanciaszintek: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  és \*\*\* $P < 0,001$ .

Az ALP teszt megmutatta, hogy a HAp és adHAp rétegekre ültetett sejtek ALP termelése 25 - 30%-kal nagyobb, mint a bevonat nélküli alapfémre (Ti6Al4V) ültetett sejteké mindegyik vizsgálati időpontban (5.22. ábra). Az ALP aktivitás növekedett a tenyésztési idővel. Hat nap

sejtnövesztés után a HAp és adHAp rétegek ALP értékei statisztikailag nagyobbak ( $p < 0,05$ ) a Ti6Al4V alapféméhez képest, azonban a HAp és adHAp rétegeken mért ALP értékek nem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget a kontrollminta esetében kapottakhoz képest.

Két hét sejtnövesztés után csak az adHAp rétegen és Ti ötvözet alapfémen mért ALP értékek, valamint a kontroll és a Ti ötvözet ALP értékei voltak statisztikailag különbözök ( $p < 0,05$ ). A legnagyobb ALP termelést minden egyes vizsgálati időpontban az adHAp rétegeken növesztett sejteknél mértem. A kétféle módszerrel elállított adHAp-II és adHAp-III rétegeknél hasonló értékeket kaptam. Az is elmondható, hogy a HAp és adHAp rétegeken valamint a Ti6Al4V alapfémen és a HAp rétegen mért ALP értékek nem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget ( $p = 0,094$ ).

Zhao és mtsai [294] leírták, hogy a magnéziummal adalékolt HAp bevonaton kétszer nagyobb ALP aktivitást mértek, mint a magnézium nélküli HAp esetében már 7 nap sejtnövesztés után. Yang és mtsai [295] pedig azt vizsgálták, hogy milyen hatása van a cinkkel adalékolt hidroxipatit bevonatnak (ZnHAp) a preoszteoblaszt, MC3T3-E1 sejtekre. A rétegeket elektrokémiai úton készítették 1,04 mol% Zn tartalommal. Azt tapasztalták, hogy a Zn helyettesítés növelte az ALP aktivitást és elősegítette a sejtosztódást. Bueno és mtsai [296] a stronciummal adalékolt HAp nanokompozitok hatását vizsgálták az OFCOLL II oszteoblaszt sejtek differenciálódására. Tanulmányokban bizonyították, hogy a stroncium jelenléte a hidroxipatitban (SrHAp) előnyösen hat az oszteoblaszt és oszteoklaszt növekedésre és elősegíti az oszteoblaszt sejtek ALP aktivitásának növekedését [297].

A kísérleteim során kapott eredmények összhangban vannak a fentiekben említett kutatásokkal. A bevonatolt mintákon az MG-63 csontsejtek ALP termelése szignifikánsan megnövekedett az alapféméhez képest.

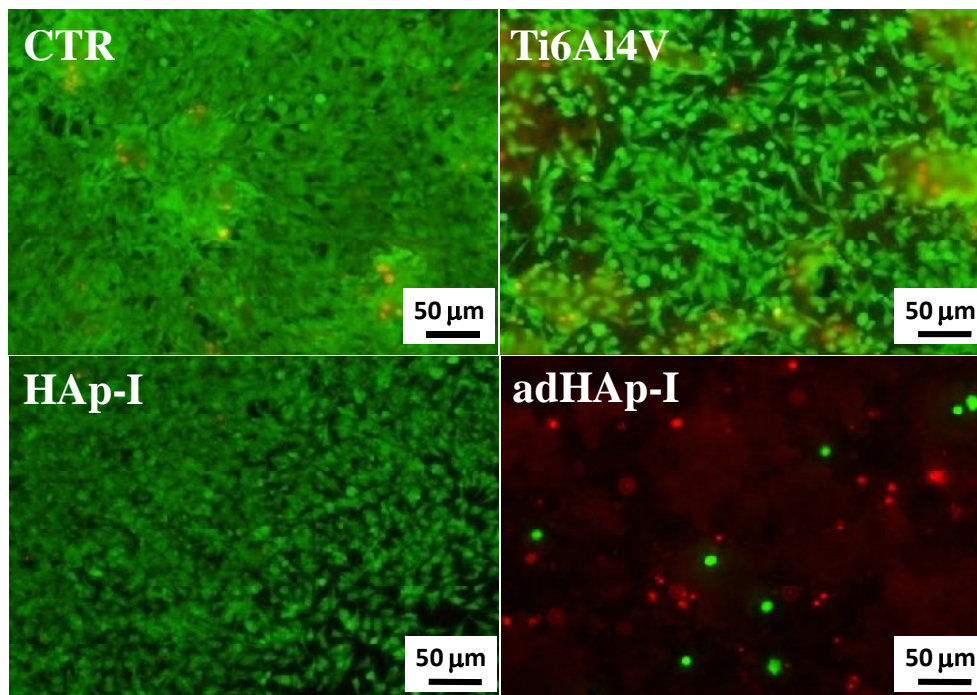
## 5.9. Sejtfestési vizsgálatok (Calcein, DAPI, LIVE/DEAD)

### 5.9.1. LIVE/DEAD sejtfestés vastag bevonatokon

A mérések során az élő sejteket az intracelluláris észteráz enzim aktivitása alapján azonosítottam, a 4.6.3 alfejezetben leírtak szerint.

A sejtfestési kísérletek megmutatták, hogy a kontrollcsoportnál, valamint az alapfémen és a HAp-I rétegen az MG-63 sejtek normál morfológiával, sorban növekedtek (5.23. ábra). Mindegyik esetben nagyszámú élő sejtet találtam. A legsorban fedett a kontrollminta és a HAp-I minta volt, míg az alapfémen némileg kevesebb sejt látható. A halott sejtek aránya ezekben az esetekben nagyon alacsony. Az adHAp-I minta felszínén azonban már nagyszámú

halott sejt és kevés él sejt található, ami mutatja a réteg rosszabb biokompatibilitását és citotoxikus jellegét a nagy koncentrációban jelenlevő antibakteriális komponenseknek köszönhetően.

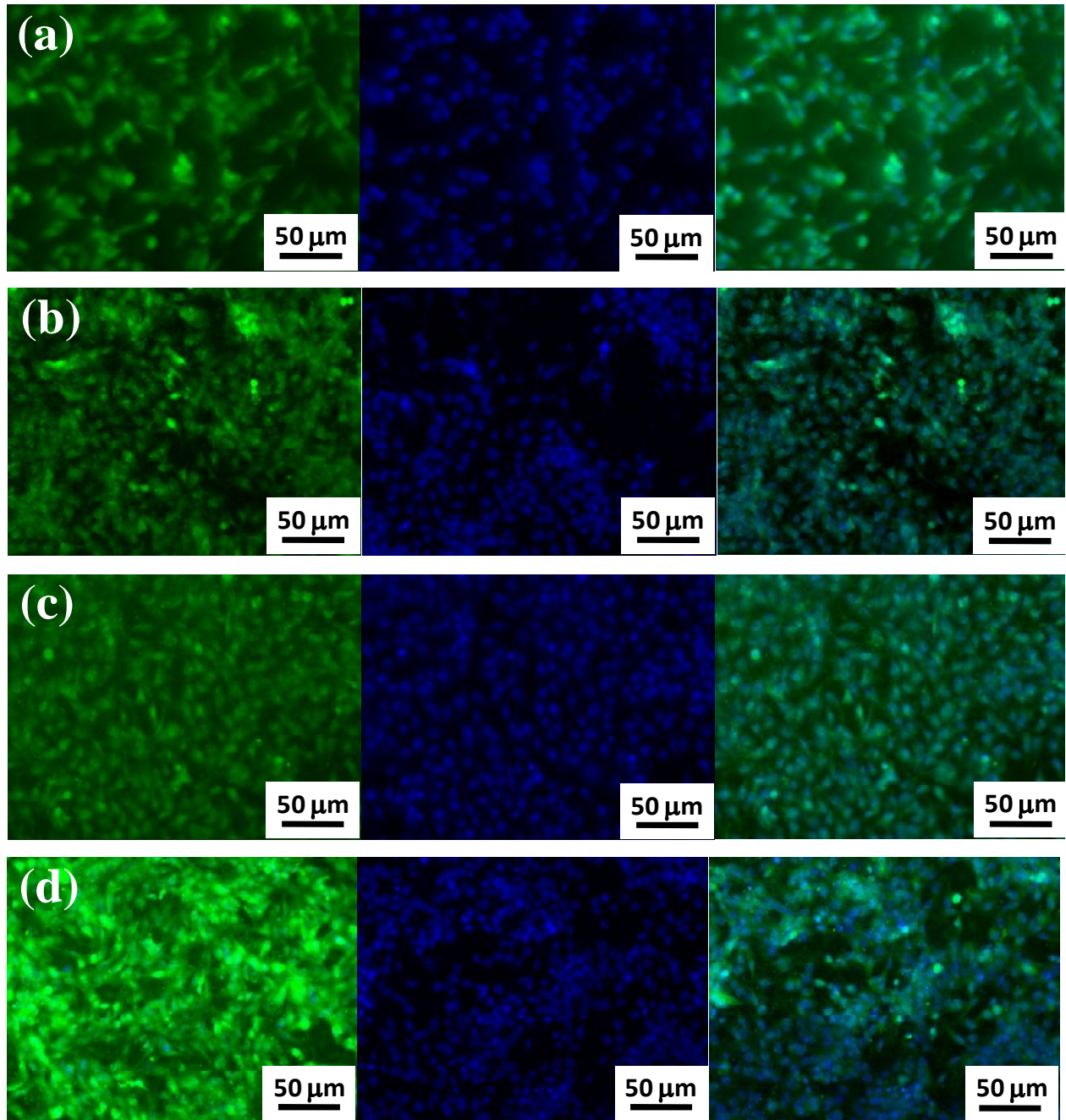


**5.23. ábra:** Sejtfestés különböző mintákon növesztett MG-63 sejteken 4 nap sejtenyésztés után (zöld festés: él sejt, piros festés: halott sejt). CTR: kizárólag MG-63 sejteket tartalmazó minta.

### 5.9.2 Calcein/DAPI festés nemfolytonos bevonatokon

A különböző minták felszínére ültetett MG-63 sejtek fluoreszcens Calcein és DAPI festését 2 nap sejtnövesztés után végeztem (5.24. ábra). A calcein festés alapja szintén a minden él sejtben megtalálható intracelluláris észteráz enzim aktivitásának mérése. A fluoreszcens DAPI festékanyag viszont a sejtmagot jelzi. Szelektíven és erősen kötődik a kétszálú DNS-ben az A-T bázispárokban gazdag régióhoz. A festékanyag át tud áramlani a sértetlen sejtmembránon. Használható mind él, mind halott (fixált) sejtek jelzésére, azonban az él sejtek membránjainak átjárhatósága rosszabb, így a festés hatékonysága is romlik. A DNS-hez kötődött DAPI festékanyag abszorpciós maximuma 358 nm-en mérhető (ultraibolya tartomány), míg az emissziós maximuma 461 nm-en van (kék tartomány)





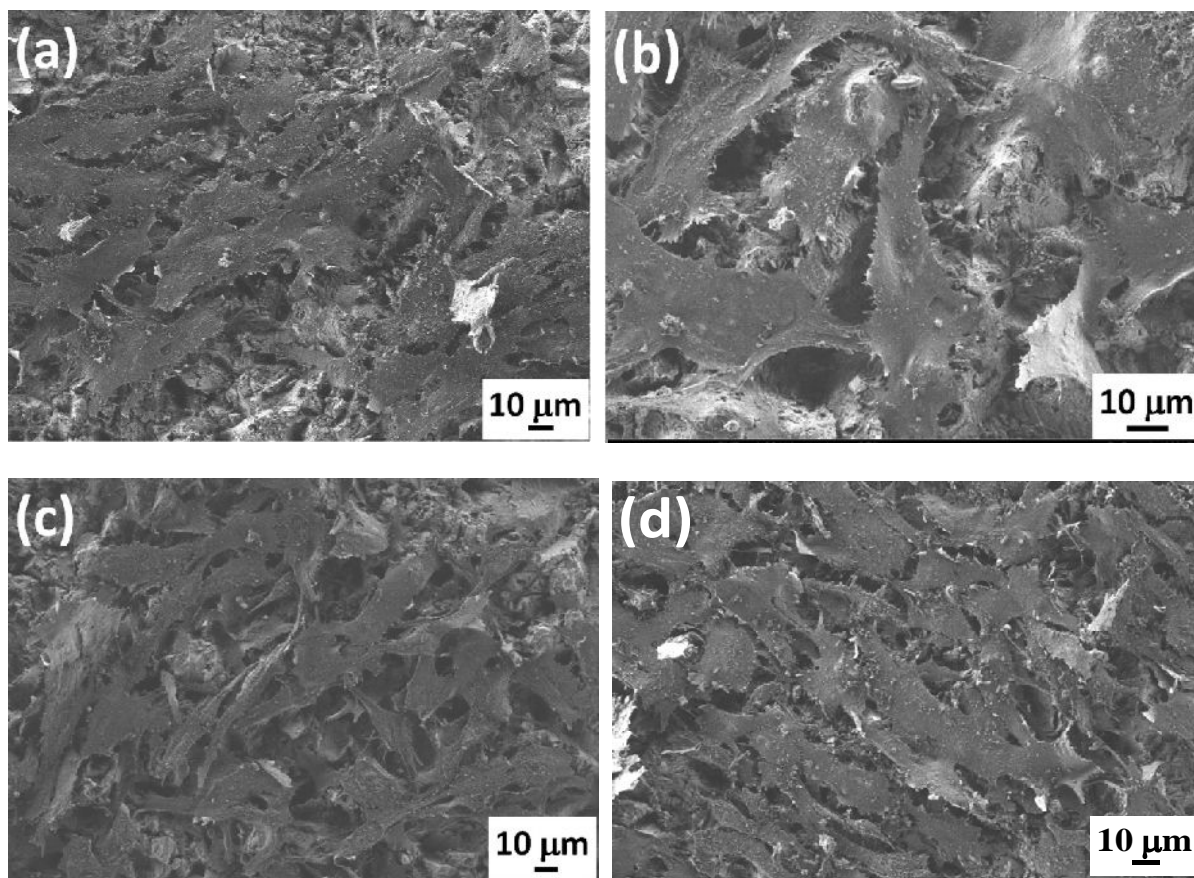
**5.24. ábra:** Fluoreszcens optikai mikroszkópos felvételek a különböző mintákra ültetett MG-63 csontsejtek Calcein (zöld fluoreszcens) és DAPI (kék fluoreszcens) festésér 1-2 nap sejtenyésztés után. (a) Ti6Al4V alapfém, (b) HAp-II, (c) adHAp-II és (d) adHAp-III mintákon. 1. oszlop: Calcein festés, 2. oszlop: DAPI festés, 3. oszlop: Calcein/DAPI festés együtt ábrázolva.

