

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Füüsika Instituut

Elyne Aaviksoo

**Meditiinilise titaani funktsionaliseerimine
aatomkihtsadestatud kiledega**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: MSc Mairo Merisalu,
PhD Mariliis Klaas,
prof. Väino Sammelseg

Kaitmisele lubatud (.....)

Juhendajad

allkiri, kuupäev

Tartu 2015

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elyne Aaviksoo,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

„Meditsiinilise titaani funktsionaliseerimine aatomkihtsadestatud kiledega,“

mille juhendajad on MSc Maido Merisalu, PhD Mariliis Klaas ja prof. Väino Sammelselg,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **01.06.2015**

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Meditsiiniline titaan	7
1.2. Bioühilduvus	8
1.2.2. Bioühilduvuse kontrollimise meetodid	9
1.2.3. Bioühilduvuse seos hüdrofiilsusega	10
1.3. Aatomkihtsadestus.....	10
1.3.1. Meetodi põhimõte	10
1.3.2. Bioühilduvad ALD kiled.....	12
1.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia	12
1.5. Ramanhajumise spektroskoopia.....	14
1.6. Induktiivsidestunud plasma massispektromeetria	16
1.7. Röntgenfluorestsents-spektromeetria.....	16
1.8. Pinnakatete testimine elektrokeemiliste meetoditega.....	18
1.9. Probleemipüstitus	20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1. Titaani eeltötlused.....	21
2.2. Aatomkihtsadestus.....	22
2.3. Hüdrofiilsuse määramine	22
2.4. Pindade karakteriseerimine mikroskoopia meetoditega	23
2.5. Pindade karakteriseerimine elektrokeemiliste analüüsimeetoditega	23
2.6. Metall-iionide eraldumine Ti-5 implantaatidest.....	24
2.7. Biokatsed – rakukasvatused eeltöödeldud ja ALD kiledega kaetud objektidel	25
3. TULEMUSED JA ANALÜÜS	26
3.1. Pindade ja ALD kilede karakteriseerimine (SEM, XRF, Ramanspektroskoopia)	26
3.2. Otsingulised uuringud	27
3.3. Põhikatsete tulemused	30

3.3.1. Valmistatud katete testimine lineaarse voltamperomeetriaga	30
3.3.2. Pindade ja ALD kilede bioühilduvus	32
3.3.2.1. Märgumine	32
3.3.2.2. Rakukasvatused	33
3.4. Metalli-ioonide eraldumine Ti-5 implantaatidest	36
4. KOKKUVÕTE	38
VIITED.....	39
SUMMARY.....	43
LISA.....	44

Kasutatud lühendid (esinemise järjekorras)

Ti-5 – Ti „Grade 5“ sulam, Ti-6Al-4V

SBF – simuleeritud kehavedelik, kunstlik lümfivedelik/ veri/ sülg; ingl. k *Simulated bodily fluid*

ALD – aatomkihtsadestus; ingl. k *Atomic layer deposition*

SEM – skaneeriv elektronmikroskoopia; ingl. k *Scanning electron microscopy*

ICP-MS - induktiivsidestunud plasma massispektromeetria; ingl. k *Inductively coupled plasma mass spectrometry*

XRF – röntgenfluorestsents; ingl. k *X-Ray fluorescence*

E_{cor} – pinge väärtus korrosioonivoolu mõõtmisel

j_{cor} – voolutihedus

Sissejuhatus

Hambaimplantaatide paigaldamine on efektiivseim ning usaldusväärseim meetod hambumuse taastamiseks, saavutamiseks ja säilitamiseks [1]. Lisaks on hambaimplantaatide eesmärk tagada patsientidele loomuliku hambumusega samaväärne funktsioon ning esteetiline välimus. Implantaatide võimalikult pika eluea saavutamiseks on vajalik nende hea ühildumine inimorganismiga, vastupidavus korrosioonile ja tsüklilisele koormusele [2].

Meditsiinilisest titaanist implantaadid on kasutusel olnud juba aastakümneid. Selle materjali bioühilduvus, mehaaniline vastupidavus ja korrosioonikindlus on teinud titaanist ühe eelistatuima materjali implantaatide valmistamiseks [3]. Üheks levinumaks implantaatide valmistamise materjaliks on titaani α - β sulam Ti-Al6-V4 (edaspidi Ti-5), mis sisaldab Al ja V lisandeid. Vaatamata selle sulami suurepärasele mehaanilistele omadustele ja suhteliselt heale bioühilduvusele, võib antud sulamist valmistatud implantaatide viimisel organismi esineda kudede ja implantaatide vahel integratsiooniraskuseid: võib tekkida allergiline reaktsioon, kuna organismi difundeerub teatud kogus Al ja V ioone [4-6]. Lisaks sellele, on probleemiks ka korrosioon, mille käigus toimub sulamist α -faasi väljasöövitus ja β -faasi tagasisadenemine [7]. Sageli on Ti-5 sulamist implantaadi kruviosade korrosiooniprotsess märksa kiirem, kui patsiendil on suus ka elektrokeemiliselt passiivsemaid, näiteks väärismetalle sisaldavaid implantaate [8]. Sellisel juhul tekib galvaaniline paar, kus passiivsem metall käitub katoodina ja aktiivsem metall anoodina.

Viimastel aastakümnetel on aatomkihtsadestamise meetod leidnud rakendust paljudes erinevates valdkondades [9]. Üheks selliseks rakenduseks on üliõhukesed korrosioonivastased katted, mis enamasti põhinevad keemiliselt vastupidaval titaandioksiidil [10]. Aatomkihtsadestatud anataasifaasiga titaandioksiidi on mitmes töös uuritud kui hambaimplantaatide bioühilduvust parendavat materjali [11, 12], kuid siiani pole uuritud seda, kas katted takistavad Al ja V ioonide väljumist ning kas katted on defektivad ja kaitsevad implantaati korrosiooni eest.

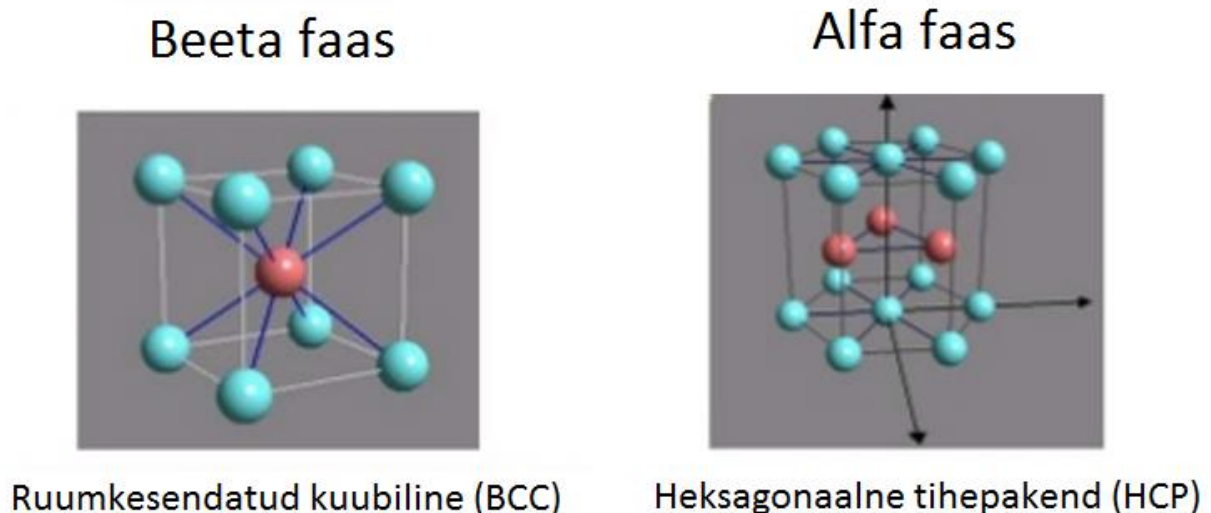
Käesolevas töös uuritakse võimalusi meditsiinilise titaani funktsionaliseerimiseks, parandamaks selle biosobivust ja korrosioonikindlust ning kasutades selleks pinna keemilise söövitamise karestamist ja pinna katmist titaandioksiidiga aatomkihtsadestuse meetodil.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Meditsiiniline titaan

Meditsiinilistes rakendustes kasutatakse kõige enam titaani sulamit Ti-5 ehk Ti-Al6-V4, mis on teatud ka nime all Ti klass 5 (*Titanium Grade 5*) [4]. Titaani tugevus ja kõvadus sõltuvad suurel määral tema koostisest – sobivad lisandid suurendavad neid omadusi oluliselt. Näiteks, kasutatakse metalseid lisandeid Al ja V legerivate elementidena.

Ti-5 on alfa-beeta sulam, mis sisaldab üht või mitut alfa-stabiliseerivat ning üht või mitut beeta-stabiliseerivat elementi, omandades sel viisil mõlema sulamiklassi parimad omadused. Titaani alfa ja beeta faaside kristallstruktuurid on toodud joonisel 1 [13, 14].



Joonis 1. Titaani alfa ja beeta faaside kristallstruktuurid [13].

Alfafaasilised sulamid on väikese kuni keskmise tugevusega, korrosioonikindlad, kergesti sepiatavad ja väga heade mehaaniliste omadustega krüogeensetel temperatuuridel. Beetafaasilised sulamid on väga hästi termiliselt töödeldavad, suure tugevusega ja keskmiste temperatuuride juures roomele (ajast sõltuv väljavenimine pideva jõu toimel mingil teatud temperatuuril) hea vastupidavusega [14].

Alfa-beeta sulam on termiliselt töödeldav, tugevusomadused on head, sulam on superplastiliselt vormitav, hoolimata külma vormitavuse piiratusest on kuuma vormitavuse omadused väga head ja roome kõrgetel temperatuuridel keskmine. Sulami Ti-5 keemiline koostis on toodud töö eksperimentaalses osas, tabelis 1.

Alumiiniumi sisaldus meditsiinilises titaanis on vajalik sulami tugevuse saavutamiseks: kui alumiiniumit on alla 4,5%, siis ei saada piisavat tugevust, samas, kui Al sisaldus on üle 5,5%, halveneb sulami lõiketöödeldavus. Vanaadiumit lisatakse sulamile samuti tugevuse parendamiseks. Vaja on vähemalt 3%-ne vanaadiumi sisaldus, et saavutada piisavat lisatugevust, kuid ka selle elemendi üle 5%-ne sisaldus halvendab sulami lõiketöödeldavust. Raud ja hapnik titaanisulamites tõstavad samuti tugevust, kuid nende sisaldus on tugevasti limiteeritud, kuna nad halvendavad sulami teisi omadusi.

Sulamit Ti-5 kasutatakse meditsiinilistes rakendustes enim, kuna see materjal on tugev, kerge ja suhteliselt korrosioonikindel. Kirurgiliste implantaatide valmistamise seisukohalt on antud materjali eeliseks hea kulumiskindlus ja magnetiliste omaduste puudumine. Kulumiskindlus võimaldab paigaldada implantaate ja kunst-liigeseid, mis kestavad aastakümneid ning magneetuvuse puudumine võimaldab vastavate implantaatidega/proteesidega patsientidel käia magnetuuringutel või kasutada südamestimulaatorit.

Ti-5 on bioühilduv, kuid selle koostises sisalduvad alumiinium ja vanaadium võivad inimorganismi vajalikest suuremates kogustes sattumisel osutada sellele toksilisteks [4]. Alumiiniumit on inimkehas keskmiselt 35 mg, peamiselt kopsudes, kuhu see on sattunud õhust, ja luudes. Liigne kogus alumiiniumit võib tekitada häireid närvisüsteemi töös, neeru-, luu-, ja ajuhaiguseid ning arvatakse, et alumiiniumil on seos ka Alzheimeri tõvega [5]. Vanaadiumit on inimkehas keskmiselt 200 µg; omades sarnasusi fosforiga, koguneb vanaadium kergesti luukoes ja neerudes. Vanaadiumi toksilisust organismile pole täielikult uuritud, kuid on leitud, et antud metalli liigne sisaldus kehas suurendab riski vähi tekkeks ja sündidefektide esinemiseks; lisaks võib inimestel esineda häireid hingamisteedes ja seedekulglas [4, 6].

1.2. Bioühilduvus

1.2.1. Bioühilduvuse mõiste

Bioühilduvus on materjali sobivus elava koe või organismiga. Bioühilduval materjalil peavad olema täidetud mitmed erinevad kriteeriumid. Üldiselt peab bioühilduv materjal olema ohutu ja mitte-toksiline bioloogilisele süsteemile (rakkudele katsetingmustes) ja organismile. Tähtis on, et vastav materjal suudaks eksisteerida kudede vahetus kontaktis, tekitamata tagasilükke-reaktsiooni [2]. Ühe võimalusena tekib materjaliga kokkupuutes põletik ja keha

nõ viskab materjali välja, lihtsaim näide on erinevate ilu-augustamiste ebaõnnestumised. Teise võimalusena tekitab organism soovimatu materjali ümber valkudest „seinad“, takistamaks materjali kokkupuudet ümbritsevate kudedelega. Bioühilduvuse raames vaadeldakse nii materjalide bioaktiivsust kui ka bioinertsust.

Bioaktiivsed materjalid (Ti, kaltsiumfosfaat, polülaktaat [15]) soodustavad rakkude kasvu nende pinnal, ühildumist kudedelega ja eeldavad seda, et implantaat või protees jääb organismi sisse ja et seda pole vaja kirurgiliselt eemaldada. Bioinertsed materjalid seevastu ei soodusta ega takista rakkude kasvu nende pinnal. Bioinertsed materjalid ei ühildu organismiga täielikult, kuid need ei tekita kehas ka tagasilükke-reaktsiooni. Sellised bioinertsetest materjalidest (Au, SiO₂ ja terased) valmistatud implantaadid fikseeritakse tihedalt luusse ning neid on võimalik vajadusel eemaldada [16].

1.2.2. Bioühilduvuse kontrollimise meetodid

Materjalide bioühilduvust kontrollitakse alati, kui on teada, et materjal puutub kokku elusorganismiga [2, 12, 17-18]. Kuigi erinevate funktsioonidega bioühilduvaid materjale on palju (näiteks metallist või keraamikast proteesid ja implantaadid, kunstnahk, elektroodid funktsionaalseks elektriliseks stimulatsiooniks, jne), püütakse esialgsete katsetega kindlaks teha peamiselt materjali ohutust organismile. Üheks efektiivseks katsetamise viisiks on vastava materjali hoidmine kunstlikus lümfivedelikus (simuleeritud kehavedelik ehk ingl. k. *simulated body fluid* – *SBF*), millel on inimese vereplasmaga sarnane ioonide kontsentratsioon, pH tase ja mida hoitakse inimkeha sisetemperatuuril. SBF meetodit kasutakse *in vitro* (s.o. katseklaasis) eksperimentides, et ennustada materjali käitumist *in vivo* (s.o. keha sees) olukorras. Uuritava materjali bioühilduvust, selle meetodi puhul ka bioaktiivsust, näitab materjali pinnale apatiidikihi tekkimine. SBF-is sisalduvad kaltsiumi- ja fosfaadi-ioonid tekitavad apatiidi kihi materjalile spontaanselt, demonstreerides seega materjali omadust soodustada selle integreerimist luukoega. Teiseks informatiivseks katseks on loomade või inimese rakukultuuride kasvatamine kasutatava biomaterjali pinnale. Antud töös analüüsiti implantaatide bioühilduvuse määra rakukasvatustega; meetodi kirjeldus ja katsete läbiviimist on kirjeldatud järgnevas peatükis.

