

Uloga jamičaste korozije u slabljenju osteosintetskih implantata izrađenih od nehrđajućega čelika 316L

Labidi, May

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:827211>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

May Labidi

**Uloga jamičaste korozije u slabljenju
osteosintetskih implantata izrađenih od
nehrđajućega čelika 316L**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

May Labidi

**Uloga jamičaste korozije u slabljenju
osteosintetskih implantata izrađenih od
nehrđajućega čelika 316L**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Fakultetu strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu uz pomoć doc. dr. sc. Mateje Šnajdar Musa u sklopu Doktorskog studija *Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Ivan Dobrić i prof. dr. sc. Janoš Kodvanj

Iskrenu zahvalnost upućujem svom entuzijastičnom, razumnom i iskusnom mentoru, dragom kolegi prof. dr. sc. Ivanu Dobriću na potpori, dostupnosti i pomoći tijekom izrade ovog rada bez čije pomoći ga ne bi bilo moguće ostvariti. Velike zahvale prof. dr. sc. Janošu Kodvanju na pedantnošću i potpori. Također umirovljenom prof. dr. sc. Slavku Davili upućujem najiskreniju zahvalu kao inicijatoru mog puta ka ovoj disertaciji, uvijek prisutnom i spremnom pomoći.

Nadalje se posebno zahvaljujem članovima Katedre strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu, posebice doc. dr. sc. Mateji Šnajdar Musa, prof. dr. sc. Vesni Alar, prof. dr. sc. Gorani Baršić koje su mi uvelike pomogle u ostvarivanju ovog rada. Na metalurškom fakultetu u Sisku upućujem divljenje i zahvalu umirovljenoj prof. dr. sc. Jadranki Malini koja mi je znatno pomogla u stvaranju plana istraživanja pomoću njenog briljantnog uma i prekrasnog karaktera.

Izvanrednu zahvalu upućujem dragom kolegi i majstoru statistike doc. dr. sc. Milanu Miloševiću koji je zaslužan za većinu tablica te je omogućio da se ova gomila tamnih jamica pretvori u smisleno svijetlo logike.

Najviše se zahvaljujem svojoj majci Kati koja mi je pružala bezuvjetnu i neizmjernu potporu, i pokazala svoju izuzetnu strpljivost po kojoj je najmanje poznata.

Blagoslovljeni bili svi navedeni.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Građa koštanog sustava.....	3
1.1.1. Koštane stanice.....	3
1.1.2. Koštani matriks.....	3
1.2. Koštano cijeljenje.....	4
1.2.1. Uvod.....	4
1.2.2. Primarno koštano cijeljenje.....	4
1.2.2.1. Kontaktno primarno koštano cijeljenje.....	5
1.2.2.2. Pukotinasto primarno koštano cijeljenje.....	5
1.2.3. Sekundarno koštano cijeljenje.....	6
1.2.4. Čimbenici koji utječu na cijeljenje kosti.....	9
1.2.4.1. Lokalni čimbenici.....	9
1.2.4.2. Sistemski čimbenici.....	10
1.3. Promjena pH vrijednosti kod koštanog cijeljenja.....	14
1.3.1. pH.....	14
1.3.2. pH-metar.....	15
1.3.3. Promjene pH vrijednosti u odnosu na aktivnost osteoblasta i osteoklasta.....	17
1.3.3.1. Uvodne napomene.....	17
1.3.3.2. Utjecaj osteoblasta na pH.....	18
1.3.3.3. Utjecaj osteoklasta na pH.....	20
1.4. Nehrđajući čelik 316L.....	22
1.4.1. Uvodne i povijesne napomene.....	22
1.4.2. Vrste i sastav nehrđajućeg čelika 316L.....	23
1.4.2.1. Vrste nehrđajućeg čelika.....	23
1.4.2.2. Osnovni legirni elementi.....	24
1.4.2.3. Sastav i svojstva nehrđajućeg čelika 316L.....	28
1.4.3. Pasivirajući sloj.....	29
1.4.3.1. Uvodne napomene.....	29
1.4.3.2. Tehnika pasivizacije.....	29
1.5. Jamičasta korozija.....	32

1.5.1. Uvodne napomene.....	32
1.5.2. Inicijacija jamičaste korozije.....	33
1.5.3. Propagacija jamičaste korozije.....	34
1.6. Slabljenje osteosintetskog implantata.....	36
1.6.1. Nepoželjne posljedice slabljenja osteosintetskog materijala.....	36
1.6.2. Najčešći mehanizmi slabljenja 316L implantata.....	36
2. HIPOTEZA.....	38
3. CILJEVI RADA.....	39
4. MATERIJALI I METODE.....	40
4.1. Struktura istraživanja.....	40
4.2. Materijali.....	41
4.2.1. Pločice nehrđajućeg čelika.....	41
4.2.2. Tekućina u kojoj se uranjaju pločice.....	41
4.2.3. Posude.....	42
4.3. Metode.....	42
4.3.1. Skenirajući elektronski mikroskop.....	42
4.3.2. Brojanje jamica.....	44
4.3.3. Eksperimentalno ispitivanje pločica.....	45
4.3.3.1. Provedba statičkih ispitivanja.....	45
4.3.3.2. Provedba cikličkih ispitivanja.....	47
4.3.4. Mjerenje hrapavosti pločice (dubina jamica).....	47
4.4. Statističke metode.....	50
5. REZULTATI.....	51
5.1. Rezultati mjerenja broja i površine jamica ovisno o pH vrijednostima u različitim vremenskim intervalima.....	51
5.2. Rezultati eksperimentalnog ispitivanja mehaničkih svojstava pločica.....	65
5.2.1. Rezultati statičkog ispitivanja.....	65
5.2.2. Rezultati cikličkog ispitivanja.....	76
5.3. Rezultati mjerenja hrapavosti pločice i određivanje dubine najdublje jamice.....	84
6. RASPRAVA.....	87
7. ZAKLJUČAK.....	96
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....	99
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLLESKOM JEZIKU.....	100
10. POPIS LITERATURE.....	101

11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	108
----------------------------	-----

POPIS OZNAKA I KRATICA

SBF	Simulated Body Fluid
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
MSC	Mesenchymal Stem Cells
PgE2	Prostaglandin E2
OPG	Osteoprotegerin ligand
PTH	Parathormon
1,25(OH)2D3	1,25-dihydroxy-vitamin D3 = calcitriol
BMP-2	Bone Morphogenic Protein
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
GPa	Giga Pascal
HNO₃	Dušična kiselina
TNF	Tumor Necrosis Factor
N	Njutm (eng. <i>Newton</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

Uporaba metalnih implantata u ortopedsko-traumatološkoj kirurgiji počinje početkom 20. stoljeća te je, gledajući povijesno, iskustvo s metalima u biološkom mediju razmjerno kratko. Kirurški nehrđajući čelik koristi se od sredine prošlog stoljeća te se od početaka njegove primjene neprestano istražuju uočene promjene koje nastaju djelovanjem raznih čimbenika, poput mehaničkog opterećivanja, elektrokemijskog utjecaja, strukture implantata itd. Od početaka korištenja osteosintetskih materijala (implantata) u ortopedsko-traumatološkoj kirurgiji pa do danas pokušalo se koristiti raznovrsne materijale koji su se apriori smatrali biokompatibilnima i podnosili opterećenje na određenom dijelu kosti, odnosno mogli osigurati stabilnu fiksaciju i opterećenje. Tako su se rabile: razne metalne legure (titanijske: Ti6Al4V, molibdenove...), biorazgradivi materijali od kojih je češće korišten magnezijски materijal, polietilenski potporni materijali, keramika i mnogobrojni ostali materijali. Zasad se na svjetskoj razini najčešće koristi upravo kirurški čelik 316L zbog zadovoljavajućih svojstava te pristupačne cijene, što je bitan čimbenik u većini zdravstvenih sustava u svijetu (1, 2, 3, 4).

Sedamdesetih godina 20. stoljeća te posljednjih nekoliko godina ispitivala se interakcija kirurškoga nehrđajućeg čelika u biološkom mediju, a pritom mehanička svojstva i promjene koje su uslijedile kao posljedica djelovanja statičkog i cikličkog opterećenja, te korozijske promjene čeličnoga implantata kod korozije u procijepu (eng. *crevice corrosion*) i tarne korozije (eng. *fretting corrosion*) za koju je razvijeno cijelo područje tribologije - tribokorozija. Mnogobrojni su pokušaji da se spriječi/smanji korozija u procijepu modificiranjem oblika rubnih struktura (primjerice, glave vijka i ležišta otvora pločice) (1, 4, 5, 6).

Kako su istraživači uglavnom imali za cilj usavršiti svojstva implantata nehrđajućeg čelika, počeo se uvoditi zaštitni sloj, takozvani pasivizirajući sloj koji se ujedno integrira s okolnim koštanim tkivom. Pasivizirajući sloj se stvara oksidacijom površinskog sloja kroma iz čelika koji je inertan spoj biokemijski te se na taj način stvori pasivni sloj koji štiti daljnje oštećenje površine agresivnom kemijskom okolinom. Također se počinju postavljati umetci između dvaju slojeva metala, a bilo je i pokušaja oblaganja plemenitim metalima, što se na početku pokazalo kao vrlo učinkovita metoda, no uočeno je da istodobno nastaje elektroprovodni učinak, a to u slučaju osteosintetskih implantata nije bilo poželjno (6, 7, 8, 9, 10).

Čelik 316L je poželjnija vrsta materijala zbog smanjenoga rizika od korozije i minimiziranja količine ugljika (eng. *L - low*), a on upravo stvara karbidne spojeve s kromom pa tako krom postaje nedjelotvoran za pasivizaciju (11, 12, 13, 14).

Nadalje, postavlja se pitanje faza u slučaju lokalizirane jamičaste korozije; nastaje li ona s „tvorničkim“ prekursorom, tj. jesu li mikro nesavršenosti u obliku točkastih defekata na površini implantata inicijatori, a naknadno se, kada se implantat ugradi u biološki medij kemijskim djelovanjem agresivnih bioloških čimbenika, nastavlja udubljivanje jamica kao sljedeća faza propagacije koju je zasad nemoguće u potpunosti zaustaviti (3, 15).

Također se dosta pažnje posvećuje posljedicama otpuštanja određenih elemenata legure u krvotok i što se to dulje promatra, sve je više različitih mišljenja i stajališta o stvarnom mogućem štetnom učinku otpuštenih elemenata i o njihovoj stvarnoj količini (14, 16, 17). Još se ne zna kako selektivna korozija (eng. *selective/dealloying corrosion*) utječe na narušavanje integriteta implantata te posljedično na njegovo oslabljivanje. Također se ne zna sa sigurnošću koji ključni čimbenik, ako postoji, narušava integritet implantata te dovodi do ishodišnog puknuća. Mnogobrojna su istraživanja o mehaničkom opterećenju i zamoru materijala u kojima se dokazuje da biomehaničke sile itekako utječu na promjenu strukture kad je riječ o slabljenju implantata (18, 19, 20, 21, 22).

Smatra se da je problematika ozbiljna i da će sigurno još godinama biti u središtu pažnje mnogih istraživača. Otežano je ispitivanje pojedinačnih vrsta korozija u istraživanjima *in vivo* kako se korozijske promjene poklapaju u određenim fazama te budući da su biološka stanja vrlo individualna (23, 24, 25). Također je varijabilna mehanička sila, tj. opterećenje na različite segmente tijela drukčije, primjerice znatno se razlikuje opterećenje gornjih i donjih ekstremiteta, uz razliku tjelesne težine pojedinih bolesnika i fizičke aktivnosti (13, 25 26).

U ovom istraživanju ispituje se utjecaj simulirane biološke sredine na korozijske promjene u slučaju lokaliziranih jamičastih korozijskih promjena. S pretpostavkom da će se utvrditi mogući utjecaj opisanih lokalnih korozija u slabljenju implantata, cilj je odrediti optimalnu debljinu implantata. Do sada nismo naišli na takva istraživanja u literaturi.

1.1. Građa koštanog sustava

Koštani sustav ljudskog tijela omogućuje mehaničku potporu i zaštitu tijela te sudjeluje u regulaciji metabolizma kalcija, magnezija, fosfora, natrija i acidobazne ravnoteže. Kost sadrži 99% sveukupnog tjelesnog kalcija, 90% fosfora, oko 50% magnezija i oko 30% natrija, a koristi 10% ukupnog protoka krvi. Koštani sustav je aktivni metabolički sustav koji se sastoji od staničnog (koštane stanice) i izvanstaničnog dijela (koštani matriks).

1.1.1. Koštane stanice

Koštano tkivo sadrži tri vrste stanica: osteoblaste, osteocite i osteoklaste. **Osteoblasti** su osnovne stanice stvaranja nove kosti, one sadrže koštani izoenzim alkalne fosfataze i receptore za parathormon (PTH) i vitamin D₃ (1,25-dihidroksikolekalciferol). Ove stanice izlučuju kolagen tip I kao osnovnu bjelančevinu uz druge bjelančevine koje nisu relevantne u ovoj disertaciji (27). Tijekom sinteze organskog matriksa, između osteoblasta i prethodno stvorene kosti na staničnoj površini izlučuju se sastojci matriksa i nastaje novi, još nemineralizirani organski matriks (osteoid) u koji se odlažu kalcijeve soli, čime završava izgradnja kosti (28). Kada se osteoblast potpuno okruži tek izlučenim matriksom, postaje **osteocit** (najbrojnije stanice koštanog sustava). Smješten je u lakuni, između lamela matriksa, okružen izvanstaničnom tekućinom i povezan citoplazmatskim izdancima s okolnim osteocitima. Svaka lakuna sadrži samo jedan osteocit. Citoplazmatski izdanci su u međusobnoj komunikaciji putem tijesnih spojeva (eng. *tight junctions*) kojima hranjive tvari dolaze u stanice. U usporedbi s osteoblastima, osteociti su spljošteni i manje aktivni od osteoblasta, a svojim metabolizmom održavaju koštani matriks. Nakon propadanja osteocita matriks se resorbira. **Osteoklasti** su stanice potrebne za resorpciju kosti, a nastaju spajanjem mononuklearnih fagocita porijeklom iz matičnih stanica hematopoeze (29). Sposobnost izazivanja resorpcije ovisi o pokretljivosti osteoklasta i njihovoj sposobnosti stvaranja kisele sredine u okolini stanice. Od površine kojom aktivni osteoklasti dodiruju koštani matriks izlaze nepravilni, često razgranati izdanci koji čine nabrani rub. Taj rub znatno povećava aktivnu resorpcijsku površinu i ujedno obuhvaća male čestice koje se razgrađuju enzimima. Kisela sredina površine ispod nabranog ruba osteoklasta (*Howshipove lakune*) omogućuje optimalne uvjete brojnim enzimima koji sudjeluju u razgradnju koštanog matriksa. Posebnost osteoklasta je prisutnost enzima kisele fosfataze koja se može detektirati u krvi i analizom rezultata može poslužiti kao indikator pregradnje kosti (30).

1.1.2. Koštani matriks

Izvanstanični matriks je organska tvar u kojoj se odlažu minerali (anorganska tvar). *Anorganska tvar* čini oko 50% suhe mase koštanog matriksa. Najviše ima kalcija i fosfora koji tvore kristale hidroksiapatita, ali prisutan je i amorfni (nekristalni) kalcij-fosfat. Kristali hidroksiapatita leže duž kolagenih vlakanca, a okružene su amorfnom osnovnom tvari. Ioni na površini hidroksiapatita su hidrirani te se oko kristala nalazi sloj vode i iona. To je hidratacijska ljuska koja olakšava izmjenu iona između kristala i tjelesnih tekućina (31). *Organsku tvar* čini kolagen tipa I i amorfna osnovna tvar. Kolagen je osnovna izvanstanična bjelančevina u kostima, a amorfna osnovna tvar sadrži glikozaminoglikane udružene s bjelančevinama. Najčešća vrsta glikozaminoglikana u kostima je hondroitin 4-sulfat (32), a osteokalcin čini otprilike 1 - 2% ukupnih bjelančevina kosti koji vrijedi spomenuti. Osteokalcin se stvara samo u osteoblastima, i nakon lučenja iz stanice odlaže se u izvanstaničnom koštanom matriksu. Njegova razina u krvi upućuje na stupanj aktivnosti osteoblasta, odnosno na brzinu stvaranja kosti (33).

1.2. Koštano cijeljenje

1.2.1. Uvod

Cijeljenje kosti se ovdje odnosi na primarno i sekundarno cijeljenje kod osteosinteze prijeloma ili osteotomije. Općenito govoreći, cijeljenje kosti u ljudi je složen proces koji je samo djelomice pojašnjen te obuhvaća niz događanja kao reakciju na ozljedu, bilo traumatu ili jatrogeno uzrokovanu ozljedu koja uključuje unutarstanične kao i izvanstanične molekularne signale za indukciju, kondukciju i osteogenezu. Ključan je faktor položaj ulomaka te stabilnost istih te će o tome uvelike ovisiti hoće li kost cijeliti primarno ili sekundarno, ako uopće dođe do cijeljenja.

Osteotomija se opisuje kao stvaranje prijelomne pukotine s instrumentima kao što su Gigli žičane pile, osteotomi, posebne oštrice za tu svrhu, pila koja rezultira definiranim razmakom itd. Unatoč nevjerojatnoj sličnosti s prirodnim prijelomom, postoje brojne diskusije mogu li se usporediti s traumatskim lomom kostiju (34, 35).

1.2.2. Primarno koštano cijeljenje

Za ovakav tip cijeljenja potrebno je apsolutno mirovanje ulomaka u idealnom položaju ulomaka koji se može naći kod jednostavnih prijeloma ili osteotomija. Prvi koji je opisao takvo cijeljenje kod

životinja te ga nazvao primarnim ili angiogenim koštanim cijeljenjem je Krompecher 1935. Kasnije su Schenk i Willenegger 1963. dokazali takvo cijeljenje u eksperimentalnim životinjama kao i u čovjeka.

Osnovna razlika između primarnog i sekundarnog koštanog cijeljenja jest da nema stvaranja kalusa tj. nedostaje periostalna reakcija kod primarnog koštanog cijeljenja.

Kalus se sastoji od hrskavice, vezivnog tkiva, osteoida, nezrele vlaknaste kosti i krvnih žila (36).

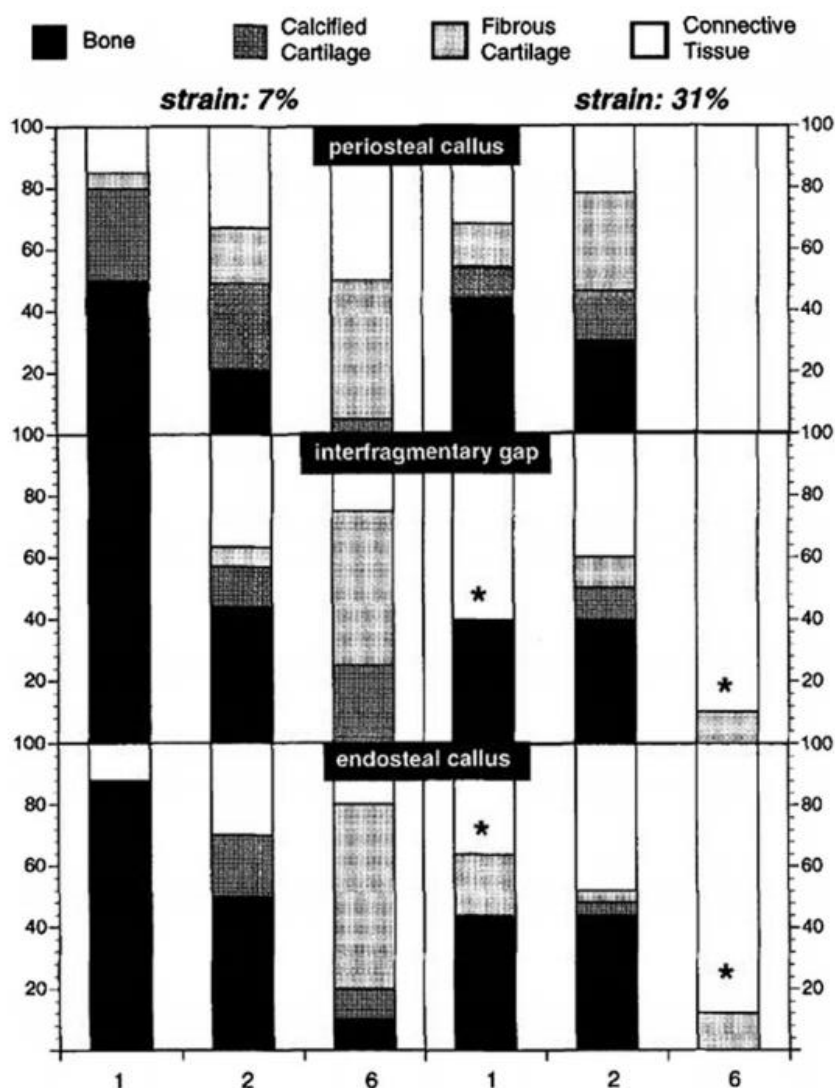
No ukoliko nestabilnost (nema mirovanja) prelazi granicu bioloških mogućnosti cijeljenja, dolazi do resorpcije krajeva ulomaka što nadalje povećava nestabilnost loma. Ukoliko takvo stanje potraje (najčešće je granica 8 - 9 mjeseci od loma), očekivanje cijeljenja loma ili osteotomije kosti se minimalizira te je izgledno da dolazi do stvaranja pseudoartroze.

1.2.2.1. Kontaktno primarno koštano cijeljenje

Kod ove vrste cijeljenja osteoni urašćuju izravno iz jednog u drugi koštani ulomak. Osteon nastaje uzajamnim djelovanjem osteoblasta i osteoklasta te je uvjet za uredno koštano cijeljenje. Osteoklasti koji se nalaze na vrhu osteona, otapaju koštano tkivo i stvaraju kanal u koji urašćuje krvna kapilara. Iz pratećega pluripotentnoga vezivnoga tkiva diferenciraju se osteoblasti koji proizvode osteoid te se u njemu ulažu minerali soli i tako se stvara lamelarna kost. Takvo se koštano cijeljenje naziva Haversovom pregradnjom, a ona se sastoji u istodobnom spajanju i rekonstrukciji kosti.

1.2.2.2. Pukotinasto primarno koštano cijeljenje

U ovom slučaju, pukotina se ispunjava koštanim tkivom, a zatim pregrađuje na principu Haversove pregradnje kao i prilikom kontaktnog cijeljenja. Što je pukotina veća između ulomaka, to je proces koštanog cijeljenja duži kao što je prikazano na slici 1 (37). Upravo zbog navedenoga, teži se anatomskej repoziciji ulomaka kako bi među njima bila što manja pukotina, a što više zona kontakata. Može se zaključiti da će brzina koštanog cijeljenja jednog prijeloma ili jedne osteotomije u uvjetima potpunog mirovanja prilikom primarnog koštanog cijeljenja ovisiti o odnosu površina područja kontakta i područja pukotina. Iako je prema nekim autorima primarno koštano cijeljenje cilj liječenja prijeloma, ono ne predstavlja osobitu prednost u odnosu na sekundarno koštano cijeljenje iz razloga što ima vrlo spor tijek, osobito kod odraslih. Sljedeći potencijalni nedostatak primarnog cijeljenja kosti je da je onemogućeno u anaerobnim uvjetima, što nije slučaj kod sekundarnog koštanog cijeljenja (38).