A Calcein/DAPI sejtfestési kísérletek igazolták, hogy az MG-63 sejtek sűrűn és egyenletesen nőtték a mintákon. A sejtek normál morfológiával növekedtek, hosszúka, elnyújtott formában, nagy sejtmaggal. A sejtek elnyújtott, sokszögű formája arra utal, hogy megfelelően

tapadtak meg a felületen. A HAp és az ionokkal adalékolt HAp bevonatoknál minden esetben nagyobb sejtszám tapasztalható, a sejtek sűrűn, tömötten és több rétegben helyezkednek el a felületen.

#### 5.10. MG-63 sejtek morfológiai vizsgálata

Az alapfémen, valamint a nemfolytonos bevonatokon növesztett MG-63 sejtek morfológiáját tovább tanulmányoztam SEM felvételek segítségével. Két nap DMEM közegben történő sejtenyésztés után a sejteket fixáltuk a minták felületén a SEM mérések előtt.



**5.25. ábra:** SEM felvételek különböző mintákon növekedett MG-63 sejtekről 2 nap sejtenyésztés után. (a) TiAl4V alapfém, (b) HAp-II bevonat, (c) adHAp-II bevonat és (d) adHAp-III bevonat.

A morfológiai vizsgálatok megmutatták, hogy a sejtek szétterültek a mintákon, ami a megfelelő tapadásukra utal (5.25. ábra). Az alakjuk főként sokszögű, elnyújtott, a vándorló sejtekben megjelenő vékony citoplazmatikus nyúlványokkal. A sejtek teljesen befedték a HAp és adHAp minták felszínét vastag, folytonos rétegben és a minták felszínének néhány részén több rétegben is növekedni kezdtek.

Megfigyeléseim alapján az alapfém esetében a fedettség nem tökéletes, néhol a fémfelszín is látható a sejtek mellett (5.25. (a) ábra). A sejtszám valamivel nagyobb a HAp-II és az ionokkal adalékolt HAp rétegeken, mint az alapfémen és a sejtek jobban szétterjedtek a bevonatolt mintákon. A sejtek morfológiája nem különbözik a HAp és adHAp bevonatokon. Ennek alapján kijelenthet , hogy a bevonatok javítják a sejtek megtapadását, ezzel el segítve a sejtosztódási folyamatokat.

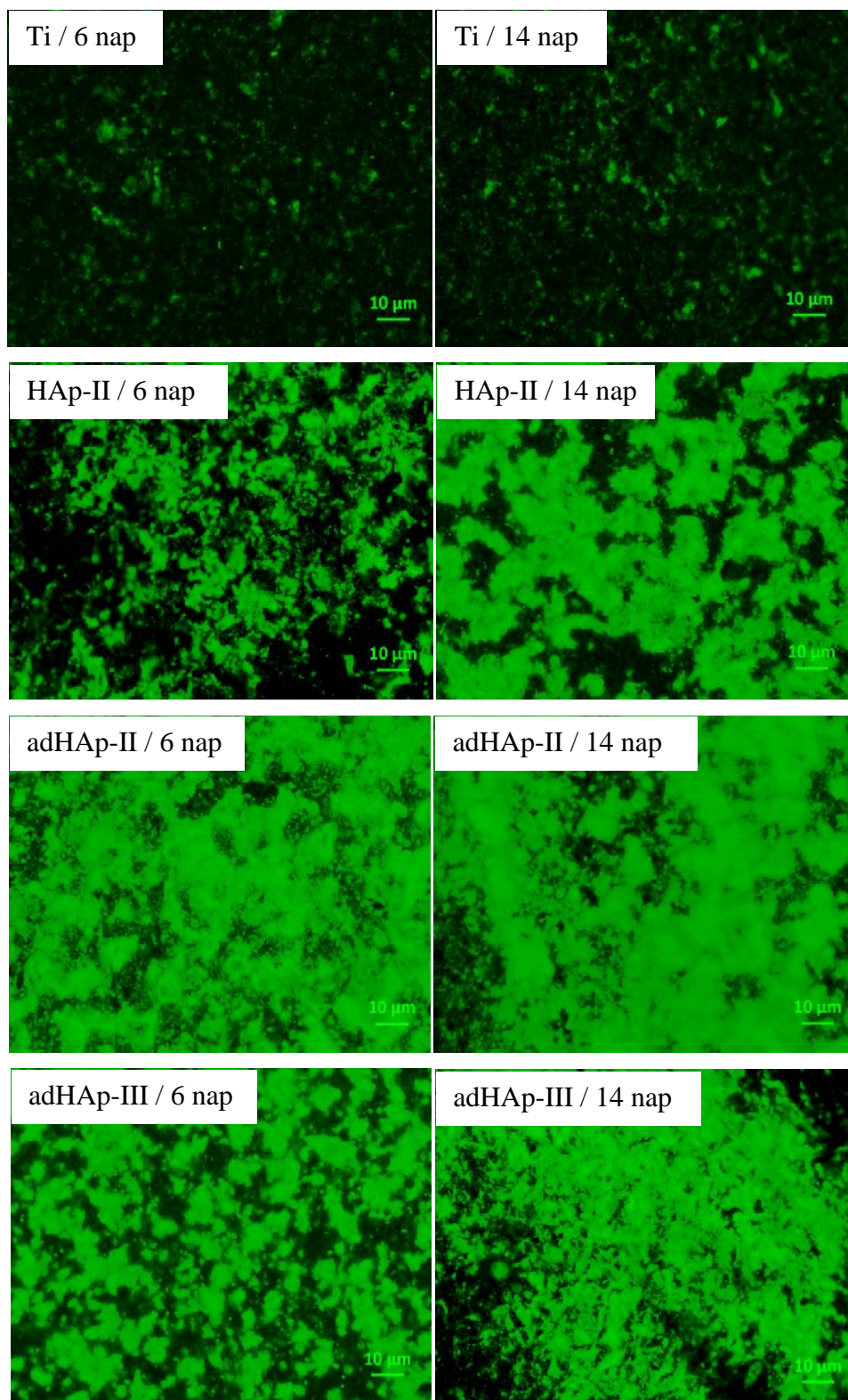
A felvételek eredményei összhangban vannak a Calcein/DAPI festésnél kapott eredményekkel.

### **5.11. OsteoImage™ Mineralizációs vizsgálatok kiértékelése**

Fluoreszcens optikai felvételekkel kimutattam, hogy a bevonat nélküli alapfém esetében a sejtek csontosodásának hatására termel d hidroxipatit szórványosan, foltokban van jelen és kis mennyiségben. A bevonatolt mintáknál azonban már szembet n változás figyelhet meg. A megjelölt hidroxipatit nagy mennyiségben van jelen és er teljes zöld fluoreszcens színt mutat. A hidroxipatit fázishoz speciálisan köt d festékanyag ezekben az esetekben a sejtek által termeltek mellett megjelölte a bevonatot is. Így fontos megjegyezni, hogy mivel a sejttenyésztés el tti állapotról nem készültek festések, a különböz módon el állított minták képeinek egymással való összehasonlítása nem lehetséges. Szemmel látható viszont, hogy a kéthetes sejttenyésztés után a mintákon a hidroxipatit mennyisége növekedett a hatnapos sejttenyésztéshez képest, ami mutatja a sejtek aktivitását.

Az 5.26. ábrán a 6 nap és 14 nap sejttenyésztés után elvégzett csontosodási festések láthatóak.

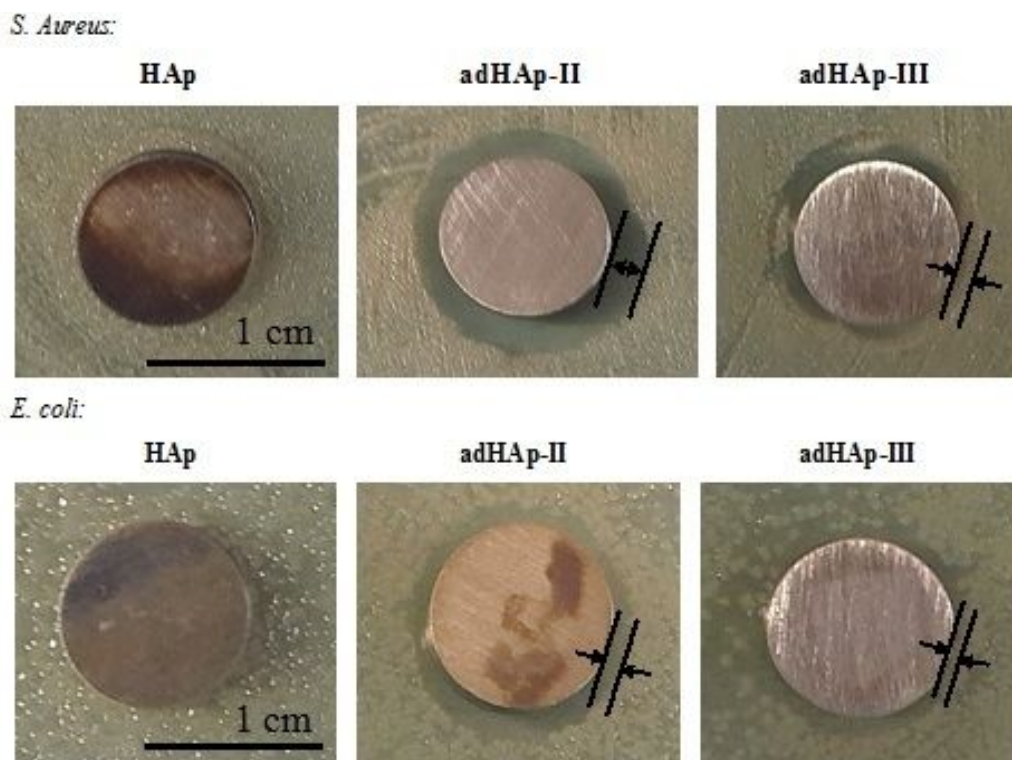




**5.26. ábra:** Csontosodási vizsgálatok különböző mintákra ültetett MG-63 sejtekkel 6 napos és 2 hétes sejtnövesztés után.

### 5.12. Antibakteriális hatás vizsgálata

Méréseim során az el állított, ionokkal adalékolt HAp rétegek antibakteriális hatásának mértékét is tanulmányoztam. A vizsgálatokhoz a két legáltalánosabban el forduló baktériumtörzset választottam ki, egy Gram pozitív (*S. Aureus*) és egy Gram negatív (*E. coli*) baktériumot. Három párhuzamos mérést végeztem. A vizsgált korongok átmér je 1 cm (5.27. ábra).



**5.27. ábra:** Antibakteriális tesztek nemfolytonos HAp-II és kétféle módszerrel készített adHAp bevonatokon kétféle (Gram+ és Gram-) baktériumtörzsszel szemben.

Az adHAp rétegek esetében gátlási zóna alakult ki a minták körül, miután 24 órán keresztül, 37 °C-on tartottuk a baktériumtenyészetekben (5.27. ábra). A tiszta HAp réteg nincs hatással a baktériumtörzsek növekedésére mivel nincs észrevehető gátlási zóna. Kimutattam, hogy a különböző módszerekkel el állított ionokkal adalékolt HAp bevonatok hatásosnak bizonyultak a kiválasztott baktériumtörzsekkel szemben. A gátlási zóna nagysága a hatékonyság mértékét mutatja, amit az 5.2. táblázatban foglaltam össze. Ahogy az 5.1. táblázatban az ICP-OES elemanalízis mutatja, az adHAp-II és adHAp III rétegekben az ezüst mennyisége hasonló, így az inhibíciós zónák nagyságában sem tapasztaltunk számottevő különbséget a két minta esetében, a mért értékek a szórási határon belüliek. A Gram+ *S. Aureus* baktériumtörzsszel szemben nagyobb gátló hatást fejtett ki mindkét módszerrel el állított ionokkal adalékolt HAp réteg, mint a Gram- *E. coli* baktériumtörzsszel szemben.

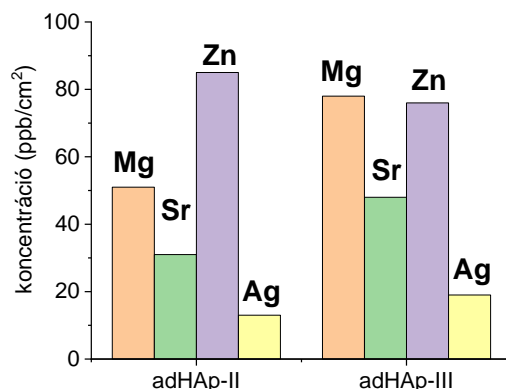
**5.2. táblázat.** Gátlási zónák a HAp és adHAp rétegek jelenlétében.

Mikroorganizmus	HAp gátlási zóna (mm)	adHAp-II gátlási zóna (mm)	adHAp-III gátlási zóna (mm)
<i>S. aureus</i>	0,0	1,7 ± 0,45	1,2 ± 0,34
<i>E. coli</i>	0,0	1,1 ± 0,14	0,7 ± 0,12

**5.13. Kioldódási vizsgálatok**

Az el állított minták biológiai hatásának még jobb feltérképezéséhez az el z ekben (5.5. fejezet) bemutatott korróziós tesztek kioldódási vizsgálatokkal egészítettem ki. A vizsgálat célja a bevonatokból kioldódó adalékoló ionok mennyiségének meghatározása. A mérésekhez a nemfolytonosan bevont mintákat 30 napon keresztül SBF oldatban tároltam, majd mintákat vettem a felülúszó folyadékból az ICP-OES elemzéshez. Az oldatokat további kezelés, feltárás nélkül közvetlenül injektáltuk a készülékbe. Minden mintából három párhuzamos mérést végeztünk. Az 5.28. ábra mutatja a kioldódott elemek koncentrációit ppb-ben, egységnyi aktív mintafelületre vonatkoztatva.