1.2.3. Bioühilduvuse seos hüdrofiilsusega

Implantaatide valmistamiseks kasutusel olevate materjalide bioühilduvuse määra kindlaks tegemisel on oluline roll implantaadi pinna märguvusel. Märguvus on üks näitajatest, millest hiljem sõltub implantaadi sobivus ja bioloogiliste protsesside kulgemine ja nende kiirus biomaterjali ja orgaanilise koe puutepinnal. Märgumisnurga (ingl.k. *contact angle*) suurusest sõltub pinna märguvuse aste. See nurk saab muutuda vahemikus 0° - 180° : nurkade puhul, mis on $< 90^{\circ}$, loetakse materjal hüdrofiilseks ja nurkade puhul, mis on $> 90^{\circ}$, loetakse materjal hüdrofoobseks. Biomaterjalide korral on eelistatud hüdrofiilsus; sellised pinnad hõlbustavad esmaste reaktsioonide toimumist implantaadi ja vastuvõtva koe vahel. Lisaks sellele on rakkude kinnitumine hüdrofiilsele pinnale parem kui hüdrofoobsele pinnale [17, 18].

1.3. Aatomkihtsadestus

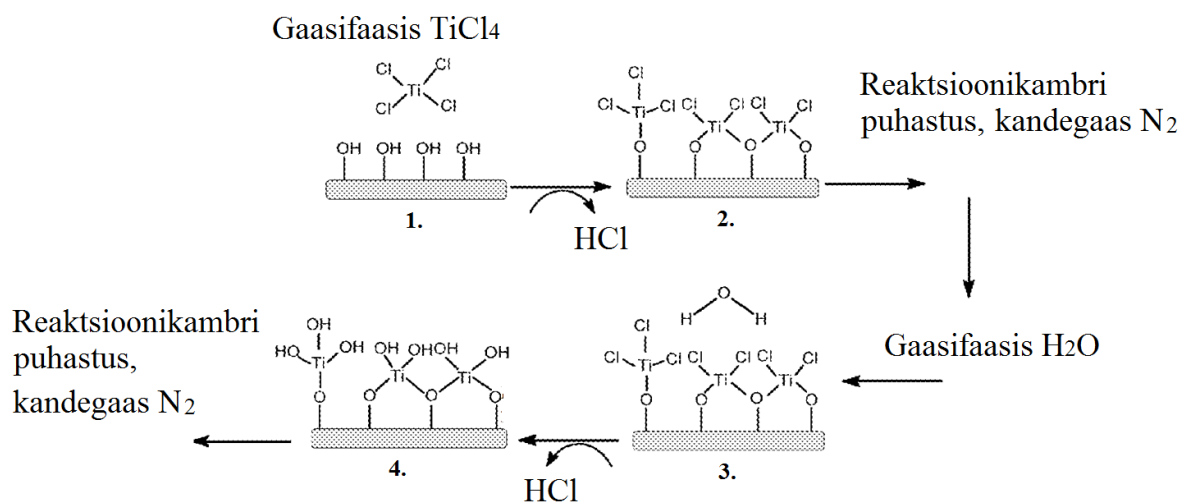
Aatomkihtsadestamine (ALD – *atomic layer deposition*) on meetod väga õhukeste tahkisekilede sadestamiseks tahke materjali pinnale [19]. Aatomkihtsadestusel on võimalik kasvatada väga täpse paksusega defektivabasid ja ühtlase paksusega kilesid igasuguse pinnastruktuuri ja geomeetriaga aluspindadele. Sadestatav kiht kasvab iga pinna ja pinnadetaili külge, poorsed materjalid, pulbrid ja nanoosakesed, ja täidab pinnal augud, vaod, kraaped või astangud.

1.3.1. Meetodi põhimõte

Aatomkihtsadestamine on tsükliline keemilise aurufaassadestuse meetod, mis põhineb vahelduvatel iseküllastuvatel pinnareaktsioonidel [19]. Pinna katmisel reageerivad alusmaterjali pinnal järgemööda kaks või enam ükshaaval reaktorisse kandegaasi (näit. N_2) abil suunatud gaasifaasilist lähteainet, nagu on näha jooniselt 2. Iga lähteaine pulsi järel on paus, mille järel toimub pinna ja kasvukambri puhastamine kandegaasi abil. Ühe reageeriva gaasi (lähteaine) liikumisel reaktsioonialasse toimub kasvupinna ja lähteaine vahel adsorptsiooniline küllastusreaktsioon, mille käigus sadestub pinnale tavaliselt teatud murdosa monokihist. Pausid doseerimispulsside vahel on vajalikud lähteainete segunemise vältimiseks

gaasifaasis ja füsisorbeerunud lähteaine komponendi eemaldamiseks katsekeha ning reaktori pindadelt. Teise lähteaine jõudmisel pinnale toimub sellel pinna reaktsiooni teine faas, mille tulemusel moodustub pinnale vajalik aine, näiteks oksiid või nitriid.

Aatomkihtsadestamise protsessis kasvatatakse kile tsükliliselt; tsükleid korratakse kile soovitud paksuse saavutamiseks. Üks sadestustsükkel sisaldab kõiki lähteainete ning nende vaheliste puhta kandegaasi pulse, seega koosnev tsükkel lihtsamal juhul neljast etapist: kasvukambrisse viiakse esimene gaasifaasis lähteaine, mis reageerib kasvupinnaga monokihi teatud osa kemisorbeerumiseni. Reaktsioon seiskub, kui lähteaine adsorbeerumine on peatunud. Tsükli teise etapina eemaldatakse puhta kandegaasi voos üleliigne lähteaine ja reaktsiooni gaasilised produktid kambrist või erijuhul, kui kandegaasiga läbipuhumist ei kasutata, kamber evakueeritakse teatud kõrgema vaakumi tasemeni. Tsükli kolmandas etapis suunatakse teine gaasifaasis lähteaine kasvukambrisse, mis reageerib esimese lähteaine kihiga. Tsükli viimases, neljandas faasis, kasvukamber ja objekti pind jällegi puhastatakse. Ühes tsükli sadestub reeglina vähem kui monokiht kasvatatavat ainet. Tsükleid saab korrata nii palju kui vaja, kuid kile kasvu jätkumise eelduseks on kilega kaetud pinna jätkuv aktiivsus, mis sõltub kasvutemperatuurist, lähteainetest ja kasvatatud ainest.



Joonis 2. TiO₂ kile aatomkihtsadestamise põhimõtteline skeem. TiO₂ sadestus toimub lähteainetest TiCl₄ ja H₂O, kandegaasiks on N₂.

ALD meetodil on oma eelised ja puudused: meetod tagab kilematerjali homogeensuse ja täpse ning kiire kontrolli kile paksuse üle, kuid protsess on seejuures ise suhteliselt aeglane. Meetod annab võimaluse kasvatada ühesuguse paksusega kilesid ka keeruka morfoloogiaga pinnale, jättes reaktori suuruse üheks peamiseks piiranguks. Sellegipoolest on ALD abil paljude

materjalide sadestamine liiga kulukas, kuna sageli on lähteained kallid ja neid kasutatakse kasvuprotsessis ebaefektiivselt. Meetodi eelisteks saab pidada võimalust kasvatada kilesid madalatel temperatuuridel ja võimalust valmistada üliõhukesi kilesid ning nende nanolaminaate.

1.3.2. Bioühilduvad ALD kiled

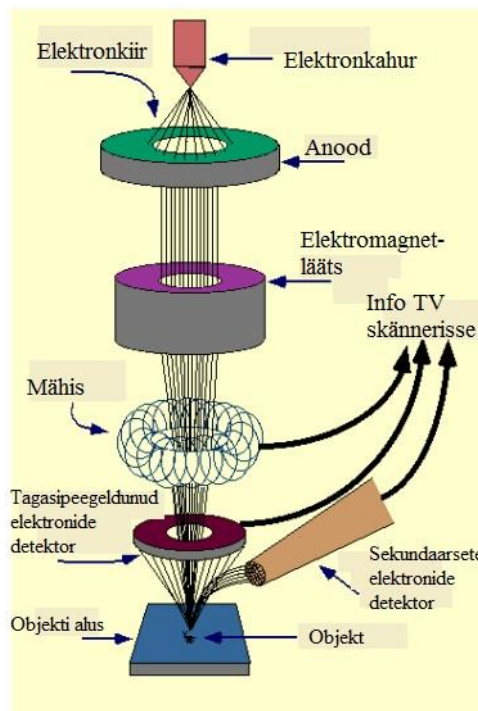
Bioühilduvaid ALD kilesid saab kasutada nii implantaatide kui kirurgiliste töövahendite katmiseks [20, 21]. Kirjandusest on teada, et ALD TiO_2 kiled on bioühilduvad, kui sadestatud kile on kristallstruktuurilt anataas ning kui kile on märguv [11, 12]. Tänu ALD protsessi omadustele on võimalik katta ka väga keerulise pinnaga objekte, tehes meetodi väärtuslikuks just meditsiinivaldkonnas. Bioühilduvate kiledega saab implantaadimaterjali täiustada – tavaliselt bioinertset titaani pinda saab funktsionaliseerida nii, et see muutuks bioaktiivseks ja soodustaks implantaadi ja keha ühilduvust. ALD kiled võimaldavad parandada implantaatide pinnaomadusi, et vähendada hõõrdumist, korrodeerumist, kulumist, samuti modifitseerida kirurgiliste tööriistade pinnaomadusi. Kui kirurgilistele tööriistadele on sadestatud ALD TiO_2 katted, siis nende kiiritamisel UV kiirgusega tekitab pind õhuhapnikust osooni (O_3), mis on antibakteriaalse toimega [22].

Bioühilduvate kiledena kasutatakse paljusid erinevaid katteid, nende hulgas alumiiniumoksiidi (Al_2O_3) [2], hüdroksüapatiiti (HA , $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) [15], ränidioksiidi (SiO_2) [16] ja titaandioksiidi (TiO_2) [12].

1.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia

Skaneeriv elektronmikroskoopia (SEM) on elektronmikroskoopia üks liikidest [23]. Selle uurimismeetodiga saadakse katseobjekti kujutis uuritavat proovi kõrge energiaga elektronkiire abil skaneerides. Elektronid interakteeruvad proovi pinna aatomitega, mille järel on võimalik registreerida signaale, mis annavad informatsiooni proovi pinna topograafia ja ka koostise kohta. Registreeritavaid signaale võtavad vastu (detekteerivad) analüsaatorid on erinevad, kuna signaalide liigid varieeruvad: sekundaarsed ja tagasihajunud elektronid, röntgenkiirgus, katoodluminesents. Skaneeriva elektronmikroskoobi tööpõhimõte on kujutatud käesolevas peatükis joonisel 3.

Vanemate elektronmikroskoopide tüüpiliseks elektronide allikaks on volframtraat, mille kuumutamisel väljuvad sellest elektronid. Elektronallikast väljunud elektronid kiirendatakse maandatud anoodi abil ja fokuseeritakse magnetläätsede abil. Skaneerimismähiste abil toimub elektronkiire juhtimine ja sellega pannakse kiir üle proovi pinna skaneerima. SEMi korral on kiirendavaks pingeks 1 kV- 30 kV, mida operaator saab vastavajalt vajadusele reguleerida. Kiirendatud elektronide kimp fokuseeritakse poolide abil magnetväljas väikesesse punkti katseobjekti pinnal ja elektronide kimp suunatakse rida-realt mööda objekti pinda kuni uuritav objekt on skaneeritud. Kuigi elektronide kimp on suure energiaga, siis objektini jõudnud elektronid hajuvad korduvalt aatomite elektronikihtidelt ja pidurduvad uuritava objektiga vastastikmõju toimeel mõne mikromeetri paksuses kihis. Interaktsioonikihi paksus sõltub elektronide konkreetsest energiast ja uuritava objekti aatominumbrist ning tihedusest. Vastastikmõju tõttu peegelduvad materjalist kõrge energiaga elektronid; välja lüüakse ka madala energiaga sekundaarelektrone ning lisaks tekib elektronide pidurdumisel aatomites röntgenkiirgus (aatomite sisekihtide elektronide ergastamisel ka karakteristlik röntgenkiirgus).



Joonis 3. Skaneeriva elektronmikroskoobi põhimõtteline skeem [24].

Peegeldunud elektronide hulk sõltub materjalist – mida suurem on materjali aatommass, seda rohkem elektrone tagasi peegeldatakse. Sel viisil on võimalik teha kindlaks katseobjekti koostis ja keemiliste elementide jaotus uuritava pinnal. Sekundaarsete elektronide abil uuritakse näidise pinna topograafiat.

Sageli kasutatakse elektronmikroskoopide juures ka röntgenkiirguse detektorit – kasutades tekkinud karakteristlikut röntgenkiirgust, võimaldab see täpselt määrata uuritava näidise keemilist koostist. Elektronmikroskoobi abil on sobiv uurida elektrit juhtivaid materjale – juhte ja ka pooljuhte, kuid mittejuhtivate materjalide jaoks tuleb nende pinda eelnevalt töödelda, näiteks katta pind väga õhukese juhtivmaterjali kihiga, näiteks kulla või plaatina, mõne nanomeetri paksuse kilega.

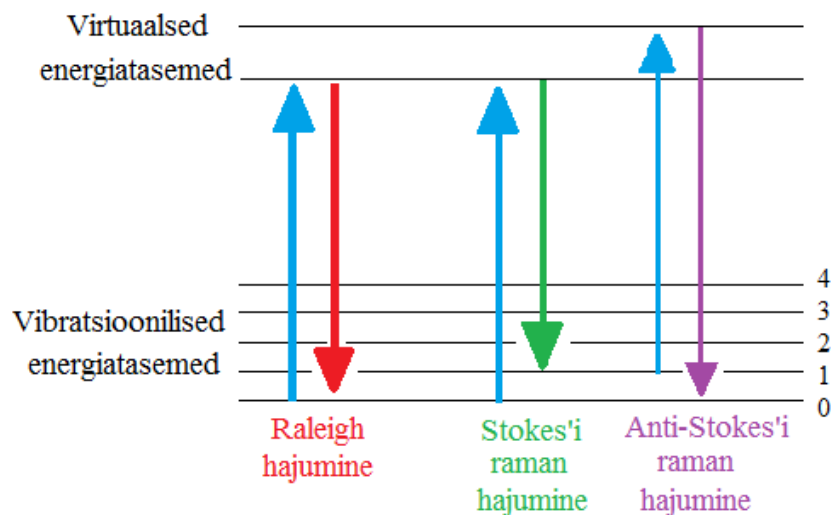
1.5. Ramanhajumise spektroskoopia

Ramanspektroskoopia on üks uurimismeetoditest, mis annab informatsiooni uuritava süsteemi vibratsiooniliste, rotatsiooniliste ja teiste madalasageduslike võnkumiste kohta [25]. Vibratsiooniline spektroskoopia on uurimismeetodina väga laialdaselt kasutatav, kuna võimaldab uurida väga erinevaid katseobjekte: erineva suurusega, erinevatel temperatuuridel ja erinevas füüsilises olekus proove. Meetodit saab kasutada proovide uurimiseks erineva põhjalikkusega, lihtsast materjali identifitseerimisest koguspektri kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsini. Ramanspektroskoopia abil tuvastatakse mitte-polaarsete aatomgruppide sümmeetrilisi vibratsioone ja meetod ise põhineb katseobjektidelt hajunud (laseri)valguse spektroskoopilisel uurimisel.