Slika 1. Utjecaj mjere razmaka prijelomne pukotine i naprezanje na diferencijaciju tkiva. S većim razmakom i naprezanjem, povećava se omjer vezivnog tkiva i vlaknasto-hrskavičnog tkiva na mjestu prijeloma te unutar samog kalusa. S druge strane, kod manjih razmaka prijelomne pukotine i manjih naprezanja, potaknuta je veća količina koštanog stvaranja. Prikaz utjecaja veličine razmaka u mm (od 0 - 100 mm) i naprezanje kosti na diferencijaciju tkiva kroz mjeseci 1 - 6 (39).

1.2.3. Sekundarno koštano cijeljenje

Kost ovdje cijeli stvaranjem kalusa koji omogućuje mirovanje prijelomnih ulomaka, a u tome sudjeluju svi elementi vezivnog tkiva u području prijeloma te taj proces sanacije kosti obično traje duže od primarnog koštanog cijeljenja. Prijelomni hematoma koji se stvara u prvih 48 h je medij u koji urašćuje granulacijsko tkivo te se tamo stvara tzv. mrljasta kost ulaganjem kristala apatita na kolagenske niti preko fibroznog veziva i vezivne hrskavice. Ove promjene nastaju kao posljedica aktivnosti osteoblasta koji nastaju iz pluripotentnih mezenhimnih stanica (40).

Prema autorima *Cruess i Dumont* u objavi 1975. sekundarno koštano cijeljenje odvija se tijekom tri preklapajuće faze, kako slijedi: upalna, reparativna i faza remodeliranja koje se temelje na opisnoj histologiji.

Upalna faza: Počinje upalnom reakcijom koja služi kao imobilizacija loma; bol uzrokuje reakciju bolesnika da miruje tim dijelom tijela, a oticanje služi kao hidrostatska udloga. Nadalje, oštećenje krvnih žila je najbitniji čimbenik za tijek cijeljenja kada osteociti ostaju bez metaboličkog supstrata i odumiru. Na taj način oba kraja prijelomne pukotine odumiru, teško oštećeni periost i koštana moždina, kao i okolna meka tkiva, mogu doprinijeti stvaranju dodatne količine nekrotičnog materijala. Upravo prisutnost obimnog nekrotičnog materijala potiče akutni upalni odgovor, koji je jednak bilo kojem tipičnom upalnom odgovoru većine tkiva na traumatski događaj (bilo nastala ozljedom ili jatrogeno). Vazodilatacija i hiperemija, posredovani histaminom, prostaglandinima i raznim citokinima prate invaziju mjesta oštećenja neutrofilima, bazofilima i fagocitima koji sudjeluju u čišćenju nekrotičnog debrisa. Prijelomni hematoma prelazi u koagulum i sprječava daljnje krvarenje te se isti organizira u vlaknastu mrežu koja se razvija i stvara puteve za staničnu migraciju (41). Pretpostavlja se da se tijekom ove upalne faze oslobađaju i aktiviraju razni ne-kolagen-proteinski faktori rasta, koji reguliraju staničnu migraciju i diferencijaciju, a koji su u normalnim uvjetima zarobljeni u koštanom matriksu. Vrhunac upalne faze jeste unutar 48 sati te se ista faza gotovo u potpunosti povuče sedam dana nakon prijeloma.

Reparativna faza: Ova faza se aktivira unutar nekoliko dana nakon prijeloma te traje do nekoliko mjeseci. Glavno obilježje ove faze je stvaranje reparativnog (popravnog) tkivnog kalusa unutar i oko područja prijeloma. Taj kalus postupno prelazi u hrskavično tkivo, a potom u kost (41). Primarni odgovor kalusa (engl. *Primary callus response*) izravan je odgovor kosti na lokalnu upalu, bez obzira je li uzrok prijelom, infekcija, strano tijelo ili neo-plastični proces. Dvije su važne značajke kod primarnog odgovora kalusa; *prva* je da je odgovor relativno neovisan o mehaničkim čimbenicima, što se pokazalo kod stvaranja primarnog odgovora kalusa na strano tijelo, ili na kraju amputacijskog bataljka ili stvaranje kalusne kape (engl. *Cap of callus*) koja se može pojaviti na dijelu koji izviruje na kraju šupljeg intramedularnog čavla. *Druga značajka* je da je primarni odgovor kalusa vremenski ograničen; što dokazuje činjenica da ako primarni kalus (engl. *provisional callus*) nije uspio ujediniti dvije strane prijeloma unutar nekoliko tjedana, može prestati rasti i resorbirati se kao što se to može naći kod kalusa amputacijskog bataljka ili na jednoj strani većeg segmentalnog defekta.

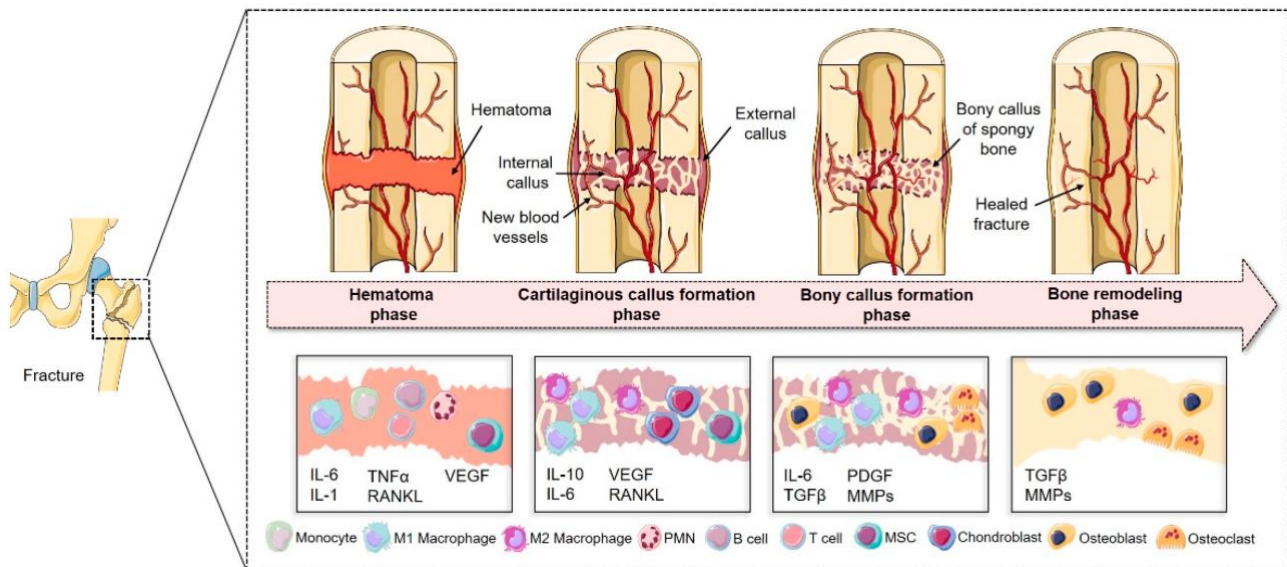
No ukoliko je primarni kalus povezao prijelomne krajeve kosti, proces cijeljenja kosti napreduje do stadija premošćujućeg kalusa (engl. *Bridging callus*) ili tvrdog kalusa (engl. *Hard callus*). Kalcifikacija kalusa kreće od osteoblasta kao izravno koštano stvaranje ili kao enhondralno okoštavanje, što ovisi o koncentraciji i količini kisika. Uobičajeno je da je rast velikog kalusa brži od rasta urastajućih krvnih žila, što rezultira prevladavanjem enhondralnog okoštavanja. S druge strane, kod manjih, mehanički stabilnih defekata, kao kod otvora uslijed bušenja kosti, prevladava primarna intramembranozna vlaknasta (nezrela) formacija kosti.

Stanični sastojci kalusa uglavnom potječu iz koštane moždine i periosta. Broj osteoblasta i osteocita prisutnih u trenutku prijeloma nedovoljan je da zadovolji visoke anaboličke zahtjeve rastućeg kalusa. Diferencijacija pluripotentnih mezenhimalnih stanica, fibroblasta i hondroblasta glavni je izvor stanice kalusa.

Kako kalus kalcificira i postaje tvrd, prijelom postaje imobiliziran iznutra. Početna kalcifikacija se remodelira putem osteoblasta i osteoklasta, čime se kalcificirana hrskavica i vlaknasta-nezrela kost zamjenjuju lamelarnom kosti u zadnjoj fazi cijeljenja prijeloma kako slijedi (42):

Faza remodeliranja: Ova faza predstavlja uobičajenu remodelirajuću aktivnost kosti, iako može biti ubrzana u području prijeloma tijekom nekoliko godina te se nadomješta određeni volumen nekoliko puta. Kod djece, ova faza se odvija znatno brže te uključuje *modeliranje* (nezavisna resorpcija i stvaranje) i *remodeliranje* (stvaranje koje je vezano za resorpciju). Rezultat faze remodeliranja je postupno modifikacija područja prijeloma, pod utjecajem mehaničkog opterećenja sve dok se ne postigne optimalni oblik, sličan obliku kosti prije prijeloma. *Wolff je 1892. g. uočio da arhitektura koštanog sustava ovisi o mehaničkim potrebama tog sustava te ga je nazvao Wolffovim zakonom transformacije kosti* (43).

Na slici 2 su prikazane faze cijeljenja koje dijele drugu fazu u još dvije faze.



Slika 2. Shematski prikaz četiri faze cijeljenja prijeloma kosti: **1.** stvaranje hematoma i lokalna upalna faza. Imune stanice poput PMN (eng. *peripheral multinucleated cells*), T- i B-stanice, monociti i MSC stanice su aktivirane i usmjerene prema prijelomnoj pukotini putem autokrinih i parakrinih puteva (npr. oslobađanjem citokina kao što su to interleukini (IL-1), IL-6 ili TNF α (eng. *Tumor necrosis factor*)). VEGF (eng. *Vascular endothelial growth factor*) također može biti uvod revaskularizacije u ovoj početnoj fazi. **2.** Stvaranje područja fibrokartilogene prenosnice odnosno faza premošćujućeg kalusa. U ovoj fazi hondroprogenitorne stanice se diferenciraju u hondroblaste, a angiogeni proces je i dalje održan. **3.** Faza karakterizirana enhondralnom osifikacijom, time što se hrskavično tkivo zamjenjuje primitivnim koštanim tkivom. **4.** U ovoj zadnjoj fazi, faza remodeliranja, struktura i funkcija kostiju se u potpunosti povrate putem uske izmjene stvaranja i resorpcije kosti (44).

1.2.4. Čimbenici koji utječu na cijeljenje kosti

Brojni su čimbenici koji utječu na cijeljenje kosti, a ti čimbenici se mogu opredijeliti na lokalne i sistemske opće čimbenike. Slijedi detaljniji opis svakog od navedena dva čimbenika.

1.2.4.1. Lokalni čimbenici

Svojstvo prijeloma. Odnosi se na brojna svojstva koja utječu na cijeljenje kosti; uvećana pomičnost ulomaka, nepravilna os cijeljenja, značajno oštećenje kosti na mjestu prijeloma te umetanje (tzv. interpozitum) mekog tkiva na mjestu prijelomne pukotine koja može dovesti do odgođenog ili potpunog sprječavanja cijeljenja kosti.

Unutar-zglobni prijelomi. Kod tih prijeloma cijeljenje u prvoj fazi je produljeno s obzirom da sinovijalna tekućina sadrži fibrinolizine koji imaju sposobnost razgradnje inicijalnog ugruška, a koji je neophodan za početni stadij cijeljenja kosti (45).

Infekcija. Infekcija kostiju na mjestu prijeloma može dovesti do odgođenog cijeljenja kosti ili do obustave cijeljenja kosti. Glavni razlog tome je što dolazi do mobilizacije lokalnih obrambenih mehanizama koji usporavaju ili čak onemogućavaju cijeljenje prijeloma.

Lokalna opskrba krvlju. Smanjena opskrba krvlju na mjestu prijeloma može dovesti do odgođenog cijeljenja kosti ili do necijeljenja kosti. Posljedično može doći do nekroze kostiju (avaskularnoj ili nekrozi kao posljedice ozračenosti), a to ovisi o opsegu manjka opskrbe krvi; što je manji opseg opskrbe krvi, to je veća vjerojatnost nastajanja nekroze zahvaćene kosti.

1.2.4.2. Sistemski čimbenici

Prisutnost bilo kojeg od ovih niže navedenih faktora ima kao posljedicu sklonost ka lošem cijeljenju.

Uznapredovala dob bolesnika. Iako se čini da sve više starije populacije brine temeljito o svom zdravlju, bilo da se radi o posebnoj prehrani i/ili fizičkim aktivnostima i tzv. zdravim životnim navikama, činjenica da je dostupnost informacija i medicinske skrbi znatno veća no što je bila prije doba interneta i globalizacije i to samo dvadesetak godina ranije, neizbježno je da cijeljenje u osoba starijih od 65 godina zahtijeva dulje razdoblje. No sporo cijeljenje kostiju nije svojstveno staničnom starenju, jer osteoblasti iz trabekularne kosti u kulturi pokazuju slične metaboličke karakteristike bez obzira na dob osobe od koje su uzete stanice. Drugi sistemski čimbenici koji utječu na proces cijeljenja u ovoj skupini, a koji imaju povećani faktor rizika te predstavljaju značajnu ulogu, su slabija vaskularizacija (ovdje se ne odnosi na lokalnu vaskularizaciju) kroz aterosklerotski promijenjene krvne žile kao i očekivane komorbiditete ove skupine bolesnika koji utječu na smanjenje dotoka kisika i hranjivih tvari. Također slabije kretanje koje je inače utvrđeno da djeluje indukcijski na proces cijeljenja i sl.

Anemija. Iako mehanizam utjecaja anemije, bez obzira na etiologiju, do sada nije u potpunosti jasan, čini se da postoji značajna povezanost između anemije i slabog koštanog cijeljenja.

Bolesti endokrinih žlijezda. Najrasprostraniji je dijabetes melitus, bolest vezana za parathormon, te disbalans hormona tijekom menopauze.

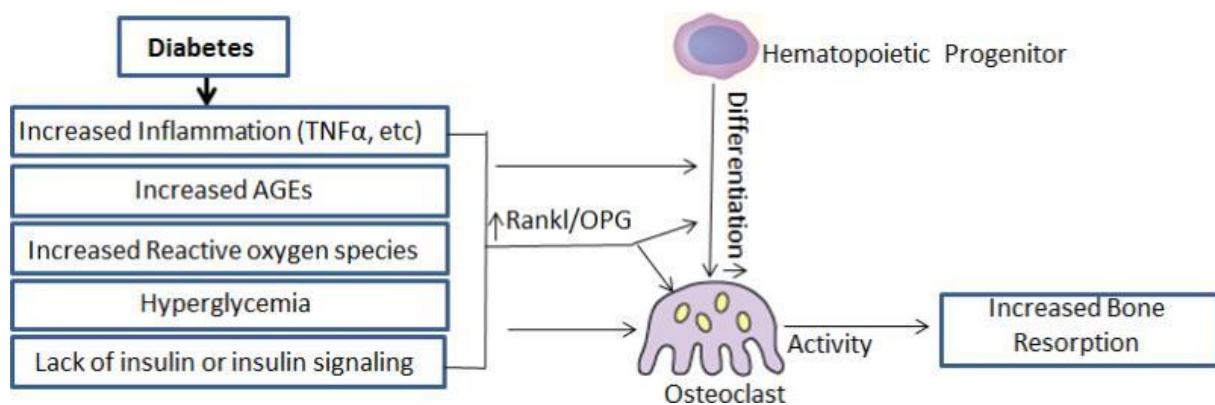
Kod bolesnika s dijabetesom melitusom cijeljenje prijeloma kostiju ima produljeni tijek za 87% (46) te je 3,4 puta veći rizik od komplikacija uključujući odgođeno cijeljenje kosti ili čak onemogućavanju cijeljenja prijeloma koje može dovesti do pseudoartroze (47).

Kliničke studije provedene na ljudima ukazuju na usporavajući utjecaj dijabetesa na cijeljenje kod prijeloma kostiju (47).

Reparativna faza cijeljenja kosti na mjestu prijeloma je inicirana proliferacijom i diferencijacijom hondroblasta koji dolaze iz izvornih stanica periosta te rezultira stvaranjem kalusa hijaline hrskavice oko ozlijeđene kosti (48).

Disbalans u apoptozi hondrocita, preuranjeno odstranjenje hrskavice, smanjenje diferencijacije i funkcije osteoblasta te promjene u opskrbi krvlju su se pokazali kao faktori koji utječu na prijelaz/tranziciju hrskavice u kost (49, 50).

Pretpostavlja se da su mehanizmi koji utječu na cijeljenje kostiju kod oba tipa dijabetesa melitusa (tip 1 i tip 2) insuficijencija inzulina, hiperglikemija i oksidativni stres. Navedeni mehanizmi mogu dovesti do smanjenja diferencijacije osteoblasta, povećanja aktivnosti osteoklasta te promjena u apoptozi hondrocita i osteoblasta te bi na taj način utjecali na cijeljenje kosti kod ovih bolesnika kao što je prikazano na slici 3 (49, 51, 52, 53).



Slika 3. Shematski prikaz utjecaja dijabetesa na povećanje resorpcije kosti: Povećava se upala, povećavaju se AGE (eng. *Advanced glycation end products*), povećava se ROS kao pokazatelj oksidativnog stresa (eng. *Reactive oxygen species*), hiperglikemija i smanjenje inzulina/signalizacija inzulina. Posljedično se povećava RANKL/OPG koji utječe u konačnici na diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta (35).

Parathormon (PTH) je hormon paratiroidnih žlijezda koji se izlučuje u krvotok kada je koncentracija kalcija u krvi niža od normalnih fizioloških vrijednosti. Time paratiroidne žlijezde putem PTH održavaju koncentraciju vanstaničnog ioniziranog kalcija u krvi unutar fizioloških vrijednosti.

Postoji nekoliko mehanizama pomoću kojih PTH održava jednoliku količinu kalcija u vanstaničnoj tekućini (54):

1. povećava reapsorpciju kalcija u proksimalnim tubulima bubrega,
2. utječe na aktivnost enzima – hidroksilaze i tako određuje količinu aktivnog oblika vitamina D, što je važno za količinu apsorpcije kalcija iz probavnog sustava,
3. povećava resorpciju kosti (receptori za PTH nalaze se na osteoblastima; osteoblasti luče citokine koji aktiviraju osteoklaste),
4. smanjuje se reapsorpcija fosfata u bubrežnim tubulima.

S obzirom na to da hormoni štitnjače stimuliraju pregradnju koštanog tkiva, dugotrajni suvišak hormona štitnjače praćen je značajnim smanjivanjem koštane mase, što je posljedica izravnog poticaja resorpcije (55). Hormoni štitnjače i hormon rasta/somatomedin C imaju sinergistički učinak na linearni rast kosti. Estrogeni djeluju izrazito povoljno na očuvanje koštane mase. Postoji nekoliko mehanizama koji se međusobno nadopunjuju.

Estrogeni izazivaju lučenje kalcitonina (tako smanjuju koštanu resorpciju), a povišena je i resorpcija kalcija iz crijeva pod utjecajem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (34). Estrogeni inhibiraju lučenje IL-1, IL-6, TNF i PgE2, poznatih aktivatora koštane resorpcije. Pod utjecajem estrogena nije samo zaustavljena/usporena koštana resorpcija, nego hormon izaziva proliferaciju osteoblasta i povećava sintezu koštanog matriksa. Učinak na osteoblaste je posredan s obzirom na to da estrogeni povećavaju lučenje IGF-1, TGF β , stimulatora staničnih mitozata i stvaranja koštanog matriksa. U razdoblju menopauze ovaj hormon je značajno smanjen što za posljedicu ima negativni efekt na kosti.

Primjena steroida. Glukokortikoidi inhibiraju stvaranje nove kosti najvjerojatnije izravnim učinkom na osteoblaste i njihove predstadije suprimiranjem sinteze RNK i time bjelančevina. Smanjenoj aktivnosti osteoblasta pridonosi i snižena razina testosterona (u žena i muškaraca), što je česta posljedica primjene glukokortikoida. Inhibitorni utjecaj na osteoblaste također je izazvan promjenama u broju receptora za 1,25(OH)2D3 što dovodi do poremećaja metabolizma 1,25(OH)2D3 (56,57). Lučenje PTH je povećano posrednim mehanizmom. Visoke doze glukokortikoida izazivaju malapsorpciju kalcija, hiperkalciuriju i hipokalcemiju što je poticaj za lučenje PTH. Glukokortikoidi imaju utjecaj na povećanje resorpcije kosti posrednim mehanizmom putem osteoklasta. Glukokortikoidi mogu povećati broj receptora za 1,25(OH)2D3 na stanicama osteoklasta i time pojačati resorptivni učinak 1,25(OH)2D3. Ukratko, glukokortikoidi izravno i neizravno djeluju na koštanu pregradnju. Neizravno povećavaju koštanu resorpciju, a izravno smanjuju stvaranje kosti. Posljedica tih učinaka je veliki gubitak koštane mase.

Loša prehrana. Bilo kakav disbalans u prehrani može utjecati na cijeljenje kosti. S obzirom na opsežnost ovog čimbenika te neizravnu relevantnost istog u ovoj disertaciji, neće se detaljnije opisivati (58, 59, 60, 61, 62).

Pušenje (nikotin). Pušenje je jedan od dokazano bitnih čimbenika koji može dovesti do odgođenog ili potpunog obustavljanja cijeljenja kosti. Jedan od mehanizama je taj da nikotin ima vazokonstriksijski učinak na krvne žile te se posljedično smanjuje opskrba krvlju i nastavlja mehanizam smanjenja krvne opskrbe. Brojna su istraživanja provedena na životinjskim uzorcima kako bi se točan mehanizam prepoznao, jedna od novijih studija pokazuje smanjene ekspresije angiogenih markera u početnoj fazi koštanog cijeljenja te nepotpunom koštanom cijeljenju. Ekspresije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor VEGF*) i von Willebrandov čimbenik (eng. *vWF*) kod skupine izložene nikotinskom dimu je bila smanjena. Također je ta skupina imala manju gustoću mikro žila od kontrolne skupine (63).

Čini se da pušenje može promijeniti tijekom početne faze upalnog odgovora te interferirati s hondrogenozom (64, 65), također može utjecati na diferencijaciju osteoblasta i na osteogenezu (66). Nadalje, može modulirati ekspresiju gena alkalne fosfataze, BMP-2, RANKL (eng. *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*) i osteoprotegerin; svi osnovni signalni faktori prilikom stvaranja nove kosti (67). Također može inhibirati migraciju fibroblasta, a ta migracija ima vitalnu ulogu u procesu učinkovitog cijeljenja kosti (68).

1.3. Promjena pH vrijednosti kod koštanog cijeljenja

1.3.1. pH

pH (lat. *Potentia hydrogenii*: snaga vodika) ili pH-vrijednost je broj koji služi kao mjera kiselosti (aciditeta), odnosno lužnatosti (alkaliteta) vodenih otopina, a koji se dobiva kao negativan dekadski logaritam množinske koncentracije (točnije: aktiviteta) vodikovih iona u otopini:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \quad \text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

Pri 25 °C vrijednost pH neke otopine može biti između 0 i 14.

U čistoj vodi i u neutralnim vodenim otopinama koncentracija vodikovih iona (H^+) i hidroksidnih iona (OH^-) jednaka je i pri 25 °C iznosi 10^{-7} mol/dm³:

$$[\text{H}^+] = 10^{-7} \quad [\text{OH}^-] = 10^{-7}$$

Prema tomu, pH i pOH su za čistu vodu i neutralne otopine prema definiciji jednaki 7:

$$\text{pH} = 7 \quad \text{pOH} = 7$$

Koncentracija vodikovih iona u kiselim otopinama veća je od 10^{-7} mol/dm³, pa je njihov pH manji od 7; u lužnatim je otopinama koncentracija hidroksidnih iona veća, a vodikovih iona manja od 10^{-7} mol/dm³ pa je njihov pH veći od 7. Poveća li se kiselost otopine za jednu pH jedinicu, koncentracija H^+ iona poveća se 10 puta (57).