Kimutattam, hogy a kioldódott ezüstionok koncentrációja a legkisebb, mindössze 13 ppb/cm<sup>2</sup> az adHAp-II és 19 ppb/cm<sup>2</sup> az adHAp-III minta esetében.

**5.28. ábra:** Kioldódási vizsgálatok eredményei ionokkal adalékolt nemfolytonos HAp bevonatok 30 napon át SBF oldatban történt áztatása után.

Számos tanulmány [299, 300] foglalkozik az ezüst toxikus hatásának vizsgálatával és a különféle egészségügyi szervezetek is nagy hangsúlyt fektetnek a minimális toxikus dózis (MTD) értékének a meghatározására. Az OSHA (US Occupational Safety and Health Administration) legfrissebb útmutatója [301] szerint a megengedett maximális expozíció

határérték ezüstre  $0,01 \text{ mg/m}^3$ , ami még semmilyen káros hatást nem fejt ki. Az EPA [302] (US Environmental Protection Agency) szerint a szájon át bevehető ezüst határértékének az  $5 \text{ } \mu\text{g}/\text{testsúlykg}$  értéket javasolja és az ivóvíz maximális ezüstartalmát  $0,1 \text{ mg/L}$ -nek állapította meg. Ezzel az értékkel a WHO is egyetért. Megállapításuk szerint ez az érték fele annak, amit egy átlagos ember 70 éven át történő expozíció során minden káros hatás nélkül tolerálni tud. Ezeket az adatokat figyelembe véve látható, hogy az általam kifejlesztett HAp bevonatokban megtalálható ezüst mennyisége bven a meghatározott határértékek alatt található, így semmilyen káros hatást nem fejtenek ki az emberi szervezetre még hosszú idejű expozíció esetén sem.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során impulzus áramú elektrokémiai leválasztással (kis- és nagyfrekvenciás áramimpulzusok alkalmazásával) és megfelelő felület-utókezeléssel sikeresen állítottam el hidroxiapatit (HAp) és különböző bioaktív és antibakteriális elemekkel adalékolt HAp rétegeket fémes implantátumok felületére. Az alkalmazott eljárás fő célja, hogy olcsó, könnyen megvalósítható és léptéknövelhető. A rétegek fizikai-kémiai tulajdonságai javíthatók a impulzusos áram alkalmazásával az egyenáramú leválasztáshoz képest, mivel megfelelő paraméterek kiválasztásával a leválasztott részecskék mérete csökkenthető. Az elektrokémiai eljárás során az elektrolit kalcium-nitrátot tartalmazott, mint Ca forrást és ammónium-dihidrogén-foszfátot, mint foszfor forrást, valamint hidrogén-peroxidot a hidrogénfejlesztés visszaszorítására. Tanulmányoztam a leválasztási paraméterek hatását a rétegek fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaira, valamint morfológiájára. A morfológiai vizsgálatok alapján a tiszta HAp rétegek főként tiszta, hosszúk kristályokból épültek fel, azonban a nagyfrekvenciájú áramimpulzusokkal (500 Hz) leválasztott bevonatokban néhány nagyobb, szabálytalanul összetett részecske is megfigyelhető volt. Ebben az esetben a részecskék méreteloszlása nem egyenletes és a határok között (100 nm – ~2 µm) változott. Ellenben a kisfrekvenciával (90 Hz) leválasztott rétegeknél azt tapasztaltam, hogy a tiszta kristályok mérete kisebb, a méreteloszlásuk egyenletesebb. A kiterjedt kísérleti munka alapján igazolható, hogy a kisfrekvenciájú áramimpulzusokkal leválasztott rétegek jobb, egyenletesebb nanostruktúrával rendelkeztek.

Munkám során a megfelelően optimalizált leválasztási paraméterekkel elsősorban sikerült olyan HAp és ionokkal adalékolt HAp klasztereket növesztetni az implantátum anyagra, amelyek nem folytonosan fedték be a felületet. A szerkezeti vizsgálatokkal igazoltam, hogy ezek a nemfolytonos HAp klaszterek szabálytalan formájú, mintegy 100 µm kiterjedésű leválások, melyek vastagsága 1–2 µm között mozgott. Sejtletképességi tesztekkel bizonyítottam, hogy ezek a biokerámia szigetek megnövelték az implantátum biokompatibilitását, kedvező hatással voltak a csontsejtek megtapadására és növekedésére. Emellett, az elállított hidroxiapatit klaszterek nagyon porózus mikrostruktúrával rendelkeztek, ami hasonló a természetes csont szerkezetéhez.

Az adalékoló ionok rétegbe történő beviteléhez többféle módszer kombinációját alkalmaztam. Ezek a módszerek az elektrokémiai leválasztás valamint a megfelelő oldatokban történő áztatás, felületre cseppentés és hőkezelés kombinációja. Az eljárások során alkalmazott oldatok megfelelő koncentrációban tartalmaztak bioaktív  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  és



$\text{Sr}^{2+}$  ionokat valamint antibakteriális  $\text{Ag}^+$  ionokat. Az el állítás során optimalizáltam az adalékoló ionok koncentrációját a rétegben annak érdekében, hogy az implantátum biokompatibilitása javuljon. A rétegben jelenlev ezüst mennyiségét úgy állítottam be, hogy az ne haladja meg az egészségügyi határértéket, ne fejtsen ki citotoxikus hatást a csontsejtekre, viszont gátolja a káros baktériumok megtapadását és ezáltal a biofilm kialakulását. Elemösszetétel vizsgálatokkal kimutattam az adalékoló ionok jelenlétét mindegyik ionokkal adalékolt minta esetében. A rétegekben jelenlev ionok pontos koncentrációját ICP-OES elemzéssel határoztuk meg, a minták salétromsavas feltárását követ en. A mérések kimutatták, hogy a csak elektrokémiai úton el állított, ionokkal adalékolt HAp rétegben az adalékoló ionok nagyobb százalékban voltak jelen: 19,66 at% Zn és 5,98 at% Ag, míg az elektrokémiai és felület utókezelési eljárások kombinációjával el állított rétegben már jóval kisebb arányban voltak mérhet ek: 1,83-2,80 at% Mg, 0,45-1,68 at% Sr, 1,06-1,64 at% Zn és mindössze 0,12-0,18 at% Ag.

Az el állított rétegek kristályszerkezetének vizsgálatával és fázisösszetételének meghatározásával igazoltam, hogy a bevonatok f ként hidroxiapatitból épülnek fel. Az elektrokémiai úton el állított rétegben azonban egyéb fázisok is kimutathatóak voltak, úgymint monetit 20,1 m/m%, parascholzit 36,8 m/m% és fémes Ag 3,4 m/m% arányban. A nemfolytonosan leválasztott ionokkal adalékolt rétegekben azonban a adalékoló elemek fázisai nem voltak kimutathatóak. Az FT-IR spektrumokon szintén csupán a kalcium-foszfát ásvány összetett anionos csoportjainak karakterisztikus abszorpciós csúcsait figyelhettük meg minden egyes minta esetében.

Tanulmányoztam a nemfolytonosan leválasztott bevonatok korróziós tulajdonságait, lebomlását szimulált biológiai környezetben, mesterséges testfolyadékban (SBF). A kísérleti eredmények megmutatták, hogy a mért korróziós áramok a bevonatok esetében szisztematikusan nagyobbak voltak, mint az alapfém esetében. Potenciodynamikus görbék felvételével igazoltam, hogy az alapfém korróziós árams r sége volt a legkisebb,  $150 \text{ nAcm}^{-2}$  körüli, és a bemeztési id vel szinte alig változott. A HAp bevonat korróziós árama a bemeztés kezdeti id szakában enyhe növekedést mutatott, majd az 5. nap után beállt egy viszonylag állandó értékre, ami megközelít leg  $350 \text{ nAcm}^{-2}$  volt. Az ionokkal adalékolt rétegek esetében azonban a mért korróziós áramok már jóval nagyobbak voltak, mintegy 6-7-szeresei az alapfém esetében mérteknek és id ben növekv tendenciát mutattak. Ez igazolta a bevonatok megnövekedett korróziós hajlamát, degradációját, és hogy oldódási folyamatok mentek végbe, melyek során  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  és  $\text{Ag}^+$  ionok kerültek az elektrolitba.

A kísérleti munkám során kifejlesztett rétegek biológiai hatékonyságát, biokompatibilitását MG-63 oszteoblaszt sejteken teszteltem. A biológiai vizsgálatok során igazoltam, hogy a nemfolytonosan leválasztott, ionokkal adalékolt HAp rétegek jelentősen javították az implantátum biokompatibilitását.

A sejttúlélési mérések a nemfolytonos HAp és adHAp mintákon kimutatták, hogy a sejttúlélési arány minden egyes vizsgálati időpontban az ionokkal módosított HAp rétegeken (adHAp-II és adHAp-III) a legnagyobb, valamint hogy a sejttúlélési értékek a két különböző módszerrel készített adHAp rétegnél nem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget. A sejttúlélés mindkét adHAp minta esetén eléri, illetve meghaladja a 90%-ot a kontrollmintához képest a kéthetes tenyésztés alatt. Ezek az értékek kivételesen jó biokompatibilitásról tanúskodnak. Eredményként mintegy 20%-kal nagyobb sejttúlélést figyeltem meg az adHAp rétegeken mint a Ti6Al4V alapfémeken két hét sejtnövesztés után. Azonban az elektrokémiai úton leválasztott adHAp-I rétegnél alacsony sejttúlélést tapasztaltam: a sejttúlélési százalékok csak 23% voltak az első nap után és 18,5% a harmadik napon. Ezzel igazoltam, hogy a réteg a benne lévő nagy mennyiségű Ag és Zn tartalom miatt már citotoxikus hatást fejtett ki a sejtekre.

Kísérleteim során LDH és ALP teszteket is végeztem a nemfolytonosan leválasztott HAp és adHAp mintákon. Az eredmények megnövekedett sejtszámot mutattak a HAp, adHAp-II és adHAp-III mintákon. Százalékosan kifejezve a sejtszám 32,8%-kal nagyobb volt a HAp bevonatnál, 33%-kal az adHAp-II bevonatnál és 38,3%-kal az adHAp-III bevonat esetében az alapféméhez képest egy hét sejtnövesztés után. Emellett a HAp és adHAp rétegekre ültetett sejtek ALP aktivitása 25 - 30%-kal nagyobb volt, mint a bevonat nélküli alapfémre ültetett sejteké minden egyes vizsgálati időpontban. Az is észrevehető volt, hogy az ALP aktivitás növekedett a tenyésztési idővel.

Munkám során sejtfestési teszteket is alkalmaztam az életképes sejtek jelölésére. A tesztek nagyszámú élő sejtet mutattak ki a HAp, adHAp-II és adHAp-III nemfolytonos rétegeken. A sejtek színén, több rétegben láttak a minták felületén megfelelő morfológiával. Azonban az adHAp-I minta esetén csak nagyszámú halott sejt és kevés élő volt megfigyelhető. Ezek az eredmények igazolták a sejttúlélési tesztek eredményeit.

Az adHAp-II és adHAp-III mintákon elvégzett antimikrobiális tesztek kimutatták, hogy a minták hatékonyak bizonyultak a kiválasztott baktériumtörzsekkel (Gram+ és Gram-) szemben, amit a körülöttük kialakult gátlási zóna is mutatott. Azt tapasztaltuk, hogy a Gram+ *S. Aureus* baktériumtörzsszel szemben nagyobb gátló hatást fejtett ki mindkét módszerrel előállított ionokkal adalékolt HAp réteg, mint a Gram- *E. coli* baktériumtörzsszel szemben.

Munkám során vizsgáltam az adalékoló ionok kioldódását az adHAp-II és adHAp-III minták hosszú idejű SBF folyadékba történő beáztatása után. A méréseket ICP-OES készülékkel végeztük. Az eredmények alapján az összes adalékoló elem kimutatható volt az oldatban ppb koncentrációtartományban. A kioldódott ezüst mennyisége mindössze  $13 \text{ ppb/cm}^2$  az adHAp-II és  $19 \text{ ppb/cm}^2$  az adHAp-III minta esetében, ami jóval a toxicitási határérték alatti.

Eredményeimet összegezve elmondható, hogy környezetbarát és költséghatékony eljárásokkal előállíthatóak biokompatibilis és antibakteriális, porózus, különféle bioaktív ionokkal adalékolt hidroxipatit nemfolytonos bevonatok, klaszterek a kereskedelmi forgalomban használt fémmimplantátum felületeken, akár ipari méretekben is. Az előállítás módja és paraméterei jelentősen befolyásolhatják a bevonat szerkezetét, fizikai-kémiai jellemzőit és biológiai aktivitását.

## 7. SUMMARY

During my research, I successfully produced hydroxyapatite (HAp) and various HAp layers doped with bioactive and antibacterial elements onto metallic implants using pulse current electrochemical deposition (using low and high frequency current impulses) and appropriate surface post-treatment. The main advantage of the novel, developed method is its simpleness and inexpensiveness. Moreover, this method is easy to implement and scale-up. The physico-chemical properties of the HAp layers can be improved by applying pulse current compared to the DC deposition, since the size of the deposited particles can be reduced by selecting the appropriate parameters. In the electrochemical process, the electrolyte contained calcium nitrate as calcium source and ammonium dihydrogen phosphate as phosphorous source and hydrogen peroxide to suppress hydrogen evolution. I studied the effect of the deposition parameters on the properties and morphology of the layers. Based on the morphological studies, the pure HAp layers consisted mainly of needle-like, elongated crystals, but the coatings prepared with high frequency pulses (500 Hz) contained some larger irregularly adherent particles as well. In this case, the particle size distribution was not uniform and it ranged between wide limits (100 nm – ~2  $\mu$ m). However, in the case of HAp layers deposited with low frequency (90 Hz) current pulses, it has been found that the needle-like crystals have a smaller size and their size distribution is more uniform. Based on the large number of experimental work, it can be noticed that the layers deposited by low frequency current impulses have better, more uniform nanostructures.