Valguse hajumine jaotatakse kaheks – elastne hajumine ja mitteelastne hajumine. Elastse, ehk Raleigh hajumise korral ei toimu energia ülekannet hajutaja ja kiirguse vahel. Seega hajunud kvandi energia (sagedus) on võrdne pealelangenu kvandi energiaga. Mitteelastse hajumise korral on hajunud kvandi sagedus erinev pealelangenu kvandi sagedusest, kusjuures hajunud kvandi sagedus (energia) võib olla nii madalam kui kõrgem (nn. Stokes'i ja anti-Stokes'i jooned). Sellist nähtust nimetatakse ramanhajumiseks. Katseobjektilt hajunud valgust analüüsitakse spektromeetri abil.

Mitteelastselt hajunud ramankiirgus tekib, kui molekulile langev valgus ergastab molekuli; protsessi käigus kiirgub mitteelastselt hajunud footon, mille lainepikkus on erinev kasutatud laserivalgusest. See on võimalik, kuna valgustatav materjal omab elektrone energiaga, mis on kas kõrgemad või madalamad footoniga ergastatud elektroni energiast. Seega saavad molekulid/aatomid kiirata samuti Raleigh hajumisele vastavast sagedusest nii suurema kui väiksema sagedusega kiirgust.

Stokes'i hajumiseks nimetatakse ramanhajumise efekti, mille korral hajunud footoni energia on väiksem kui ergastava footoni energia. Kui footoni energia on suurem esialgse footoni energiast, on tegemist anti-Stokes'i hajumisega. Energiate erinevus ei sõltu ergastava valguse energiast, vaid sõltub molekuli alg- ja lõppoleku energiatega erinevusest. Stokes'i hajumise korral ergastatakse molekuli energia põhiolekust virtuaalsele energianivoole ning molekuli relakseerub seejärel mõnele põhiolekust kõrgemale energianivoole. Anti-Stokes'i hajumise korral on molekuli ergastatud seisundis, molekuli ergastatakse langeva kvandi poolt virtuaalsele nivoole ja see relakseerub seejärel mõnel esialgsel seisundil madalamal energianivoole. Kuna tavalistel temperatuuridel on enamik molekule põhiolekus, on suurem osa hajumistest Stokes'i hajumised. Suuremate molekulide süsteemide korral leiavad aset mõlemat liiki protsessid, kuid enamasti on Stokes'i hajumise intensiivsus siiski kordades suurem kui anti-Stokes'i hajumise intensiivsus. Suurema intensiivsuse tõttu detekteeritakse Ramani spektroskoopias Stokes'i hajumist. Hajumiste kohta on toodud selgitav joonis 4.



Joonis 4. Valguse hajumiste skeem elastsel- ja ramanhajumisel.

Seega on ramanspekter erinevate võnkeseisundite spekter, mille energianivoode põhjal saab tuvastada aineid, keemilisi ühendeid, materjalide faase ja struktuure. Samuti on võimalik saada informatsiooni tahkiste pingete kohta.

1.6. Induktiivsidestunud plasma massispektromeetria

ICP-MS (ingl. k. *inductively coupled plasma mass spectrometry*; induktiivsidestatud plasma massispektromeetria) on üks kõige tundlikumaid elementanalüüsi meetodeid [26]. Antud elementanalüüsi tehnika on poolkvantitatiivne ehk ei kasuta elementide tuvastamiseks etteantud standardeid ning suudab mõne teadaoleva elemendi sisalduse abil kalibreerida signaali teiste elementide jaoks. Meetodi olulisus elementanalüüsi seisukohalt seisneb selle tundlikkuses (madalates avastamispriirides) ning võimes tuvastada kiiresti enamikku elemente.

Antud meetodi korral kasutatakse induktiivsidestatud plasmat proovi aurustamiseks, atomiseerimiseks ja ioniseerimiseks; tekkinud ioone analüüsitakse massispektromeetri abil. Meetod näeb ette uuritava proovi sisestust üldjuhul aerosoolina, mis tekitatakse proovi piserdamisel inertgaasi voolus. Aerosool juhitakse plasmasse, kus algab proovi maatriksi lagundamine ja ioniseerimine. Induktiivsidestatud plasma meetodit kasutatakse peamiselt katioonide analüüsiks proovides.

Atomiseerimiseks ja ioniseerimiseks kasutatakse plasmatorvikut (ingl. k. *plasma torch*), mille ehitus mõjutab ioniseerimise efektiivsust ja maatriksi lagundamise võimet. Tõrviku ehitus peab tagama võimalikult efektiivse proovi ioniseerimise. Plasma tekitatakse tavaliselt ülipuhtas argoonis, kuna Ar aatomite ionisatsioonenergia on kõrgem enamiku teiste elementide omast ja madalam kõigi metallide teisest ionisatsioonist.

Plasmas tekkinud katioonid juhitakse massispektromeetrisse, kus massianalüsaator eraldab elektromagnet- või magnetväljas ioonid nende massi ja laengu suhte järgi ning detektor mõõdab tekkinud signaali tugevust, võimaldades andmetest välja arvutada iga iooni esinemise hulga. Signaali töötlemisel on võimalik luua massispekter, milles kajastub eelnevalt tuvastatud ionide jaotus. Käesolevas töös kasutati induktiivsidestatud plasma massispektromeetria, et määrata kunstsüljes leotatud Ti-5 implantaatidest väljunud metallioone. Analüüsitulemustest on lähemalt kirjutatud töö tulemuste ja analüüsi osas.

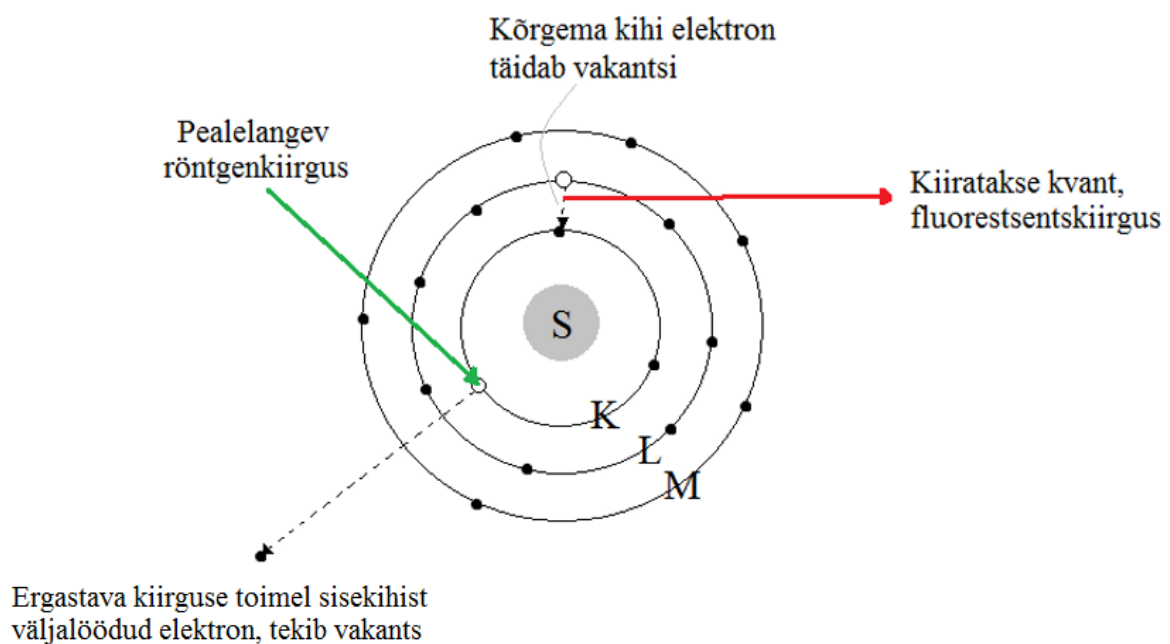
1.7. Röntgenfluorestsents-spektromeetria

Röntgenfluorestsents-spektromeetria (ehk lühendatult XRF) on meetod, kus objektis leiduvate elementide aatomeid analüüsitakse registreerides neile iseloomulikku röntgenkiirgust [27, 28]. XRF meetod leiab kasutust prooviobjektide elementanalüüsis, kus

röntgenfluorestsents on karakteristliku sekundaarse röntgenkiirguse emissioon materjali pinnast, mida on ergastatud suure energiaga röntgenkiirtega.

Elementanalüüsil XRF meetodiga ergastatakse prooviobjekti suure energiaga (lühikese lainepikkusega) röntgenkiirtega, mille neeldumisel toimub fotoefekt ja ergastatud ionide tekkimine. Kui primaarkiire energia on piisavalt suur, et välja lüüa (ioniseerida) mõni uuritava objekti aatomi sisekihi elektron, muutub aatom ebastabiilseks ja püüab saavutada olukorda, kus mõni kõrgema kihi elektron asendub kiirguse poolt tekitatud sisekihi vakantsi. Väliskihi elektroni liikumisel sisekihil olevasse vakantsi vabaneb kiirgusena energia, mis sõltub nii sise- kui ka väliskihi elektronide seoseenergiast. Seejuures on kiiratud kvandi energia primaarsest röntgenkiirgusest väiksema väärtusega. Proovi ergastatud aatomite relakseerumisel vabanenud kiirgust nimetataksegi fluorestsentskiirguseks. Eraldunud footoni energial on karakteristlik väärtus konkreetse elemendi jaoks, sest selline üleminek toimub antud aatomis kindla energiaga. Seega on fluorestsents röntgenkiirguse abil võimalik määrata prooviobjekti elementkoostist.

XRF meetodi puhul on tegemist kvantitatiivse analüüsiga, kuna elementide iseloomulikud emissioonijooned vastava fluorestsentskiirguse intensiivsusel vastavad proportsionaalselt kiirgava elemendi aatomite hulgale prooviobjektis. Põhimõtteline skeem aatomi ergastamisest ja relakseerumisest on toodud juuresoleval joonisel 5.



Joonis 5. Fluorestsentskiirguse tekkimise lihtsustatud skeem.

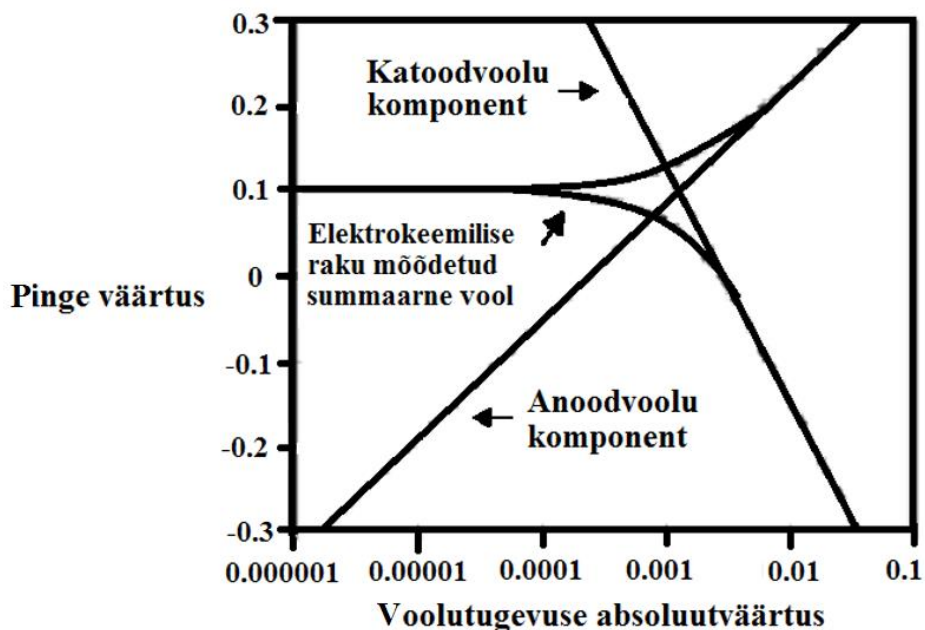
1.8. Pinnakatete testimine elektrokeemiliste meetoditega

Elektrokeemia on keemia haru, kus mõõdetakse elektrilisi suurusid nagu pinge ja voolutugevus ning uuritakse nende seost keemiliste parameetritega [29]. Elektrokeemiliste mõõtemetodite korral uuritakse reaktsioone elektroodi pinnal ja selle meetodi suur eelis seisneb kiiruses ning katsete läbiviimiseks vajalike lahuste väikestes kogustes. Elektrokeemiliste analüüsimeetodite populaaruse kasvule on kaasa aidanud ka antud mõõtemetodite ning mõõtevahendite kiire areng viimastel aastakümnetel.

Elektrokeemilised mõõtmised viiakse läbi kolme-elektroodilises mõõterakus, mille olulisemateks komponentideks on elektrolüüdiga täidetud inertsest materjalist (klaasist) anum, tööelektrood, võrdluselektrood ning vastaselektrood. Antud elektroodid ühendatakse seejuures potentsiostaadiga ning mõõtmised viiakse läbi sellega ühendatud arvutiga spetsiaalse tarkvara abil. Mõõteraku joonis ning ülevaade elektrokeemilisest analüüsist on toodud käesoleva töö peatükis 3.5. Uuritavad elektrokeemilised protsessid toimuvad seejuures tööelektroodi ja elektrolüüdi vahelisel piirpinnal. Võrdluselektrood on stabiilse ja kindla elektroodi potentsiaaliga ning inertsest juhtivast materjalist (Pt või grafiit), vastaselektrood on vooluringi tagamiseks.

Üheks levinumaks elektrokeemiliseks mõõtemetodiks on lineaarne voltamperomeetria, mille korral muudetakse teatud kiirusega fikseeritud pindalaga tööelektroodile rakendatud potentsiaali ning mõõdetakse elektrokeemiliste protsessidega kaasnevat voolutugevust. Meetodi rakendamisel valitakse esmalt potentsiaalide vahemik võrdluselektroodi või tasakaalupotentsiaali suhtes, milles mõõtmine läbi viiakse (näiteks algpotentsiaaliks $-1V$ ning lõpp-potentsiaaliks $+1V$). Seejärel valitakse sobiv potentsiaali laotuskiirus ehk potentsiaali muutus ajaühiku vältel (näiteks $1mV/s$). Mõõtmise tulemusena saadakse voltamperogramm, kus potentsiaali ja voolutugevuse vaheline sõltuvus kirjeldab elektroodi pinnal toimuvaid elektrokeemilisi protsesse. Protsesse kirjeldab joonis 6 käesolevas peatükis.

Lineaarne voltamperomeetria on levinud ka materjalide korrosiooni ning õhukeste pinnakatete testimise meetodina, kuna metallide korrosioon on elektrokeemiline protsess ja seda on võimalik sobiva pinge rakendamisel esile kutsuda. Korrosiooni uurimiseks mõõdetakse esmalt tasakaalupotentsiaal (E_{cor}), mille puhul anood- ja katoodreaktsioonid kulgevad võrdse kiirusega. Seejärel valitakse algpotentsiaal, mis on tasakaalupotentsiaal kuni $250 mV$ katoodsem ning lõpp-potentsiaal, mis on tasakaalupotentsiaal kuni $250 mV$ anoodsem.



Joonis 6. Anood- ja katoodvoolu komponendid korrosiooniprotsessis, Tafeli diagramm.