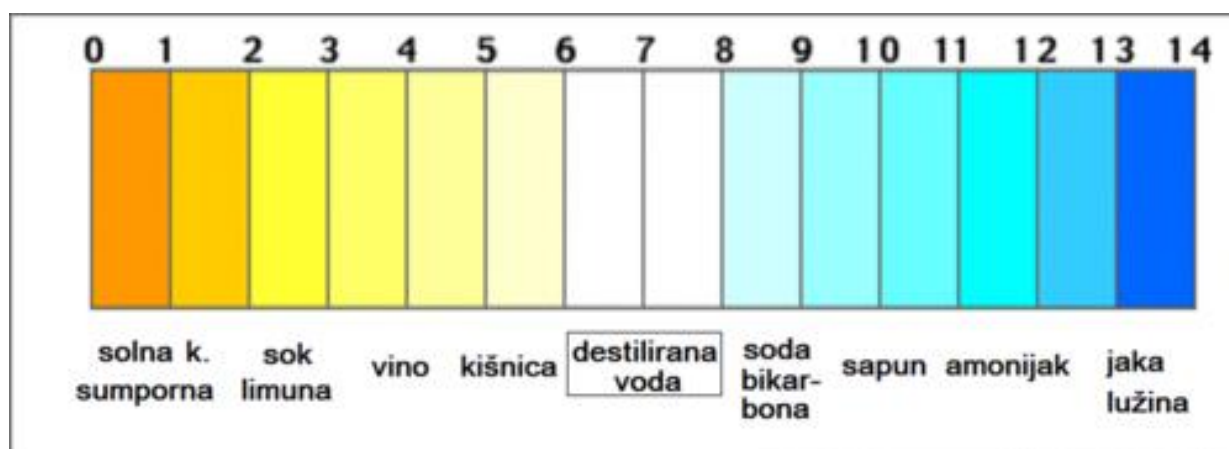
Umnožak koncentracija vodikovih i hidroksidnih iona, prema zakonima kemijske ravnoteže, konstantan je u svim vodenim otopinama:

$$[\text{H}^+] = 10^{-7} \quad [\text{OH}^-] = 10^{-7}$$

dakle: $[\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$ ili $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$

K_w je konstanta za čistu vodu i za sve vodene otopine pri 25 °C i naziva se ionski produkt vode.

Vrijednost pH grubo se određuje pomoću indikatorskih papira (lakmus), koji kod različitih koncentracija vodikovih iona pokazuju različite boje kao što je prikazano na pH skali na slici 4, a mnogo točnije pomoću potenciometrijskog uređaja zvanoga pH-metar. Točno utvrđivanje, poznavanje ili održavanje pH važno je u mnogim prirodnim i tehničkim procesima (enzimske reakcije; tekstilna, prehrambena industrija, agrikultura itd.). Pojam i vrijednosti pH uvedeni su 1909. prema prijedlogu P. L. Sørensen (57).



Slika 4. Prikaz pH skale 0 - 14 označen je različitim bojama koje su standardne. Sedam je neutralan medij, smjer od sedam prema nuli je kiseli medij, a smjer od sedam prema 14 je lužnati medij.

Zbog nesigurnosti o fizičkom značenju koncentracije vodikovih iona, Nacionalni ured za standarde SAD definirao je pH vrijednosti kao *elektromotornu silu* (elektromotorna sila je u elektrotehnici veličina kojom se izražava rad potreban za razdvajanje nositelja električnih naboja u izvoru električne struje, pri čemu sila koja djeluje na električne naboje nije izravna posljedica električnog polja. Definira se kao omjer rada i količine električnog naboja, iz čega slijedi da je mjerna jedinica za elektromotornu silu džul po kulonu, što je jednako voltu:

$[EMS] = 1 \text{ J} / 1 \text{ C} = 1 \text{ V}$ koja postoji između pojedinih standardnih elektroda u otopinama.

1.3.2. pH-metar

pH se obično mjeri pH-metrom prikazanim na slici 5, a pH vrijednost je razlika elektromotorne sile (električni potencijal i napon) između odgovarajućih elektroda smještenih u otopini koja se

ispituje. U osnovi pH-metar je voltmetar spojen na elektrodu, koja reagira na promjene pH, i referentnu (nepromjenjivu) elektrodu.

Na pH osjetljiva elektroda je obično staklo, a referenca je obično živa-živin klorid (kalomel) elektroda. Također se koriste srebro/srebrov klorid elektrode. Kada su dvije elektrode uronjene u otopinu one djeluju kao baterija. Staklena elektroda razvija električni potencijal koji je izravno povezan s aktivnošću vodikovih iona u otopini, a voltmetar mjeri razliku potencijala između stakla i referentne elektrode. Instrument može imati ili digitalni ili analogni prikaz rezultata. Digitalni prikaz ima prednost točnosti očitavanja dok analogna očitavanja daju bolje pokazatelje stope promjena.

Testovi pH mogu se provesti i manje precizno lakmus papirom ili miješanjem indikatorskih boja u tekuće suspenzije i njihovim nanošenjem na papir. Dobivene boje se uspoređuju s kalibriranim grafom boja koje odgovaraju određenom pH (57).



Slika 5. pH-metar

1.3.3. Promjene pH vrijednosti u odnosu na aktivnost osteoblasta i osteoklasta

1.3.3.1. Uvodne napomene

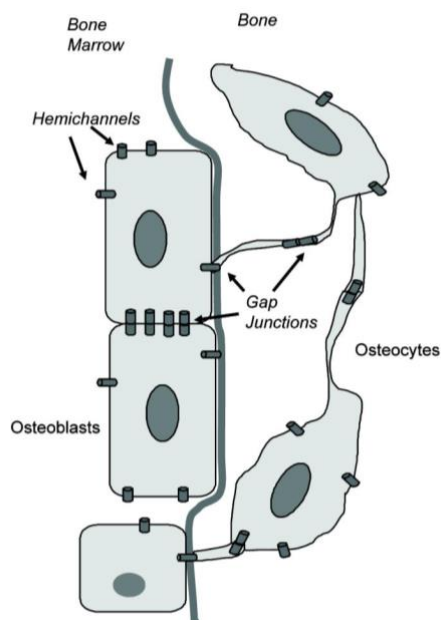
Iako se malo zna o pH vrijednostima intersticijske tekućine kosti, najvjerojatnije je da se isključivo u izvanrednim situacijama ta pH vrijednost intersticijske tekućine kosti dramatično fluktuiraju. Moguće je da, u situacijama niskog protoka krvi kroz kost te niske oksigenacije, kao što je kod starenja i početnog razdoblja cijeljenja kosti, pH vrijednost koja se snižava utječe na aktivnost osteoblasta (69).

Okolišni faktori kao što je protok krvi, nutritivna opskrba i mehanički stres uvelike utječu na aktivnost osteoblasta, stanice koje stvaraju kosti (70, 71, 72, 73). Promjenjivi uvjeti okoliša koji okružuju osteoblaste mogu igrati važnu ulogu u regulaciji tih stanica. Promjene u lokalnom okolišu osteoblasta mogu utjecati na proliferaciju, diferencijaciju i na fenotipsku ekspresiju osteoblasta. Pokazalo se da vanstanični pH mijenja aktivnost pilećih osteoblasta *in vitro* (74).

Fenotipska ekspresija (alkalna fosfataza, sinteza kolagena) se smanjuje smanjenjem pH vrijednosti, dok sadržaj DNK i sinteza ostaje stalna. Kao što je ranije spomenuto, kod određenih stanja (70) može doći do smanjenja opskrbe stanice kostiju te može doći do smanjenja sposobnosti odstranjivanja metabolita otpadnih proizvoda, kao što je mliječna kiselina. Pretpostavlja se da mliječna kiselina uzrokuje smanjenje lokalne pH vrijednosti okoline osteoblasta, koje posljedično smanjuje aktivnost osteoblasta. Uz to, pokazalo se da se smanjuje aktivnost osteoblasta kod metaboličke acidoze, a obrnuto je kod metaboličke alkalozije, kada se aktivnost osteoblasta povećava. Autori u Japanu (75) su dokazali da uvećanje u izvanstaničnoj pH vrijednosti povećava broj propusnih veza koje su se stvorile između osteoblasta. Iz tih studija se može zaključiti da okolišna pH vrijednost može imati značajan regulatorni utjecaj na funkciju/aktivnost osteoblasta (69).

Propusne veze su dokazane u kostima u *in vitro* kulturama stanica, one nastaju između osteoblasta, osteoblasta i osteocita, te među osteocitima i stvaraju se putem kanalikularnih procesa (slika 6). Iako njihova funkcija u kostima nije za sada poznata, pretpostavlja se da bi mogle imati sljedeće funkcije: 1. koordinacija osteoblasta u „epitel“ za sekreciju i mineralizaciju proteinskog koštanog matriksa, 2. regulacija proliferacije osteoblasta putem prolaza, još uvijek nepoznatih faktora, iz stanice u stanicu, 3. propagacija signala stanica koje su započete lokalnim rastom i faktorima diferencijacije ili fizičkim stimulansom u određenoj lokaciji na udaljenim lokacijama kako bi se „regrutirale“ druge stanice koje su međusobno povezane,

4. služiti kao medij fizičkog kontakta između heterolognih vrsta stanica u kosti gdje može doći do „križnog-razgovora“ između heterolognih stanica tako da jedna vrsta stanica može regulirati funkciju druge stanične vrste putem citoplazmatske izmjene malih biokemijskih glasnika (76).



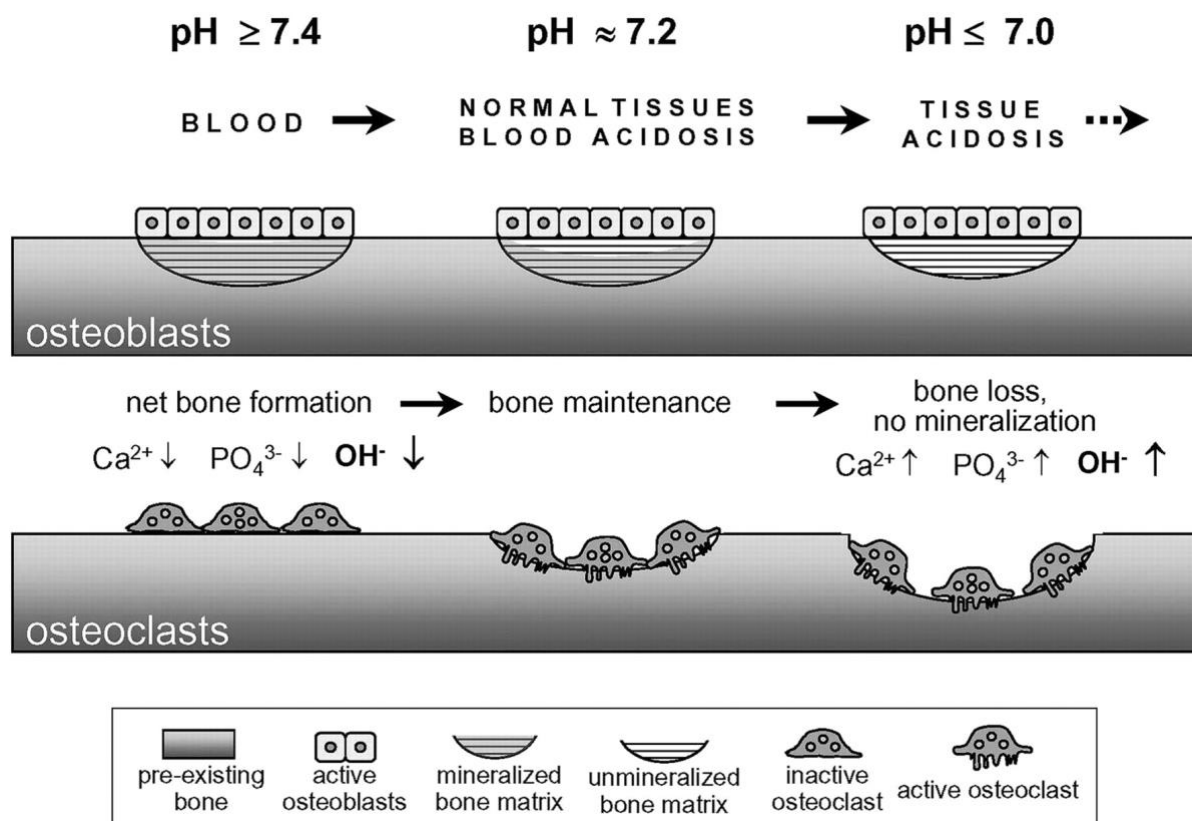
Slika 6. Prikaz veza (kanalikularnih procesa) između osteoblasta, osteoblasta i osteocita te među osteocitima (77).

1.3.3.2. Utjecaj osteoblasta na pH

Osteoblasti igraju važnu ulogu u koštanom cijeljenju, ekstremni mikro uvjeti u području prijeloma ili osteotomije imaju negativan utjecaj na osteoblaste koji su zaštićeni autofagijom ne bi li se zadržala stanična homeostaza. Autofagija može nastati kao rezultat lokalne ishemije ili oksidativnog stresa i hipoksije te nije sasvim jasno potiče li kisela pH vrijednost autofagiju kako je pokazala jedna *in vitro* studija, no ono što se zna jest da zasigurno nastaje niska pH vrijednost na mjestu prijeloma ili osteotomije (78).

Prekid opskrbe krvlju je ključni faktor kod nastajanja acidoze tkiva te se ova pojava može vidjeti primjerice u tumoru, kod dijabetesa, rana i prijeloma te je udružena s hipoksijom. Stanice kostiju imaju recipročni odgovor na količinu kisika te tako kod izražene hipoksije ($PO_2 < 1\%$), znatno se povećava

stvaranje osteoklasta kao i resorpcija kosti, a rast osteoblasta i njihova diferencijacija kao i stvaranje kolagena su potisnuti (79).



Slika 7. Sažetak utjecaja vanstaničnog pH na stvaranje i resorpciju kosti. Mineralizacija matriksa je znatno inhibirana utjecajem acidoze te se ona ne događa u uvjetima pH manjeg od 7.0. S druge strane, osteoklasti su neaktivni ili znatno manje aktivni u uvjetima pH vrijednost 7.4, ali se oni aktiviraju stvarajući resorpcijske jamice kada pH vrijednost opada prema 7.0. Na taj način, alkani koštani mineral koji sadrži u najvećoj mjeri Ca^{2+} , $\text{PO}_3\text{--}4\text{PO}_4^{3-}$, i OH^- ione deponira se u kostima u uvjetima kada je pH iznad 7,2, a kada je pH vrijednost manja, tada se koštani mineral mobilizira (tj. otapa se) kako bi otpustao OH^- ione u vanstaničnoj tekućini i krvotoku ne bi li se ispravila sistemska acidoza (preuzeto od Arnett (80)).

Uobičajena pH vrijednost tjelesnog medija je gotovo neutralna sa srednjom vrijednošću od 7,4 (78) kao što je prikazano na slici 7, uz to je prikazan utjecaj vanstaničnog pH na stvaranje i resorpciju kosti. Na mjestu ozljede (bilo zbog traume kod prijeloma ili u kirurški izazvanih uvjeta; primjerice kod osteotomije) pH vrijednost prelazi na kiselije vrijednosti sve do 4,0, naročito kod hematoma (79). Nastavno na utjecaj pH vrijednosti i otpuštanje iona, treba istaknuti da od svih komponenti iona u

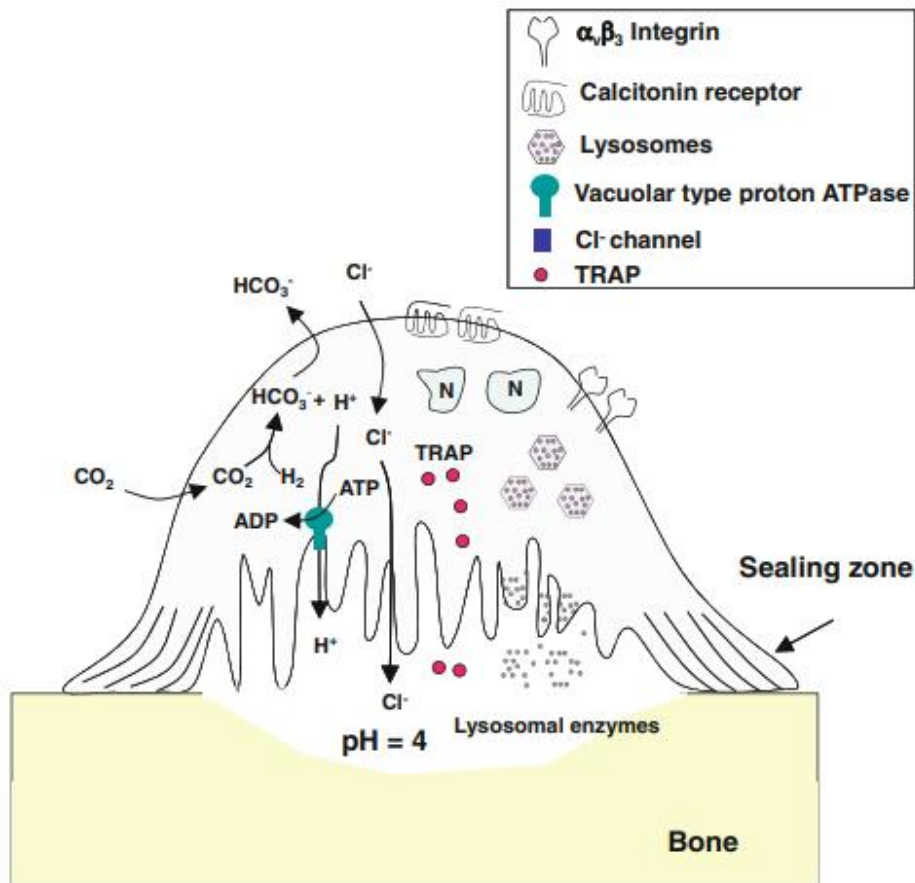
krvnoj plazmi i intersticijskog medija, kloridni ioni su najčešće najagresivniji prema metalnim implantatima te postoje brojne korozijske promjene izazvane kloridom koje su opisane da utječu na nehrđajući čelik; jamičasta, intergranularna korozija i korozija procijepa (80).

1.3.3.3. Utjecaj osteoklasta na pH

Osteoklasti se krajnje diferenciraju u stanice s više jezgara koje su osnova, ako ne i isključivo, resorptivne stanice kosti koje igraju ključnu ulogu u stvaranju skeleta, kao i reguliranju njegove mase (81, 82, 83).

Osteoklasti su načelno odgovorni za degradaciju mineraliziranog matriksa tijekom fiziološke i patološke izmjene kosti. Resorpcija kosti putem osteoklasta obuhvaća kompleksan proces kako slijedi (slika 8):

1. proliferacija progenitora osteoklasta
2. diferencijacija progenitora u mononuklearnim perfuzijskim osteoklastima (engl. *Perfusion osteoclasts: pOCs*)
3. fuzija pOC-ova u osteoklaste s više jezgara
4. prijanjanje osteoklasta kalcificiranom tkivu
5. polarizacija; razvoj nabrane granice i čiste zone (aktinski prsten), iza koje slijedi izlučivanje kiselina i enzima lizozima u prostor ispod nabrane granice
6. apoptoza.



Slika 8. Shema aktivnog osteoklasta kako je gore opisano. Osteoklast je visoko polarizirana višejezgrasta stanica koja razvija nabrani rub te jasnu zonu (aktinski prsten), nakon čega slijedi izlučivanje kiseline, tartarat-rezistentnima kisele fosfataze (TRAP) i lizosomskih enzima u prostoru podno nabranog ruba (84).

Proces cijeljenja (reparacije) tkiva kao što je cijeljenje rana i lomova kostiju uključuje složenu no vrlo dobro reguliranu kaskadu događaja. Tijek kiselosti kod cijeljenja rana, tj. pH vrijednost unutar rana i lomova mijenja se iz kiselog u neutralni, potom u alkalni pH kako napreduje proces cijeljenja. Naime, lokalni medij je kiseli tijekom početne faze cijeljenja. Ovdje trombociti izlučuju tvari koje sudjeluju u poticanju proliferacije mezenhimalnih stanica, kasnije medij postaje više neutralan, i konačno alkaličan, a to rezultira u oslobađanju drugih tvari trombocita koje kataliziraju diferencirana zbijanja osteoblasta koja su više diferencirana poput ekspresije ALP-a (56, 85).

1.4. Nehrđajući čelik 316L

1.4.1. Uvodne i povijesne napomene

Čelik je legura željeza s ugljikom (do 2,1%). Gotovo sva količina proizvedenog sirovog željeza iz visoke peći prerađuje se u čelik, jer su njegova mehanička svojstva mnogo bolja od svojstva željeza. Odlikuje se velikom čvrstoćom, tvrdoćom, žilavošću, otpornošću prema koroziji i toplini, magnetskom propusnošću, mogućnošću lijevanja i mehaničke obrade te velikom elastičnošću. Svojstva čelika mogu se mijenjati legiranjem, toplinskom obradom (npr. kaljenjem i žarenjem), površinskom obradom, hladnim oblikovanjem ili nanošenjem prevlake pa se tako mogu prilagoditi svakoj vrsti primjene. Čelik se dobiva oksidacijskim pročišćavanjem sirovog željeza koje sadrži 3,5 do 4% ugljika te redovito silicij (0,2 do 0,4%), mangan (0,3 do 0,5%), fosfor (do 0,1%) i sumpor (do 0,03%).

Nehrđajući čelik ili korozijski postojan čelik je legura željeza i najmanje 10,5% kroma (do 30%), koji mu upravo daje to najvažnije svojstvo otpornosti na koroziju. Uz to, sastoji se od brojnih drugih legiranih elemenata koji su detaljnije pojašnjeni u daljnjem tekstu.

Nehrđajući čelik se koristi u koštano-zglobnoj kirurgiji od početka 20. stoljeća zbog svojih pogodnih biomehaničkih i biokompatibilnih svojstava. Bez obzira na uvođenje novih implantata izrađenih od titanskih legura šezdesetih godina, i dalje je nehrđajući čelik najučestaliji na tržištu u ortopediji i traumatologiji.

Do sada, nehrđajući čelik je materijal koji je najčešće korišten u sektoru medicinskih implantata, a naročito u proizvodnji ortopedskih implantata i drugih biomedicinskih uređaja, uključujući pločice kod prijeloma kostiju, u stomatologiji i slično. Smatra se da zahvaljujući prisutnosti kroma i molibdena u njemu, ima izvrsnu biokompatibilnost, mehanička svojstva i otpornost jamičastoj koroziji te koroziji u procijepu (78, 82, 83).

Unatoč tomu, postoji nepodudarnost Youngovog modula (modul elastičnosti) čelika s onim od ljudske kosti (79). Youngov modul čelika iznosi ~193 GPa, u usporedbi s onim ljudske kosti koji iznosi 10 - 30 GPa te ga time čini podložnim oštećenju (engl. *Stress shielding*), također je podložna oštećenju zbog slabog vezivanja između implantata i okolnog tkiva (84). Iz ovog razloga posljednjih godina teži se proizvodnji visoko poroznih implantata kontrolirane gustoće kako bi se čvrstoća implantata izrađenog od nehrđajućeg čelika približila čvrstoći ljudske kosti (37). Nadalje, porozni implantat pruža

dobru biološku okolinu jer dopušta učinkoviti prolazak tjelesnih tekućina ili lijekove kroz poroznu mrežu, i time omogućuje rast tjelesnom tkivu. Na taj način se opskrbljuje izvanredna veza između površina implantata i prirodne kosti te tako potiče oseointegraciju (80, 86).