During the course of my research, as a novelty, I have grown HAp clusters and multi-element doped HAp clusters onto the surface of implant material. These clusters did not cover the surface continuously. The elemental composition study demonstrated that these non-continuous HAp clusters were irregularly shaped, approximately 100  $\mu$ m large deposits with thickness of 1-2  $\mu$ m. These novel bioceramic islands increased the biocompatibility of the implant and had a beneficial effect on the adhesion and growth of bone cells. In addition, the produced hydroxyapatite clusters had a highly porous microstructure, similar to that of the natural bone structure.

In order to dope the HAp layers with different bioactive and antibacterial elements, a combination of different preparation methods was used and I compared their efficacy. These methods are a combination of pulse current electrochemical deposition as well as soaking in the appropriate solutions, dripping sufficient amount of solution onto the sample surface and

additional heat treatment. The solutions used in the processes contained bioactive  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  ions and antibacterial  $\text{Ag}^+$  ions at an optimized concentration. During production, I optimized the concentration of doping ions within the layer to improve the biocompatibility of the implant.

The amount of silver present in the layer was adjusted properly so that it did not exceed the toxic level, did not cause any cytotoxic effect to bone cells, but still inhibited the adherence of harmful bacteria and thus the formation of a biofilm. I confirmed the presence of doping elements in each multi-element doped sample by EDX elemental analysis. The exact concentration of the ions present in the layers was determined by ICP-OES analysis after dissolving the coatings in nitric acid solution. I demonstrated that the multi-element modified adHAp-I layer prepared only electrochemically represented a higher percentage of doping elements, such as 19.66 at% Zn and 5.98 at% Ag while in the case of adHAp-II and adHAp-III samples (prepared by the combination of electrochemical deposition and surface post-treatments) the ratio of doping elements was much smaller within the coatings: 1.83-2.80 at% Mg, 0.45-1.68 at% Sr, 1.06-1.64 at% Zn and only 0.12-0.18 at% Ag.

The crystalline structure and phase composition of the developed layers were tested by XRD measurements. The XRD patterns showed that the coatings mainly consisted of hydroxyapatite. However, in the electrochemically prepared layer, other phases were also detected, such as monetite 20.1 w/w%, parascholzite 36.8 w/w %, and metallic Ag 3.4 w/w%. In the adHAp-II and adHAp-III layers, the phases of dopant elements were not detectable owing to their low concentrations. In the FT-IR spectra, only the characteristic absorption peaks of the complex anionic groups of calcium phosphate were observed for each sample.

I studied the corrosion properties of non-continuous coatings and their degradation in a simulated biological environment, simulated body fluid (SBF). The experimental results showed that the measured corrosion currents in the coatings were systematically larger than in the case of uncoated metal. Based on the potentiodynamic curves, the corrosion current density of substrate material was the smallest (around  $150 \text{ nAcm}^{-2}$ ) and it hardly changed over immersion time. The corrosion current of the HAp coating showed a slight increase in the initial period of immersion and then reached a relatively constant value ( $\sim 350 \text{ nAcm}^{-2}$ ) after 5 days. However, for multi-element doped layers, the measured corrosion currents were much larger, approximately 6-7 times higher than that for substrate material and showed time-increasing tendency. This also proved the increased proneness to corrosion and that degradation and dissolution processes occurred in the coatings during which  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$  ions got dissolved into the electrolyte.

The biological efficacy and biocompatibility of the developed layers were tested on MG-63 osteoblast cells. In the course of the studies, it has been proved that the non-continuous, multi-element doped HAp clusters significantly improved the biocompatibility of the implant. Cell viability measurements on HAp and adHAp samples showed that the cell survival rate at each test period was the highest on non-continuous multi-element-modified HAp layers and that cell viability values of adHAp-II and adHAp-III samples did not show statistically significant difference. Cell survival on both adHAp samples exceeds 90% compared to the control group over two weeks of cell culture. These values proved the exceptionally good biocompatibility of adHAp-II and adHAp-III samples. Moreover, about 20% better cell survival was observed on non-continuous adHAp clusters than on the Ti6Al4V substrate after two weeks of cell growth. However, the electrochemically deposited adHAp-I layer exhibited low cell survival: the cell survival rate was only 23% after the first day and 18.5% on the third day. This result indicated that the layer had a cytotoxic effect on the cells due to the large amount of Ag and Zn content within the thicker coating.

I performed LDH and ALP assays on the non-continuous HAp and adHAp samples. Results showed an increased cell amount on HAp, adHAp-II and adHAp-III samples. In percentage terms, the cell count was 32.8% higher for the HAp coating, 33% for the adHAp-II coating, and 38.3% for the adHAp-III coating compared to the substrate metal after one week of cell growth. In addition, the ALP activity of cells seeded on HAp and adHAp layers was 25-30% higher than those seeded on uncoated substrate at each test time. It is also noteworthy that ALP activity increased with culture time.

During my research, I applied cell staining tests to mark viable cells. Tests showed a large number of live cells on non-continuous HAp, adHAp-II, and adHAp-III clusters. Cells were densely grown in multiple layers on the surface of the samples with normal morphology. However, in the case of adHAp-I, only a large number of dead cells and a few living cells could be observed. These results were in good agreement with the results of cell survival tests.

Antibacterial tests on adHAp-II and adHAp-III samples showed that the samples were effective against selected bacterial strains (Gram+ and Gram-), which was demonstrated by the formed inhibition zone around the samples. It has been found that both types of multi-element doped HAp clusters had greater inhibitory effect against Gram+ (*S. Aureus*) strain than against the Gram- (*E. coli*) strain.

I also investigated the dissolution of dopant ions after long-term immersion of adHAp-II and adHAp-III samples into SBF solution. Measurements were performed with ICP-OES. Based

on the results, all doping elements were detected in the solution in ppb concentration range. The amount of silver released was only 13 ppb/cm<sup>2</sup> for adHAp-II and 19 ppb/cm<sup>2</sup> for the adHAp-III sample which was below the toxicity limit.

Summarizing the results, I can state that biocompatible and antimicrobial, porous, non-continuous hydroxyapatite clusters doped with various bioactive ions can be deposited onto commercially available metal implant surfaces by using environmentally friendly and cost-effective methods, even at industrial level. Methods and parameters of preparation procedures can significantly influence the structure, physico-chemical properties and biological activity of the coatings.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, P.K. Yarlagadda; Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 228(10) (2014) 1083-1099.
- [2] R.B. Heimann, H.D. Lehmann; Bioceramic coatings for medical implants: Trends and Techniques. (2015) Wiley, ISBN: 978-3-527-33743-9.
- [3] A.H. Choi, B. Ben-Nissan; Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications: Part II: Current research and development. *Nanomedicine* 2 (2007) 51–61.
- [4] H. Li, K.A. Khor, P. Cheang; Impact formation and microstructure characterization of thermal sprayed hydroxyapatite/titania composite coatings. *Biomaterials* 24 (2003) 949–957.
- [5] S. Dimitrievska, M.N. Bureau, J. Antoniou et al; Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 98 (2011) 576–588.
- [6] Z. Xuhui, Y. Lingfang, Z. Yu, X. Jinping; Hydroxyapatite Coatings on Titanium Prepared by Electrodeposition in a Modified Simulated Body Fluid. *Chin. Journal Chem. Eng.* 17(4) (2009) 667–671.
- [7] J.R. Woodard, A.J. Hildore, S.K. Lan, C.J. Park, A.W. Morgan, J.A. Eurell, S.G. Clark; The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 1 (2007) 45–54.
- [8] C. Lindahl, W. Xia, H. Engqvista, A. Snisa, J. Lausma, A. Palmquist; Biomimetic calcium phosphate coating of additively manufactured porous CoCr implants. *Appl. Surf. Sci.* 353 (2015) 40–47.
- [9] F. Barrère, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot; Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Internat. J. Nanomed.* 1(3) (2006) 317–332.
- [10] R.E. Holmes; Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast. Reconstr. Surg.* 63 (1979) 626–633.
- [11] I.R. Gibson; Calcium phosphate as scaffolds for mesenchymal stem cell. In: Ramalingam M, Ramakrishna S, Best S (eds) *Biomaterials and stem cells in regenerative medicine*. CRC Press, Boca Raton (2012) 219–237.
- [12] M. Bohner; Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 (2000) 37–47.
- [13] L.L. Hench, I. Thompson; Twenty first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface* 7(4) (2010) S379–S391.



- [14] <http://www.infectioncontrolday.com/articles/2008/03/reducing-surgical-site-infections.aspx#>
- [15] C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, P.L. Coustumer, L.V. Constantin, D. Predoi; Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 324–332.
- [16] C. Shi, J. Gao, M. Wang, J. Fu, D. Wang, Y. Zhu; Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 55 (2015) 497–505.
- [17] A.E. Boudreau; Fluid evolution in layered intrusions: Evidence from the chemistry of halogen bearing minerals. In: *Magmas, Fluids, and Ore Deposits*, ed by Thompson JFH, Mineralogical Association of Canada, Short Course Series 23 (1995) pp 2545.
- [18] J.M. Hughes, J. Rakovan; The crystal structure of apatite,  $a_5(PO_4)_3(F,OH,Cl)$ . In: *PHOSPHATES: Geochemical, Geobiological, and Materials Importance*, ed by M.J. Kohn, J. Rakovan, J.M. Hughes, Reviews in Mineralogy and Geochemistry, vol.48, Mineralogical society of America, Washington, DC (2002) pp 112.
- [19] R. Narayanan, S. Dutta, S.K. Seshadri; Hydroxy apatite coatings on Ti-6Al-4V from seashell. *Surf. Coat. Techn.* 200 (2006) 4720–4730.
- [20] J. Trinkunaite-Felsen, A. Prichodko, M. Semasko, R. Skaudzius; Synthesis and characterization of iron-doped/substituted calcium hydroxyapatite from seashells *Macoma balthica* (L.). *Adv. Powd. Techn.* 26 (2015) 1287–1293.
- [21] B. Hosseini, S.M. Mirhadi, M. Mehrazin, M. Yazdanian, et al; Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite Using Eggshell and Trimethyl Phosphate. *Trauma Monthly* DOI: 10.5812/traumamon.36139.
- [22] C. Balázs, F. Wéber, Z. Kövér, E. Horváth, C. Németh; Preparation of calcium–phosphate bioceramics from natural resources, *J. Eur. Cer. Soc.* 27 (2007) 1601–1606.
- [23] S.W. Lee, S.G. Kim, C. Balázs, W.S. Chae, H.O. Lee; Comparative study of hydroxyapatite from eggshells and synthetic hydroxyapatite for bone regeneration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 113(3) (2012) 348–353.
- [24] K. Balázs, G. Gergely, C.H. Chae, H.Y. Sim, J.Y. Choi, S.G. Kim, C. Balázs; Biogenic hydroxyapatite from eggshell as bone formation material. *Cells and Materials* 24(1): (2012) pp. 18.
- [25] N.A.M. Barakat, M. SeobKhil, A.M. Omran, Faheem, A. Sheikh, H. YongKim; Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *J. Mat. Process. Techn.* 209(7) (2009) 3408–3415.

- [26] W. Khoo, F.M. Nor, H. Ardhyanta, D. Kurniawan; Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures, *Procedia Manufacturing* 2 (2015) 196–201.
- [27] E. Kusriani, A.R. Pudjiastuti, S. Astutiningsih, S. Harjanto; Preparation of Hydroxyapatite from Bovine Bone by Combination methods of Ultrasonic and Spray Drying, International Conference on Chemical, Bio-Chemical and Environmental Sciences (ICBEE'2012) December 14–15, (2012) Singapore.
- [28] M. Rana, N. Akhtar, S. Rahman, H.M. Jamil, S. M. Assaduzzaman; Extraction of Hydroxyapatite from Bovine and Human Cortical Bone by Thermal Decomposition and Effect of Gamma Radiation: A Comparative Study, *Internat. J. Compl. Alter. Med.* 8(3) (2017) pp. 00263.
- [29] E. Hosseinzadeh, M. Davarpanah, N. Hassanzadeh Nemati, S. A. Tavakoli; Fabrication of a Hard Tissue Replacement Using Natural Hydroxyapatite Derived from Bovine Bones by Thermal Decomposition Method. *Int J Organ Transplant Med.* 5(1) (2014) 23–31.
- [30] Newman WD and Neuman MW. The nature of the mineral phase of bone. *Chem Rev* 53: 145, 1953
- [31] A.S. Posner, G. Duyckaerts; Infrared study of the carbonate in bone, teeth and francolite. *Experientia* 10 (1954) pp. 424425.
- [32] E.D. Eanes, A.S. Posner; A note on the crystal growth of hydroxyapatite precipitated from aqueous solutions. *Mater. Res. Bull.* 5 (1970) pp. 377383.
- [33] W.J. Wu, G.H. Nancollas; Factors controlling crystallization of calcium phosphates on solid surfaces. In: *Bioceramics* 11, ed by R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros, World Science, Singapore (1998) pp. 469472.
- [34] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros; Phosphate Minerals in Human Tissues. In: *Phosphate Minerals*, ed by J.O. Nriagu, P.B. Moore, SpringerVerlag, Berlin (1984) pp 351383.
- [35] J.D. Dana, G.J. Brush; A system of mineralogy, Descriptive mineralogy, comprising the most recent discoveries. 5th ed, John Wiley & Sons, New York, (1868)
- [36] J.O. Nriagu; Phosphate Minerals: Their Properties and General Modes of Occurrence. In: *Phosphate Minerals*, ed by J.O. Nriagu, P.B. Moore, SpringerVerlag, Wien, (1984) pp 1136.
- [37] M.J. Dallemagne, L.J. Richelle; Inorganic chemistry of bone. In: *Biological Mineralization*, ed by I. Zipkin, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, New York (1973) pp 2342.