Saadud voltamperogrammi abil on hiljem võimalik hinnata klassikalise Tafeli analüüsi abil korrosiooni voolutihedus (j_{cor}), millega on seotud korrosiooni kiirus. Kuna uuritaval materjalil toimuvate protsessidega kaasnev voolutugevus on otseselt sõltuv lahusega kokkupuutuva proovi pindalast, siis on selle meetodiga võimalik hinnata ka õhukese katete defektsust. Defektse katte korral on pind vaid osaliselt varjestatud, kuid protsessidega kaasnevad voolud on väiksemad kui katteta proovil. Kvaliteetsema kattega on mõõdetavad voolutihedused veelgi väiksemad. Antud meetodiga on võimalik hinnata ka katete vastupidavust, kui rakendada tööelektroodile/katseobjektile kõrgemaid anoodseid potentsiaale, mille juures toimuks aktiivne alusmaterjali reageerimine lahusega. Seejuures määratakse ära punktcorrosiooni (ingl. k. *pitting corrosion*) potentsiaal, E_{pit} , mille juures kate laguneb ja voolutihedus tõuseb järsult.

1.9. Probleempüstitus

Meditsiinilise titaani sulam Ti-5 (Ti *Grade 5*) on enimkasutatud materjal implantaatide valmistamiseks [3, 4]. Hoolimata laialdasest kasutusest on Ti-5 sulamil ka puuduseid, näiteks, Al ja V jääkide difundeerumine implantaadimaterjalist inimorganismi [4-6]. Pikema aja jooksul võib esineda ka implantaadi korrodeerumist, mis võib viia selle purunemiseni. Osseointegratsiooni ehk luukoega ühildumise parendamise jaoks on kasutusel erinevad meetodid, sh. keemilised söövitused titaani pinna karestamiseks. Viimastel aastatel on meditsiinilise titaani pinna bioühilduvuse parandamiseks materjali kaetud aatomkihtsadestatud TiO₂ kiledega [11, 12]. Kuna aatomkihtsadestatud kilede kvaliteet sõltub olulisel määral aluspinnast, siis mõjutab aluspinna töötlus ka saadud katte bioühilduvust, korrosioonikindlust ning võimet takistada metalliioonide pinnaledifundeerumist. Seetõttu viidi materjaliteaduse projekti SLOFY 12164T raames läbi süstemaatilised uuringud, kus kombineeriti erinevaid titaani keemilisi eeltötluseid ja erinevatel temperatuuridel aatomkihtsadestatud kilesid, et leida parim meetod Ti-5 hambaimplantaatide omaduste parendamiseks.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Titaani eeltötlused

Töös kasutati ja uuriti meditsiinilisest Ti-5 titaanist valmistatud katseobjekte, mis olid saadud partner-ettevõttelt Microfix OÜ materjalitehnoloogia projekti SLOFY12164T raames. Otsinguliste uuringute katsete jaoks kasutati sarnase koostisega titaani sulamit, edaspidi tähistatud Ti-5 freesitud titaanina. Kasutatud sulamite elemendilised koostised on toodud kokkuvõtvas tabelis 1. Esmastes katsetes kasutusel olnud titaanobjektide mõõtmed olid 17 x 17 x 6 mm. Põhikatsetes olid kasutusel silindrilised plaadid, diameetriga 20 mm ja paksusega 3 mm ning 21 mm pikkused Trinon Q hambaimplantaadid.

Tabel 1. Titaanisulamite elemendilised koostised, mõõdetud XRF meetodil.

Sulam	Ti (%)	Al (%)	V (%)	Muu
Ti-5 freesitud titaan	93,3	4,9	1,8	-
Ti-5 titaan partnerilt	89,5	5,4	3,6	C max 1,4% Si max 0,1%

Kõikidele objektidele teostati enne uurimist, söövitamist ja pinnakatete pealekandmist standardne puhastus, et eemaldada pinnal olev mustus. Selleks puhastati objektid esmalt pestes rohke destilleeritud veega. Seejärel hoiti objekte destilleeritud veega täidetud keeduklaasides ultrahelivannis 5 minutit, vahetati vesi ja protsessi korrati kaks korda. Lisaks hoiti objekte tolueni lahuses ($\geq 99,5\%$, Carl ROTH) 5 minutit, atsetoonilahuses ($\geq 99,5\%$, Carl ROTH) 5 minutit ning isopropanooli lahuses ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) 5 minutit. Viimase etapina loputati objekte veelkord rohke destilleeritud veega.

Erinevate katseobjektide eeltötluseks kasutati söövitamist lahustes, mille valmistamisel kasutati järgmiseid aineid: HCl (36.5-38%, Sigma-Aldrich), NaOH (98-100%, Sigma-Aldrich), H₂SO₄ (96% Carl ROTH) ja NaOH / H₂O₂ (30% Carl ROTH). Eeltötluste läbiviimise täpsemad tingimused on toodud tabelis 2. Peale eeltötlusi puhastati objektid esmalt pestes rohke destilleeritud veega. Seejärel hoiti objekte destilleeritud veega täidetud keeduklaasides ultrahelivannis 5 minuti jooksul, vahetati vesi ja protsessi korrati kaks korda. Viimase etapina loputati objekte veelkord rohke destilleeritud veega.

Tabel 2. Katseobjektide eeltöötluste parameetrid.

Kasutatud lahus	Lahuse kontsentratsioon	Aeg (min)	Temperatuur
NaOH	15 %	150	93°C
HCl	10 %	25	66°C
H ₂ SO ₄	10 %	25	66°C
NaOH/H ₂ O ₂	0,5M/ 1M	10	toatemperatuur

2.2. Aatomkihtsadestus

50 nm paksuste TiO₂ kilede aatomkihtsadestamine teostati madalal rõhul läbivoolu tüüpi reaktoris [30]. ALD katted valmistas Lauri Aarik. Kilede valmistamisel olid lähteaineteks titaan(IV)kloriid (99.9%, Sigma-Aldrich) ning veeaur. Erineva struktuuri (amorfse, anataasi ja rutiili) saavutamiseks kasutati kasvatustemperatuure 100°C, 300°C ja 500°C [31, 32]. Kile kasvatuse tsükkel algas 0,5 sekundilise TiCl₄ pulsiga, mille järel eemaldati kandegaasi N₂ abil reaktsiooni produktid ja üleliigne lähteaine. Seejärel viidi reaktoris 2 sekundi vältel veeaur. Tsükli lõpus eemaldati kandegaasi N₂ abil reaktsiooniproduktid ja lähteainete jäägid 5 sekundise pulsiga. Tsüklite arv oli 1000-1100, vastavalt kile kasvukiirusele erineval temperatuuril. Kilede kasvatamise parameetrid on toodud kokkuvõtvas tabelis 3.

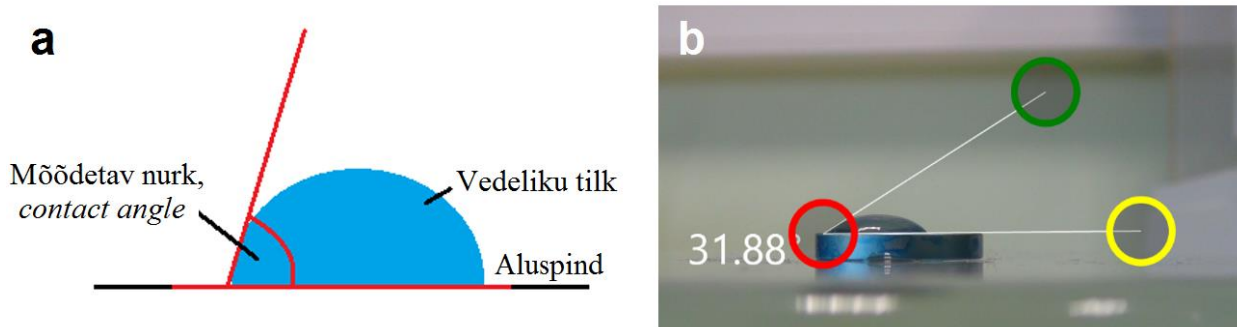
Tabel 3. ALD kilede sünteesimise parameetrid.

ALD kile	Kasvutemperatuur (°C)	Lähteained	Ajaskeem	Tsüklite arv
TiO ₂ amorfne	100	TiCl ₄ +H ₂ O	0,5/2/2/5	1000
TiO ₂ anataas	300	TiCl ₄ +H ₂ O	0,5/2/2/5	1000
TiO ₂ rutiil	500	TiCl ₄ +H ₂ O	0,5/2/2/5	1100

2.3. Hüdrofiilsuse määramine

Saadud pindade märguvust uuriti koht-tilgutus meetodil. Pindade. Selleks kasutati VWR Ergonomic High-Performance pipetti ja VWR Universal blue tips 200-1000 µl pipetiotsakuid; destilleeritud vee kogus, mis ühele objektile pipeteeriti, oli 45 µl.

Märgumisnurga mõõtmiseks tehti objektidest kaameraga fotod ja arvutiprogrammi Adobe Photoshop CS6 abil mõõdeti nurga suurus tahke objekti ja veetilga piirpinna ning veetilga ja õhu piirpinna vahel. Kasutatud meetodi täpsuses on vea-allikateks pipeti ebaühtlus veekoguse mõõtmisel ja selle väljastamisel, pildistamisel kasutatud nurk ja ka mõõtetäpsus arvutiprogrammis, kuid töö olemusest tulenevalt võib märgumiskatsete tulemused lugeda arvestatavateks. Märgumisnurga mõõtmise skeem on toodud joonisel 7 ning tulemused on toodud töö lisa kokkuvõtvast tabelis 4.



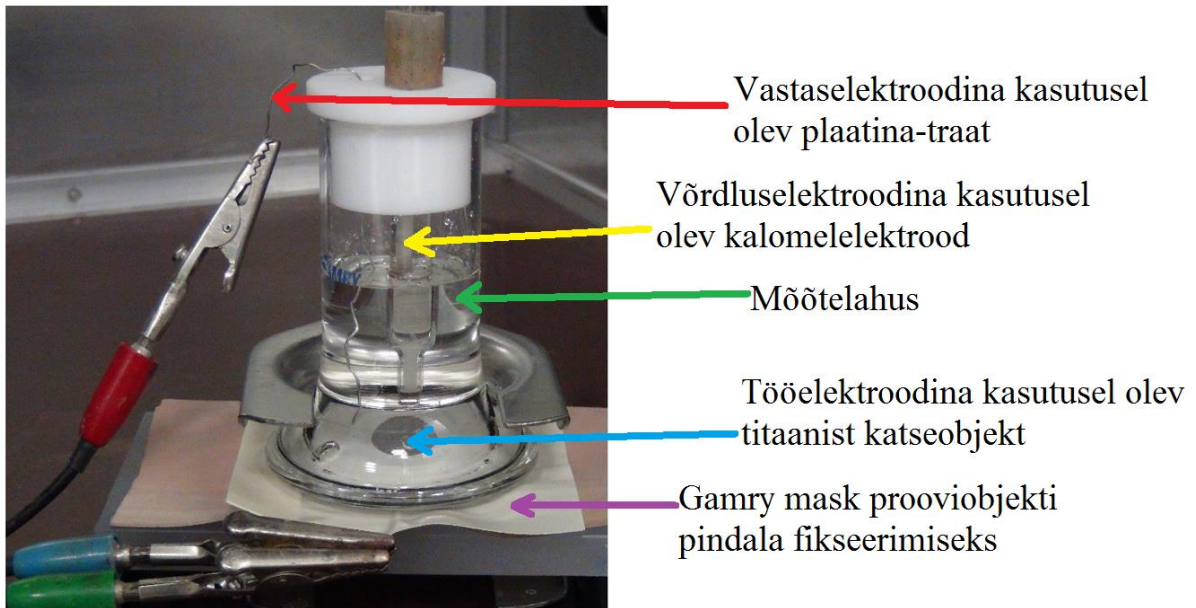
Joonis 7. Märgumisnurga mõõtmine: a – märgumisnurga mõõtmise põhimõtteline skeem, b – märgumisnurga mõõtmine HCl eeltöötletud ja 300°C juures sadestatud ALD kilega objektil.

2.4. Pindade karakteriseerimine mikroskoopia meetoditega

Kõigi katseobjektide pindu uuriti kahekiirelise SEM-FIB seadmega Helios Nanolab 600 (FEI), mõõtmised viis läbi MSc Jekaterina Kozova. Fotod katseobjektidest jäädvustati fotokaameraga SONY Handicam HDR-CX570E. Optilise mikroskoopia uuringud teostati mikroskoobiga Nikon Eclipse LV150. Täiendavad Raman spektroskoopia uuringud viidi läbi Renishaw inVia micro-Raman spektromeetriga, mõõtmised viis läbi PhD Ahti Niilisk. Elementanalüüs viidi läbi röntgenfluorestsents spektroskoobiga XRF Rigaku ZSX400, mõõtmised viis läbi Peeter Ritslaid.

2.5. Pindade karakteriseerimine elektrokeemiliste analüüsimeetoditega

Elektrokeemiline karakteriseerimine viidi läbi Gamry Instrumental Reference 600 potentsiostaadi abil kolmeelektroodilises elektrokeemilises rakus (Gamry Instrumental, Paint Test Cell – PTC1™), mis on välja toodud selgitaval joonisel 8.



Joonis 8. Elektrokeemilistel mõõtmistel kasutatud kolmeelektroodilise elektrokeemilise raku skeem.

Mõõterakku oli viidud tööelektroodina uuritav titaanist objekt, vastaselektroodina Pt traat ja võrdluselektroodina küllastatud kalomelelektrood. Uuritava objekti pindala fikseeriti spetsiaalse elektrokeemilise maski (Gamry Instrumental 990-00254 Electrochemical Sample Masks PortHoles™, 1cm²) abil. Elektrolüüdina kasutati küllastatud NaCl (puhtus $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich) vesilahust, mida deaereeriti enne eksperimenti argooniga 20 minuti vältel. Lineaarse voltamperomeetria katses valiti algpotentsiaaliks -250 mV, lõpp-potentsiaaliks 250 mV ja laotuskiiruseks 1 mV/s.

2.6. Metall-iionide eraldumine Ti-5 implantaatidest

Metalli-iionide eraldumise analüüs viidi läbi immersioonikatsete abil koostöös Tartu Ülikooli Geoloogiainstituudiga Chemicumi õppehoones. Immersioonitestid viis läbi Elyne Aaviksoo ning järgnevad ICP-MS mõõtmised MSc. Päärn Paiste.

Immersioonikatsete läbiviimiseks asetati objektid eraldiseisvatesse 50 ml klaaskaantega klaasanumatesse, mis hiljem fikseeriti teflonteibiga. Immersioonikatsete lahuseks kasutati 0,9% NaCl vesilahust (NaCl puhtus $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich, Milli-Q deioniseeritud vesi); lahuse pH tasemeks mõõdeti 5,73 [33]. ALD kiledega kaetud objekte ning puhast võrdlusobjekti hoiti lahuses 150 päeva. Peale katse lõppu eemaldati objektid lahusest ning seejärel mõõdeti kõigi lahuste vanaadiumisisaldust Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS

massispektromeetiga. Tulemused immersioonikatsete kohta on toodud töö tulemuste ja analüüsi alajaotuses.

2.7. Biokatsed – rakukasvatused eeltöödeldud ja ALD kiledega kaetud objektidel

Luurakkude kasvatamine katseobjektidele ja esmased analüüsid ning saadud graafikud rakkude arvust ning proliferatiivsusest tehti koostöös Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudiga (TÜMRI) TÜMRI-s, tööde läbiviijaks oli PhD Mariliis Klaas.

Rakkude kasvatamine toimus kahes etapis, esmalt kasvatati rakke koekultuuris ja seejärel titaanist katseobjektidel.