1.4.2. Vrste i sastav nehrđajućeg čelika 316L

1.4.2.1. Vrste nehrđajućeg čelika

Postoje brojne vrste nehrđajućeg čelika koji se označuju brojevima koje predstavljaju tzv. gradaciju (gradira se po serijama; 200, 300, 400, 500 i 600), općenito najčešće korištena je 304 na prvom mjestu a potom 316 koji se jedini koristi za proizvodnju osteosintetskih implantata. Oznaci se također dodaju slova koja predstavljaju određene specifičnosti pojedinačnih skupina gradacija, kao što je primjerice količina ugljika; niska L (eng. *Low*) kao što je u slučaju materijala ove disertacije, 316L (87).

Nehrđajući čelik se općenito može klasificirati u četiri glavne različite vrste ovisno o njegovoj kristalnoj strukturi (87):

- austenitni
- feritni
- austenitno-feritni (dupleks) nehrđajući čelici
- martenzitni.

Svaka od tih vrsta ima različitu metaluršku fazu koja utječe na njihova mehanička i korozivna svojstva. **Austenitni** nehrđajući čelici (u ovu vrstu spada nehrđajući čelik 316L) su čvrsta otopina ugljika i katkada drugih tvari u željezu koja nastaje kao sastavni dio čelika pod određenim uvjetima. Austenitni nehrđajući čelici mogu se podijeliti na skupinu s kromom i niklom u koju spada 316L (serija 300), s mangan-krom-nikal-dušikom (serija 200) i skupine specijalnih legura prema specifičnim količinama legiranih elemenata.

Feritni nehrđajući čelici. Ferit je faza koja prevladava u mikrostrukturi ovih čelika i po tome su i dobili ime. Feritna mikrostruktura određuje mehanička i neka druga svojstva. Osnovna karakteristika ovih čelika je njihova osobita otpornost na napetosnu i jamičastu koroziju te koroziju u procijepu (osobito u medijima koji sadrže kloride). Feritni čelici sadrže 12 - 17% Cr i < 0,1% C uz dodatak određenih

drugih legirnih elemenata (Mo, Si, Al, Ti ili Nb). Kod ovih čelika udio austenitizirajućih elemenata (C, N i Ni) vrlo je malen.

Austenitno-feritni (dupleks) nehrđajući čelici dobili su ime po svojoj mikrostrukturi koja se sastoji od ferita i austenita u podjednakim volumnim udjelima (50:50). Nisu bili u široj primjeni do osamdesetih godina 20. stoljeća zbog problema sa zavarivanjem, korozijskom postojanošću i krhkošću, nakon čega su tek doživjeli širu primjenu kada su im navedeni nedostaci uklonjeni, uglavnom dodavanjem dušika. Osim dušika, važni legirni elementi su molibden, volfram i bakar. Molibden, volfram i bakar dodaju se uglavnom zbog povišenja korozijske postojanosti. Dupleks čelici se primjenjuju na mnogim mjestima izvan bioloških medija zbog izvrsne korozijske postojanosti i vrlo dobrih mehaničkih svojstva. Zbog visokog udjela ferita oni su feromagnetični, imaju višu toplinsku vodljivost i nižu toplinsku rastezljivost od austenitnih čelika. Na mjestima gdje se traži visoka otpornost na napetosnu i jamičastu koroziju, bolji su izbor od austenitnih čelika. Od dupleks čelika se izrađuju konstrukcije koje su izložene koroziji jer posjeduju izvanrednu kombinaciju korozijske postojanosti i mehaničkih svojstava.

Martenzitni nehrđajući čelici su legure temeljene na trojnom sustavu Fe-Cr-C. Martenzitni nehrđajući čelici, zbog potrebe zakaljivanja, imaju povišeni udio C (0,20 – 1,0%) te u pravilu iznad 13% Cr (do 18%). Mogu sadržavati i do 1,3% Mo i 2,5% Ni. Kod ovih čelika martenzitna mikrostruktura postiže se alotropskom modifikacijom austenita. Mikrostruktura se sastoji od ferita i karbida. Feromagnetični su, optimalna svojstva i korozijska postojanost postiže se kaljenjem na zraku ili u ulju naknadnim popuštanjem. Martenzitni čelici kristaliziraju iz taline u delta ferit, a zatim pri hlađenju prelaze u austenit koji daljnjim hlađenjem prelazi u martenzit.

1.4.2.2. Osnovni legirni elementi

Poznato je da ni jedna skupina materijala ne može legiranjem toliko mijenjati svojstva kao čelik. Čeliku se dodaju određeni elementi kako bi se postiglo željeno svojstvo ili kombinacija svojstava gotovog proizvoda. Najčešći legirajući elementi prisutni u čelicima su *krom, nikal, mangan, silicij, volfram, vanadij i molibden*. U određenim slučajevima čelik se može legirati kobaltom, titanom, aluminijem, niobijem i drugim legirajućim elementima, a oni se u čeliku javljaju u sljedećim oblicima: otopljeni u α -željezu ili γ -željezu, kao spojevi (karbidi, intermetalni spojevi), ili kao nemetalni uključci (oksidi, nitridi, sulfidi, fosfidi).

Ugljik je sastavni dio čelika (maksimalno 2%) i za njega se ne smatra da je legirni element iako ima najveći utjecaj na svojstva čelika. Porastom udjela ugljika u čeliku raste čvrstoća i granica razvlačenja, a smanjuje se duktilnost i žilavost. Ugljik ima važan utjecaj u osiguravanju zakaljivosti nelegiranih i legiranih čelika. Zakaljivost čelika predstavlja mogućnost kaljenja. Kod nelegiranih čelika uvjet je da je sadržaj ugljika veći od 0,25%. Uglavnom je sadržaj ugljika nizak osim kod martenzitnih čelika gdje viši udio ugljika omogućuje toplinsku obradu. Ugljik ima utjecaj na smanjenje otpornosti na koroziju kada se ugljik veže s kromom i stvara karbide, čime se osiromašuje površinski sloj slobodnim atomima kroma te se onemogućava stvaranje dovoljne količine otpornog površinskog sloja krom oksida.

Krom omogućava kaljenje čelika u ulju (čak i na zraku) budući da povisuje prokaljivost čelika i snižava temperaturu početka stvaranja martenzita (M_s). Zbog afiniteta prema ugljiku, krom lako stvara karbide pa se često dodaje čelicima za izradu reznih alata. Karbidi kroma povećavaju otpornost na trošenje čime se povećava izdržljivost i trajnost oštrice proizvedenog alata. Dodatkom kroma kao elementa legiranja, povisuje se toplinska čvrstoća, vatrootpornost i otpornost na djelovanje komprimiranog vodika. Nužni uvjet za korozijsku postojanost čelika pri sobnoj temperaturi je legiranje s minimalno 12% kroma. Ukoliko se uz krom (tvorac ferita) ne dodaju elementi koji proširuju područje austenita (npr. Ni, Mn), nisko-ugljični čelik s 15% Cr posjedovat će postojanu feritnu mikrostrukturu. Legiranje kromom utječe na sklonost pojavi krhkosti nakon popuštanja, ali se to može izbjeći dodatnim legiranjem s molibdenom.

Nikal kao legirni element proširuje područje austenita te zbog vrlo slabog afiniteta prema ugljiku ne stvara karbide. Legiranjem s niklom može se povećati žilavost konstrukcijskih čelika kao i korozijska postojanost (uz minimalni dodatak 12% kroma). Dakle, nikal je zaslužan za stvaranje austenitne strukture koja omogućuje povišenu čvrstoću, duktilnost čak i na vrlo niskim temperaturama. Također daje materijalu nemagnetičnost. Zbog ekonomskih razloga (visoka cijena) nikal se gotovo uvijek legira u kombinaciji s drugim legirajućim elementima.

Molibden. Legiranjem s molibdenom (najčešće u kombinaciji s ostalim legirnim elementima) povećava se prokaljivost i čvrstoća čelika, a sprječava pojava visoko-temperature krhkosti popuštanja. Iz tog razloga, konstrukcijski čelici sadrže od 0,2 do 5% molibdena. Molibden je tvorac karbida, pa tako utječe na sitnozrnatost čelika i na otpornost na trošenje (npr. brzorezni čelici). U kombinaciji s kromom, molibden povećava otpornost čelika prema općoj i jamičastoj koroziji.

Mangan se najčešće koristi kao dezoksidator i desulfizator tijekom proizvodnje čelika. Zbog velikog afiniteta prema sumporu, mangan stvara sulfid (MnS) čime se sprječava negativno djelovanje sulfida (FeS). Legiranjem s manganom povećava se prokaljivost čelika u odnosu na ugljične čelike, a u nezakaljenim čelicima se poboljšava čvrstoća i žilavost. Dodatak svakih 1% mangana može dovesti do povećanja granice razvlačenja konstrukcijskih čelika za oko 100 N/mm². Čelici poprimaju austenitnu mikrostrukturu, neovisno o sadržaju ugljika, ukoliko je sadržaj mangana veći od 12%. Sulfidni uključak (MnS) u čeliku s 0,35% ugljika su najčešći uključci čelika (80).

Silicij se često koristi kao sredstvo za dezoksidaciju te kao legirni element koji povećava čvrstoću, otpornost prema trošenju i granicu razvlačenja (npr. čelici za izradu opruga). Budući da silicij izrazito povećava otpornost prema djelovanju topline, neizbježan je legirni element koji se dodaje čelicima otpornima na vatru (do 2,5%).

Titan zbog svog izraženog afiniteta prema kisiku, dušiku, sumporu i ugljiku djeluje izrazito dezoksidirajuće, denitrirajuće i desulfizirajuće. Vezanjem s ugljikom, titan stvara vrlo stabilan karbid (TiC) pa se zajedno s niobijem i tantalom primjenjuje za stabilizaciju nehrđajućih čelika. Ukoliko se nalazi u većim udjelima, može djelovati na precipitacijsko očvršćivanje stvaranjem intermetalnih spojeva Ni₃Ti ili Ni₃(Ti, Al). Titan sprječava interkristalnu koroziju u zoni zavara kod feritnih čelika.

Vanadij: Dodatkom vanadija kao legirnog elementa može se postići usitnjavanje primarnog austenitnog zrna. Budući da je vanadij jaki karbidotvorac i nitrotvorac, u udjelima iznad 0,4% povećava otpornost na trošenje stvaranjem stabilnog VC ili V₄C₃ karbida.

Volfram kao legirni element pripada skupini karbidotvoraca. Legiranjem čelika s volframom sprječava se rast zrna, a time posredno utječe i na povećanje žilavosti čelika.

Niobij i tantal zbog identičnog djelovanja na svojstva dolaze gotovo uvijek zajedno kao legirni elementi u čeliku. Budući da su izrazito jaki karbidotvorci, uglavnom se primjenjuju za stabilizaciju čelika postojanih na djelovanje kiselina. Niobij pored karbida može stvarati nitrde i karbido-nitrde, potpomagati nastanak sitnijeg zrna u čeliku i olakšavati precipitacijsko očvršćivanje. Kao legirni element, niobij se dodaje sa ili bez dodatka vanadija u zavarljive sitnozrnate čelike povišene granice razvlačenja i čvrstoće (eng. *HSLA* čelici) te u neke ultra čvrste PH-čelike.

Olovo se koristi kao legirni element kod čelika za obradu odvajanjem čestica na automatima jer pozitivno utječe na lomljenje strugotine i postizanje čiste obrađene površine. Olovo je netopivo u čeliku te ne utječe na mehanička svojstva čelika.

Kobalt ne stvara karbide, ali utječe na sprječavanje rasta zrna pri visokim temperaturama. Poboljšava vlačnu čvrstoću i postojanost na popuštanje pri povišenim temperaturama.

Bor u nehrđajućim austenitnim čelicima omogućava precipitacijsko očvršćivanje (povišenje granice razvlačenja i vlačne čvrstoće), ali i snižava otpornost prema općoj koroziji. Dodatkom bora se s jedne strane poboljšava prokaljivost nisko i srednje ugljičnih čelika, ali se s druge strane pogoršava njihova zavarljivost.

Aluminij se najčešće koristi kao sredstvo za dezoksidaciju. Dodatkom aluminija čelik postaje manje osjetljiv prema starenju te se potpomaže stvaranje sitnijeg zrna. Sposobnošću stvaranja nitrida, aluminij predstavlja vrlo važan legirajući element za nitriranje (stvara spojeve AlN). Također, reakcijom aluminija s niklom ili titanom mogu nastati intermetalni spojevi (Ni₃Al i Ni₃Ti). Aluminij se dodaje nehrđajućim čelicima kojima izlučeni precipitati povisuju čvrstoću i tvrdoću. Aluminij je snažan feritotvorac te se dodaje nekim feritnim čelicima s niskim udjelom kroma da im povisi otpornost na opću koroziju.

Bakar se rjeđe koristi kao legirni element jer se pri visokim temperaturama nakuplja ispod površinskog sloja ogorine te uzrokuje površinsku osjetljivost tijekom kovanja ili valjanja (tzv. crveni lom). Dodatkom bakra može se povećati omjer granica razvlačenja/vlačna čvrstoća, a ukoliko ga ima iznad 0,4%, tada omogućava precipitacijsko očvršćivanje. Bakar može pozitivno djelovati na postojanost prema djelovanju različitih kiselina ukoliko mu sadržaj ne prelazi 1% (npr. visokolegirani čelici otporni na kiseline).

Ostali legirni elementi; Dušik: u većini slučajeva predstavlja nepoželjni element (nečistoća), ali se ponekad dodaje i kao legirni element. Već 0,01% dušika povisuje granicu razvlačenja i čvrstoću, ali smanjuje deformabilnost (sposobnost materijala da se deformira bez loma) i žilavost čelika. Brzim hlađenjem dušik može ostati zarobljen u rešetci željeza. U nelegiranim i niskolegiranim čelicima nije poželjan jer povećava sklonost takvih čelika prema starenju, posebno kod hladno deformiranih čelika (deformacijsko starenje). Pojava starenja rezultira porastom čvrstoće i smanjenjem žilavosti. Ukoliko se uz dušik dodaju elementi koji imaju veći afinitet prema dušiku od željeza (npr. aluminij, titan,

niobij), dolazi do povlačenja dušika iz čvrste otopine u nitride, a čelik postaje otporan na starenje. U slučaju austenitnih nehrđajućih čelika dušik predstavlja legirni element, jer kao intersticijski element znatno povećava granicu razvlačenja te proširuje područje austenita. Legiranjem dušikom može se zamijeniti dodatak određene količine vrlo skupog nikla. Dušik se kao legirajući element najčešće dodaje u količini do ~ 0,25%.

Cirkonij je izrazito djelotvoran za dezoksidaciju i odsumporavanje. Sulfidi cirkonija su još manje štetni od sulfida mangana. Cirkonij kao karbidotvorac utječe na usitnjenje zrna pa se dodaje u niskolegirane sitnozrnate čelike namijenjene poboljšanju (87).

1.4.2.3. Sastav i svojstva nehrđajućeg čelika 316L

Kemijski sastav i razlika u razini ugljika kod nehrđajućeg čelika 316L prikazani su u **tablici 1**, a mehanička svojstva s obzirom na razinu ugljika prikazana su u **tablici 2**.

Tablica 1. Kemijski sastav i razlika u razini ugljika (87)

	AISI 316 (1.4401)	AISI 316L (1.4404)
Cr (krom)	16,5 – 18,5 %	16,5 – 18,5 %
Ni (nikl)	10 - 13 %	10 - 13 %
Mn (mangan)	<= 2 %	<= 2 %
Mo (molibden)	2 – 2,5 %	2 – 2,5 %
Si (silicij)	<= 1 %	<= 1 %
N (dušik)	0,11 %	0,11 %
P (fosfor)	0,045 %	0,045 %
C (ugljik)	<= 0,07 %	<= 0,03 %
S (sumpor)	0,03 %	0,02 %

Tablica 2. Svojstva (mjerena na 20 °C) i razlika u odnosu na razinu ugljika (87)

	AISI 316 (1.4401)	AISI 316L (1.4404)
Gustoća	8 g/cm ³	8 g/cm ³
Modul elastičnosti	193 GPa	193 GPa
Tvrdoća, Brinell	215 Max HB (Hardness Brinell)	215 Max HB
Vlačna čvrstoća	500 - 700 MPa	520 - 680 MPa
Čvrstoća popuštanja	200 MPa	220 Mpa
Toplinska vodljivost	16,3 W/(m·K)	16,3 W/(m·K)
Talište	1400 °C	1400 °C

1.4.3. Pasivizirajući sloj

1.4.3.1. Uvodne napomene

Pasivnost metala je stanje u koje mogu privremeno prijeći neki neplemeniti metali (npr. željezo, krom, nikal, titan, aluminij i mnogi drugi metali) pri čemu postaju kemijski otporni poput plemenitih metala. Za razliku od aktivnog stanja, pasivno stanje karakteriziraju pozitivniji potencijali bliski potencijalima plemenitih metala. U dodiru s oksidacijskim sredstvima potencijal željeza poprima u kratkom vremenu visoko pozitivne vrijednosti, koje ima i platina u istoj otopini i ponaša se kao tipičan plemenit metal tj. otapa se u kiselini. Općenito, pasivnim se naziva oksidiran metal koji ne ulazi u kemijsku reakciju s okolinom.

1.4.3.2. Tehnike pasivizacije

Tijekom akcija rukovanja i procesuiranja kao što je strojna obrada, oblikovanje, prevrtanje i omotavanje, čestice željeza, metal alata ili nečistoće okoline prostorije u kojem se nalaze, mogu se ugraditi ili razmazati po površini dijelova nehrđajućeg čelika. Takove nečistoće mogu umanjiti učinak

pasivizirajućeg sloja odnosno filma oksida koji se stvara na površini nehrđajućeg čelika izloženog kisiku.

Ukoliko se te čestice ne uklone, one mogu korodirati i stvoriti fleke poput hrđe na nehrđajućem čeliku. U svrhu prevencije ovih pojava, poludovršeni ili dovršeni dijelovi se obrađuju, a obrada se sastoji od čišćenja potom uranjanja dijelova nehrđajućeg čelika u otopine HNO₃ ili HNO₃ plus oksidirajuće soli. Kisela otopina otapa ugrađene ili razmazane čestice željeza, te tako vraća originalnu kemijski postojeću površinu i maksimalizira inherentnu korozivnu rezistenciju.

Postoje dva pristupa u kojima se koristi tehnika implantacije iona (engl. *Ion implantation*) kako bi se povećala otpornost na koroziju supstrata; *prva* je da se potaknu karakteristike pasivizacije, a *druga* je da se stvori novi materijal. U prvom pristupu, implantacija iona stvara površinu sastava koji je osnovan na konvencionalnoj metalurškoj praksi, a ta površina reagira s okolinom kako bi stvorila pasivni sloj. U drugom pristupu, implantacija iona stvara površinu sastava i strukturu koju je teško, nemoguće ili nepraktično postići principima konvencionalne metalurgije.

Dva ključna problema u primjenjivanju metoda implantacija iona u svrhu stvaranja jest izrada površine koje su otporne na koroziju (engl. *corrosion-resistant surfaces*) koja ima dovoljno nisku stopu korozije koja bi mogla prevenirati penetraciju kroz pasivni sloj u osnovni materijal tijekom predodređenog vijeka života predmeta te proizvodnju površine koja se sama popravljiva tj. samoreparirajuća površina. Prvi problem se može pristupiti na način da se uvedu elementi koji bi potaknuli korozivnu otpornost/rezistenciju kao što je to u konvencionalnoj metalurgiji, primjerice krom ili molibden u metala željeza (36, 42).

Može se također pristupiti problemu na način da se stvori kombinacija elemenata u slojevima površine koje nije moguće proizvesti metodama konvencionalne metalurgije, primjerice tantal u željezu (41) ili fosfor u legurama željeza i kroma (43). Tantal sa željezom stvara spojeve unutar metala, no konvencionalne legure koje su na tržištu nemaju dovoljno visoki sastav tantala. Ostali primjeri su amorfnih slojevi koji su kemijski otporni, proizvedeni primjerice na željezo-krom s implantiranim fosforom, ugljikom, silicijem ili borom. Kod takvih materijala nastaje spontana pasivizacija u 25% otopini klorovodične kiseline (HCl) (43).

Drugom problemu se pristupa na način da se uvode elementi koji nisu topivi u okolnom mediju, ili se ne odstrane spontano okolišem, primjerice paladij u titanu; pasivizacija titana je znatno potaknuta

paladijem te može biti u leguri s njim kako bi se osigurala dugotrajna samopasivirajuća svojstva u kiselom mediju. Unatoč tomu, paladij je potreban samo na površini kao katalizator za reakciju redukcije vodika te nije dostupan za otapanje. Čini se kako bi troškovi bili znatno veći ukoliko bi se implantacijom modificirala površina umjesto korištenja paladija u cijelom volumenu legure. Pasivizacija titana potpomognuta paladijem je učinak koji se uporno istražuje (88) te se veliki naponi ulažu kako bi se moglo učinkovito implantirati ione za poticanje otpornosti prema koroziji (21, 38, 44, 57, 76, 86, 89). Najveći izazov leži u debljini implantiranog sloja; slojevi otporni na koroziju ne smiju biti u potpunosti istrošeni ili oštećeni. Mnogo istraživačkih napora se ulaže u mimikriji sastojaka konvencionalnih legura, iako je stopa korozije kod sustava konvencionalnih legura prevelika u usporedbi s debljinom implantiranog sloja. Najučinkovitiji pristupi su obuhvaćali detaljno znanje određenog materijala i korozijskih uvjeta okoliša, ili su stvorili nekonvencionalne materijale (90).

Nadalje, tehnologija selektivnog otapanja laserom (engl. *Selective Laser Melting*; SLM) je privukla značajan interes (36, 42) zbog brze proizvodnje pojedinih dijelova te zbog mogućnosti proizvodnje više kompleksnih dijelova/sastojaka bez skupocjenih instrumentacija i strojeva (41). Očekuje se da SLM postane jedan od najpoznatijih procesa proizvodnje u izradi bioloških dijelova (89).

1.5. Jamičasta korozija

1.5.1. Uvodne napomene

Zbog ionske provodljivosti okoline, nastaje korozija kao elektrokemijska reakcija te na nju značajno utječu faktori kao što su potencijal elektrode i kiselost otopine. Ovisno o zakonima termodinamike, odlučuje se pod kojim uvjetima reakcije budu u elektrokemijskom ekvilibrijumu, postoji li pomak od točke ekvilibrijuma, u kojim smjerovima reakcije mogu propagirati te koliko su jake vodeće snage (90).

Nukleacija jamice odnosno sama inicijacija jamice (lokalno otapanje metala, engl. *dissolution*) nastaje po modelima koji se mogu podijeliti u tri osnovne skupine. U prvoj skupini modela, pretpostavlja se da nastaje penetracija kloridnih iona bez uništavanja zaštitnog/pasivnog filma prije no nastane nukleacija same jamice, a otapanje metala nastaje kada kloridni ioni dosegnu sam metal. U drugoj skupini modela, pretpostavlja se da prije no nastane nukleus jamice koja se smatra inicijacijom jamice, nastane „mehanički“ lom pasivizirajućeg filma. Konačno, pretpostavlja se da u trećoj skupini modela nastaje lokalno stanjivanje pasivnog filma koji dovodi do potpune izloženosti metala. Dakako, postoje više mehanizama inicijacije jamice koji se ne mogu uvrstiti u gore opisane skupine.