- [38] S.L. Rowles; Chemistry of the mineral phase of dentine. In: Structural and Chemical Organization of Teeth, ed by A.E.W. Miles, Academic Press, London (1976) pp 201246.
- [39] F. Brudevold, R. Soremark; Chemistry of the mineral phase of enamel. In: Structural and Chemical Organization of Teeth, ed by A.E.W. Miles, Academic Press, London (1976) pp 247278.
- [40] A.S. Posner; The mineral of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 200 (1985) pp. 8799.
- [41] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros, O.R. Trautz, E. Klein; Spectral properties of carbonate in carbonate containing apatites. *Dev. Appl. Spectrosc.* 7B (1970) 312–320.
- [42] R.Z. LeGeros; Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature* 206 (1965) pp. 403404.
- [43] T. Sakae; Xray diffraction and thermal studies of crystals from the outer and inner layers of human dental enamel. *Arch. oral. Biol.* 33 (1988) pp. 707713.
- [44] R.Z. LeGeros, T. Sakae, C. Bautista, M. Retino, J.P. LeGeros; Magnesium and Carbonate in Enamel and Synthetic Apatites. *Amer. Dent. Res.* 10 (1996) pp. 225231.
- [45] T. Suwa, T. Sakae, H. Nakada, R.Z. LeGeros, K. Kobayashi; Variation in composition of bone surrounding implants. *Key Engin. Mater.* (2006) pp. 309311
- [46] R.Z. LeGeros, O.R. Trautz, E. Klein, J.P. LeGeros; Two types of carbonate substitution in the apatite structure. *Experientia* 25 (1969) 57–65.
- [47] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I.R. Dickson, M.J. Glimcher; The carbonate environment in bone mineral: A resolutionenhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif. Tissue Int.* 45 (1989) pp. 157164.
- [48] M.E. Fleet; The carbonate ion in hydroxyapatite: Recent Xray and infrared results. *Front. Biosci.* E5 (2013) pp. 643652.
- [49] M. Vallet-Regí; Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use from Materials to Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1st edition, (2008)
- [50] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, and M.J. Glimcher; Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteopor. Intern.* 20(6) (2009) 1013–1021.
- [51] J.D. Pasteris, B. Wopenka, J.J. Freeman et al; Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25(2) (2004) 229–238.
- [52] H.M. Kim, C. Rey, and M.J. Glimcher; Isolation of calciumphosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. *J. Bone Min. Res.* 10(10) (1995) 1589–1601.

- [53] N.A.M. Barakat, K.A. Khalil, F.A. Sheikh et al; Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: extraction of biologically desirable HAp. *Mater. Sci. Eng. C* 28(8) (2008) 1381–1387.
- [54] A.L. Arsenault; Crystal-collagen relationships in calcified turkey leg tendons visualized by selected-area dark field electron microscopy. *Calcif. Tissue Intern.* 43(4) (1988) 202–212.
- [55] S.N. Danilchenko, A.V. Koropov, I.Y. Protsenko, B. Sulkio-Cleff, L.F. Sukhodub; Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone: an X-ray diffraction study. *Cryst. Res. Techn.* 41(3) (2006) 268–275.
- [56] A.M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, T. Panz; Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones. *Microchim. Acta* 161(3-4) (2008) 349–353.
- [57] H.M. Kim, C. Rey, M.J. Glimcher; X-ray diffraction, electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage. *Calcif. Tissue Intern.* 59(1) (1996) 58–63.
- [58] N.A.M. Barakat, K.A. Khalil, F.A. Sheikh et al; Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: extraction of biologically desirable HAp, *Mater. Sci. Eng. C*, 28(8) (2008) 1381–1387.
- [59] S.H. Kim, J.W. Shin, S.A. Park et al; Chemical of bo, structural properties, and osteoconductive effectiveness ne block derived from porcine cancellous bone. *J. Biomed. Mater. Res. B* 68(1) (2004) 69–74.
- [60] C.Y. Ooi, M. Hamdi, S. Ramesh; Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceram. Internat.* 33(7) (2007) 1171–1177.
- [61] R. Murugan, T.S.S. Kumar, K.P. Rao; Fluorinated bovine hydroxyapatite: preparation and characterization. *Mater. Lett.* 57(2) (2002) 429–433.
- [62] R. Murugan, S. Ramakrishna, K.P. Rao; Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone. *Mater. Lett.* 60(23) (2006), pp. 2844–2847, 2006.
- [63] D.S. Seo, J.K. Lee; Dissolution of human teeth-derived hydroxyapatite. *Annal. Biomed. Eng.* 36(1) (2008) 132–140.
- [64] A.I. Pearce, R.G. Richards, S. Milz, E. Schneider, S.G. Pearce; Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials* 13 (2007) 1–10.
- [65] H.L. Rosenthal, M.M. Eves, O. A. Cochran; Common strontium concentrations of mineralized tissues from marine and sweet water animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 32(3) (1970) 445–450.

- [66] G. Daculsi, N. Passuti, S. Martin, R.Z. LeGeros; Macroporous biphasic calcium phosphate ceramic for long bone surgery in human and dogs: clinical and histological study. *J. Biomed. Mater. Res.* 4 (1990) 379–396.
- [67] R.Z. LeGeros, P. Go, K.H. Vandemaele, G.B. Quirolgico, D.J. LeGeros; Transformation of calcium carbonates and calcium phosphates to carbonate apatites: possible mechanism for phosphorite formation. In: Proceedings 2nd international congress on phosphorous compounds, Morocco Institut de Mondial de Phosphate, Boston, (1980) 41–54.
- [68] R.F. Ellinger, E.G. Mery, K.L. Lynch Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *J Periodontics Restor. Dent.* 3 (1986) 223–233.
- [69] R.Z. LeGeros, G. Daculsi, E. Nery, K. Lynch, B. Kerebel; In vivo transformation of biphasic calcium phosphates of varying TCP:HA ratios: ultrastructural characterization. In: Proceedings of the 3rd world biomaterials congress. Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo (1988).
- [70] R.Z. LeGeros, D. Daculsi; In vivo transformation of biphasic calcium phosphate ceramics: ultrastructural and physico-chemical characterizations. In: Yamamuro T, Wilson J, Hench LL (eds) Handbook of bioactive ceramics 11 CRC Press, Boca Raton (1997) 17–28.
- [71] G. Daculsi, N. Passuti; Bioactive ceramics fundamental properties and clinical applications: the Osseo-coalescence process. In: G. Heimcke, H. Oonishi (eds) Bioceramics, vol 2. Butterworth-Heinemann, Cologne, (1990) 3–10.
- [72] L.L. Wykrota, C.A. Garrido, F.H. Wykrota; Clinical evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic used in orthopaedic lesions. In: LeGeros RZ, LeGeros JP (eds) Bioceramics, vol 11. World Scientific Publishing, Singapore (1998) 64–72.
- [73] H. Ohgushi, A.I. Caplan; Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* 48 (1999) 913–927.
- [74] J. Toquet, R. Rohanizadeh, J. Guicheux, G. Daculsi; Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 98–109.
- [75] R.Z. LeGeros; Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthopaed. Relat. Res.* 395 (2002) 81–98.
- [76] C. Doyle; Bioactive composites in orthopaedics. In: T. Yamamuro, L.L. Hench, J. Wilson-Hench (eds) Handbook of bioactive ceramics, vol 2. CRC Press, Boca Raton, (1990) 195–207.

- [77] M. Okazaki, H. Ohmae, T. Hino; Insolubilization of apatite-collagen composites by UV irradiation. *Biomaterials* 10 (1989) 564–568.
- [78] M. Jarcho; Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 157 (1981) 259–278.
- [79] H. Aoki, K. Kato, M. Ogiso; Studies on the application of apatite to dental materials. *J. Dent. Eng.* 18 (1971) 86–89.
- [80] D.S. Metsger, T.D. Driskell, J.R. Paulsrud; Tricalcium phosphate ceramic—a resorbable bone implant: review and current status. *J. Am. Dent. Assoc.* 105(6) (1982) 1035–1038.
- [81] R.Z. LeGeros; Apatites in biological systems. *Prog. Cryst. Growth Character.* 4 (1981) 1–45.
- [82] R.Z. LeGeros, T. Salcae, C. Bautista; Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites. *Adv. Dent. Res.* 10 (1996) 225–231.
- [83] M. Okazaki, R.Z. LeGeros; Crystallographic and chemical properties of Mg-containing apatites before and after suspension in solutions. *Magnes. Res.* 5 (1992) 103–108.
- [84] R.Z. LeGeros, M.S. Tung; Chemical stability of carbonate and fluoride containing apatites. *Caries. Res.* 17 (1983) 419–429.
- [85] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros, O.R. Trautz, E. Klein; Conversion of monetite,  $\text{CaHPO}_4$ , to carbonate apatite: effect on crystallinity. *Adv. X-ray Appl.* 14 (1971) 57–66.
- [86] J.J. Klawitter; A basic investigation of bone growth in porous materials. PhD thesis Clemson University, Clemson (1979)
- [87] L.L. Hench; Bioceramics: from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74: (1994) 1487–1510
- [88] J.F. Osborn, H. Newesely; The material science of calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 1 (1980) 108–111.
- [89] M. Heogbebaert, R.Z. LeGeros, M. Gineste, M. Guilhern, G. Bonel; Physico-chemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in non-osseous sites. *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 257–268.
- [90] R.Z. LeGeros, G. Daculsi, I. Orly; Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralization. In: J.E. Davies (ed) *The BoM biomaterials interface*. University of Toronto Press, Toronto, (1991) 76–88.
- [91] D. Le Nihouannen, G. Daculsi, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, S. Delplace, P. Pilet, P. Layrolle; Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36(6) (2005) 1086–1093.

- [92] N. Aebli, J. Krebs, D. Schwenke, H. Stich, P. Schawalder, J.C. Theis; Degradation of hydroxyapatite coating on a well-functioning femoral component. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 85-B (2003) 499–503.
- [93] C. Delaunay; Effect of hydroxyapatite coating on the radio-clinical results of a grit-blasted titanium alloy femoral taper. A case-control study of 198 cementless primary total hip arthroplasty with the Alloclassic™ system. *Orthop. Traumatol. Surg. Res* 100 (2014) 739–744.
- [94] S.R. Nodzo, D.W. Hohman, A.S. Hoy, M. Bayers-Therin et al; Short Term Outcomes of a Hydroxyapatite Coated Metal Backed Patella. *J. Arthroplasty* 30 (2015) 1339–1343.
- [95] T. Sato, Y. Nakashima, K. Komiyama; The Absence of Hydroxyapatite Coating on Cementless Acetabular Components Does Not Affect Long-Term Survivorship in Total Hip Arthroplasty. *J. Arthroplasty* 31(6) (2016) 1228-1232.
- [96] J.A. D’Antonio, W.N. Capello, O.D. Crothers, W.L. Jaffe, M.T. Manley; Early clinical experience with hydroxyapatite-coated femoral implants. *J. Bone Joint Surg.* 74 (1992) 995–1008.
- [97] S.A. McNally, J.A.N. Shepperd, C.V. Mann, J.P. Walczak; The results at nine to twelve years of the use of a hydroxyapatite-coated femoral stem. *J. Bone Joint Surg. Br.* 82B: (2000) 378–382.
- [98] R.J. Furlong, J.F. Osborn; Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J. Bone Joint Surg. Br.* 73B (1991) 741–745.
- [99] C.H. Rorabeck; Tapered hydroxyapatite-coated press-fit stems: any added value? *J. Arthroplasty* 21 (2006) 85–88.
- [100] Y.H. Kim, J.S. Kim, S.H. Oh, J.M. Kim; Comparison of porous-coated titanium femoral stems with and without hydroxyapatite coating. *J. Bone Joint Surg.* 85 (2003) 1682–1688.
- [101] S. Eto, S. Kawano, S. Someya, H. Miyamoto, M. Sonohata, M. Mawatari; First Clinical Experience With Thermal-Sprayed Silver Oxide Containing Hydroxyapatite Coating Implant, *J. Arthroplasty* 2016; 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2015.12.034>.
- [102] M.A. Worsley, T.F. Baumann, J.H. Satcher, T.Y. Olson, J.D. Kuntz, K.A. Rose; Methods of electrophoretic deposition for functionally graded porous nanostructures and systems thereof. Patent:US 8968865 B2, (2015).
- [103] K.A. Rose, J.D. Kuntz, M.A. Worsley; Methods of three-dimensional electrophoretic deposition for ceramic and cermet applications and systems thereof. Patent:US 9453289 B2, (2016).

- [104] M.A. Worsley, J.D. Kuntz, K.A. Rose; Stabilization of green bodies via sacrificial gelling agent during electrophoretic deposition (Patent:US 20120269218A1, (2012).
- [105] S. Leeuwenburgh, J.Wolke, J. Schoonman, J. Jansen; Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66(2) (2003) 330–334.
- [106] A. Muthutantri, J. Huang, M. Edirisinghe; Novel method of preparing hydroxyapatite foams. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19(4) (2008) 1485–1490.
- [107] J. Huang, S.N. Jayasinghe, S.M. Best, M.J. Edirisinghe, R.A. Brooks, W. Bonfield; Electro spraying of a nanohydroxyapatite suspension. *J. Mater. Sci.* 39 (2004) 1029–1032.
- [108] M. Eltohamy, U. Sang Shin, J.E. Won et al; Electro sprayed tricalcium phosphate spherical microcups and antibiotic drug delivery. *Mater. Lett.* 65 (2011) 2043–2046.
- [109] Y. Wu, S.J. Kennedy, R.L. Clark; Polymeric particle formation through electro spraying at low atmospheric pressure. *J. Biomed. Mater. Res. B* 91(1) (2009) 381–387.
- [110] V.O. Kollath, Q. Chen, R. Closset, J. Luyten, K. Traina, S. Mullens, A.R. Boccaccini; R. Cloots; AC vs. DC electrophoretic deposition of hydroxyapatite on titanium, *J. Europ. Ceram. Soc.* 33 (2013) 2715–2721.
- [111] M. Farrokhi-Rad, T. Shahrabi; Effect of suspension medium on the electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles and properties of obtained coatings, *Ceram. Intern.* 40 (2014) 3031–3039.
- [112] M. Farrokhi-Rad; Electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles in different alcohols: Effect of Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) as a dispersant, *Ceram. Intern.* 42 (2016) 3361–3371.
- [113] A.A. Abdeltawab, M.A. Shoeib, S.G. Mohamed; Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on titanium from dimethylformamide suspensions, *Surf. Coat. Techn.* 206 (2011) 43–50.
- [114] R. Rojaee, M. Fathi, K. Raeissi; Electrophoretic deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on AZ91 magnesium alloy implants with different surface treatments. *Appl. Surf. Sci.* 285P (2013) 664–673.
- [115] S. Guangfei, J. JunMa, Z. Shengmin; Electrophoretic deposition of zinc-substituted hydroxyapatite coatings. *Mater. Sci. Eng. C* 39 (2014) 67–72.
- [116] D.J. Blackwood, K.H.W. Seah; Electrochemical cathodic deposition of hydroxyapatite: Improvements in adhesion and crystallinity. *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1233–1238.
- [117] D.J. Blackwood, K.H.W. Seah; Galvanostatic pulse deposition of hydroxyapatite for adhesion to titanium for biomedical purposes. *Mater. Sci. Eng. C* 30 (2010) 561–565.