Osteoblastide kasvatamisel koekultuuris kasvatati inimese primaarseid osteoblaste 7-10 päeva 90 mm-se läbimõõduga koekultuuri Petri tassidel (BD Biosciences) kõrge glükoosisisaldusega (4500 mg/ml) Isocove'i poolt modifitseeritud Dulbecco (IMDM) söötmes (Lonza), mis sisaldas 10% veise loote seerumit (Gibco), 100 U/ml penitsillini, 100 µg/ml streptomüsiini (PAA), 25 mM HEPES (4-(2-hüdoksüetüül)-1-piperazineetaansulfoon hape) puhvrit ja 100 µg/ml askorbiinhapet (Sigma-Aldrich). IMDM sööde kasutab naatrium bikarbonaat puhvri süsteemi (3,024 g/l) ja füsioloogilise pH (u 7,4) hoidmiseks kasvatati rakke 37° C juures 5% CO₂ inkubaatoris.

Osteoblastide kasvatamiseks titaanobjektidel pesti plaatidel kasvavaid rakke fosfaatpuhverdatud soolalahusega (PBS) ja tõsteti lahusesse 0,05% trüpsiini lahusega, mis sisaldas 0,53 mM etüleendiamiintetraädikhapet (Invitrogen). Rakke tsentrifuugiti 300 g juures 5 min, eemaldati trüpsiiniga sööde ja lisati värske rakkude kasvusööde. Titaanobjektid asetati 6-kannulistesse koekultuuri plaatidesse (BD Biosciences) ja steriliseeriti 70% etanooliga umbes 10 s, seejärel eemaldati etanooli jäägid PBSiga pestes. Igasse titaanobjektiga kannu lisati 5 ml söödet, mis sisaldas umbes 35 000 osteoblasti. Titaanobjektid koos osteoblastidega asetati 37° C juurde 5% CO₂ inkubaatorisse viieks päevaks. Rakukasvatuste ülevaatlikud tulemused on toodud töö lisa kokkuvõtvas tabelis 5.

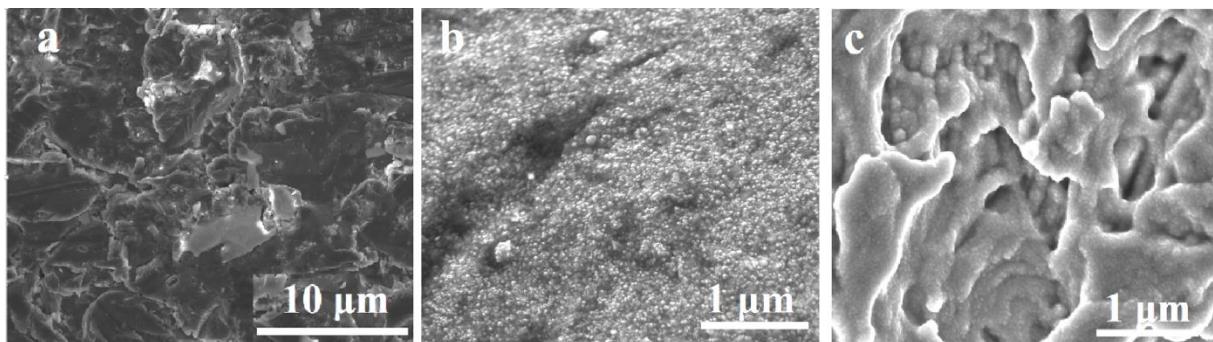
3. Tulemused ja analüüs

3.1. Pindade ja ALD kilede karakteriseerimine (SEM, XRF, Ramanspektroskoopia)

Antud töös analüüsiti katseobjektide pindu ja ALD kilesid erinevate meetoditega, saamaks teada katseobjektide elemendilist koostist ning valmistatud katete struktuuri, katvust ja pinnadetailide järgivust.

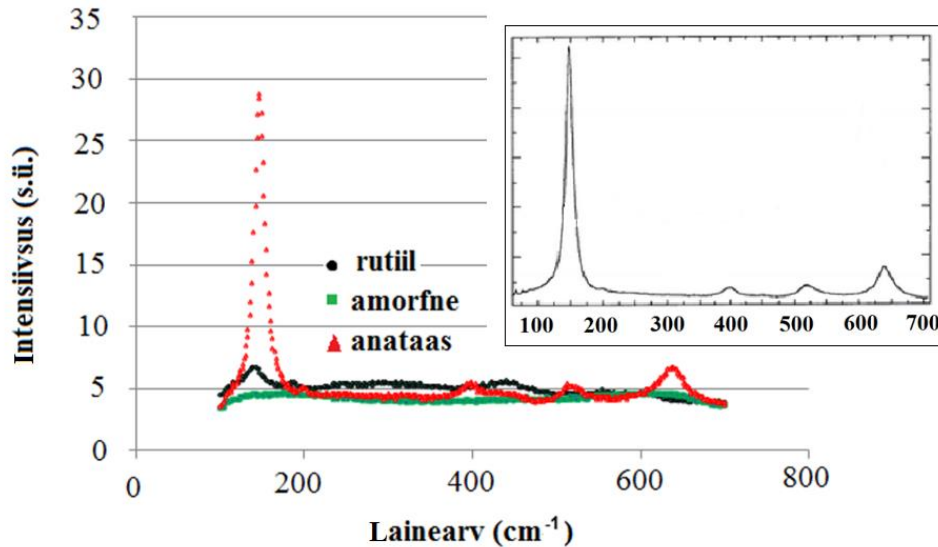
XRF uuringud näitasid, et otsinguliste uuringute katsetes kasutusel olnud titaani sulami elementkoostisesse kuulusid Ti, Al ja V (vastavalt 93,27%, 4,96% ja 1,77%), ning seega võib, hoolimata kahe sulami elementide sisalduse erinevustest massiprotsentides, otsinguliste uuringute sulamit pidada väga sarnaseks meditsiinilise titaani Ti-5 koostisele. Põhikatsetes kasutusel olnud partnerilt saadud Ti-5 titaani elementkoostis saadi järgmine: Ti, Al ja V (vastavalt 89,5%, 5,42%, 3,55%). Käesolevas töös kasutatud titaanisulamite elementkoostised on toodud kokkuvõtvalt tabelis 1.

ALD meetodil valmistatud kilede katvuse analüüsiks ning sadestatud kilede pinna kareduse tuvastamiseks kasutati skaneerivat elektronmikroskoopi (ehk SEM-i). Kõigil temperatuuridel aatomkihtsadestatud ~50 nm paksused kiled katsid ühtlaselt aluspinda, sh ka erinevatel meetoditel karestatud pinna, järgides pinnastruktuuri. Näide ALD kilest siledal ja keemiliselt karestatud pinnal on toodud joonisel 9.



Joonis 9. SEM pildid Ti-5 pinnast, mis on poleeritud (a), poleeritud ja ALD meetodil anataasiga kaetud (b) ning keemiliselt karestatud ja ALD meetodil anataasiga kaetud (c).

Ramanspektroskoopia uuringud näitasid, et aatomkihtsadestamisel 100°C, 300°C ja 500°C juures saadi vastavalt amorfne, anataasi faasis ja rutiili faasis TiO₂. Sadestatud kilede struktuurid vastasid ootustele, lisaks on toodud selgitav joonis 10.



Joonis 10. Ramanhajumise spektrid mõõdetud TiO₂ kilest Ti-5 freesitud titaani pinnal; kleebisel anataasifaasi spekter [34].

3.2. Otsingulised uuringud

Otsingulised uuringud teostati selleks, et leida võimalusi titaani pinna karestamiseks, sellisel viisil, et karestamise meetodid sobiksid ka eeltötluseks enne pealmise TiO₂ kihi valmistamist aatomkihtsadestamise meetodil. Selleks prooviti titaani söövitada HCl, H₂SO₄, NaOH, NaOH/H₂O₂ lahustes ning saadud karestatud pinnad kaeti aatomkihtsadestuse meetodil TiO₂ kilega vastavalt 100°C, 300°C ja 500°C juures. Selleks, et uurida, kas erinevate eeltötlustega pindadele kantud ALD kiled olid defektivabad, viidi läbi lineaarse voltamperomeetria katsed. Saadud pindade bioühilduvust uuriti rakukasvatuste ja määrgumisenurga mõõtmisega.

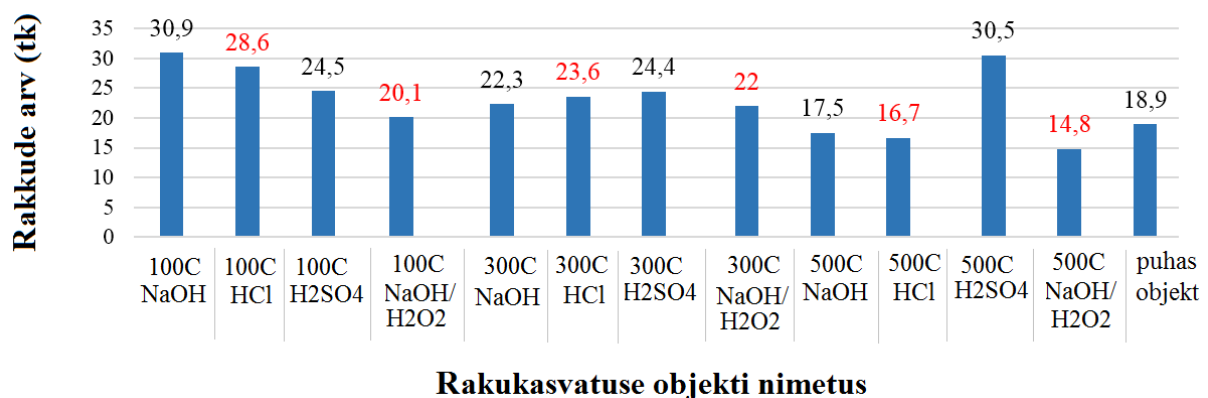
Lineaarse voltamperomeetria korrosioonitestid näitasid, et väikseimad korrosioonivoolud esinesid eelkõige 100°C ja 300°C juures valmistatud katete korral, kus eeltötluseks sobis HCl, H₂SO₄ ning NaOH/H₂O₂ söövitus. Elektrokeemiliste eksperimentide kohta kokkuvõttev tabel 6 on toodud käesoleva töö lisa. Korrosioonitestide lõpus selgus samuti, et kõigi sadestatud katete nakkuvused aluspinnaga olid väga head ja elektrokeemilise maski eemaldamisel ALD kile delamineerumist ei esinenud.

Määrgumistestidel olid analüüsitud objektidest märguvaimad kõigi nelja eeltötluse lahusega (HCl, H₂SO₄, NaOH, NaOH/H₂O₂) söövitatud ja 300°C juures sadestatud ALD

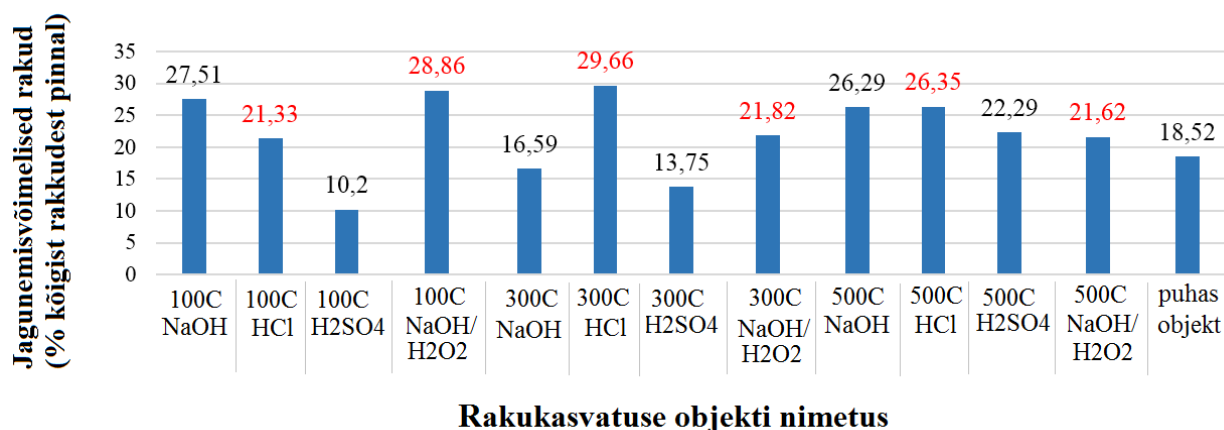
kiledega kaetud objektid. Antud objektide märgumisnurgad jäid alla 10°. Märgumisnurkade kohta kokkuvõttev tabel 4 on toodud käesoleva töö lisan.

Rakukasvatuste tulemused näitasid, et osteoblastid kasvavad eelistatult pikliku kujuga ning arvestades loendatud rakkude koguste erinevusi objektide erinevates piirkondades, oli keskmiselt kõige rohkem rakke vaateväljas ja kõige rohkem proliferatiivseid ehk jagunemisvõimelisi rakke objektidel, mille ALD kiled olid sadestatud 300°C juures. Katsete tulemuste analüüsisist järeldus, et kõigi eelkatsete objektide pinnal olnud vagude tõttu oli rakkudel eelistatud kasvusuund piki mööda vagu, rakkudele tavapärase ja omase laialisirutumise ning ühtlase pinnale jaotumise asemel. Hoolimata rakkude ebaharilikust paigutusest ja kujust hinnati rakkude kasv objektidel heaks; aluseks võeti puhtal titaaniobjektil rakkude kasvu võrdlemine kõigi teiste objektidega. Otsinguliste uuringute rakukasvatuste tulemuste kohta on alljärgnevalt toodud joonised 11 ja 12. Kõik antud töös otsinguliste uuringute katsetes, põhikatsetes ja immersioonikatsetes kasutusel olnud objektid on toodud töö lisan tabelis 7.

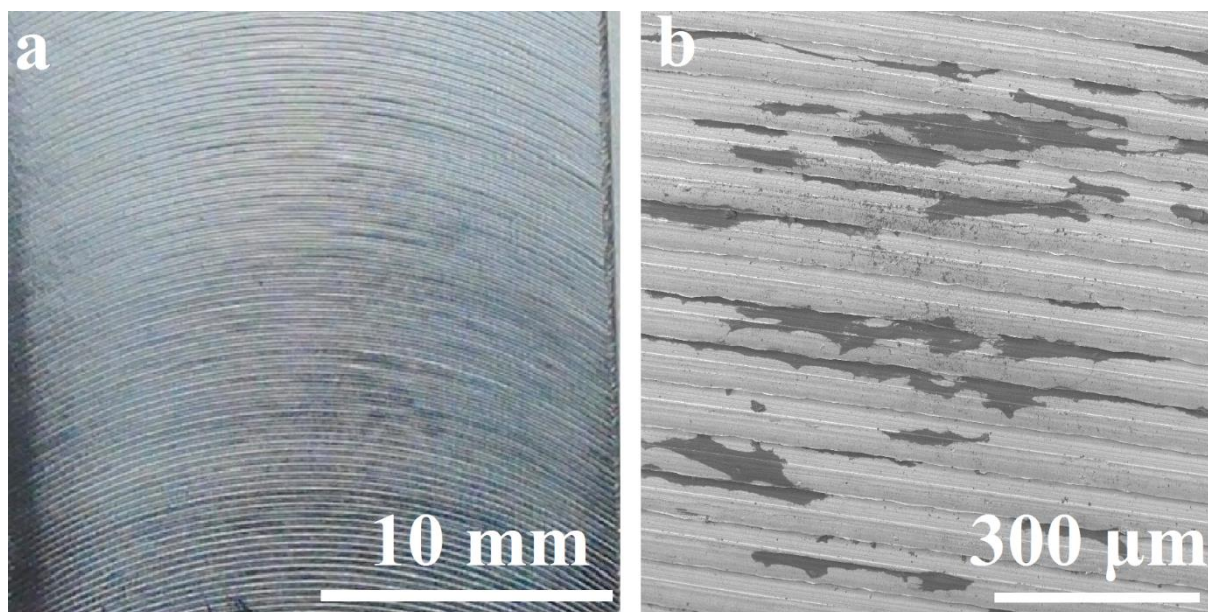
Lisaks analüüsiiti rakukasvatuste tulemusi ka skaneeriva elektronmikroskoobiga, et teha kindlaks rakkude asetus, laotus ja jaotus erinevate objektide pindadel. Skaneeriva elektronmikroskoobi uuringud kinnitasid, et Ti-5 freesitud objektidel kasvasid osteoblastid eelistatult katseobjektidel olnud freesimisvagudesse ja piklikuna, käesolevas peatükis on selgitava joonisena toodud joonis 13.