Kao što je već poznato, pasivni film je poluvodič, prema tome neizbježno je proučavati pasivne filmove te procese koji nastaju na njima i unutar samog filma, također je potrebno proučavati poluvodička svojstva filma. Pokazalo se da se pasivni film mnogih legura sastoji od dva sloja; tako je pasivni film kod nehrđajućeg čelika sastavljen od unutarnjeg sloja *p*-tip (*p* predstavlja pozitivni naboj u tzv. *elektronskim rupama*, tj. u praznom mjestu elektrona), i vanjskog sloja *n*-tip (*n* predstavlja negativne elektrone budući da većina nosača naboja u kristalu su negativni elektroni) sloja. *n-p* spoj kontrolira elektronsku strukturu pasivnog filma. Kod polarizacije anode, razvija se naboj u potrošenom prostoru u *n*-tip dijelu filma te nastane akumulacija naboja u prostoru *p*-tipa dijelu filma (57).

U slučaju pojedinog pasivnog filma na metalu, kao što je primjerice slučaj kod željeza, spoj metal – pasivni sloj (poluvodič) stvara se s područjem barijere (područje iscrpljivanja) na mjestu doticanja ova dva sloja. Povezanost između svojstava poluvodiča pasivnog filma i jamičaste korozije je nedavno dokazana, naime prosvjetljavanje (fluoroskopija) obično utječe na jamičastu koroziju te ima inhibicijski efekt, otpornost jamičastoj koroziji se povećava s povećanjem energetske razmaka pojasa (engl. *Band gap*: najmanja količina energije potrebna da elektron oslobodi svoje veze), tako se stvaraju

meta-stabilne jamice iznad potencijala ravnih pojasa (potencijal poluvodiča kod kojeg nema *p-n*-spoja ili nema sloja osiromašenja na spoju između poluvodiča i elektrolita). Iz navedenog se može pretpostaviti da poluvodička svojstva utječu na stvaranje pasivnog filma.

Autori *Schmuki i Bohni* (86, 89) su odredili svojstva poluvodiča - filma oksida za tri komercijalna čelika poznata za svoju podložnost jamičastoj koroziji. Ta podložnost se procjenjivala prema događajima metastabilnih jamica u otopini natrij – klorida te se uočilo da sve što je veći razmak pojasa, bolja su bila svojstva protiv korozije. Jasno je da elektronska svojstva pasivnog filma utječu na jamičastu koroziju te što je veća otpornost jamičastoj koroziji, to je manja vjerojatnost postojanja lokaliziranih stanja smještena u dubljem razmaku pojasa. Iz toga se može zaključiti da je distribucija tzv. lokaliziranih stanja diskretnija u slučajevima filma visokog otpora na jamičastu koroziju.

Potrebno je naglasiti kako je mala vjerojatnost da je elektronska struktura pasivnog filma jednolika te se može očekivati da je vrijednost razmaka pojasa na različitim lokacijama pasivnog filma također nejednaka/različita. Neke nečistoće, inkluzije, precipitacije druge faze te ostale nehomogenosti mogu imati niži razmak pojasa, a kao rezultat toga, potreban bi bio niži napon za raspadanje filma u takvim materijalima za razliku od onih „čistih“ (89).

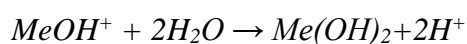
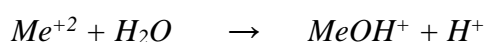
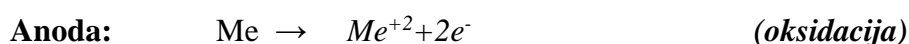
Korozija se dijeli na opću (eng. *general*) i lokaliziranu (eng. *localised*) u koju spada upravo jamičasta korozija. Jamičasta korozija kao jedna vrsta lokalizirane korozije zahvaća nehrđajući čelik, a ta vrsta korozije može nastati kao reakcija vodikovih iona koji napadaju površinu što rezultira lokaliziranim oštećenjem kao i otpuštanjem određenih količina iona metala, ili mogu već postojati kod nekorištenih proizvoda kao nesavršenosti koje propagiraju kod kontakta s vodikovim ionima u biološkom mediju (90).

Analiza autora *Proverbio i Bonaccorso 2001*. prelomljene pločice izrađene od nehrđajućeg čelika 316L SEM-om kod osteosinteze loma bedrene kosti, pokazala je važnost težnji ka savršenosti površine s obzirom na ponašanje ortopedsko-traumatoloških implantata (80). Za takvu analizu koristili su fraktografska obilježja koja su omogućila pregled razvoja događaja koja su dovela do loma pločice.

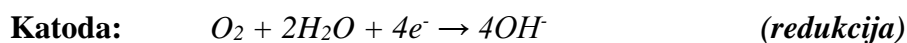
Jamičasta korozija je nazvana tim nazivom zbog izgleda tih nepravilnosti koji se doimaju kao jamice, a katkada ih se naziva i rupice.

1.5.2. Inicijacija jamičaste korozije

Kako bi se jamica razvila iz procesa inicijacije (nukleacije), potrebna je katoda na kojoj su nakupine redukcijske tvari. U samoj jamici koja predstavlja anodu, otopljeni su metalni ioni. Kako bi se balansirao ionski naboj, kloridni anioni su raspršeni u jamici, koja za posljedicu ima utjecaj na daljnju katalizu porasta koncentracije aniona i vodikovih iona te smanjenju pH vrijednosti. Zbog toga, jamica se počinje stvarati na auto-katalitički ili samo-propagirajući način. Reakcija tzv. polu-stanice kod otapanja metala (u reakciji označeno kao *Me*) je općenito gledajući kako slijedi:



Jasno je kako ova reakcija polu-stanice može jedino biti održiva ako su elektroni oslobođeni i iskorišteni/potrošeni u katodnoj reakciji. Ta reakcija se događa na vanjskoj površini jamice koja ostaje pasivna, mjesto gdje nastaje redukcija kisika:



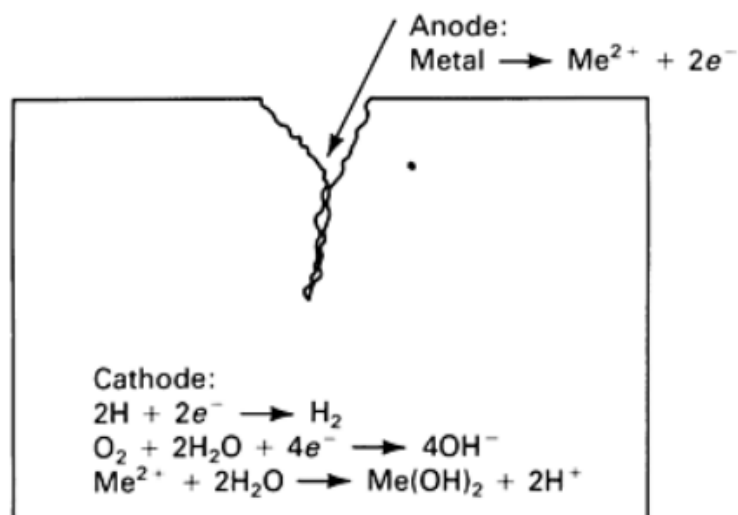
(82).

1.5.3. Propagacija jamičaste korozije

Jamice mogu nastati (inicijacija) prilikom nastanka puknuća u zaštitnom sloju/filmu, kod defekta u samom metalu ili zaštitnom filmu te u inkluzijama ili praznim udubinama. Prilikom inicijacije, čelik je izložen različitim ionima (primjerice Cl^- kloridi), tjelesnom mediju i vodi. Jednom kada se jamica inicirala, ioni metala stvaraju naslage (precipitat) na vrhu jamice te se time najčešće stvara film koji pokriva istu, a upravo taj film ograničava ulazak kisika u jamicu i onemogućava repasivizaciju koja bi mogla obnoviti zaštitu.

Kontinuirani rast jamice ovisi o njezinoj mogućnosti zadržavanja kisele okoline na način da transportira katione metala daleko od jamice, a kloridne anione unutar jamice. Na taj način je rast jamice kontroliran difuzijom (21).

Mehanizam propagacije jamičaste korozije leži u činjenici da ograničeno područje jamice kao i njen vrh djeluje kao anoda naspram ostatka implantata koji djeluje kao katoda (slika 9) te upravo ta činjenica rezultira u visokoj gustoći korozijske struje na dnu jamice. Kao rezultat ograničenja kretanja iona metala ili iona vodika (H^+) iz dna jamice pokrovnog filma, pH vrijednost na dnu jamice se snižava prema kiselijim vrijednostima te se istovremeno jamičasta korozija ubrzava (90).



Slika 9. Shema nastajanja jamičaste korozije

Prihvatljiva brzina korozije za nehrđajući čelik (visokolegirane čelike) je oko $0,1 \mu m$ /godini u uvjetima kada bi se isključili svi drugi čimbenici koji utječu na trošenje implantata od čelika 316L (91, 92).

1.6. Slabljenje osteosintetskog implantata

1.6.1. Nepoželjne posljedice slabljenja osteosintetskog materijala

Neuspjeh/slabljenje (lom ili savijanje) pločica kao osteosintetski implantat nije neuobičajen događaj, no svakako je nepoželjan.

Prema *Banovetz i sur.* učestalost neuspjeha (93) iznosi oko 13% kod titanskih implantata te 1% kod implantata izrađenih od nehrđajućeg čelika (80).

Ortopedski implantati su izloženi biokemijskom dinamičkom okolišu ljudskog tijela te su oblikovani prema anatomiji, a ograničeni fiziološkim uvjetima. Iza svakog pojedinačnog slučaja neuspjeha implantata, stoji zabrinuti bolesnik koji iskusi traumu ponovljene operacije (reoperacije), uz to bolesnik prolazi dodatno razdoblje u kojem je u bolovima i financijskom gubitku zbog dugotrajnog bolovanja. Nadalje, odstranjenje neuspjelog implantata stvara velike tegobe i troškove bolesniku kao što je spomenuto. Iz navedenih razloga se broj tih neuspjeha nastoji svesti na minimum. Jedan od bitnih faktora koji može pomoći u tomu je određivanje mehanizma neuspjeha, a također je važno detaljno istražiti pojedine slučajeve i odrediti razloge ili slijed događaja zbog kojih je došlo do neuspjeha i potrebe reoperacije. Nadalje, ta ista analiza događaja i mehanizama može utjecati na unapređenje ukupne učinkovitosti implantata putem revizijskog inženjeringa (37, 79, 80, 84, 88, 93).

1.6.2. Najčešći mehanizmi slabljenja implantata od čelika 316L

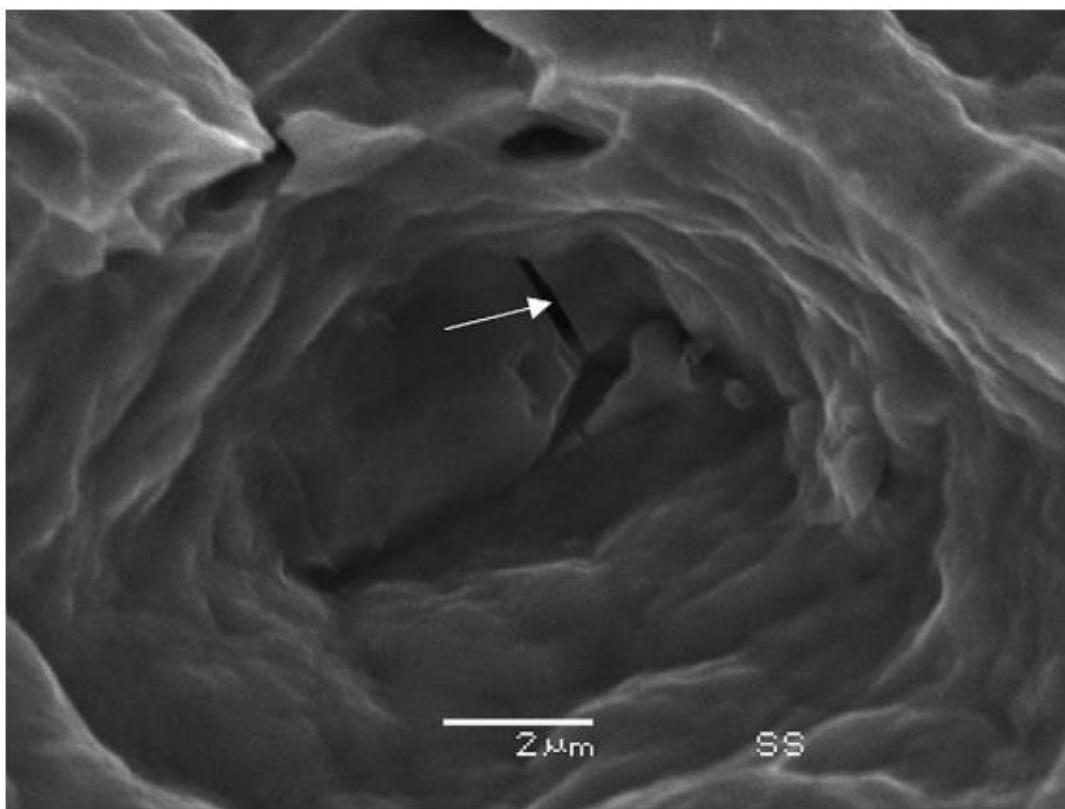
Najčešći mehanizam oštećenja implantata od čelika 316L jest zamor i/ili korozijski zamor (42, 56, 69, 90). Zamor materijala implantata je fenomen koji nastaje putem cikličkog opterećenja te koji generira/stvara male nesavršenost površine istog, koja posljedično vodi ka neuspjehu. Stopa propagacije ovisi o uvjetima opterećenja, no općenito se s vremenom povećava.

Brzina propagacije procijepa može biti vrlo visoka te upravo ona može uzrokovati lom dijela implantata u roku nekoliko sati do nekoliko dana ovisno o opterećenju i frekvenciji cikličkog opterećenja. Kod niskih opterećenja, inicijacija nesavršenosti površine je, općenito govoreći otežana u dijelovima koje su dobro polirane i bez uključaka (nečistoća) te se pod takvim uvjetima proces inicijacije pukotina može kontrolirati/uvjetovati vijek zamora određenog dijela implantata. No ukoliko

već postoji nesavršenost, događaj inicijacije se premošćuje budući da je upravo ta nesavršenost područje inicijacije. Nadalje, zbog niske pH vrijednosti oko svježe rane u kojoj se nalazi tjelesni medij koji sadrži Cl⁻ ione, vrijeme do slabljenja dijela implantata se skraćuje i to se pripisuje lakoći inicijacije i povećanoj stopi propagacije zamora u procjepu (80).

U jednom retrospektivnom preglednom istraživanju kratko nakon dolaska titanskih implantata na tržištu, autora *Banovetza 1996.*, pokazalo se kako dolazi do neuspjeha u implantatima korištenima kod osteosinteze prijeloma i kod onih za stabilizaciju osteotomija izrađenih od titana kao i onih od nehrđajućeg čelika, čime se predlaže da se takvi implantati pažljivo koriste te je potrebno dodatno istražiti koje su indikacije za upotrebu istih (93).

Promatranjem većeg broja uleknuća na raznim lokacijama implantata istraživanjem *K.V. Sudhakar* objavljenom 2005., čini se da je neuspjeh nastao zbog tzv. duktilnog loma (duktilnost je svojstvo materijala da podnese plastičnu deformaciju prije loma, a lom nastaje kada se pređe ta granica i materija gubi svoj mehanički integritet). Pokazalo se da implantati s prisutnošću nemetalnih uključaka (eng. *inclusions*) imaju sklonost biti područje inicijacije napuknuća i preuranjenom lomu implantata uključaka. Na slici 10 je prikazano mjesto mikro-napuknuća u uključku.



Slika 10. Prikaz mikro-napuknuća u uključku (88)

2. HIPOTEZA

Biološka okolina utječe na osteosintetske implantate od nehrđajućeg čelika 316L zbog pojave jamičaste korozivne promjene koja mijenja mikrostrukturu implantata te posljedično slabi mehanička svojstva.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj rada je utvrditi pojavu jamičaste korozije skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i širenjem korozivnih jamica s promjenom kiselosti simuliranog biološkog medija, te utvrditi slabi li implantat od nehrđajućeg čelika 316L pri mehaničkom testiranju.

Specifični ciljevi rada:

1. Utvrditi utječe li jamičasta korozija pregledom i mjerenjem SEM-om znatno na promjenu mikrostrukture implantata od čelika 316L uronjenih u biološki medij.
2. Utvrditi utječe li duljina uranjanja implantata u biološki medij poticajno na progresiju jamičaste korozije.
3. Utvrditi ima li kiseliji medij veći utjecaj na pojavu i brzinu nastajanja jamičaste korozije.
4. Mehaničkim ispitivanjem implantata promijenjenih jamičastom korozijom u završnoj fazi istraživanja dokazati da je čvrstoća (implantata promijenjenih jamičastom korozijom) manja u usporedbi s kontrolnom netretiranom skupinom implantata.
5. Prema dubini jamica koje se mjere u posljednjoj fazi mjerenja, predvidjeti adekvatnu debljinu pasivnog sloja / implantata kako bi se značajno smanjio rizik od slabljenja implantata.

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje se vršilo *in vitro*, a testiranja i pripreme su se proveli na Fakultetu strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu te u suradnji s odsjekom Biokemije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

4.1. Struktura istraživanja

Prema izvornom planu, izdvojene su četiri skupine pločica od nehrđajućeg čelika 316L te su provedena mjerenja SEM-om na sve četiri skupine prije uranjanja kao nulto mjerenje, a potom u još 4 različita vremenska razdoblja koja simuliraju različite faze cijeljenja kosti prema poznatim definicijama sukladno knjigama raznih autora koje su detaljno pojašnjene u uvodu (1. nakon 10 dana, 2. nakon mjesec dana, 3. nakon 6 mjeseci, 4. nakon godinu dana). Ova vrsta materijala implantata je specifično odabrana iz razloga što je najrasprostranjeniji materijal koji se i dalje koristi za osteosinteze zbog ranije navedenih razloga. U svakoj skupini je 12 pojedinih pločica, a ukupno ih je bilo 48, što se analizom snage testa za zavisnu analizu varijance (4 ponovljena mjerenja i 3 ispitivane skupine) pokazalo više nego dostatnim prema sljedećim parametrima: očekivana korelacija između mjerenja 0,5; očekivani učinak veličine $f = 0,25$ i snaga testa od 80%, u istraživanje je potrebno uključiti najmanje 30 ispitanika. Analiza je provedena pomoću programske potpore G*Power for Windows, verzija 3.1.9.2. Pomoću programa randomizacije (www.randomizer.org) obavila se randomizacija uzoraka.

Nulta skupina je kontrolna skupina koja nije bila uronjena te su ostale tri skupine bile uronjene u SBF godinu dana u tri otopine različitih pH vrijednosti koje simuliraju promjene kiselosti mikro-okoliša područja prijeloma ili osteotomije (1. pH = 7,0, 2. pH = 6,0, 3. pH = 5,0). Uzorci su bili čuvani u staklenim posudama u polumraku, bez izravnog izlaganja sunčevom ili umjetnom svjetlu na sobnoj temperaturi od 23 C°. pH vrijednost se redovito provjeravala i titrirala prema potrebi svakih mjesec dana kako bi se osigurali konstantni/stabilni uvjeti eksperimenta.

Nadalje, prema eksperimentalnom planu, na kraju isteka godine dana uronjeni uzorci iz sve 3 skupine, uz uzorke kontrolne 4. skupine koji su na početku testirani, izložili su se statičkom i cikličkom testiranju na kidalici Messphysik Beta 50-5 te servohidrauličkoj umaralici Walter Bai LFV-50-HH

redom. Za maksimalni iznos sile odabrano je $F_{\max} = 900$ N, a za minimalni iznos $F_{\min} = 90$ N. Svi uzorci pločica ispitivani su do loma. Odabrana frekvencija je iznosila 5Hz.

4.2. Materijali

4.2.1. Pločice nehrđajućeg čelika

Materijali koji su se koristili za ovo istraživanje jesu pločice nehrđajućeg čelika proizvođača *Synthes®* iz Švicarske i to 48 DCP (eng. *Dynamic Compression Plate*) kompresijska pločica 3,5 mm, svaka sadrži 6 otvora za vijke te je duljine 74 mm. Ove dimenzije su uzete iz praktičnih razloga testiranja, a ujedno se smatraju i prosječnom pločicom (83). Takav tip pločica je odabran budući da se često koriste u današnjim standardnim zbrinjavanjima prijeloma kost. Materijal nehrđajućeg čelika 316L koji se koristi u proizvodnji osteosintetskih implantata diljem svijeta je ujedinen u smislu smjese te načina procesa završne obrade. Ovaj proizvođač je odabran iz razloga dostupnosti na domaćem tržištu te jamstva standardne kvalitete.

4.2.2. Tekućina u kojoj se uranjaju pločice

Medij koji se koristio za uranjanje pločica jest SBF (eng. *Simulated Body Fluid*) tekućina prema Kokubo et al. 1991. koja se titriralna mliječnom kiselinom radi postignuća različitih pH vrijednosti odnosno kiselosti. Prva skupina od dvanaest pločica uranja se u SBF; pH vrijednost 7,0, druga skupina sastoji se od dvanaest istih implantata uronjenih u puferiranoj otopini mliječne kiseline od pH vrijednosti 6,0, a treća skupina također se sastoji od dvanaest istih implantata uronjenih u puferiranoj otopini mliječne kiseline od pH vrijednosti 5,0.

Otopine su se pripremale na odsjeku Biokemije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Tekućina je prema svjetskim standardima pripremljena te mijenjana svakih mjesec dana kako bi se održala željena pH vrijednost. Mliječna kiselina se koristila s obzirom da je bila dostupna te je sastavni dio ljudskog tjelesnog biološkog sustava. Mliječna kiselina koja spada u grupu hidroksikarboksilnih kiselina, uobičajeno je ime za α -hidroksikarboksilnu kiselinu, odnosno 2-hidroksipropionsku kiselinu te ima sljedeću kemijsku strukturu: $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$. L-mliječna kiselina stvara se prirodno raspadanjem glikogena u mišićima koji su pod opterećenjem i uzrok je njihova umora. U tablici 3 prikazana je usporedba koncentracije iona u SBF i ljudskoj krvnoj plazmi.

Tablica 3. Usporedba koncentracije iona u SBF i ljudskoj krvnoj plazmi (81)

Ioni	Koncentracija $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	4,2	148,8	1,0	0,5
Krvna plazma	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,5

4.2.3. Posude

Posude u kojoj su se uranjale pločice u različite tekućine su napravljene od stakla koje su se držale u polumraku na sobnoj temperaturi od 23 °C bez izlaganju izravnom svjetlu, bilo sunčanom ili umjetnom, prema optimalnim uvjetima. Oznake pločica po rednom broju i pH vrijednosti određene uronjene tekućine su obilježene s vanjske strane posuda na način da tinta oznake ne utječe na otopine i njihov sastav, kao ni na pločice i njihovu površinu.

4.3. Metode

4.3.1. Skenirajući elektronski mikroskop

TESCAN VEGA TS5136MM

U svrhu praćenja promjena mikrostrukture testiranih uzoraka, uslijed izlaganja uzoraka djelovanju otopina različitih pH vrijednosti, provedena je analiza mikrostrukture u intervalima definiranim normom. Mikrostrukturna analiza provedena je u laboratoriju za materijalografiju Fakulteta strojarstva i brodogradnje u Zagrebu na skenirajućem elektronskom mikroskopu, SEM model TESCAN VEGA 5136 MM pri povećanjima 2,000x.