- [118] W.J. Shih, Y.H. Chen, S.H. Wang, W.L. Li et al; Effect of NaOH(aq) treatment on the phase transformation and morphology of calcium phosphate deposited by an electrolytic method. *J. Cryst. Growth* 285 (2005) 633–641.
- [119] C. Huang, P. Cao; Tuning Ca:P ratio by NaOH from monocalcium phosphate monohydrate (MCPM). *Mater. Chem. Phys.* 181 (2016) 159–166.
- [120] M.H. Prado Da Silva, J.C.H. Lima, G.A. Soares, C.N. Elias, M.C. de Andrade, S.M. Best, I.R. Gibson; Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium. *Surf. Coat. Techn.* 137 (2001) 270–276.
- [121] W.J. Shih, M.C. Wang, K.M. Chang, C.L. Wang, S.H. Wang, W.L. Li, H.H. Huang; Phase Transformation of Calcium Phosphates by Electrodeposition and Heat Treatment. *Metall. Mater. Trans. A* 41(3) (2010) 3509–3516.
- [122] D. Gopi, J. Indira, L. Kavitha; A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel. *Surf. Coat. Techn.* 206 (2012) 2859–2869.
- [123] H.X. Wang, S.K. Guan, X. Wang, C.X. Ren, L.G. Wang; In vitro degradation and mechanical integrity of Mg–Zn–Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process. *Acta Biomater.* 6 (2010) 1743–1748.
- [124] Z.S. Seyedraoufi, S. Mirdamadi; Effects of pulse electrodeposition parameters and alkali treatment on the properties of nano hydroxyapatite coating on porous MgZn scaffold for bone tissue engineering application. *Mater. Chem. Phys.* 148 (2014) 519–527.
- [125] R. Chakraborty, S. Sengupta, P. Saha, K. Das, S. Das; Synthesis of calcium hydrogen phosphate and hydroxyapatite coating on SS316 substrate through pulsed electrodeposition. *Mater. Sci. Eng. C* 69 (2016) 875–883.
- [126] F. Marashi-Najafi, J. Khalil-Allafi, M.R. Etminanfar; Biocompatibility of hydroxyapatite coatings deposited by pulse electrodeposition technique on the Nitinol superelastic alloy. *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 278–286.
- [127] Y. Feng, S. Zhu, L. Wang, L. Chang, B. Yan, X. Song, S. Guan; Characterization and corrosion property of nano-rod-like HA on fluoride coating supported on Mg–Zn–Ca alloy. *Bioactive Mater.* 2 (2017) 63–70.
- [128] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, N. Roveri; Rietveld structure refinements of calcium hydroxylapatite containing magnesium. *Acta Crystallogr.* 52 (1996) 87–92.
- [129] F.Z. Ren, R.L. Xin, X. Ge, Y. Leng; Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. *Acta Biomater.* 5 (2009) 3141–3149.

- [130] Y. Cai, S. Zhang, X. Zeng, Y. Wang, M. Qian, W. Weng; Improvement of bioactivity with magnesium and fluorine ions incorporated hydroxyapatite coatings via sol–gel deposition on Ti6Al4V alloys. *Thin Solid Films* 517(17) (2009) 5347–5351.
- [131] S. Ziani, S. Meski, H. Khireddine; Characterization of magnesium-doped hydroxyapatite prepared by sol–gel process. *Int. J. Appl. Ceram. Tec.* 11(1) (2014) 83–91.
- [132] Z. Geng, Z. Cui, Z. Li, S. Zhu, et al; Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Mat. Sci. Eng. C* 58 (2016) 467–477.
- [133] M.H. Prado da Silva, F.N. Moura, D. Navarro da Rocha, et al; Zinc-modified hydroxyapatite coatings obtained from parascholzite alkali conversion. *Surf. Coat. Tech.* 249 (2014) 109–117.
- [134] F. Miyaji, Y. Kono, Y. Suyama; Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Mater. Res. Bull.* 40 (2005) 209–220.
- [135] Y. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, et al; Zinc incorporation into hydroxylapatite. *Biomaterials* 30 (2009) 2864–2872.
- [136] N. Iqbal, M. Rafiq, A. Kadir, N.H. Mahmood, et al; Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc–silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis. *Ceram. Int.* 40 (2014) 4507–4513.
- [137] H. Wang, N. Eliaz, L.W. Hobbs; The nanostructure of an electrochemically deposited hydroxyapatite coating. *Mater. Lett.* 65 (2011) 2455–2457.
- [138] D.M. Thanh, P.T. Nam, N.T. Phuong, L.X. Que, N.V. Anh, T. Hoang, T.D. Lam; Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel. *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 2037–2045.
- [139] M. Saremi, S. Mohajernia, S. Hejazi; Controlling the degradation rate of AZ31 Magnesium alloy and purity of nano-hydroxyapatite coating by pulse electrodeposition. *Mater. Lett.* 129 (2014) 111–113.
- [140] Yardnapar Parcharoen, Puangrat Kajitvichyanukul, Sirinrath Sirivisoot, Preecha Termsuksawad, Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications, *Applied Surface Science* 311 (2014) 54–61.
- [141] N. Monasterio, J.L. Ledesma, I. Aranguiz, A. Garcia-Romero, E. Zuza, Analysis of electrodeposition processes to obtain calcium phosphate layer on AZ31 alloy, *Surface & Coatings Technology* 319 (2017) 12–22.
- [142] S. Leeuwenburgh, J. Wolke, J. Schoonman, J. Jansen; Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66(2) (2003) 330–334.

- [143] S.C.G. Leeuwenburgh, J.G.C. Wolke, M.C. Siebers, J. Schoonman, J.A. Jansen; In vitro and in vivo reactivity of porous, electrosprayed calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 27 (2006) 3368–3378.
- [144] J. Huang, S.N. Jayasinghe, S.M. Best, M.J. Edirisinghe, R.A. Brooks, W. Bonfield; Electrospraying of a nano-hydroxyapatite suspension. *J. Mater. Sci.* 39(3) (2004) 1029–1032.
- [145] S. Singh, V.K. Meena, M. Sharma, H. Singh; Preparation and coating of nano-ceramic on orthopaedic implant material using electrostatic spray deposition. *Mater. Design* 88 (2015) 278–286.
- [146] C. Schouten, G.J. Meijer, J.J.J.P. van den Beucken, S.C.G. Leeuwenburgh; In vivo bone response and mechanical evaluation of electrosprayed CaP nanoparticle coatings using the iliac crest of goats as an implantation model. *Acta Biomater.* 6 (2010) 2227–2236.
- [147] L.T. de Jonge, J.J.J.P. van den Beucken, S.C.G. Leeuwenburgh, et al; In vitro responses to electrosprayed alkaline phosphatase/calcium phosphate composite coatings. *Acta Biomater.* 5 (2009) 2773–2782.
- [148] L.T. de Jonge, S.C. Leeuwenburgh, J.J. van den Beucken, J. Riet, W.F. Daamen, J.G. Wolke, D. Scharnweber, J.A. Jansen; The osteogenic effect of electrosprayed nanoscale collagen/calcium phosphate coatings on titanium. *Biomaterials* 31(9) (2010) 2461–2469.
- [149] J. Weng, X.G. Liu, X.D. Li, X.D. Zhang; Intrinsic factors of apatite influencing its amorphization during plasma-spray coating. *Biomaterials* 16 (1995) 39–44.
- [150] W. Tong, J. Chen, X. Li, Y. Cao, Z. Yang, J. Feng, et al; Effect of particle size on molten states of starting powder and degradation of the relevant plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 17 (1996) 1507–1513.
- [151] K.A. Gross, C.C. Berndt, H. Herman; Amorphous phase formation in plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 407–414.
- [152] S.W.K. Kweh, K.A. Khor, P. Cheang; High temperature in-situ XRD of plasma sprayed HA coatings. *Biomaterials* 23 (2002) 381–387.
- [153] F. Wu, Y. Huang, L. Song, et al; Method for preparing porous hydroxyapatite coatings by suspension plasma spraying. US 8,877,283 B2 (2014)
- [154] L. Gan, M.L. Scott, S.C. Jani; Coating and coating method. WO 2009111307 A2 (2009)
- [155] Y. Wang, T. Fan, Z. Zhou, D. He. Hydroxyapatite coating with strong (002) crystallographic texture deposited by micro-plasma spraying. *Mater. Lett.* 185 (2016) 484–487.

- [156] Y.C. Tsui, C. Doyle, T.W. Clyne; Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. *Biomaterials* 19 (1998) 2015–2029.
- [157] G. Balasundaram, D.M. Storey, T.J. Webster; Molecular plasma deposition: biologically inspired nanohydroxyapatite coatings on anodized nanotubular titanium for improving osteoblast density. *Internat. J. Nanomed.* 10 (2015) 527–535.
- [158] G. Balasundaram, T.M. Shimpi, D.M. Storey; Hydroxyapatite coated nanostructured titanium surfaces. US 2009/0035722 A1 (2009)
- [159] K.L. Choy; Chemical vapour deposition of coatings. *Prog. Mater. Sci.* 48 (2003) 57–170.
- [160] H. Li, L. Wang, C. Liang, Z. Wang, W. Zhao; Dispersion of carbon nanotubes in hydroxyapatite powder by in situ chemical vapor deposition. *Mat. Sci. Eng. B* 166 (2010) 19–23.
- [161] Y. Gao, A.A. Campbell; Method of coating a substrate with a calcium phosphate compound. US006113993A (2000)
- [162] L. Cléries, J.M. Fernandez-Pradas, J.L. Morenza; Bone growth on and resorption of calcium phosphate coatings obtained by pulsed laser deposition. *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 43–52.
- [163] V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I.N. Mihailescu; Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and radio-frequency magnetron sputtering: comparative study. *Appl. Surf. Sci.* 228 (2004) 346–356.
- [164] L. Duta, F.N. Oktar, G.E. Stan, G. Popescu-Pelin, N. Serban, C. Luculescu, I.N. Mihailescu; Novel doped hydroxyapatite thin films obtained by pulsed laser deposition. *Appl. Surf. Sci.* 265 (2013) 41–49.
- [165] Q. Bao, C. Chen, D. Wang, Q. Ji, T. Lei; Pulsed laser deposition and its current research status in preparing hydroxyapatite thin films. *Appl. Surf. Sci.* 252 (2005) 1538–1544.
- [166] American Society for Testing and Materials [ASTM], Standard specification for composition of ceramic hydroxylapatite for surgical implants, F 1185-03 (2009) 514–515.
- [167] Food and Drug Administration [FDA], Calcium phosphate (Ca–P) coating draft guidance for preparation of FDA submissions for orthopedic and dental endosseous implants, (1997) 1–14.

- [168] M. Komath, P. Rajesh, C.V. Muraleedharan, H.K. Varma, R. Reshmi, M.K. Jayaraj; Formation of hydroxyapatite coating on titanium at 200 °C through pulsed laser deposition followed by hydrothermal treatment. *Bull. Mater. Sci.* 34 (2011) 389–399.
- [169] H.C. Man, K.Y. Chiu, F.T. Cheng, K.H. Wong; Adhesion study of pulsed laser deposited hydroxyapatite coating on laser surface nitrided titanium. *Thin Solid Films* 517 (2009) 5496–5501.
- [170] Y. Hashimoto, M. Kusunoki, R. Hatanaka, K. Hamano, H. Nishikawa, Y. Hosoi, S. Hontsu, M. Nakamura; Improvement of hydroxyapatite deposition on titanium dental implant using ArF laser ablation. It's effect on osteoblast biocompatibility in vitro. *Adv. Sci. Technol.* 49 (2006) 282–286.
- [171] Y. Yang, S.R. Paital, N.B. Dahotre; Effects of SiO<sub>2</sub> substitution on wettability of laser deposited Ca-P biocoating on Ti-6Al-4 V. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2511–2521.
- [172] S. Hontsu, Y. Hashimoto, Y. Yoshikawa, M. Kusunoki, H. Nishikawa, A. Ametani; Fabrication of hydroxyl apatite coating titanium web scaffold using pulsed laser deposition method. *J. Hard Tissue Biol.* 21 (2012) 181–188.
- [173] G. Popescu-Pelin, F. Sima, L.E. Sima, C.N. Mihailescu, C. Luculescu, I. Iordache, M. Socold, G. Socol, I.N. Mihailescu; Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and matrix assisted pulsed laser evaporation: Comparative study. *Appl. Surf. Sci.* 418 (2017) 580–588.
- [174] H. Nishikawa, T. Hasegawa, A. Miyake, Y. Tashiro, et al; Relationship between the Ca/P ratio of hydroxyapatite thin films and the spatial energy distribution of the ablation laser in pulsed laser deposition. *Mater. Lett.* 165 (2016) 95–98.
- [175] G. Voicu, D. Miu, I. Dogaru, S.I. Jinga, C. Busuioc; Vitroceramic interface deposited on titanium substrate by pulsed laser deposition method. *Int. J. Pharm.* 510 (2016) 449–456.
- [176] H. Khandelwala, G. Singh, K. Agrawal, S. Prakash, R.D. Agarwal; Characterization of hydroxyapatite coating by pulse laser deposition technique on stainless steel 316 L by varying laser energy. *Appl. Surf. Sci.* 265 (2013) 30–35.
- [177] A.W.G. Nijhuis, S.C.G. Leeuwenburgh, J.A. Jansen; Wet-Chemical Deposition of Functional Coatings for Bone Implantology. *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 1316–1329.
- [178] L.T. de Jonge, S.C.G. Leeuwenburgh, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm. Res.* 25 (2008) 2357–2369.
- [179] K. Groot, J. Wolke, J. Jansen; Calcium phosphate coatings for medical implant. *Proc. Inst. Mech. Eng. H* 212 (1998) 137–147.