Joonis 11. Erinevatele pindadele kasvanud rakkude arv vaateväljas, 450×337,5 μm. Keskmistatud tulemus, võrdluses 13 objekti. Punasega toodud välja objektid, mille parameetritega jätkati põhikatsetes. Objektide juurde märgitud kile sadestustemperatuur ja eeltöötuse lahus.



Joonis 12. Ki67 markeriga märgistatud proliferatiivsete (jagunemisvõimeliste) rakkude kogus katseobjektidel; punasega toodud välja objektid, mille parameetritega jätkati põhikatsetes. Objektidele juurde märgitud kile sadestustemperatuur ja eeltötluse lahus.



Joonis 13. Ti-5 freesitud titaanobjekti pinnad: a – digifoto, b – SEM pilt Ti-5 freesitud pinnale kasvanud rakkudest: rakud on kasvanud vagudesse, rakkude laialisirutumine minimaalne.

Eeltötluste lõikes suuri erinevusi ei esinenud, kuid põhikatsete tarbeks otsustati teha objektidest valim, millega uurimust jätkata. Otsustati alles jätta vaid kaks eeltötlust ja kõik kolmel temperatuuril (100, 300 ja 500°C) kasvatatud kiled. Eeltötluste valikust NaOH või NaOH/H₂O₂ jäeti alles NaOH/H₂O₂ töötlus, kuna segutötluseks kulunud aeg oli 15 korda lühem ning võrreldes NaOH töötlusega võis pidada rakkude arvu ja eeltötlusega saavutatud

pinna karedust samaväärseks. Valikust H_2SO_4 või HCl jäeti alles HCl töötlus, kuna H_2SO_4 eeltöötusega objekt 500 kraadi juures kasvatatud ALD kilega läks rakukasvatuseksperimenti ajal katki, samal ajal pinna karedused ja rakkude kasv olid taaskord samaväärsed. Lisaks sellele on HCl söövitusega pinda kergem jääkidest puhastada. Kuna otsingulistest uuringutes oli tegu vaid keemiliselt karestatud objektidega ja keemilise töötusega võidi pinda mingil määral siiski saastada, mis omakorda võis mõjutada saadud katte kvaliteeti, siis oli vajadus võrdluskatsete järele. SEM-iga tehtud uuringud näitasid ka, et otsingulistest uuringutes kasutatud objektide freesitud pinnad mõjutasid rakkude kasvusuunda ja laotumist objekti pinnal, selgitav joonis 13 on toodud peatüki lõpus. Nendest punktidest lähtuvalt otsustati läbi viia korduskatsed nii siledade keemiliselt karestamata Ti-5 objektidega kui ka keemiliselt karestatud Ti-5 objektidega.

3.3. Põhikatsete tulemused

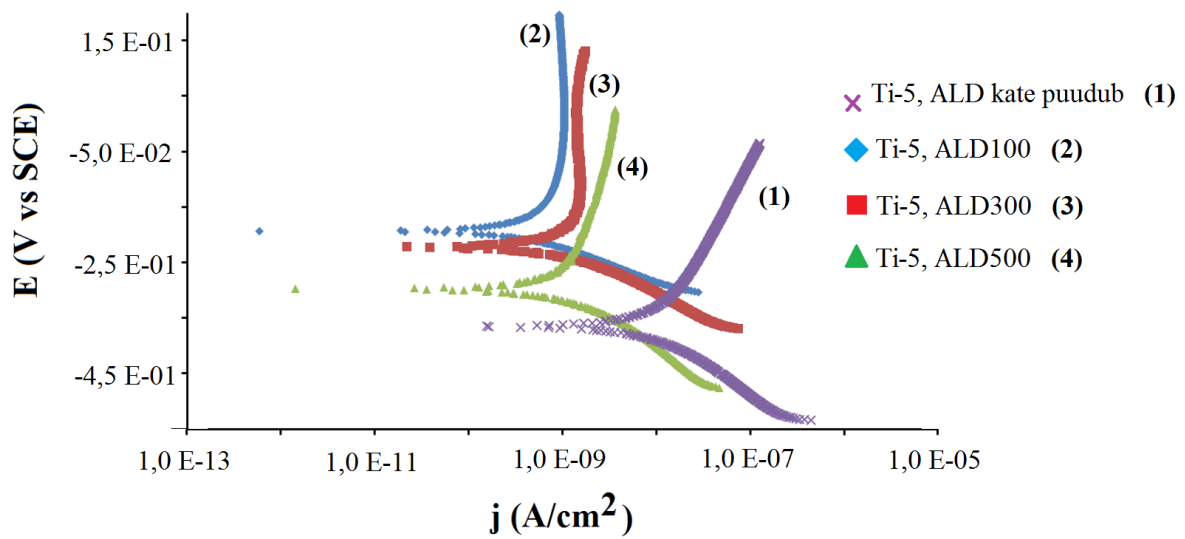
Otsinguliste uuringute tulemuste põhjal tehtud järeldustest tulenevalt viidi läbi põhikatset siledade (poleeritud) ja keemiliselt karestatud (HCl ja $NaOH / H_2O_2$) Ti-5 sulamist objektidega, millele oli ALD meetodil kantud ~50 nm paksune TiO_2 kile 100, 300 ja 500°C juures. Selleks uuriti süstemaatiliselt kõikide katete korrosioonikindlust lineaarse voltamperomeetriaga, bioühilduvust rakukasvatuste ning mürgumisnurkade määramisega ja metalli-ioonide väljumist ICP-MS-iga.

3.3.1. Valmistatud katete testimine lineaarse voltamperomeetriaga

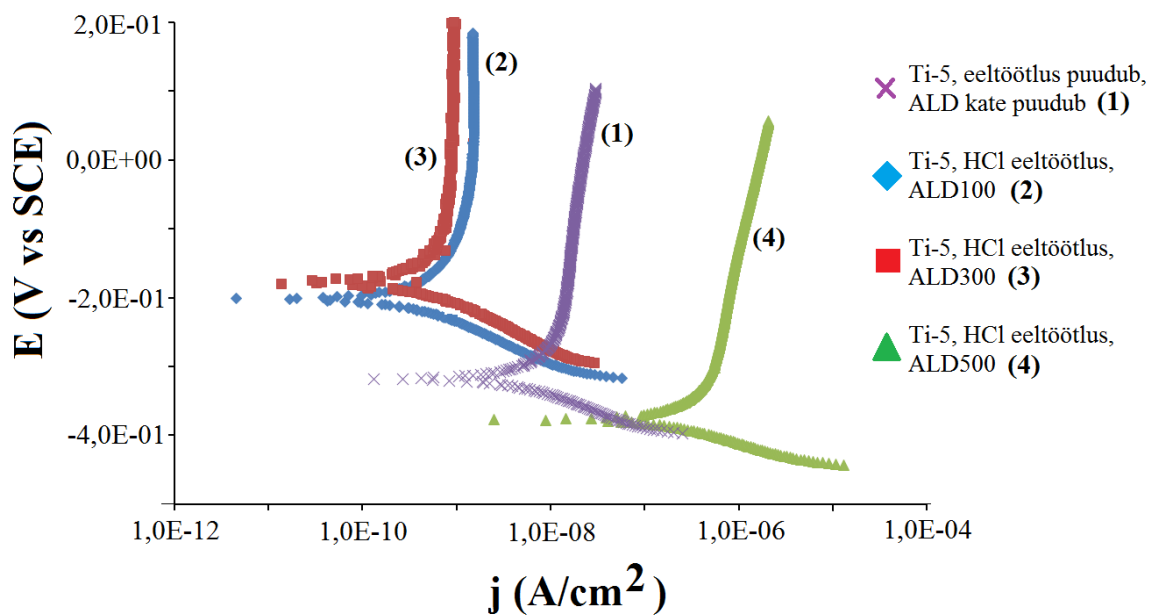
Siledatele ja keemiliselt karestatud pindadele aatomkihtsadestatud TiO_2 kiledes võimalike defektide esinemist (korrosioonikindlust) uuriti lineaarse voltamperomeetria abil kolme-elektroodilises mõõterakus, mille ehitus on toodud joonisel 8.

Lineaarse voltamperomeetria testid näitasid, et katted vähendasid tunduvalt korrosioonivoolu ning erinevate katete korral ei olnud korrosiooni voolutiheduse (j_{cor}) väärtused märgatavalt erinevad (Joonis 14, tabel 6 töö lisas). HCl ning $NaOH/H_2O_2$ lahuste abil karestatud objektidel oli j_{cor} madalaim amorfse ning anataasi faasis oleva katte korral.

Rutiili faasis oleva TiO₂ katte korral, aga, oli söövitatud aluspindade puhul j_{cor} sadu kordi suurem (Joonis 15, tabel 6 töö lisas).



Joonis 14. Lineaarse voltamperomeetria kõverad: katteta (1) ja ALD kattega Ti-5 proovidele (2-4), mis valmistati temperatuuridel 100°C (2), 300°C (3) ning 500°C (4).



Joonis 15. Lineaarse voltamperomeetria kõverad: katteta (1) ja ALD kattega Ti-5 proovidele (2-4), mis valmistati HCl-ga karestatud pinnale temperatuuridel 100°C (2), 300°C (3) ning 500°C (4).

Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et ALD meetodil valmistatud TiO₂ passiveerib sileda Ti-5 pinna, kuid eelnevalt karestatud objektide korral tuleb kile pigem valmistada madalamal (kuni 300°C) temperatuuril. Varasemates uuringutes on ka V. Sammelselg demonstreerinud, et parima keemilise vastupidavusega TiO₂ kile saab ALD meetodil temperatuuride vahemikus 200-300°C [10]. Karestatud pindadele kõrgematel temperatuuridel valmistatud katted näitasid testides suuremaid korrosioonivoolusid ja see võib viidata defektide olemasolule kaitsekattes.

3.3.2. Pindade ja ALD kilede bioühilduvus

3.3.2.1. Märgumine

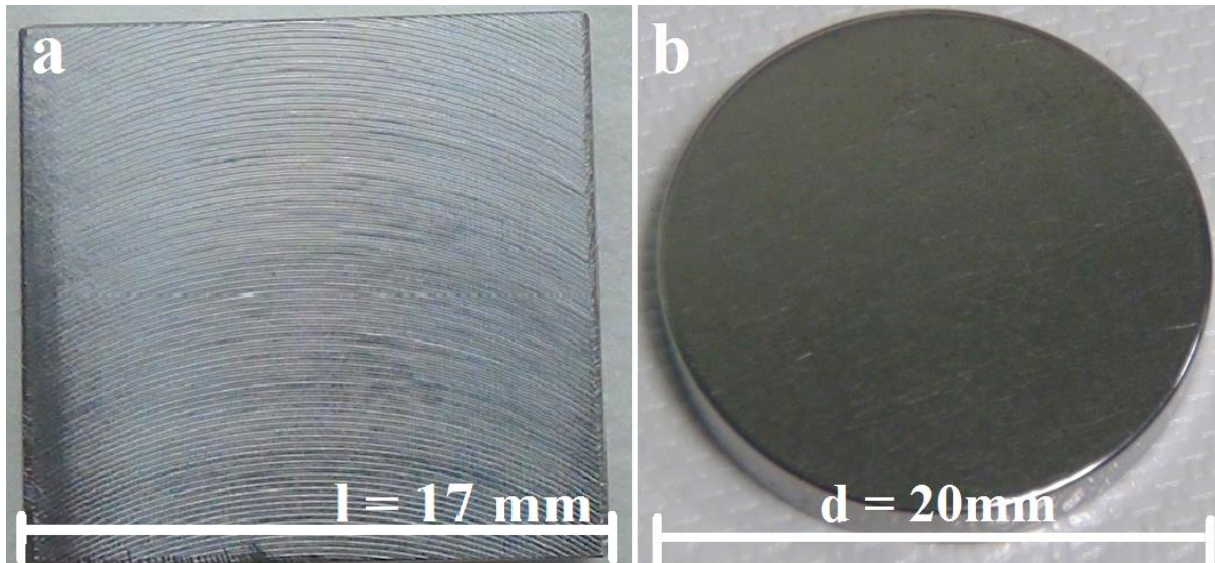
Katseobjektide bioühilduvuse hindamiseks uuriti valmistatud pindade märguvust koht-tilgutuse meetodil, mõõtes pinnale kantud veetilga märgamisnurka.

Märgumisenurkade mõõtmiste tulemusena selgus, et kõik saadud pinnad on märguvad, ehk nende märgumisenurk on alla 90°. Märguvaimad objektid olid HCl ja NaOH/H₂O₂ eeltötluste lahustega söövitatud ning 300°C juures aatomkihtsadestatud anataasi kiledega objektid. Märgumisenurkade kohta kokkuvõttev tabel 4 on toodud käesoleva töö lisas.

Märgumiskatsete tulemustest tuleb selgelt välja, et otsingulistest uuringutes kasutatud Ti-5 freesitud objektide ja põhikatsetes kasutatud koostööpartnerilt saadud Ti-5 objektide märgumistel mõõdetud nurgad sama eeltötluse ja kile struktuuri korral ei lange kokku. Selline nähtus on seletatav asjaoluga, et märgumisenurga suurus sõltub nii pinna energiast (pinna vabaenergia, pindpinevusjõud) kui ka pinna eelnevast karedusest [17]. Materjali pinna karedus mõjutab lisaks ka veel pinna võimet osseointegreeruda. Antud töö otsinguliste uuringute katsetes kasutatud objektide pinnastruktuur enne eeltötlusi oli juba reljeefsem kui põhikatsetes kasutatud partnerilt saadud objektide pinnastruktuur, mis põhjustas otsinguliste uuringute katsete objektidel märgumiskatsetes paremad märgumisenurgad. Ti-5 freesitud titaaniobjektide pinnal olid töötlemisest tingitud vaod, partnerilt saadud katseobjektide pinnad olid silmaga vaadates siledad. Objektide pinnad toodud välja alapeatüki lõpus joonisel 16.

Põhikatsete objektide märgumisenurgad olid otsinguliste uuringute katsete objektide märgumisenurkadest suuremad; kuigi antud töös konkreetsed objektid põhikatsetel olid endiselt hüdrofiilsed, on keeruline ette teada, kas soovitud märgumisenurkade vahemik on alati saavutatav, kui implantaatide pinnad karestada vaid mikro- või vaid nanoskaalal. Lisaks sellele vähendab märgumist aja möödudes ka pinna saastumine õhust tulevate ainete toimel,

mis asendavad või blokeerivad titaanoksiidi pinnal olevad OH rühmad [35]. Vaatamata sellele saab parima märgumisnurga, kui sadestada keemiliselt karestatud pinnale kile ALD meetodil 300°C juures.