Osnove rada skenirajućeg elektronskog mikroskopa sastoje se od skeniranja površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Uzorak se nalazi na nosaču u komori mikroskopa, a izvor elektrona je katoda smještena u emisionoj komori. Elektroni se ubrzavaju na putu između katode i anode koje se nalaze pod visokim naponom. Elektroni se dalje fokusiraju i usmjeruju pomoću

magnetskih leća na površinu uzorka (69). Komora i kolona elektronskog mikroskopa za vrijeme rada nalaze se pod niskim ili visokim vakuumom. Prilikom udarca elektrona o površinu uzorka, događaju se razni efekti koje koristimo za dobivanje slike i provođenje analize u SEM-u. Slika 11 prikazuje osnovne elemente SEM-a.

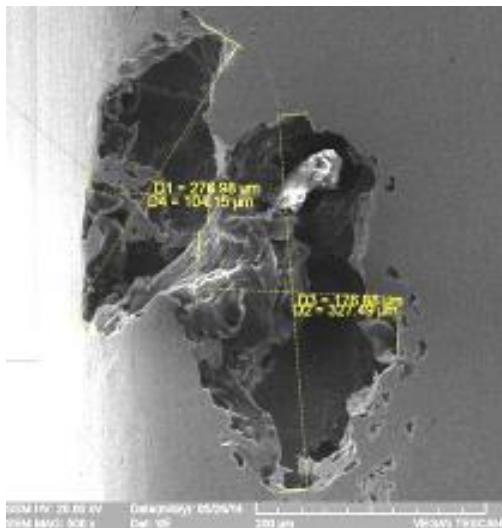


Slika 11. Shema osnovnih elemenata SEM-a

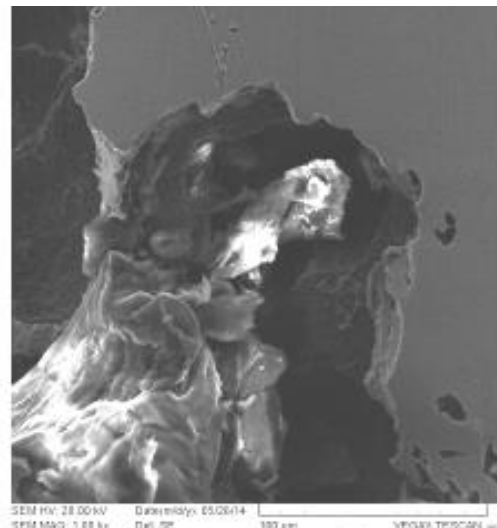
Prednosti SEM-a su:

1. rezolucija - sposobnost da se „vide“ vrlo mali objekti
2. dubina polja - sposobnost da objekti različite „visine“ na uzorkovanoj površini ostanu u fokusu
3. mikroanaliza - sposobnost da se analizira sastav uzorka
4. jednostavan je za upotrebu s „user-friendly“ sučeljem
5. većina aplikacija zahtijeva minimalnu pripremu uzorka
6. generira podatke u digitalnom obliku što je od velike važnosti za prijenos i manipulaciju podataka.

Primjena SEM-a je idealan uređaj za snimanje prijelomnih površina svih vrsta materijala (metali, tekstil, prirodni materijali itd.). Primjeri povećanja prikazani su na slikama 12 i 13.



Slika 12. Primjer povećanja korozijske jamice SEM-om s prikazom dimenzija



Slika 13. Ista promjena korozijske jamice s većim uvećanjem prikazana SEM-om

4.3.2. Brojanje jamica

Ova metoda ovisila je o vidnom polju snimanog dijela dimenzije 75 x 75 µm te se brojanje vršilo u danom segmentu vidnog polja koji se nije mogao svaki puta identično ponoviti zbog slobode namještanja pločice u SEM-u.

Intervali snimanja SEM-om te brojanja jamica. Nulto mjerenje se provelo netom prije uranjanja na svih 48 uzoraka pločica. Prvo mjerenje se provelo deseti dan, drugo mjerenje dvadeset osmi dan (nakon 4 tjedna), treće mjerenje sto šezdeset osmi dan (nakon 6 mjeseci), a posljednje mjerenje se provelo tristo šezdeset peti dan (nakon godinu dana). Razmaci mjerenja u skladu su s dinamikom cijeljenja kosti, odnosno s promjenom kiselosti sredine.

4.3.3. Eksperimentalno ispitivanje pločica

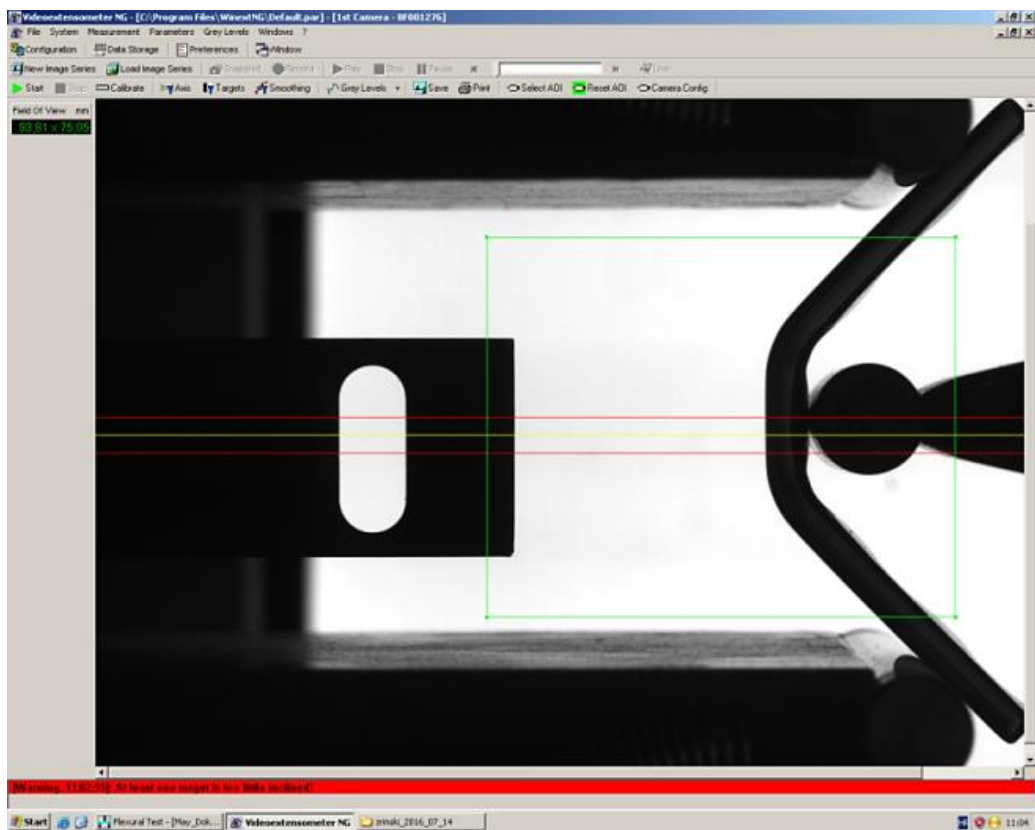
4.3.3.1. Provedba statičkih ispitivanja

Eksperimentalna statička ispitivanja uzoraka savijanjem u tri točke provedena su na kidalici Beta 50-5 (Messphysik Materials Testing GmbH, Austria). Pomaci tijekom eksperimenta mjereni su videoekstenzometrom ME-46-NG (Messphysik Materials Testing GmbH, Austria). Svaka skupina (S1, S2, S3 i S4) ispitana je s pet uzorka koji su opterećivani do narušavanja integriteta pločica. Statička ispitivanja provedena su s ciljem određivanja iznosa maksimalne sile i odgovarajućeg progiba ovisno o kiselosti medija pohrane uzoraka pločica. Rezultati statičkih ispitivanja također su poslužili za definiranje iznosa opterećenja za provedbu cikličkih ispitivanja.

Uzorci su na kidalici postavljeni i pozicionirani na valjcima naprave za savijanje koja je zatikom i maticom pričvršćena na kidalici. Za opterećivanje uzoraka korišten je centralno postavljeni valjak na napravi koja je zatikom i maticom pričvršćena za prihvat na mjernoj dozi. Promjer valjaka koji su služili kao oslonci, kao i valjak za opterećivanje uzoraka iznosio je 10 mm. Razmak oslonaca iznosio je 51 mm, a udaljenost centralno postavljenog valjka od oslonaca iznosio je 25,5 mm. Svi uzorci su opterećivani brzinom 10 mm/min. Kao mjerna doza za mjerenje sile korištena je doza 6,3 kN serija K (GTM Testing and Metrology GmbH, Njemačka). Eksperimentalni postav za provedbu savijanja pločica u tri točke prikazan je na slici 14, a princip mjerenja progiba videoekstenzometrom tijekom ispitivanja prikazan je na slici 15.



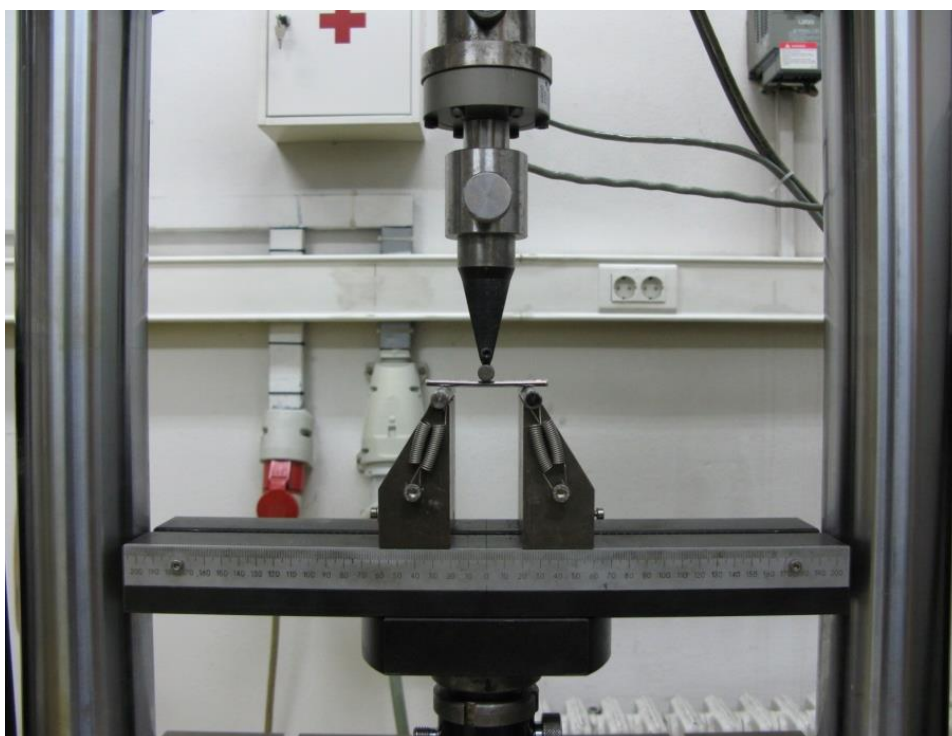
Slika 14. Eksperimentalni postav kod statičkog savijanja pločica u tri točke



Slika 15. Mjerenje progiba pločica videoekstenzometrom tijekom savijanja u tri točke

4.3.3.2. Provedba cikličkih ispitivanja

Ciklička ispitivanja pločica savijanjem u tri točke provedena su na servohidrauličkoj umaralici LFV-50-HH (Walter Bai AG, Švicarska). Pozicioniranje i opterećivanje uzoraka je bilo isto kao i kod statičkog ispitivanja (slika 16).



Slika 16. Eksperimentalni postav kod cikličkog ispitivanja pločica savijanjem u tri točke

Za provedbu cikličkih ispitivanja napisan je programski kod u kojem su definirani parametri ispitivanja. Za opterećenje uzoraka odabran je sinusoidalni oblik, a frekvencija je iznosila 5 Hz. Visina opterećenja pri cikličkom ispitivanju odabrana je tako da tijekom ispitivanja nastupi lom pločica. Za maksimalni iznos sile odabrano je $F_{\max} = 900$ N, a za minimalni iznos $F_{\min} = 90$ N. Sila tijekom ispitivanja mjerena je kao i kod statičkog ispitivanja mjernom dozom 6,3 kN (GTM Testing and Metrology GmbH, Njemačka). Svi uzorci pločica ispitivani su do loma.

4.3.4. Mjerenje hrapavosti pločice (dubina jamica)

Mjerenja hrapavosti (utvrđivanje geometrije profila hrapavosti) su provedena kontaktnom metodom korištenjem mjernog uređaja Perthometer S8P (slika 17) proizvođača Mahr Perthen.



Slika 17. Perthometer S8P

Značajne informacije:

- Perthometer S8P je umjeren sukladno DKD-R 4-2: *Calibration of Devices and Standards for Roughness Metrology, Calibration of Vertical Measuring System of Stylus Instruments*
- Sljedivost rezultata mjerenja ostvarenih na Perthometru S8P osigurana je preko državnih etalona za hrapavost RH (u vlasništvu Nacionalnog laboratorija za duljinu RH)
- Nacionalni laboratorij za duljinu RH ima objavljene CMC vrijednosti za parametre hrapavosti R_a i R_z (mjerenje na Perthometru S8P) u CIPM MRA KCDB.

Utvrđivanje geometrije profila hrapavosti provedeno je mjerenjem devet profila uz sljedeće uvjete mjerenja:

- mjesto mjerenja: Nacionalni laboratorij za duljinu RH
- mjerni uređaj: Perthometer S8P, Feinprüf Perthen GmbH
- Gaussov filter, $\lambda_c = 0,8$ mm
- vođenje nožicom

- radijus ticala $r = 5 \mu\text{m}$
- duljina ispitivanja $l_t = 5,6 \text{ mm}$
- duljina vrednovanja $l_n = 4,0 \text{ mm}$
- mjerna sila 1,3 mN.

Ispitivanje hrapavosti površina provedeno je u skladu sa zahtjevima normi:

- [1] ISO 4287:1997 Geometric Product Specification (GPS) — Surface texture: profile method — Terms, definitions and surface texture parameters
- [2] ISO 4288:1996 Geometric Product Specification (GPS) — Surface texture: profile method — Rules and procedures for the assessment of surface texture
- [3] ISO 3274:1996 Geometrical Product Specifications (GPS) — Surface texture: Profile method — Nominal characteristics of contact (stylus) instruments

4.4. STATISTIČKE METODE

Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljev testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima kao i malom broju uzoraka primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone (IQR) a razlike između njih analizirane Kruskal-Wallisovim testom. Razlike u površini jamica kao i ukupnom broju jamica između pojedinih mjerenja analizirane su Friedmanovim testom. Načinjeni su Box i Whiskerovi plotovi unutar kojih su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 1,5 interkvartilna raspona.

P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

Analizom snage testa za zavisnu analizu varijance (4 ponovljena mjerenja i 3 ispitivane skupine) prema sljedećim parametrima: očekivana korelacija između mjerenja 0,5; očekivani učinak veličine $f = 0,25$ i snaga testa od 80%, u istraživanje je potrebno uključiti najmanje 30 ispitanika. Analiza je provedena pomoću programske potpore G*Power for Windows, verzija 3.1.9.2.

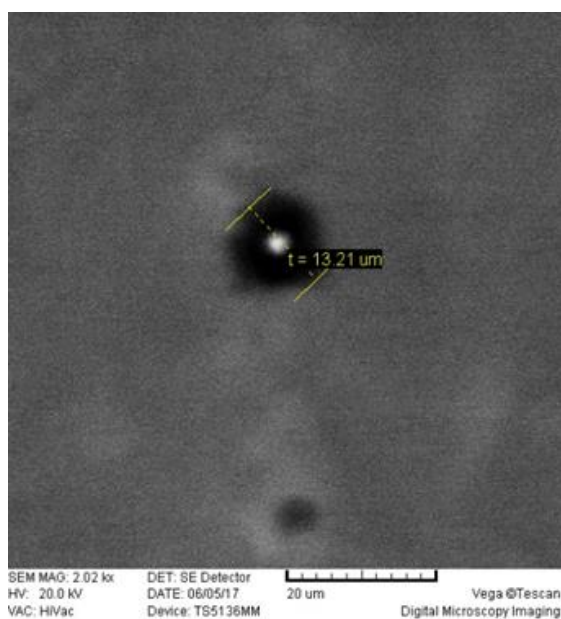
Pomoću programa randomizacije (www.randomizer.org) obavila se randomizacija.

5. REZULTATI

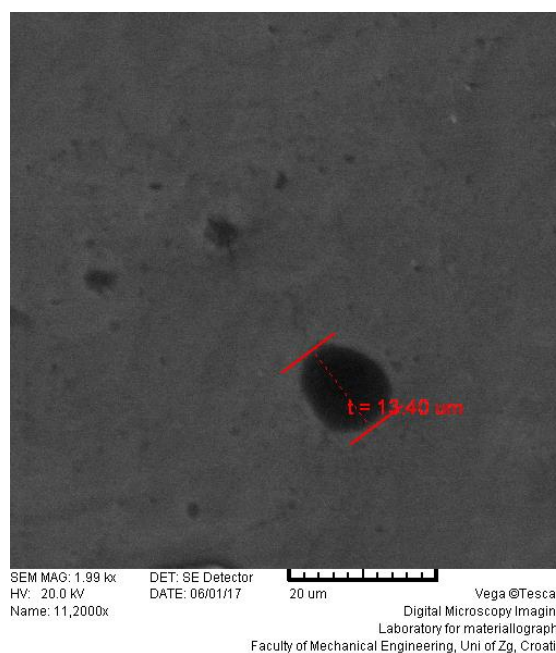
5.1. Mjerenje broja i površine jamica ovisno o pH vrijednostima u različitim intervalima

Na slikama od 18 do 31 su prikazane promjene jamičaste korozije u četiri različita vremenska intervala ovisno o skupini. Također su prikazane dimenzije najvećih jamica u svakom uzorku. Razmaci mjerenja u skladu su s dinamikom cijeljenja kosti, odnosno promjenom kiselosti uronjene sredine.

Slike 18 i 19 prikazuju promjene i dimenzije najvećih korozijskih jamica kod nultog mjerenja SEM-om dviju pločica iz uronjene i kontrolne skupine koje je provedeno netom prije uranjanja uzoraka svih 48 pločica u medij, s obzirom da su tvornički jednake, nije se smatralo da se više primjeraka treba prikazivati.

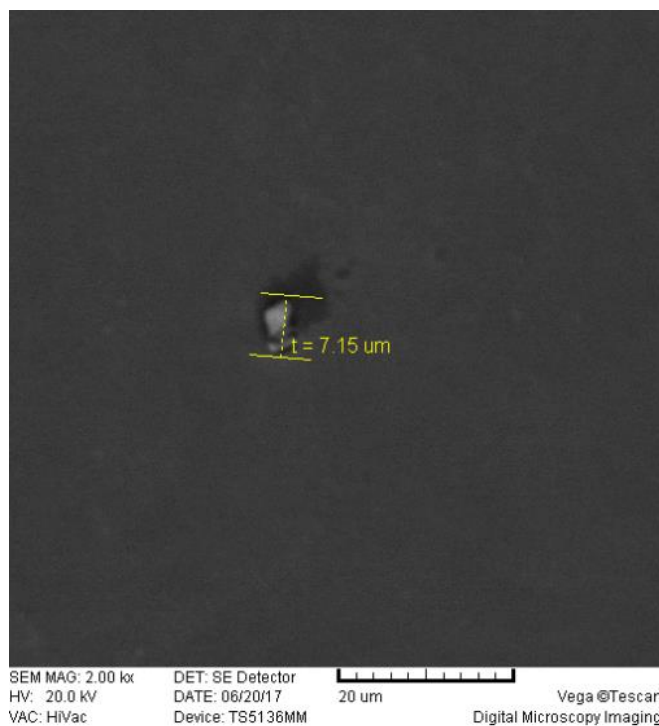


Slika 18. Korozijska jamica pločice iz prve skupine s označenom dimenzijom prikazana SEM-om

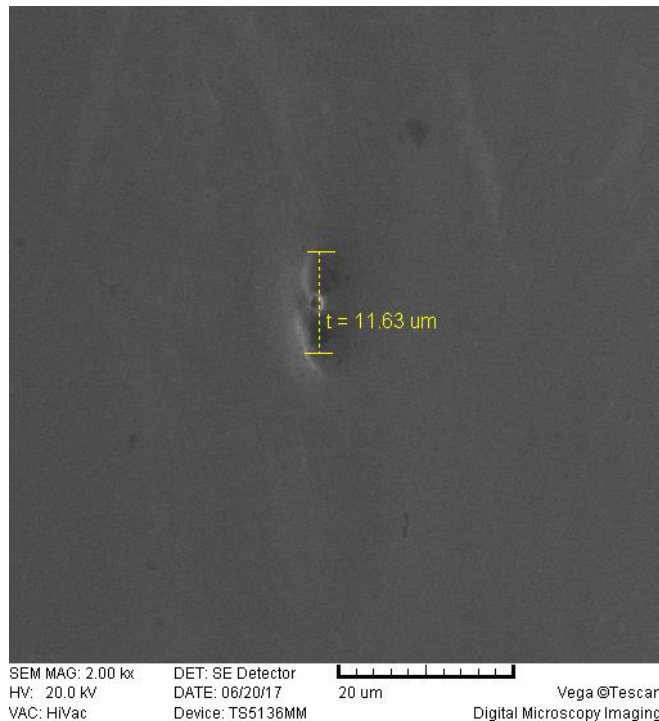


Slika 19. Korozijska jamica pločice iz kontrolne skupine s označenom dimenzijom prikazana SEM-om

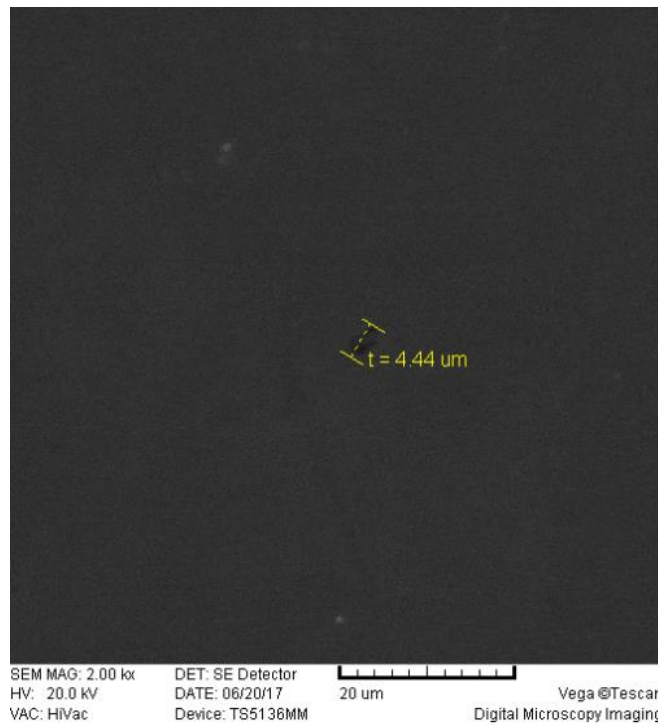
Slike od 20 do 22 prikazuju promjene i dimenzije najvećih korozijskih jamica kod prvog mjerenja SEM-om koje je provedeno deseti dan od uranjanja uzoraka u medij na pločicama prve, druge i treće skupine redom.