- [180] T. Hanawa; Biofunctionalization of titanium for dental implant. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 46 (2010) 93–101.
- [181] S.K.F. Asl, S. Nemeth, M.J. Tan; Mechanism of calcium phosphate deposition in a hydrothermal coating process. *Surf. Coat. Techn.* 270 (2015) 197–205.
- [182] J.S. Earl, D.J. Wood, S.J. Milne; Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. *J. Phys. Conf. S.* 26(26) (2006) 268–271.
- [183] Y. Wang, et al; Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template. *Mater. Lett.* 60(12) (2006) 1484–1487.
- [184] Y. Fujishiro, et al; Preparation of needle-like hydroxyapatite by homogeneous precipitation under hydrothermal conditions. *J. Chem. Tech. Biotech.* 57(4) (1993) 349–353.
- [185] D.M. Roy, S.K. Linnehan; Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature* 247 (1974) 220–222.
- [186] O.R. Bingöl, C. Durucan; Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite from Calcium Sulfate Hemihydrate. *Am. J. Biomed. Sci.* 4(1) (2012) 50–59.
- [187] R.Z. LeGeros; Calcium phosphates in oral biology and medicine. In: H. Myers, S. Karger (eds) *Monographs in oral sciences*, vol 15. Karger, Basel (1991)
- [188] E. Hayek, H. Newesely, M.L. Rumpel Pentacalcium monohydroxyorthophosphate. In: J. Kleinberg (ed) *Inorganic syntheses*, 7. Wiley, Hoboken, (1963) 63–69.
- [189] M. Jarcho, C.H. Bolen, M.B. Thomas, J. Bobick, J.F. Kay, R.H. Doremus; Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *J. Mater. Sci.* 11 (1976) 2027–2035.
- [190] H. Scheicher, E. Wendler; Bone replacement material on the basis of carbonate and alkali containing calcium phosphate apatites. patent Nr 4,917,702 (1990)
- [191] M. Akao, H. Aoki, K. Kato; Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *J. Mater. Sci.* 16 (1981) 809–812.
- [192] 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.
- [193] N. Nörenberg, H.J. Sterzel, V. Koch; Rod shaped apatite crystals with a specific length-to-width ratio. WO 2003000588 A1 (2003)
- [194] K. Saita, S. Fujiwara; Method for forming hydroxyapatite coating film using coating liquor containing hydroxyapatite. patent Nr. 5,030,474 (1991)
- [195] T. Troczynski, D.M. Liu, Q. Yang; Biofunctional hydroxyapatite coatings and microspheres for in situ drug encapsulation. US 6,730,324 B2 (2004)

- [196] A.K. Lynn, W. Bonfield; A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield. *Acc. Chem. Res.* 38 (2005) 202–207.
- [197] M. Vallet-Regí, J.M. Gonzalez-Calbet; Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 1–31.
- [198] S. Gomes, J.M. Nedelec, E. Jallot, D. Sheptyakov, G. Renaudin; Silicon location in silicate-substituted calcium phosphate ceramics determined by neutron diffraction. *Cryst. Growth Des.* 11 (2011) 4017–4026.
- [199] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung, Y.H. Kim; Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials* 24 (2003) 1389–1398.
- [200] S. Dorozhkin; Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. *Materials* 2 (2009) 1975–2045.
- [201] S.S. Kim, S.M. Park, O. Jeon, C.Y. Choi, B.S. Kim; Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27 (2006) 1399–1409.
- [202] R. Detsch, A.R. Boccaccini; The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9 (2015) 1133–1149.
- [203] L. Xia, K. Lin, X. Jiang, Y. Xu, M. Zhang, J. Chang, et al; Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds via activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways. *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5403–5416.
- [204] P. Gouma, R. Xue, C.P. Goldbeck, P. Perrotta, C. Balázs; Nano-hydroxyapatite—Cellulose acetate composites for growing of bone cells. *J. Mat. Sci. Eng. C* 32(3) (2012) 607–612.
- [205] H.Y. Kweon, K.G. Lee, C.H. Chae, C. Balázs, S.K. Min, J.Y. Kim, J.Y. Choi, S.G. Kim; Development of Nano-Hydroxyapatite Graft With Silk Fibroin Scaffold as a New Bone Substitute. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 69(6) (2011) 1578–1586.
- [206] P. Habibovic, F. Barr re, C.A.V. Blitterswijk, K.D. Groot, P. Layrolle; Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *J. Am. Ceram. Soc.* 83 (2002) 517–522.
- [207] K.A. Gross, S. Saber-Samandari; Revealing mechanical properties of a suspension plasma sprayed coating with nanoindentation. *Surf. Coat. Technol.* 203 (2009) 2995–2999.
- [208] A.P. Malshe, W. Jiang; Nanostructured hydroxyapatite coating for dental and orthopedic implants. WO2011022642 A1 (2011)

- [209] B. Ben-Nissan, A.H. Choi; Sol–gel production of bioactive nanocoatings for medical applications: part I: an introduction. *Nanomedicine* 1 (2006) 311–319.
- [210] T. Troczynski, D.M. Liu; Sol-gel calcium phosphate ceramic coatings and method of making same. US 6,426,114 B1 (2002)
- [211] T. Troczynsky, D.M. Liu, Y. Quanzu; Process for manufacture of biofunctional hydroxyapatite coatings and microspheres for in situ drug encapsulation. EP 1 383 481 B1 (2004)
- [212] M. Eltohamy, U. Sang Shin, J.E. Won, et al; Electrosprayed tricalcium phosphate spherical microcaps and antibiotic drug delivery. *Mater. Lett.* 65 (2011) 2043–2046.
- [213] S. Bose, S. Tarafder; Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater.* 8 (2012) 1401–1421.
- [214] V. Uskokovic, D.P. Uskokovic; Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 96 (2011) 152–191.
- [215] K. Lin, L. Chen, P. Liu, Z. Zou, M. Zhang, Y. Shen, et al; Hollow magnetic hydroxyapatite microspheres with hierarchically mesoporous microstructure for pH-responsive drug delivery. *Cryst. Eng. Comm.* 15 (2013) 2999–3008.
- [216] K. Lin, P. Liu, L. Wei, Z. Zou, W. Zhang, Y. Qian, et al; Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release. *Chem. Eng. J.* 222: (2013) 49–59.
- [217] W. Bonfield, I.R. Gibson; Process for the preparation of magnesium and carbonate substituted hydroxyapatite. WO 1999032400 A1 (1999)
- [218] H. Takahashi, M. Yashima, M. Kakihana, M. Yoshimura; Synthesis of stoichiometric hydroxyapatite by a gel route from the aqueous solution of citric and phosphonic acids. *E. J. Sol. St. Inorg. Chem.* 32 (1995) 829–835.
- [219] C.S. Chai, B. Ben-Nissan, S. Pyke, L. Evans; Sol-Gel Derived Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications. *Mater. Manuf. Processes* 10 (1995) 205–216.
- [220] D.B. Haddow, P.F. James, R. Van Noort; Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 7 (1996) 255–260.
- [221] Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, H. Ji, C. Ding, H. Li, et al; Silver release from silver containing hydroxyapatite coatings. *Surf. Coat. Technol.* 205 (2010) 1892–1896.
- [222] N. Kose, A. Otuzbir, C. Peks, et al; A Silver Ion-doped Calcium Phosphate-based Ceramic Nanopowder-coated Prosthesis Increased Infection Resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 471 (2013) 2532–2539.



- [223] S. Erakovic, A. Jankovic, I.Z. Matic, Z.D. Jurani et al; Investigation of silver impact on hydroxyapatite/lignin coatings electrodeposited on titanium. *Mater. Chem. Phys.* 142 (2013) 521–530.
- [224] S. Erakovic, A. Jankovic, C. Ristoscu, L. Duta, N. Serban, A. Visan, I.N. Mihailescu, et al; Antifungal activity of Ag:hydroxyapatite thin films synthesized by pulsed laser deposition on Ti and Ti modified by TiO<sub>2</sub> nanotubes substrates. *Appl. Surf. Sci.* 293 (2014) 37–45.
- [225] X. Liu, Y. Mou, S. Wu, H.C. Man; Synthesis of silver-incorporated hydroxyapatite nanocomposites for antimicrobial implant coatings. *Appl. Surf. Sci.* 273 (2013) 748–757.
- [226] L. Song, Y.F. Xiao, L. Gan, Y. Wu, F. Wu, Z.W. Gu; The effect of antibacterial ingredients and coating microstructure on the antibacterial properties of plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Surf. Coat. Techn.* 206 (2012) 2986–2990.
- [227] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, S.S. So, H. Kim, Y.H. Park; Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74(7) (2008) 2171–2178.
- [228] X. Lu, B. Zhang, Y. Wang, X. Zhou, et al; Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *J. R. Soc. Interface* 8 (2011) 529–539.
- [229] M. Yamaguchi; Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11 (1998) 119–135.
- [230] B.S. Moonga, D.W. Dempster; Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 10 (1995) 453–457.
- [231] X. Xia Li, K. Senda, A. Ito, Y. Sogo, A. Yamazaki; Difference in Osteoclast Responses to Tricalcium Phosphate in Culture Medium Supplemented with Zinc and to Zinc-Containing Tricalcium Phosphate. *Bioceram. Dev. Appl.* 1 (2011) 1–4.
- [232] Y. Yamada, A. Ito, H. Kojima, M. Sakane, S. Miyakawa, T. Uemura, et al; Inhibitory effect of Zn<sup>2+</sup> in zinc-containing beta-tricalcium phosphate on resorbing activity of mature osteoclasts. *J. Biomed. Mater. Res. A* 84 (2008) 344–352.
- [233] I.Y. Ortiz, A.R. dos Santos, A.M. Costa, et al; In vitro assessment of zinc apatite coatings on titanium surfaces. *Ceram. Internat.* 42 (2016) 15502–15510.
- [234] J.Y. Reginster, O. Bruyere, A. Sawicki, A. Rocas-Varela, P. Fardellone, A. Roberts, et al; Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone* 45(6) (2009) 1059–1064.
- [235] C.J. Chung, H.Y. Long; Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. *Acta Biomater.* 7 (2011) 4081–4087.

- [236] A.R. Boyd, L. Rutledge, L.D. Randolph, B.J. Meenan; Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique. *Mater. Sci. Eng. C* 46 (2015) 290–300.
- [237] Y. Li, Q. Li, S. Zhu, E. Luo, J. Li, G. Feng, Y. Liao, J. Hu; The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials* 31 (2010) 9006–9014.
- [238] M. Percival; Bone health & osteoporosis. *Appl. Nutr. Sci. Rep.* 5 (1999) 1–5.
- [239] M. Kheradmandfard, M.H. Fathi, F. Ansari, T. Ahmadi; Effect of Mg content on the bioactivity and biocompatibility of Mg-substituted fluorapatite nanopowders fabricated via mechanical activation. *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 136–142.
- [240] E.M. Carlisle; Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 167 (1970) 279–280.
- [241] S. Klaus, B.M. Divid; Growth-promoting effect of silicon in rats. *Nature* 239 (1972) 333–334.
- [242] E.M. Carlisle; In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *J. Nutr.* 106 (1976) 478–484.
- [243] X. Qiu, P. Wan, L. Tan, X. Fan, K. Yang; Preliminary research on a novel bioactive silicon doped calcium phosphate coating on AZ31 magnesium alloy via electrodeposition. *Mater. Sci. Eng. C* 36 (2014) 65–76.
- [244] Y. Huang, M. Hao, X. Nian, H. Qiao, X. Zhang; Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *Ceram. Internat.* 42 (2016) 11876–11888.
- [245] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay; Trace element doping in calcium phosphate ceramics to understand osteogenesis and angiogenesis. *Trends Biotechnol.* 31(10) (2013) 594–605.
- [246] M.L. Turski, D.J. Thiele; New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease, *J. Biol. Chem.* 284(2) (2009) 717–721.
- [247] N. Iqbal, M. Rafiq, A. Kadir, N.H. Mahmood, et al; Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc–silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis. *Ceram. Internat.* 40 (2014) 4507–4513.
- [248] M. Furko, Y. Jiang, T.A. Wilkins, C. Balázs; Electrochemical and morphological investigation of silver and zinc modified calcium phosphate bioceramic coatings on metallic implant materials. *Mater. Sci. Eng. C* 62 (2016) 249–259.

- [249] M. Furko, Y. Jiang, T.A. Wilkins, C. Balázs; Development and characterization of silver and zinc doped bioceramic layer on metallic implant materials for orthopedic application. *Ceram. Internat.* 42 (2016) 4924–4931.
- [250] M. Furko, V. Havasi, Z. Kónya, A. Grünwald, R. Detsch, A.R. Boccaccini, C. Balázs; Development and characterization of multi-element doped hydroxyapatite bioceramic coatings on metallic implants for orthopaedic applications. *Bol. Soc. Esp. Cer. Vid.* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.09.003>.
- [251] M. Furko, Z. May, V. Havasi, Z. Kónya, A. Grünwald, R. Detsch, A.R. Boccaccini, C. Balázs; Pulse electrodeposition and characterization of non-continuous, multi-element doped hydroxyapatite bioceramic coatings. *J. Solid State Electrochem.* 22(2) (2018) 555–566.
- [252] D.G.A. Nelson, J.D.B. Featherstone, J.F. Duncan, T.W. Cutress. Effect of carbonate and fluoride on the dissolution behaviour of synthetic apatites. *Caries Res.* 17(3) (1983) 200–211.
- [253] D. Tadic, F. Peters, M. Epple; Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials* 23 (2002) 2553–2559.
- [254] J.D.B. Featherstone, I. Mayer, F.C.M. Driessens, R.M.H. Verbeeck, M. Heijligers; Synthetic apatites containing Na, Mg, and CO<sub>3</sub> and their comparison with tooth enamel mineral. *Calcif. Tissue Int.* 35 (1983) 169–171.
- [255] E.C. Moreno, M. Kresak, R.T. Zahradnik; Physicochemical aspects of fluoride–apatite systems relevant to the study of dental caries. *Caries Res.* 11 (1977) 142–171.
- [256] W.Y. Zhou, M. Wang, W.L. Cheung, B.C. Guo, D.M. Jia; Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 103–110.
- [257] W. Xiao, B.S. Bal, M.N. Rahaman; Preparation of resorbable carbonate-substituted hollow hydroxyapatite microspheres and their evaluation in osseous defects in vivo. *Mater. Sci. Eng. C* 60 (2016) 324–332.
- [258] A. Fahami, G.W. Beall, T. Betancourt; Synthesis, bioactivity and zeta potential investigations of chlorine and fluorine substituted hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 78–85.
- [259] J. Wang, Y.L. Chao, Q.B. Wan, Z.M. Zhu, H.Y. Yu; Fluoridated hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. *Acta Biomater.* 5 (2009) 1798–1807.