Joonis 16. Digifotod Ti-5 objektidest: a – freesitud objekt, pinnal freesimisest ühtlased vaod, b – lihvitud sulamist objekt, pind ühtlane ja makroskoopilisel tasemel sile.

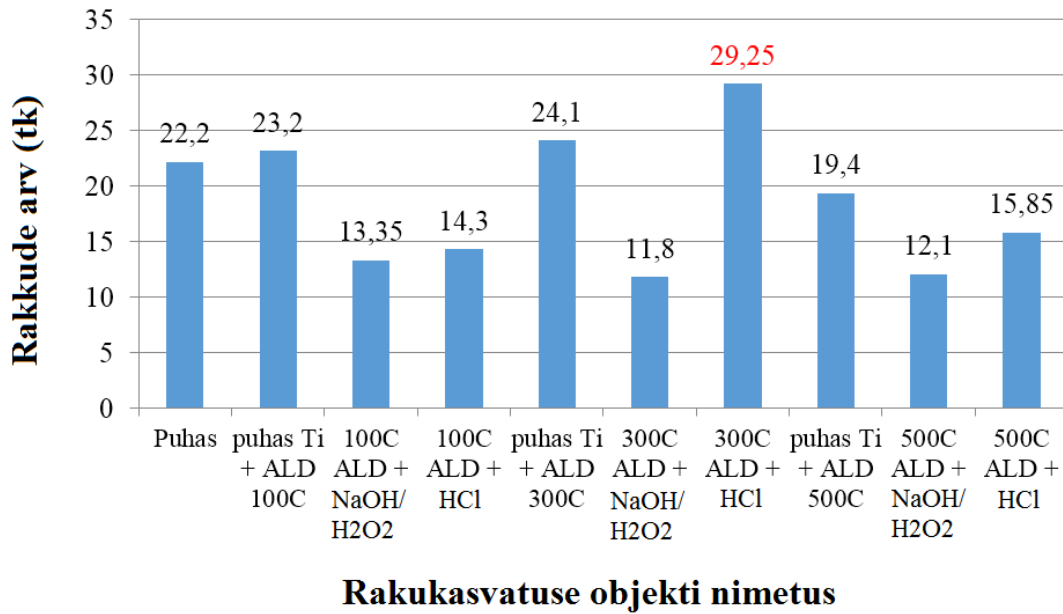
3.3.2.2. Rakukasvatused

Siledatele ja eelnevalt keemiliselt karestatud titaanist objektidele aatomkihtsadestatud kilede bioühilduvuse uurimiseks viidi läbi rakukasvatused ja tulemusi hinnati kahel viisil: rakkude arv vaateväljas ning Ki67 markeriga proliferatiivsete (ehk jagunemisvõimeliste) rakkude arv.

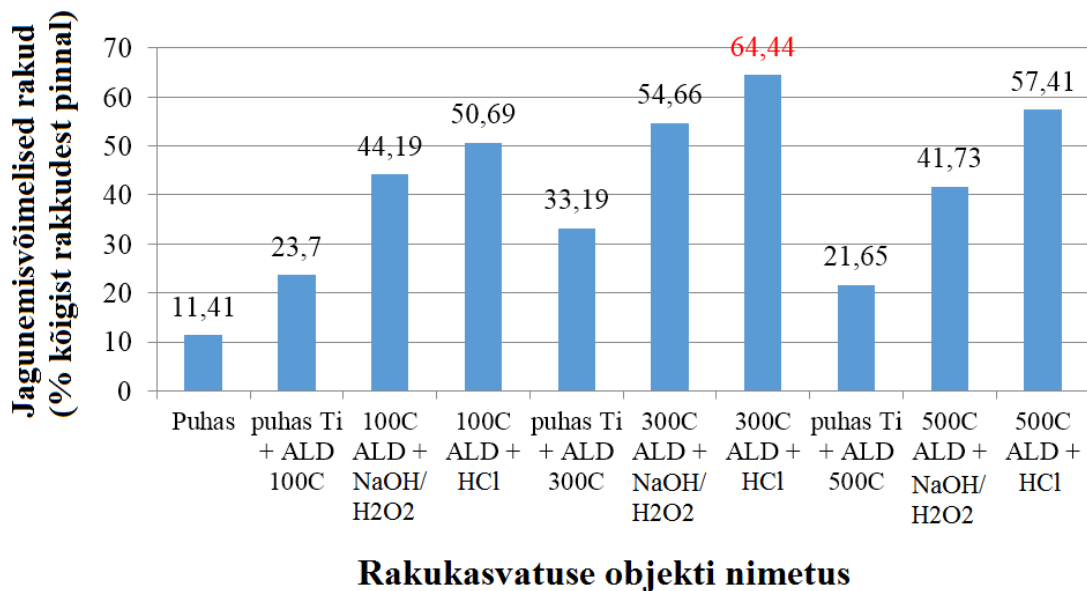
Tulemuste analüüsiks kasutati kaht erinevat näitajat, kuna rakkude arvu hindamine vaateväljas võib osutuda ebatäpsemaks meetodiks kvantifitseerimise mõttes juhusliku varieeruvuse tõttu, kuid rakkude laotumist pinnal hindab meetod hästi. Ki67 markeriga proliferatiivsete rakkude hindamine markeerib ka rakke, mis pole veel jagunenud, kuid valmistuvad selleks, seega see meetod on üldjuhul varasem ja täpsem indikaator rakkude elujõulisuse hindamiseks objekti pinnal.

Antud katsete objektidel olid rakud laialisirutunud ning kõigi objektide seast oli selgelt eristunud üks katseobjekt, kus rakkude kasv on tunduvalt parem. HCl eeltötlusega ning 300 kraadi juures sadestatud ALD kilega titaaniobjektile oli suurim rakkude arv vaateväljas ning

kõige rohkem proliferatiivseid rakke. Põhikatsete rakukasvatuste kohta on illustreerivad joonised 17 ja 18.



Joonis 17. Rakkude arv vaateväljas 450×337,5 µm: keskmistatud tulemused. Punasega toodud välja parim tulemus; objektide juurde märgitud kile sadestustemperatuur ja eeltötluse lahus.

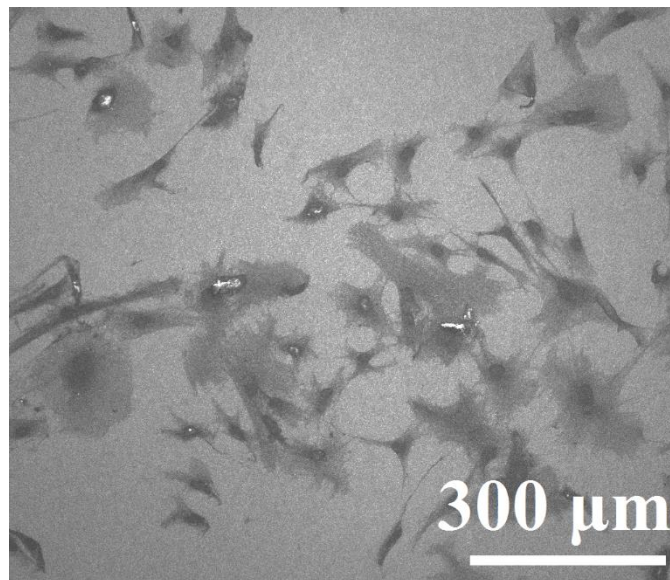


Joonis 18. Ki67 markeriga märgistatud proliferatiivsete (jagunemisvõimeliste) rakkude kogus katseobjektidel. Punasega toodud välja parim tulemus; objektidele juurde märgitud kile sadestustemperatuur ja eeltötluse lahus.

Rakukasvatuste tulemuste analüüs SEM-iga näitas, et rakkude asetus, laotus ja jaotus erinevate objektide pindadel oli omane luurakkude loomulikule kasvule. Põhikatsete objektide SEM uuringud kinnitasid, et siledama pinnaprofiiliga objektidele laotusid rakud laiali ning rakkude arv kinnitas pinna sobivust rakkude kasvule, selgitava joonisena on toodud joonis 19 käesoleva peatüki lõpus.

Rakkude arvu hindamine vaateväljas ei näita konkreetset seost ALD sadestatud kilede olemasolu ja rakkude rohkuse vahel. Kuigi kirjandusest on teada anataas-struktuuriga katte hea sobivus biomaterjaliks [11], on joonisel 17 näha, et erinevatel temperatuuridel sadestatud kiledel on rakkude arv vaateväljas väga vähe varieeruv. Kõik pinnad on sellegipoolest rakkudele kinnitumiseks sobivad ja erinevus rakkude arvus vaateväljas võis tingitud olla keskmistamisest (mõnes vaateväljas on väga vähe rakke ja mõnes tunduvat rohkem). Analüüsides rakkude proliferatiivsust katseobjektide pinnal võib väita, et ALD sadestatud TiO₂ kate on puhta titaaniga võrreldes rakkudele kinnitumiseks ja jagunemiseks meelepärasem pind. Ka kirjandusest on teada, et titaani on biomaterjalina kasutatud juba mitukümmend aastat, ning, et titaanoksiidkiled on kasutusel luukoekasvu kiirendavate katetena [36, 37].

Baseerudes eelpool toodud katsete tulemustele võib järeldada, et parima bioühilduva pinna saab objekti keemilisel karestamisel HCl lahusega ning selle katmisel anataas TiO₂-ga.

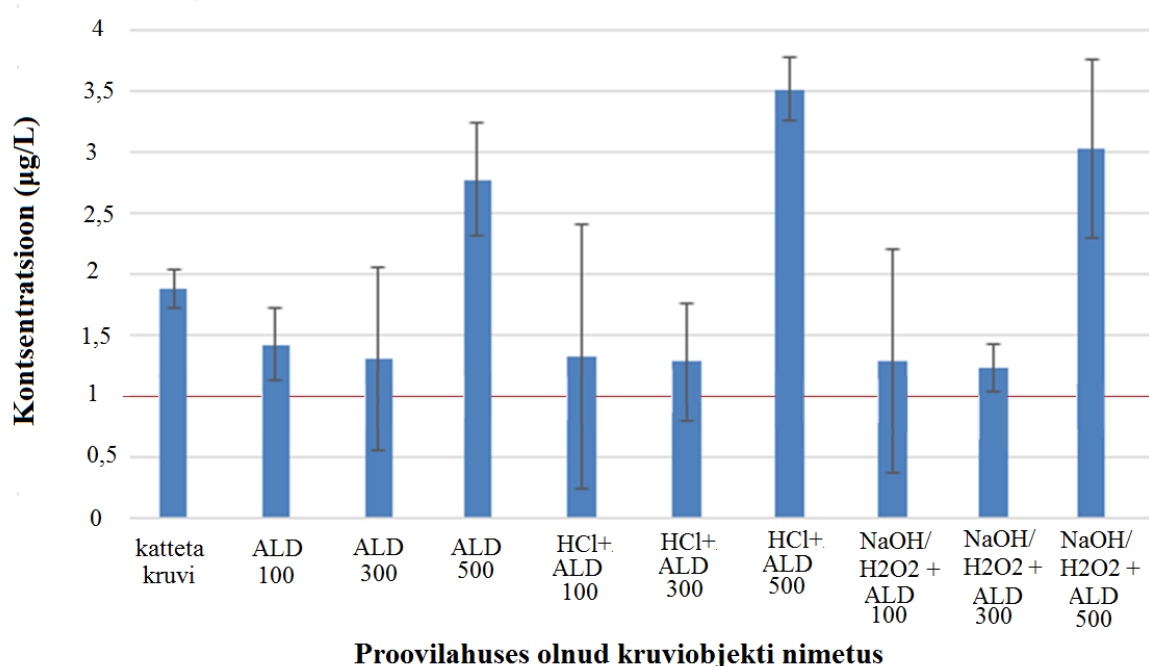


Joonis 19. SEM pilt rakkude laotusest Ti-5 implantaadi pinnal, mis läbis HCl eeltötluse ja oli kaetud ALD 300°C juures sadestatud ALD kilega: rakud on objekti pinnal laotunud ja laialisirutunud.

3.4. Metallioonide eraldumine Ti-5 implantaatidest

Selleks, et uurida metallioonide võimalikku väljumist kattega ja katteta Ti-5 hambaimplantaatidest, hoiti koostööpartnerilt saadud kruvi-katseobjekte esmalt 150 päeva 0,9% NaCl vesilahuses ning seejärel määrati eraldunud metallioonide kontsentratsioon ICP-MS meetodil.

ICP-MS uuringud näitasid, et kõige vähem oli vanaadiumi eraldunud objektide korral, millele oli aatomkihtsadestatud amorfne või anataas TiO₂ kate, kõigi katseobjektide tulemused toodud joonisel 20.



Joonis 20. ICP-MS meetodil määratud vanaadiumi sisaldus immersioonikatsete lahustes, milles olid eelnevalt katteta ja erinevate katetega hambaimplantaadid: punane joon näitab oletatavat nullnivood, 100, 300 ja 500 tähistavad TiO₂ aatomkihtsadestamise temperatuuri (°C) ning HCl ja NaOH/H₂O₂ kasutatud eeltötlust.

Suurimad vanaadiumi sisaldused olid lahustes, milles oli hoitud 500 kraadi juures valmistatud TiO₂ katetega objekte. Metallioonide väljadifundeerumis-vastaste ALD TiO₂ katete immersioonikatsete tulemusi võib lugeda indikaativseteks väga suurte veapiiride väärtuste tõttu. Vaatamata suurele veale on siiski selgelt eristatavad 500°C juures valmistatud kiled, mille korral leiti immersioonilahustest märgatavalt suurem kogus vanaadiumit. Kuna vanaadiumi sisaldus antud lahustes oli suurem isegi katmata implantaadi omast, võib tegu olla

sulami ümberstruktureerumisega 500°C juures, mille tulemusena eraldub sulamist vanaadium. Seetõttu sobivad kaitsekateteks pigem madalamatel temperatuuridel (100 või 300 °C juures) valmistatud ALD kiled. Sulami ümberstruktureerumist 500°C juures antud töö raames eraldi ei uuritud, kuid väite kinnitamiseks on plaanitud täiendavad uuringud röntgendifraktsiooni meetodil.

4. Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti meditsiinilise titaani Ti-5 pinna funktsionaliseerimise võimalusi bioühilduvuse ja korrosioonikindluse parendamise eesmärgil, kasutades katseobjektide pinna karestamist keemilise söövituse abil ning seejärel titaanoksiidiga katmist ALD meetodil. Keemilised karestamised viidi läbi HCl, H₂SO₄, NaOH ja NaOH/H₂O₂ lahustes. Pealekantav TiO₂ kiht valmistati ALD meetodil lähteainetest TiCl₄ ja H₂O temperatuuridel 100, 300 ja 500°C ning saadi vastavalt amorfseid, anataasi ja rutiili kristallstruktuuriga katted. Katseobjektidel hinnati luurakkude kasvu, kinnitumist ja jagunemist, objektide määrguvust, korrosioonile vastupidavust ning V-ioonide eraldumist implantaatidest. Rakukasvatustest selgus, et jagunemisvõimelisi rakke oli kõige enam objektidel, mille korral kasutati eeltöötlusena HCl söövitust ja anataasi struktuuriga TiO₂ kilet pealmise kihina. Antud prooviobjekti korral oli ka vee määrgumisnurk väiksem, s.t. näitas parimat määrguvust. Lineaarse voltamperomeetria katsed näitasid, et karestatud objektide korral olid korrosioonivoolud väiksemad HCl, H₂SO₄ ja NaOH/H₂O₂ eeltöötluste korral, kus pealmine TiO₂ kate oli ALD meetodil valmistatud 100 või 300 °C juures. ICP-MS mõõtmised näitasid, et metalli-ioonide väljumist takistasid kõige paremini amorfne ja anataasi struktuuriga TiO₂ kile.