Slika 20. Korozivna jamica pločice iz prve skupine s uključkom i označenom dimenzijom prikazanim SEM-om (1. mjerenje)

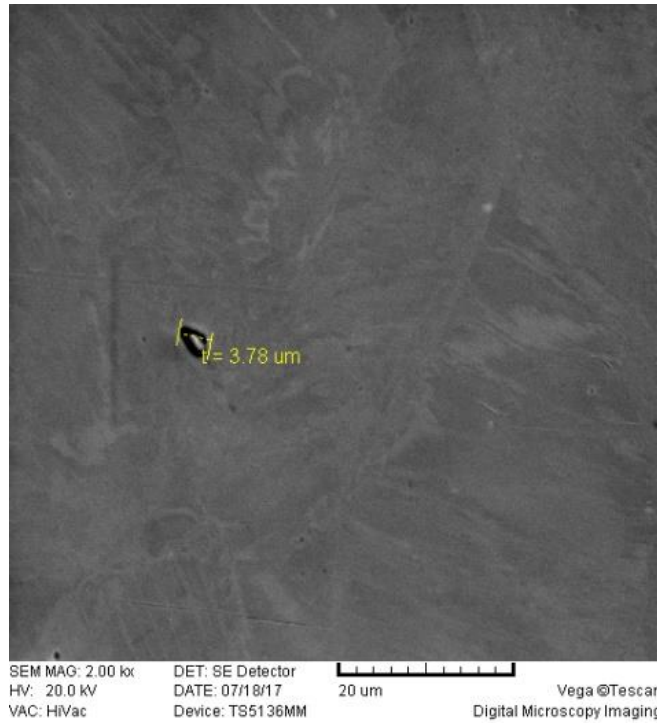


Slika 21. Korozivna jamica pločice iz druge skupine s označenom dimenzijom prikazanim SEM-om (1. mjerenje)

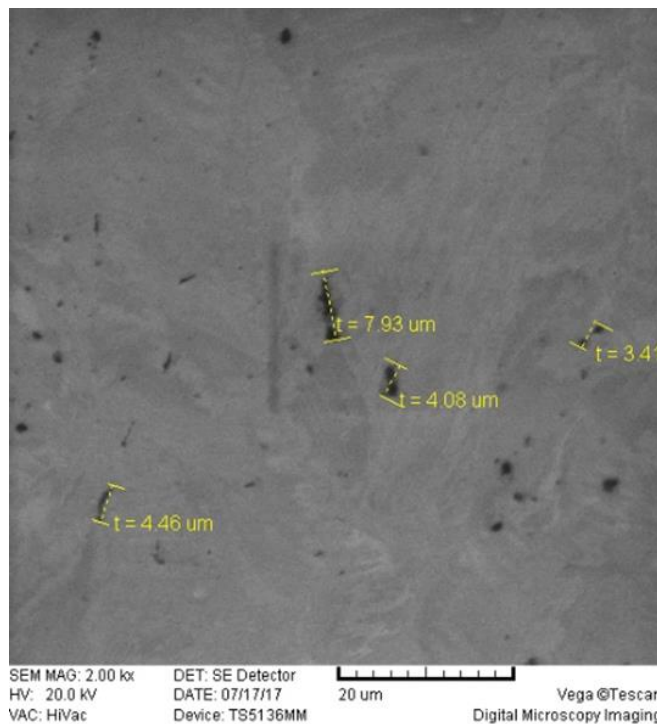


Slika 22. Korozijska jamica pločice iz treće skupine s označenom dimenzijom prikazanim SEM-om (1. mjerenje)

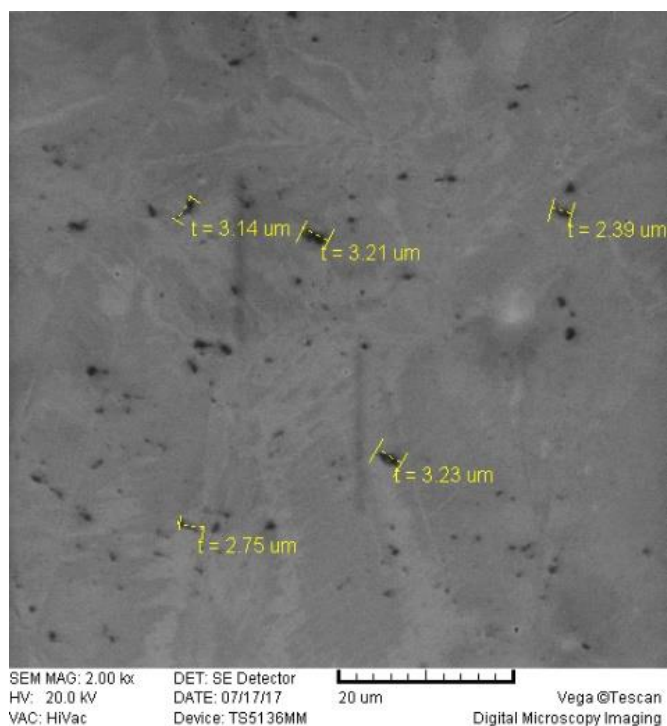
Slike od 23 do 25 prikazuju promjene i dimenzije najvećih korozijskih jamica kod drugog mjerenja SEM-om dvadeset i osmi dan od uranjanja uzoraka u medij (nakon 4 tjedna) koje je provedeno na pločicama prve, druge i treće skupine redom.



Slika 23. Korozijska jamica pločice iz prve skupine s označenom dimenzijom prikazanim SEM-om (2. mjerenje)

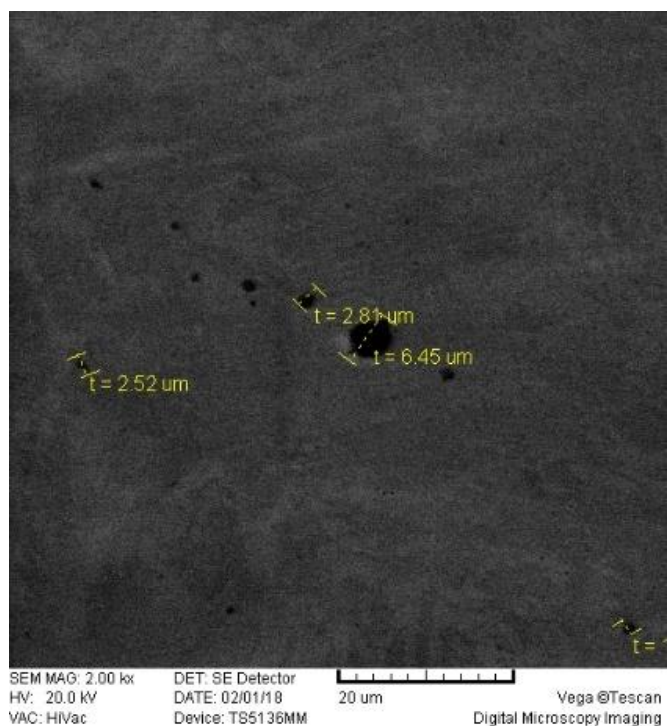


Slika 24. Korozijske jamice pločice iz druge skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (2. mjerenje)

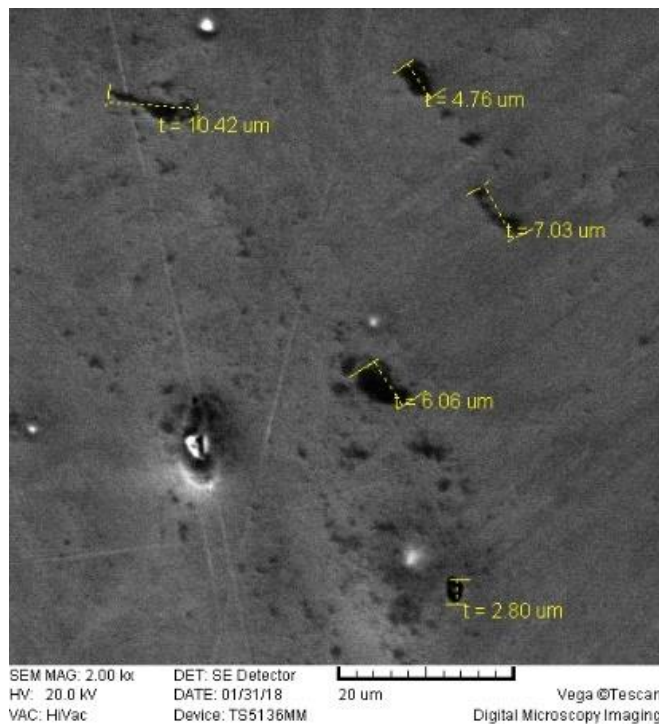


Slika 25. Korozijske jamice pločice iz treće skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (2. mjerenje)

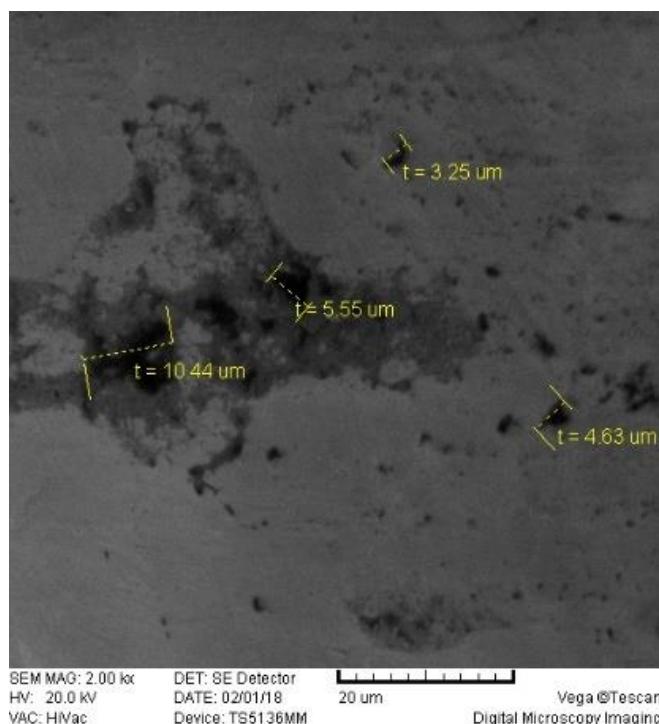
Slike od 26 do 28 prikazuju promjene i dimenzije najvećih korozijskih jamica kod trećeg mjerenja SEM-om (6 mjeseci od uranjanja uzoraka u medij) koje je provedeno na pločicama prve, druge i treće skupine redom.



Slika 26. Korozijske jamice pločice iz prve skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (3. mjerenje)

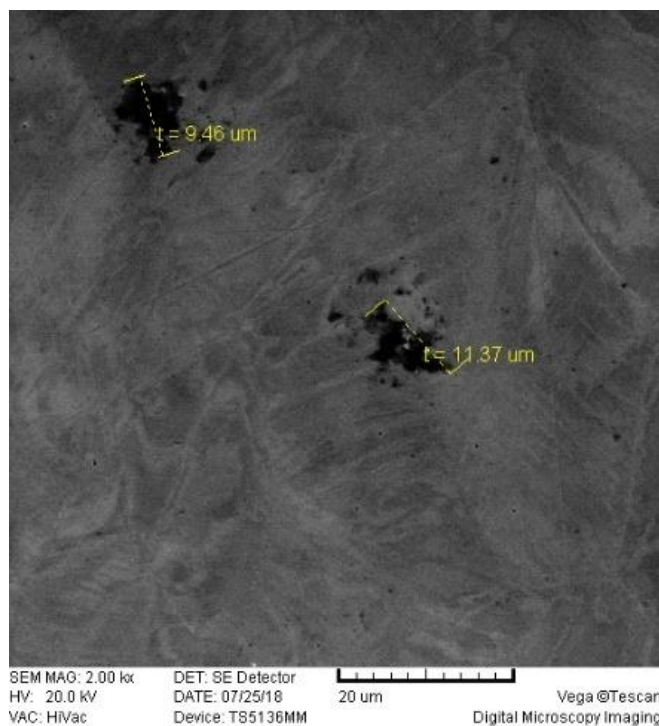


Slika 27. Korozijske jamice pločice iz druge skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (3. mjerenje)

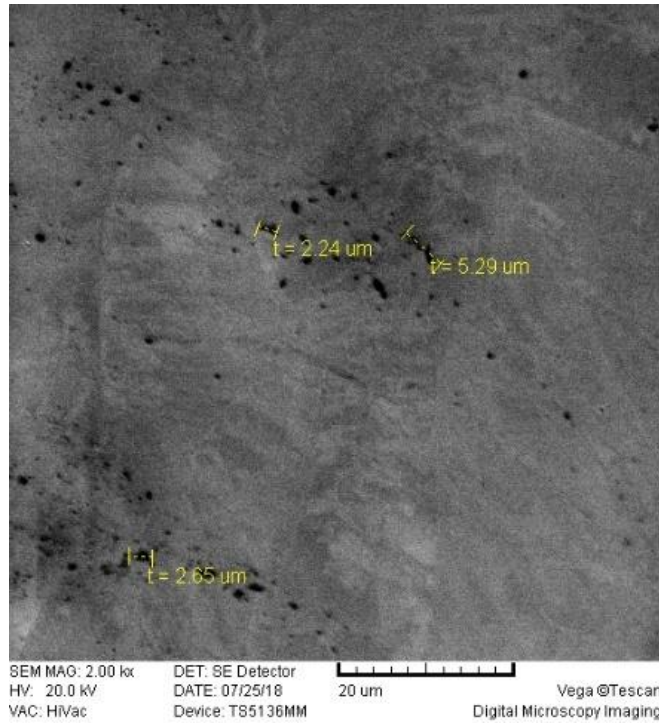


Slika 28. Korozijske jamice pločice iz treće skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (3. mjerenje)

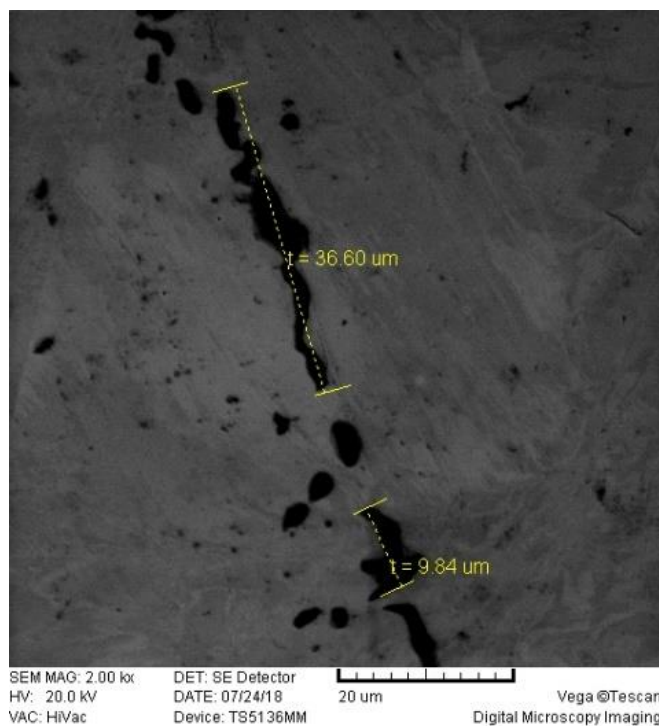
Slike od 29 do 31 prikazuju promjene i dimenzije najvećih korozivskih jamica kod četvrtog, ujedno i zadnjeg mjerenja SEM-om tristo šezdeset i peti dan od uranjanja uzoraka u medij (nakon godinu dana), koje je provedeno na pločicama prve, druge i treće skupine redom.



Slika 29. Korozivske jamice pločice iz prve skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (4. mjerenje)



Slika 30. Korozijske jamice pločice iz druge skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (4. mjerenje)



Slika 31. Korozijske jamice pločice iz treće skupine s označenim dimenzijama prikazanim SEM-om (4. mjerenje)

Broj jamica ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih mjerenja prikazan je u **tablici 4 i na slici 32**, a razlike između pojedinih mjerenja unutar pojedinih podskupina u **tablici 5**. **Iz tablice 4** je uočljivo kako su značajne razlike u broju jamica prisutne tek kod trećeg ($p = 0,006$) i četvrtog mjerenja ($p = 0,003$) s tim da je najveći ukupni broj jamica u skupini s pH 5,0, odnosno u skupini s najvišom razinom kiselosti. Ako se promatra dinamika promjene ukupnog broja jamica ovisno o vremenu mjerenja (**tablica 5**) u svim skupinama kiselosti je inicijalno (drugo mjerenje) došlo do pada ukupnog broja jamica koji se postupno povećavao i to najviše u skupini s najnižim pH, odnosno s najvišom kiselosti (pH 5,0) što je vidljivo i na **slici 32**.

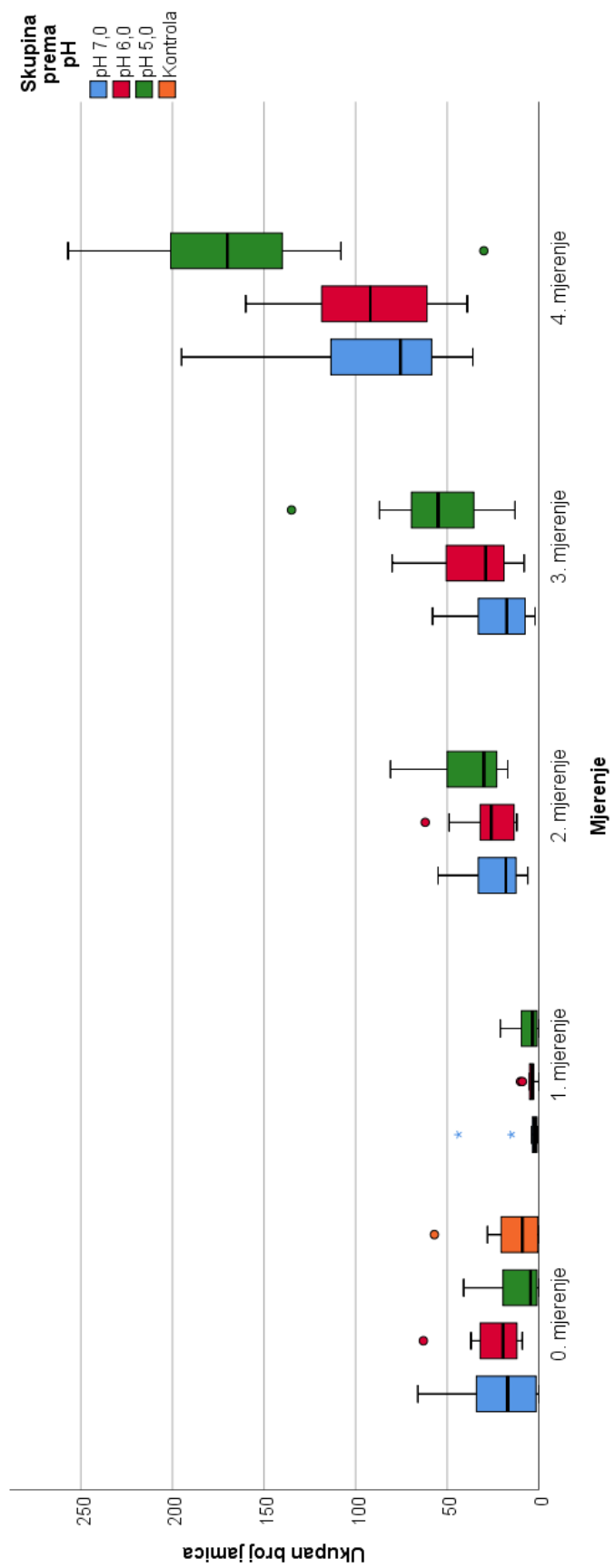
Tablica 4. Ukupan broj jamica kod svih uzoraka svake skupine ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih intervala mjerenja, Kruskal-Wallisov test prikazuje razliku u ukupnom broju jamica po skupinama ovisno o intervalu mjerenja

Skupina prema pH		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Ukupan broj jamica 0. mjerjenje	pH 7,0	12	20,00	20,423	0	66	1,25	17,00	36,00
	pH 6,0	12	23,83	15,349	9	63	12,00	19,50	33,50
	pH 5,0	12	11,08	14,177	0	41	0,50	4,50	22,25
	Kontrola	12	13,50	16,893	0	57	0,25	9,00	22,25
Ukupan broj jamica 1. mjerjenje	pH 7,0	12	6,58	12,398	1	44	1,00	2,00	3,75
	pH 6,0	12	4,25	2,800	0	10	3,00	3,50	5,00
	pH 5,0	12	6,08	6,501	0	21	1,00	3,50	9,75
Ukupan broj jamica 2. mjerjenje	pH 7,0	12	23,50	16,161	6	55	12,25	18,00	33,50
	pH 6,0	12	27,33	15,447	12	62	13,25	26,00	34,00
	pH 5,0	12	37,33	19,727	17	81	21,50	30,00	54,00
Ukupan broj jamica 3. mjerjenje	pH 7,0	12	21,75	17,211	2	58	6,25	17,50	35,50
	pH 6,0	12	34,33	22,580	8	80	18,50	29,00	53,75
	pH 5,0	12	57,75	32,003	13	135	33,25	55,00	69,75
Ukupan broj jamica 4. mjerjenje	pH 7,0	12	89,92	45,236	36	195	57,75	75,50	121,75
	pH 6,0	12	93,50	39,339	39	160	59,00	92,00	125,25
	pH 5,0	12	164,67	60,446	30	257	138,50	170,00	205,00

	Kruskal-Wallis H	df	P
Ukupan broj jamica 0. mjerenje	6,005	3	0,111
Ukupan broj jamica 1. mjerenje	1,493	2	0,474
Ukupan broj jamica 2. mjerenje	4,581	2	0,101
Ukupan broj jamica 3. mjerenje	10,089	2	0,006
Ukupan broj jamica 4. mjerenje	11,339	2	0,003

Tablica 5. Razlike u ukupnom broju jamica između pojedinih mjerenja ovisno o kiselosti medija:
Friedmanov test

N	Vrijednost X²	df	P
12	29,5	4	<0,001
Skupina prema pH = pH 7,0			
N	Vrijednost X²	df	P
12	36,13	4	<0,001
Skupina prema pH = pH 6,0			
N	Vrijednost X²	df	P
12	40,33	4	<0,001
Skupina prema pH = pH 5,0			



Slika 32. Razlike u ukupnom broju jamica između pojedinih mjerenja ovisno o kiselosti medija

Površina jamica (μm^2) ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih mjerenja prikazana je u **tablici 6 i na slici 33.** a razlike između pojedinih mjerenjima unutar pojedinih podskupina u **tablici 7.** Ako promatramo dinamiku promjena unutar pojedinih skupina, značajne razlike su zabilježene samo u skupini s pH 6: $p=0,001$.