- [260] F.A. Al-Mulhim, M.A. Baragbah, M. Sadat-Ali, A.S. Alomran, M.Q. Azam; Prevalence of surgical site infection in orthopedic surgery: a 5-year analysis. *Int. Surg.* 99(3) (2014) 264–268.
- [261] Y. Kadono, H. Yasunaga, H. Horiguchi, H. Hashimoto, S. Matsuda, S. Tanaka, K. Nakamura; Statistics for orthopedic surgery 2006-2007: data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *J. Orthop. Sci.* 15(2) (2010) 162-170.
- [262] P. Pearce, M. McKenzie, G. Taylor; Wound infections in orthopedic surgery: effect of extended surveillance on infection rate. *Can. J. Surg.* 34(1) (1991) 31-35.
- [263] N.H. Amin, A. Jakoi, A. Katsman, S.P. Harding, J.A. Tom, D.L. Cerynik; Incidence of orthopedic surgery intervention in a level I urban trauma center with motorcycle trauma. *J. Trauma.* 71(4) (2011) 948-951.
- [264] J. Maksimovi , L. Markovi -Deni , M. Bumbaširevi , J. Marinkovi , H. Vlajinac; Surgical Site Infections in Orthopedic Patients: Prospective Cohort Study. *Croat. Med. J.* 49(1) (2008) 58–65.
- [265] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro; Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721–734.
- [266] Y. Bengi, E. Zafer; Biomimetic coatings of calcium phosphates on titanium alloys. Chapter 1: In Webster, Thomas & Yazici, Hilal. Biomedical Nanomaterials: From Design To Implementation. The Institution of Engineering and Technology. (2016) 3–14. doi:10.1049/PBHE004E\_ch1. ISBN 9781849199650.
- [267] S.M.M. Arsad, P.M. Lee, L.K. Hung; Morphology and Particle Size Analysis of Hydroxyapatite Micro- and Nano-Particles. International Conference on Science and Social Research (CSSR), Kuala Lumpur, Malaysia (2010) DOI: 10.1109/CSSR.2010.5773682.
- [268] E.A. Abdel-Aala, D. El-Sayed, M. Shoeiba, A.T. Kandil; Enhancing coating of brushite/hydroxyapatite layer on titanium alloy implant surface with additives. *Appl. Surf. Sci.* 285B (2013) 136–143.
- [269] A. Rakngarm, Y. Mutoh; Electrochemical depositions of calcium phosphate film on commercial pure titanium and Ti–6Al–4V in two types of electrolyte at room temperature. *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 275–283.
- [270] R. Astala, M.J. Stott; First-principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption. *Phys. Rev. B* 78 (2008) pp. 075427

- [271] H-M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo, T. Nakamura; The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *J. R. Soc. Interface* 1 (2004) 17–22.
- [272] L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenco; Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*, T. Theophile (Ed.), ISBN: 978-953-51-0537-4 (2012) 123–148.
- [273] A.A. El Hadad, E. Peón, F.R. García-Galván, V. Barranco, J. Parra, A. Jiménez-Morales, J.C. Galván, Biocompatibility and Corrosion Protection Behaviour of Hydroxyapatite Sol-Gel-Derived Coatings on Ti6Al4V Alloy, *Materials* (2017) 10, 94; doi:10.3390/ma10020094
- [274] I.C. Lavos-Valereto, I. Costa, S. Wolyneć; The electrochemical behavior of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in Hanks' solution, *J. Biomed. Mater. Res.* 63 (2002) 664–670.
- [275] D. Buser, R.K. Schenk, S. Steinemann, J.P. Fiorellini, C.H. Fox, H. Stich; *J. Biomed. Mater. Res.* 25 (1991) 889–902.
- [276] Z. Schwartz, C.H. Lohmann, J. Oefinger, L.F. Bonewald, D.D. Dean, B.D. Boyan; *Adv. Dent. Res.* 13 (1999) 38–48.
- [277] C.T. Kwok, P.K. Wong, F.T. Cheng, H.C. Manc; *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 6736–6744.
- [278] Z. Zhang, M.F. Dunn, T.D. Xiao, A.P. Tomsia, E. Saiz; Nanostructured hydroxyapatite coatings for improved adhesion and corrosion resistance for medical implants. *Nanotech. Biotech. Conver.* 703 (2002) 291–296.
- [279] S. Wüst, R. Müller, S. Hofmann; Controlled Positioning of Cells in Biomaterials—Approaches Towards 3D Tissue Printing. *J. Funct. Biomater.* 2(3) (2011) 119–154.
- [280] Y.C. Huang, P.C. Hsiao, H.J. Chai; Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceram. Internat.* 37 (2011) 1825–1831.
- [281] W. Pon-On, P. Suntornsaratoon et al; Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Mat. Sci. Eng. C* 62 (2016) 183–189.
- [282] N.F. Mohammad, R. Othman et al; In vitro Evaluation of Mesoporous Carbonated Hydroxyapatite in MC3T3-E1 Osteoblast Cells. *Proc. Chem.* 19 (2016) 259–266.
- [283] A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitza et al; Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* 298 (2014) 225–235.

- [284] M. Mirzaee, M. Vaezi , Y. Palizdar; Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid. *Mater. Sci. Eng. C* 69 (2016) 675–684.
- [285] G. Thrivikraman, G. Madras, B. Basu; In vitro/In vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv.* 4 (2014) 12763–12781.
- [286] S.D. Miao, K. Cheng, W.J. Weng, P.Y. Du, G. Shen, G.R. Han, W.Q. Yan, S. Zhang; Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability. *Acta Biomater.* 4 (2008) 441–446.
- [287] H. Kawamura, A. Ito, T. Muramatsu, S. Miyakawa, N. Ochiai, T. Tateishi; Long- term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora. *J. Biomed. Mater. Res. A* 65 (2003) 468–474.
- [288] S. Horiuchi, M. Hiasa, A. Yasue, K. Sekine et al; Fabrications of zinc-releasing biocement combining zinc calcium phosphate to calcium phosphate cement. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 29 (2014) 151–160.
- [289] M. Agostini, F. Romeo, S. Inoue, M.V. Niklison-Chirou et al; Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Diff.* 23 (2016) 1502–1514.
- [290] L. Schneider, S. Giordano, B. R. Zelickson et al; Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51(11) (2011) 2007–2017.
- [291] Y. Lei, A. Sinha, N. Nosoudi et al; Hydroxyapatite and Calcified Elastin Induce Osteoblast-like Differentiation in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Exp. Cell Res.* 323 (2014) 198–208.
- [292] E.S. Thian, Z. Ahmad, J. Huang, M.J. Edirisinghe, S.N. Jayasinghe, D.C. Ireland, R.A. Brooks, N. Rushton, W. Bonfield, S.M. Best; The role of surface wettability and surface charge of electrosprayed nanoapatites on the behaviour of osteoblasts. *Acta Biomater.* 6 (2010) 750–755.
- [293] K.L. Kilpadi, P.-L. Chang, S.L. Bellis; Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J. Biomed. Mater. Res.* 57 (2001) 258–267.
- [294] S. Zhao, Q. Jiang, S. Peel, X. Wang, F. He; Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration. *Clin. Oral Impl. Res.* 24 (2011) 34–41.

- [295] F. Yang, W. Dong, F. He et al; Osteoblast response to porous titanium surfaces coated with zinc substituted hydroxyapatite. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 113 (2012) 313–318.
- [296] V.B. Bueno, R. Bentini, L.H. Catalani, L. R.S. Barbosa, D.F.S. Petri; Synthesis and characterization of xanthan–hydroxyapatite nanocomposites for cellular uptake. *Mat. Sci. Eng. C* 37 (2014) 195–203.
- [297] C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi; Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater.* 4 (2008) 1885–1893.
- [298] J. Andrews; BSAC Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 2.1.5 (2003) 1–41.
- [299] P.L. Drake, K.J. Hazelwood; Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. occup. Hyg.* 49(7) (2005) 575–5855.
- [300] A.B.G. Lansdown; Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use, Kiadó: Royal Society of Chemistry (2010) 1-274. ISBN: 9781849731799.
- [301] <https://www.osha.gov/dsg/annotated-pels/tablez-1.html>
- [302] [https://www.wqa.org/Portals/0/Technical/Technical%20Fact%20Sheets/2015\\_Silver.pdf](https://www.wqa.org/Portals/0/Technical/Technical%20Fact%20Sheets/2015_Silver.pdf)

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálás köszönetemet témavezet mnek, Dr. Balázsi Csabának, aki lehet vé tette, hogy elkezdhessem és befejezzem a PhD munkámat. Köszönöm még Dr. Balázsi Katalinnak az MTA-EK Vékonyréteg-Fizika Osztály vezet jének a rengeteg segítséget és Dr. Pécz Béla igazgató úrnak (MTA-EK-MFA) hogy biztosították a doktori disszertációm megírásához szükséges feltételeket. Valamint köszönöm Prof. Kónya Zoltánnak, a Szegedi Tudományegyetem Környezettudományi Doktori Iskola vezet jének a támogatást.

A minták elektrokémiai leválasztását és korróziós vizsgálatait a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft-ben végeztem, külön köszönöm Lakatosné Prof. Dr. Varsányi Magdának a sok segítséget, amit közös munkánk során nyújtott.

Köszönöm Zagyva Tamásnak a hidroxipatit vázlatos kristálystruktúrájának és kristályrácsának ábrázolását, melyet CrystalMaker szoftverrel készített.

Köszönettel tartozom a SEM/EDX mérésekért Illés Leventének (MTA-EK), Dr Horváth Zsolt Endrének (MFA, Nanoszerkezetek Osztály) az XRD mérések elvégzéséért és a kiértékelésükben nyújtott segítségéért. Köszönöm Havasi Viktornak (SZTE) az XRD és FT-IR méréseket.

Köszönöm a SEM/TEM-EDX méréseket a Leeds Egyetem professzorának, Terry Wilkinsnek valamint Dr. Yunhong Jiangnak. Ezeket a méréseket a QualityNano projekt támogatásával végeztük 2014 októberében és 2015 áprilisában.

Hálás vagyok a lehet ségért, hogy a COST-STSM projekt segítségével biokompatibilitási tesztek végezhettem a Rizzoli Otopédiai Intézetben, Bolognában az ottani kutatócsapattal, Prof. Milena Finivel és Dr. Elena Della Bellával.

Köszönöm még a JECS-TRUST anyagi támogatását, melynek keretein belül szintén biokompatibilitási tesztek végeztem az Erlangen-Nürnbergi Egyetemen. Hálás vagyok az ottani kutatócsoportnak a sok segítségért: Prof. Aldo R. Boccaccininek, a Bioanyagok Intézet Igazgatójának, Dr. Rainer Detschosztályvezet nek, Alina Grünwald technikusnak valamint Yuyun Yang doktorandusz hallgatónak az antibakteriális tesztekért.

Külön hálás vagyok még az MTA-EK Vékonyréteg-Fizika Osztály összes kollégájának a kedvességükért és biztatásukért.



## MELLÉKLET

**M.1. Táblázat:** Ti6Al4V alapfém valamint a nemfolytonos HAp és adHAp bevonatok impedancia adatainak fittelt eredményei. A mérések nyitott áramköri potenciálon történtek, SBF oldatban, 37 °C-on különböző bemerítési idő után.

	nap	$R_s$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$CPE_{\text{coat}}$ ( $\mu\text{Fcm}^{-2}\text{s}^{n-1}$ )	$n$	$R_{\text{coat}}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$CPE_{\text{ct}}$ ( $\mu\text{Fcm}^{-2}\text{s}^{n-1}$ )	$n$	$R_{\text{ct}}$ ( $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )	$CPE_{\text{cp}}$ ( $\mu\text{Fcm}^{-2}\text{s}^{n-1}$ )	$n$	$R_{\text{cp}}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\chi^2$ ( $\times 10^{-5}$ )
Ti6Al4V	1	32	39,7	0,85	402	54	0,91	5546	-	-	-	4,9
	5	44	30,5	0,85	596	56	0,93	2676	-	-	-	5,3
	10	36	33,6	0,86	554	67	0,92	3768	-	-	-	3,0
	15	27	34,1	0,85	536	71	0,95	4028	-	-	-	2,5
	20	31	32,4	0,89	521	66	0,95	6578	-	-	-	2,6
HAp-II	1	24	1616	0,60	290	198	0,83	910	445	0,59	949	8,2
	5	32	1409	0,63	310	216	0,84	1554	490	0,60	790	1,6
	10	41	1526	0,55	313	214	0,84	950	486	0,62	1010	1,8
	15	44	1310	0,53	324	198	0,85	894	480	0,61	1162	0,9
	20	39	1318	0,54	319	143	0,85	884	477	0,64	1169	3,5
adHAp-II	1	25	1245	0,60	216	287	0,83	662	1032	0,59	145	4,6
	5	31	916	0,61	278	211	0,83	655	1145	0,55	257	3,8
	10	33	927	0,56	255	217	0,84	590	997	0,55	254	3,7
	15	35	1030	0,55	285	235	0,85	449	1110	0,52	237	5,1
	20	40	1066	0,55	281	242	0,85	410	1038	0,52	239	4,9

adHAp-III	1	45	794	0,62	167	311	0,83	722	921	0,56	176	3,4
	5	49	785	0,62	221	320	0,84	690	785	0,55	269	7,2
	10	36	892	0,61	245	296	0,84	557	810	0,55	182	3,5
	15	51	1034	0,60	230	307	0,85	491	850	0,54	168	0,4
	20	43	1086	0,60	214	345	0,84	455	793	0,53	147	0,9