Võttes arvesse rakukasvatuste, elektrokeemiliste mõõtmiste, ICP-MS uuringute ning määrgumise uuringute tulemusi, võib öelda, et parima kate saab Ti-5 hambaimplantaadile, kui karestada pinda eelnevalt HCl lahuses ning seejärel katta saadud pind anataasi kilega ALD meetodil. Antud väljatöötatud meetodit võib kohandada ka teiste titaanist valmistatud meditsiiniliste implantaatide jaoks, kuid iga uue sulami jaoks on vaja läbi viia põhjalikud täiendavad uuringud.

Viited

- [1] Y. Suzuki, H. Osada, M. Kobayashi, M. Katoh, Y. Kokubo, J.-I. Sato, C. Ohkubo, „Long-term clinical evaluation of implant over denture,“ *Journal of Prosthodontic Research* 56, 32-36 (2012).
- [2] D. F. Williams, „On the mechanisms of biocompatibility,“ *Biomaterials* 29, 2941–2953 (2008).
- [3] A.F.Yetim, A. Alsaran, I. Efeoglu, A. Celik, „A comparative study: The effect of surface treatments on the tribological properties of Ti-6Al-4V alloy,“ *Surface & Coatings Technology* 202, 2428-2432 (2008).
- [4] C.N. Elias, J.H.C. Lima, R. Valiev, M.A. Meyers, „Biomedical Applications of Titanium and its Alloys,“ *JOM* 60, 46-49 (2008).
- [5] <http://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=1076&tid=34>, viimati uuendatud: september 2008; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [6] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp58.pdf>, viimati uuendatud: september 2012; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [7] J.E.G. Gonzalez, J.C. Mirza-Rosca, „Study of the corrosion behaviour of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications,“ *Journal of Electroanalytical Chemistry* 471, 109-115 (1999).
- [8] C. Sola, A. Amorim, A. Espias, S. Capelo, J. Fernandes, L. Procena, L. Sanchez, I. Fonseca, „Galvanic Corrosion Behaviour of Ti and Ti6Al4V Coupled to Noble Dental Alloys,“ *International Journal of Electrochemical Science* 8, 406-420 (2013).
- [9] P. Violet, E. Blanquet, D. Monnier, I. Nuta, C. Chatillon, „Experimental thermodynamics for the evaluation of ALD growth processes,“ *Surface & Coatings Technology* 204, 882-886 (2009).
- [10] V. Sammelselg, I. Netsipailo, A. Aidla, A. Tarre, L. Aarik, J. Asari, P. Ritslaid, J. Aarik, „Chemical resistance of thin film materials based on metal oxides grown by atomic layer deposition,“ *Thin Solid Films* 542, 219-224 (2013).

- [11] S. Patel, A. Butt, Q. Tao, J.I. Rossero, D. Royhman, C. Sukotjo, C.G. Takoudis, „Novel functionalization of Ti-V alloy and Ti-II using atomic layer deposition for improved surface wettability,“ *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 115, 280-285 (2014).
- [12] I. P. Grigal, A. M. Markeev, S. A. Gudkova, A. G. Chernikova, A. S. Mityaev, A. P. Alekhin, „Correlation between bioactivity and structural properties of titanium dioxide coatings grown by atomic layer deposition,“ *Applied Surface Science* 258, 3415– 3419 (2012).
- [13] <http://www.slideshare.net/MilanVanBree1/microstructurallymodifiedtial6v1>, viimati uuendatud: 10.04.2015; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [14] <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=2591>, viimati uuendatud: 11.06.2013; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [15] D.C. Greenspan, „Bioactive ceramic implant materials,“ *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 4, 389-393 (1999).
- [16] R. Condie, S. Bose, A. Bandyopadhyay, „Bone cell-materials interaction on Si microchannels with bioinert coatings,“ *Acta Biomaterialia* 3, 523-530 (2007).
- [17] F. Rupp, R. A. Gittens, L. Scheideler, A. Marmur, B. D. Boyan, Z. Schwartz, J. Geis-Gerstorfer, „A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects,“ *Acta Biomaterialia* 10, 2894-2906 (2014).
- [18] R. Narayanan, T.-Y. Kwona, K.-H. Kim, „TiO₂ nanotubes from stirred glycerol/NH₄F electrolyte: Roughness, wetting behavior and adhesion for implant applications,“ *Materials Chemistry and Physics* 117, 460–464 (2009).
- [19] S. M. George, „Atomic Layer Deposition: An Overview,“ *Chemical Reviews* 110, 111–131 (2010).
- [20] E. Cianci, S. Lattanzio, G. Seguni, S. Vassanelli, M. Fanciulli, „Atomic layer deposited TiO₂ for implantable brain-chip interfacing devices,“ *Thin Solid Films* 520, 4745–4748 (2012).

- [21] Y. J. Suh, N. Lu, S. Y. Park, T. H. Lee, S. H. Lee, D. K. Cha, M. G. Lee, J. Huang, S.-S. Kim, B.-H. Sohn, G.-H. Kim, M. J. Ko, J. Kim, M. J. Kim, „Three-dimensional observation of TiO₂ nanostructures by electron tomography,“ *Micron* 46, 35–42 (2013).
- [22] M. Sharma, J. B. Hudson, „Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent,“ *American Journal of Infection Control* 36(8), 559-563 (2008).
- [23] L. Reimer, *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis* (Springer, Berlin, 1998).
- [24] P. J. Goodhew, J. Humphreys, R. Beanland, *Electron Microscopy and Analysis, Third Edition* (Taylor & Francis, London, 2001).
- [25] <http://www.andor.com/learning-academy/raman-spectroscopy-an-introduction-to-raman-spectroscopy>, viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [26] <http://tera.chem.ut.ee/~ivo/ak2/icp-ms.pdf> Analüütiline keemia II, õppematerjal veebis, viimati uuendatud: 2013; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [27] <http://tera.chem.ut.ee/~ivo/ak1/AS.pdf> Analüütiline keemia, õppematerjal veebis, viimati uuendatud: 2012; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [28] http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRF.html, viimati uuendatud: 11.12.2013; viimati vaadatud: 01.06.2015.
- [29] J. Wang, *Analytical Electrochemistry* (Wiley, John & Sons, Incorporated, New York, 1994).
- [30] J. Aarik, A. Aidla, A. Kasikov, H. Mändar, R. Rammula and V. Sammelselg, „Influence of carrier gas pressure and flow rate on atomic layer deposition of HfO₂ and ZrO₂ thin films,“ *Applied Surface Science* 252, 5723-5734 (2006).
- [31] J. Aarik, A. Aidla, H. Mändar, T. Uustare, „Atomic layer deposition of titanium dioxide from TiCl₄ and H₂O: investigation of growth mechanism,“ *Applied Surface Science* 172, 148-158 (2001).

- [32] L. Aarik, T. Arroval, R. Rammula, H. Mändar, V. Sammelselg, J. Aarik, „Atomic layer deposition of TiO₂ from TiCl₄ and O₃,“ *Thin Solid Films* 542, 100-107 (2013).
- [33] A. Galeotti, R. Uomo, G. Spagnuolo, S. Paduano, R. Cimino, R. Valletta, V. D'Anto, „Effect of pH on in vitro biocompatibility of orthodontic miniscrew implants,“ *Progress in Orthodontics* 2013, 14:15 (2013).
- [34] A. Varez, M. L. Sanjuan, M. A. Laguna, J. I. Pena, J. Sans, G. F. de la Fuente, „Microstructural development of the La_{0.5}Li_{0.5}TiO₃ lithium ion conductor processed by the laser floating zone (LFZ) method,“ *Journal of Materials Chemistry* 11, 125-130 (2011).
- [35] I. Jõgi, A. Haljaste, M. Laan, „Hybrid TiO₂ based plasma-catalytic reactors for the removal of hazardous gasses,“ *Surface & Coatings Technology* 242, 195-199 (2014).
- [36] C. Oldani, A. Dominguez, „Titanium as a Biomaterial for Implants,“ in *Recent Advances in Arthroplasty*, Samo K. Fokter, ed., InTech (2012), saadaval aadressilt: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-arthroplasty/titanium-as-a-biomaterial-for-implants>
- [37] Y. H. Jeong, I. B. Sonc, H. C. Choe, „Formation of Surface Roughness on the Ti-35Nb-xZr Alloy Using Femtosecond Laser for Biocompatibility,“ *Procedia Engineering* 10, 2393–2398 (2011).

Functionalization of medical grade titanium with thin TiO₂ layers grown by ALD method

By Elyne Aaviksoo

Summary

In this work we studied the possibilities of functionalizing medical grade 5 titanium (Ti-5) in order to enhance its biocompatibility and corrosion resistance by using chemical pretreatments for roughening and atomic layer deposition (ALD) for making a biocompatible top layer. In order to find the best combination of chemical treatment and the atomic layer deposited coating, the samples were first separately etched in HCl, H₂SO₄, NaOH and NaOH/H₂O₂ solutions. Next, the treated substrates were coated with TiO₂ by ALD at 100°C, 300°C or 500°C.

Scanning electron microscopy studies showed that the top layers, prepared by ALD, followed the rough surface that was obtained by etching. Electrochemical linear sweep tests showed the lowest current densities in the case of coatings prepared by ALD at lower temperatures (100°C and 300°C). Biocompatibility tests with osteoblast cells showed the best performance in the case of HCl etching and anatase coating (ALD at 300°C). The same substrate also proved to be most wetting, having the lowest contact angle. ICP-MS preliminary studies showed that vanadium ions may diffuse through the coating when ALD is done at high temperatures (500°C), but the diffusing is substantially lower for objects with ALD coatings prepared at lower temperatures.

According to biocompatibility tests with osteoblast cells, corrosion tests with linear sweep voltammetry, ICP-MS studies and wettability measurements, the best coating for grade 5 titanium dental implants can be made by using HCl pretreatment and atomic layer deposited anatase phase TiO₂ top layer. This method may also be used to enhance other medical implants manufactured from different alloys, however, applying this method on other alloys requires additional research and testing.

LISA

Tabel 4. Katseobjektide märgumisnurgad

	Eeltöötuse lahus	ALD kile struktuur objektil	Möödetud märgumisnurk (°)
Otsingulised uuringud	Poleeritud	-	17
	HCl	TiO ₂ amorfne	57
	H ₂ SO ₄	TiO ₂ amorfne	55
	NaOH	TiO ₂ amorfne	43
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ amorfne	61
	HCl	TiO ₂ anataas	4
	H ₂ SO ₄	TiO ₂ anataas	5
	NaOH	TiO ₂ anataas	8
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ anataas	7
	HCl	TiO ₂ rutiil	16
	H ₂ SO ₄	TiO ₂ rutiil	41
	NaOH	TiO ₂ rutiil	29
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ rutiil	55
	Eeltöötuse lahus	ALD kile struktuur objektil	Möödetud märgumisnurk (°)
Põhikatsed	Poleeritud	-	55
	Poleeritud	TiO ₂ amorfne	76
	HCl	TiO ₂ amorfne	69
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ amorfne	65
	Poleeritud	TiO ₂ anataas	61
	HCl	TiO ₂ anataas	32
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ anataas	58
	Poleeritud	TiO ₂ rutiil	67
	HCl	TiO ₂ rutiil	60
	NaOH/H ₂ O ₂	TiO ₂ rutiil	76

Tabel 5. Rakukasvatuste tulemused

	Titaani materjal	Eeltötluse lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)	Jagunemisvõimelised rakud vaateväljas (tk)
Otsingulised uuringud	Ti-5 freesitud	-	-	19
	Ti-5 freesitud	HCl	100	21
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	100	10
	Ti-5 freesitud	NaOH	100	28
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	100	29
	Ti-5 freesitud	HCl	300	30
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	300	14
	Ti-5 freesitud	NaOH	300	17
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	300	22
	Ti-5 freesitud	HCl	500	26
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	500	22
	Ti-5 freesitud	NaOH	500	26
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	500	22
	Titaani materjal	Eeltötluse lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)	Jagunemisvõimelised rakud vaateväljas (tk)
Põhikatsed	Ti-5	-	-	11
	Ti-5	-	100	24
	Ti-5	HCl	100	51
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	100	44
	Ti-5	-	300	33
	Ti-5	HCl	300	64
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	300	55
	Ti-5	-	500	22
	Ti-5	HCl	500	57
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	500	42

Tabel 6. Elektrokeemiliste katsete tulemused

	Titaani materjal	Eeltöötlemise lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)	j_{cor} (nA / cm²)	E_{pit} (V vs SCE)
Otsingulised uuringud	Ti-5 freesitud	-	-	18	3
	Ti-5 freesitud	HCl	100	4	5
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	100	0,8	4
	Ti-5 freesitud	NaOH	100	6	-
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	100	0,9	5
	Ti-5 freesitud	HCl	300	1	-
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	300	2	-
	Ti-5 freesitud	NaOH	300	208	-
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	300	1	-
	Ti-5 freesitud	HCl	500	95	4
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	500	3	4
	Ti-5 freesitud	NaOH	500	253	3
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	500	66	4
	Titaani materjal	Eeltöötlemise lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)	j_{cor} (nA / cm²)	E_{pit} (V vs SCE)
Põhikatsed	Ti-5	-	-	9	-0,5
	Ti-5	-	100	1,1	
	Ti-5	HCl	100	0,5	-
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	100	0,3	-
	Ti-5	-	300	1,7	
	Ti-5	HCl	300	0,4	-
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	300	0,3	-
	Ti-5	-	500	1,2	
	Ti-5	HCl	500	317	2,2
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	500	200	4,0

Tabel 7. Käesolevas töös kasutatud katseobjektid

	Titaani materjal	Eeltöötuse lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)
Otsingulised uuringud	Ti-5 freesitud	-	-
	Ti-5 freesitud	NaOH	100
	Ti-5 freesitud	HCl	100
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	100
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	100
	Ti-5 freesitud	NaOH	300
	Ti-5 freesitud	HCl	300
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	300
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	300
	Ti-5 freesitud	NaOH	500
	Ti-5 freesitud	HCl	500
	Ti-5 freesitud	H ₂ SO ₄	500
	Ti-5 freesitud	NaOH/H ₂ O ₂	500
		Titaani materjal	Eeltöötuse lahus
Põhikatsed	Ti-5	-	-
	Ti-5	-	100
	Ti-5	HCl	100
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	100
	Ti-5	-	300
	Ti-5	HCl	300
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	300
	Ti-5	-	500
	Ti-5	HCl	500
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	500
	Titaani materjal	Eeltöötuse lahus	TiO₂ kile ALD kasvutemperatuur (C°)
Kruvibjektid	Ti-5	-	-
	Ti-5	-	100
	Ti-5	-	300
	Ti-5	-	500

	Ti-5	HCl	100
	Ti-5	HCl	300
	Ti-5	HCl	500
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	100
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	300
	Ti-5	NaOH/H ₂ O ₂	500