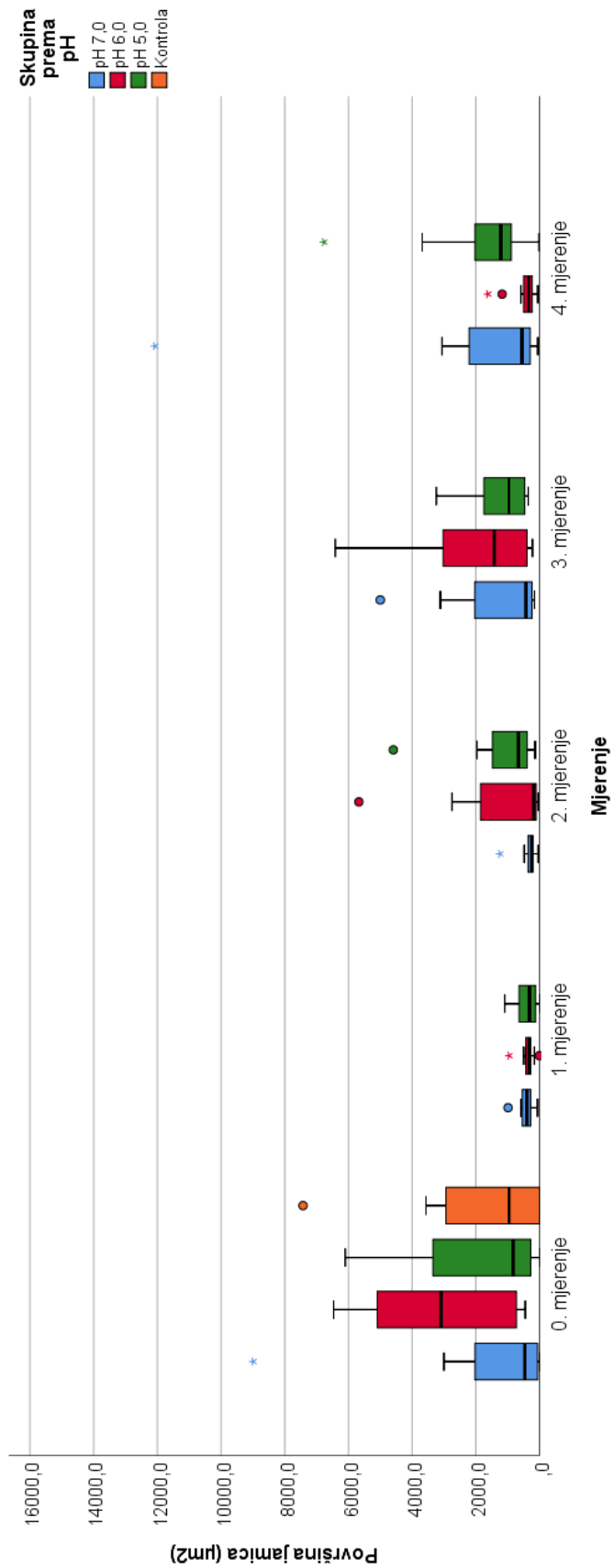
Tablica 6. Prikazane su izmjerene vrijednosti ukupne površine jamice (μm^2) po skupini tijekom pojedinih pet mjerenja SEM-om, Kruskal-Wallisov test prikazuje razliku u ukupnim površinama jamica po skupinama ovisno o intervalu mjerenja

Skupina prema pH		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Površina jamica (μm^2) 0. mjerjenje	pH 7,0	12	1506,51	2558,16	0,0	8990,8	30,37	460,32	2117,50
	pH 6,0	12	3068,93	2196,76	443,9	6460,6	693,96	3091,49	5306,97
	pH 5,0	12	1755,59	2109,91	0,0	6101,2	135,95	827,20	3901,11
	Kontrola	12	1687,27	2243,55	0,0	7425,7	0,00	952,87	3078,23
Površina jamica (μm^2) 1. mjerjenje	pH 7,0	12	422,74	235,39	61,9	988,2	264,16	395,31	550,48
	pH 6,0	12	361,43	228,26	0,0	952,9	268,18	331,15	434,64
	pH 5,0	12	389,28	343,35	0,0	1089,8	94,87	311,87	712,38
Površina jamica (μm^2) 2. mjerjenje	pH 7,0	12	334,99	306,19	44,9	1241,0	199,53	243,17	358,69
	pH 6,0	12	2397,46	5096,48	44,9	17695,5	94,75	184,25	2297,12
	pH 5,0	12	1147,11	1233,00	135,5	4589,2	375,61	660,38	1515,20
Površina jamica (μm^2) 3. mjerjenje	pH 7,0	12	1273,57	1526,77	157,4	4998,9	222,43	424,06	2231,69
	pH 6,0	12	1891,68	1869,62	220,0	6412,3	356,12	1419,36	3028,26
	pH 5,0	12	1192,85	874,41	351,5	3241,5	444,21	960,99	1765,80
Površina jamica (μm^2) 4. mjerjenje	pH 7,0	12	4176,51	8785,58	53,3	29978,3	262,70	548,05	2634,52
	pH 6,0	12	483,26	458,29	52,5	1620,9	192,53	337,05	538,74
	pH 5,0	12	1803,88	1825,59	9,9	6772,0	808,71	1216,06	2189,07

	Kruskal-Wallis H	df	P
Površina jamica (μm^2) 0. mjerenje	6,085	3	0,108
Površina jamica (μm^2) 1. mjerenje	0,897	2	0,639
Površina jamica (μm^2) 2. mjerenje	5,343	2	0,069
Površina jamica (μm^2) 3. mjerenje	1,776	2	0,411
Površina jamica (μm^2) 4. mjerenje	7,236	2	0,027

Tablica 7. Razlike u površini jamica između pojedinih mjerenja ovisno o kiselosti medija:
Friedmanov test

N	Vrijednost X^2	df	P
12	5,333	4	0,255
Skupina prema pH = pH 7,0			
N	Vrijednost X^2	df	P
12	18,533	4	0,001
Skupina prema pH = pH 6,0			
N	Vrijednost X^2	df	P
12	8,050	4	0,090
Skupina prema pH = pH 5,0			



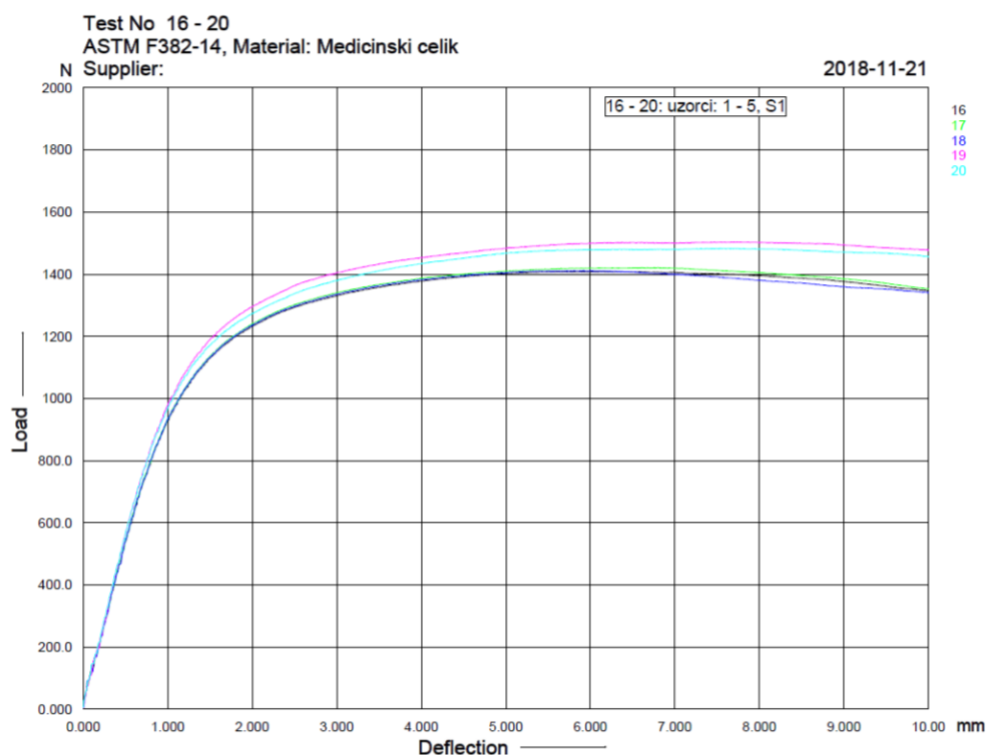
Slika 33. Razlike ukupnih površina jamica (μ^2) po skupinama ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih mjerenja

5.2. Rezultati eksperimentalnog ispitivanja mehaničkih svojstava pločica

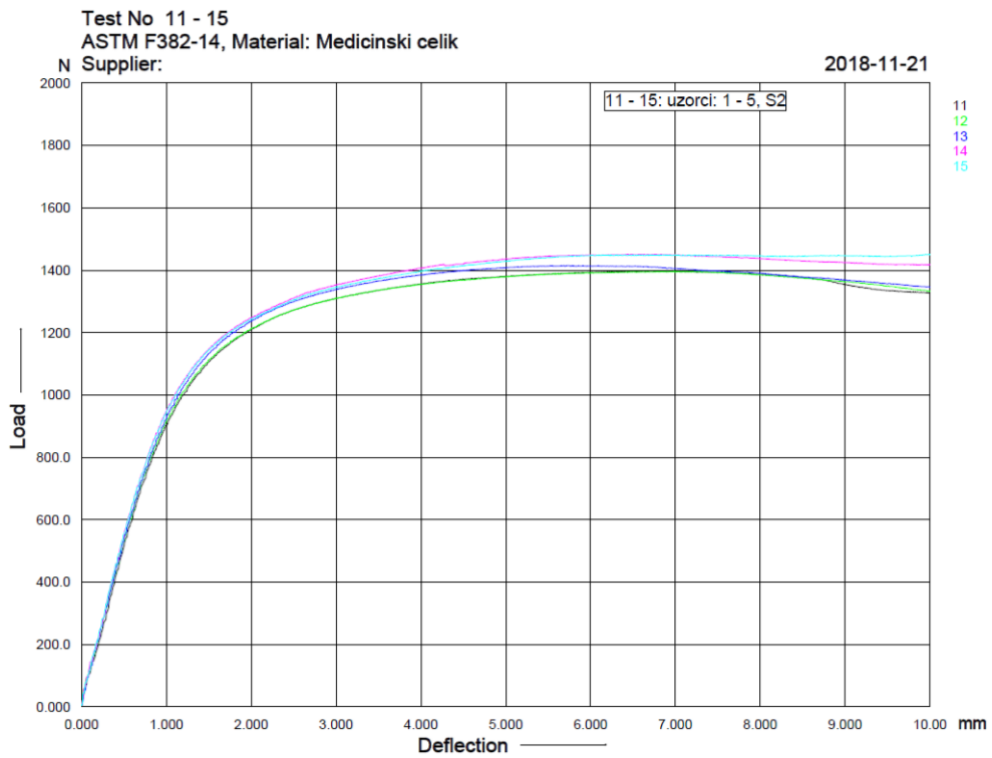
5.2.1. Rezultati statičkog ispitivanja

Rezultati statičkog ispitivanja u obliku dijagrama sila-progib za sve skupine uzoraka prikazani su na slikama od 34 do 37 i u tablicama od 8 do 11. Progib pločica tijekom statičkog ispitivanja savijanjem u tri točke prikazan je na slici 38.

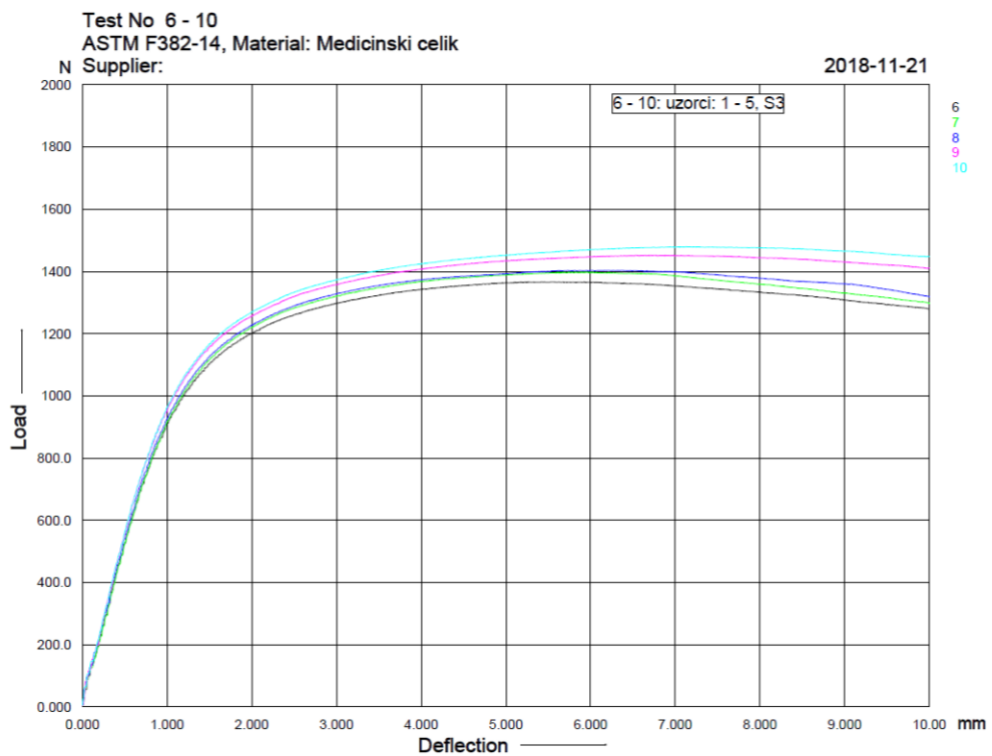
Na slikama od 39 do 46 prikazani su po jedan uzorak pločica iz svake skupine po statičkom opterećenju sprijeda i sa strane.



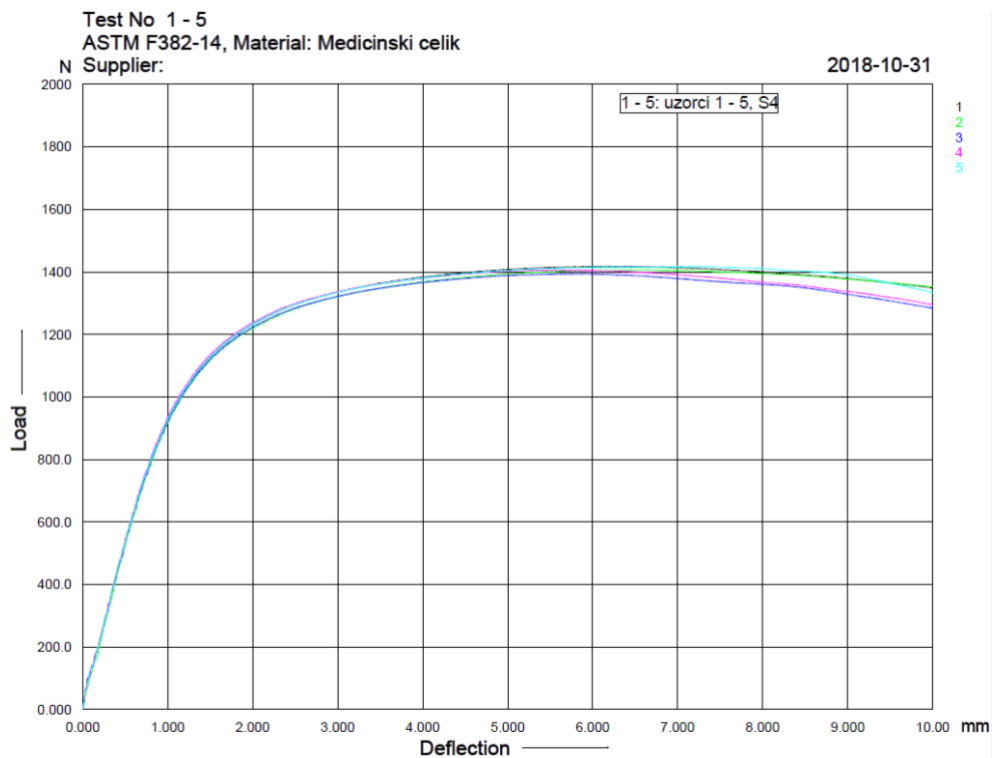
Slika 34. Dijagram sila-progib za skupinu uzoraka S1



Slika 35. Dijagram sila-progib za skupinu uzoraka S2



Slika 36. Dijagram sila-progib za skupinu uzoraka S3



Slika 37. Dijagram sila-progib za skupinu uzoraka S4

Tablica 8. Rezultati statičkog ispitivanja uzoraka skupine S1

Uzorak	Maksimalna sila N	Maksimalni progib mm
1	1409	5,718
2	1421	6,612
3	1411	5,723
4	1503	6,322
5	1480	6,258
Sred. vrijednost	1445	6,127
Stand. devijacija	43,64	0,394

Tablica 9. Rezultati statičkog ispitivanja uzoraka skupine S2

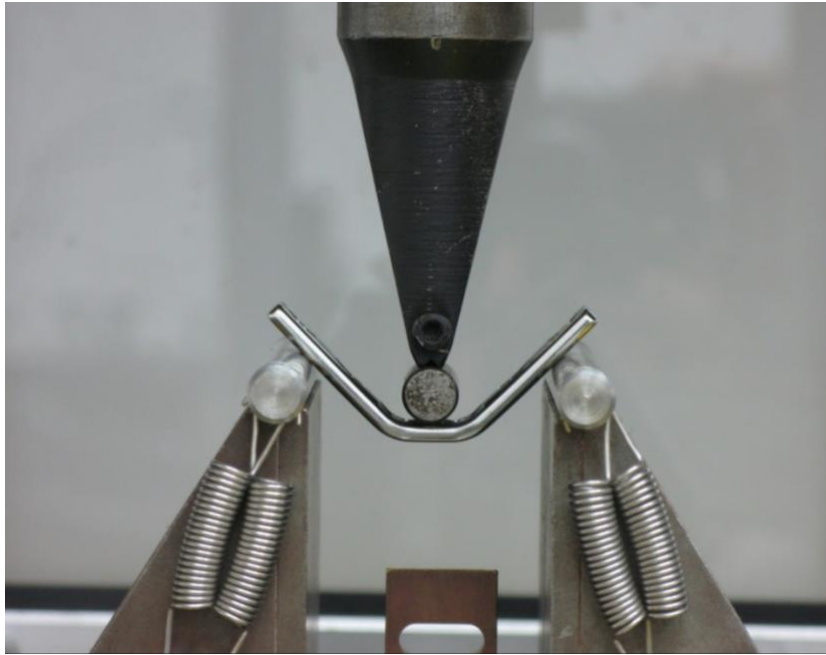
Uzorak	Maksimalna sila N	Maksimalni progib mm
1	1398	6,703
2	1397	6,991
3	1415	5,524
4	1451	6,418
5	1449	6,134
Sred. vrijednost	1422	6,354
Stand. devijacija	26,55	0,563

Tablica 10. Rezultati statičkog ispitivanja uzoraka skupine S3

Uzorak	Maksimalna sila N	Maksimalni progib mm
1	1366	5,177
2	1397	5,604
3	1403	5,627
4	1452	6,530
5	1480	7,130
Sred. vrijednost	1420	6,014
Stand. devijacija	45,71	0,795

Tablica 11. Rezultati statičkog ispitivanja uzoraka skupine S4

Uzorak	Maksimalna sila N	Maksimalni progib mm
1	1418	6,052
2	1407	6,363
3	1394	5,741
4	1406	5,264
5	1417	6,771
Sred. vrijednost	1408	6,038
Stand. devijacija	9,76	0,577



Slika 38. Maksimalni progib pločice tijekom statičkog ispitivanja



Slika 39. Pločica broj 12 iz prve skupine prikazana sprijeda (pH 7,0) po statičkom opterećenju



Slika 40. Ista pločica broj 12 prikazana sa strane (pH 7,0)



Slika 41. Pločica broj 13 iz druge skupine prikazana sprijeda (pH 6,0) po statičkom opterećenju



Slika 42. Ista pločica broj 13 prikazana sa strane (pH 6,0)



Slika 43. Pločica broj 35 iz treće skupine prikazana sprijeda (pH 5,0) po statičkom opterećenju



Slika 44. Ista pločica broj 35 prikazana sa strane (pH 5,0)



Slika 45. Pločica broj 37 iz četvrte skupine prikazana sprijeda (kontrolna skupina) po statičkom opterećenju



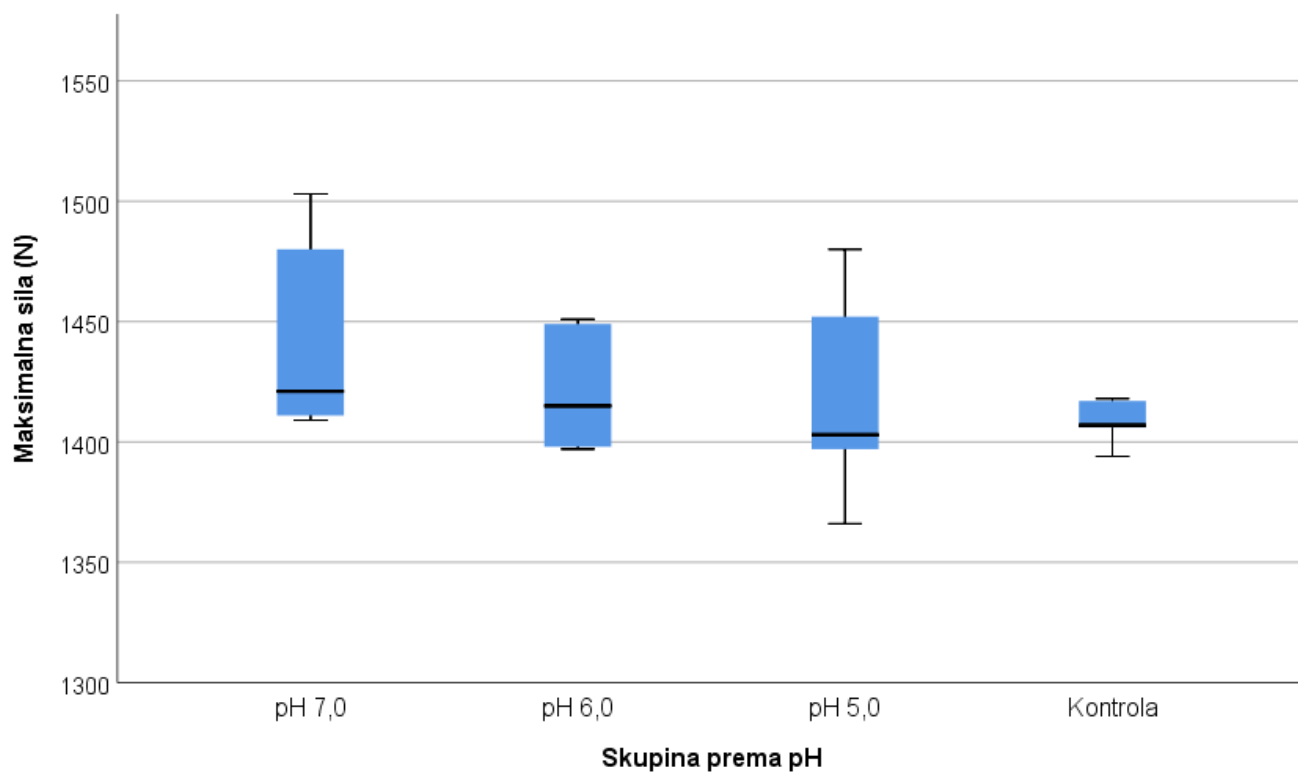
Slika 46. Ista pločica broj 37 prikazana sa strane (kontrolna skupina)

Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija prikazane su u **tablici 12 i na slici 47**. Najniži medijan vrijednosti maksimalne sile bio je kod kontrolne skupine: 1407 N (IQR: 1400 – 1417,5 N), a najviši kod pH 7,0: 1421,0 N (IQR: 1410,0 – 1491,5 N) iako između skupina razlika nije statistički značajna ($p = 0,398$).

Tablica 12. Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija: Kruskal-Wallisov test

Skupina prema pH		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Maksimalna sila (N)	pH 7,0	5	1444,80	43,64	1409	1503	1410,00	1421,00	1491,50
	pH 6,0	5	1422,00	26,55	1397	1451	1397,50	1415,00	1450,00
	pH 5,0	5	1419,60	45,71	1366	1480	1381,50	1403,00	1466,00
	Kontrola	5	1408,40	9,76	1394	1418	1400,00	1407,00	1417,50

	Kruskal-Wallis H	df	P
Maksimalna sila (N)	2,962	3	0,398



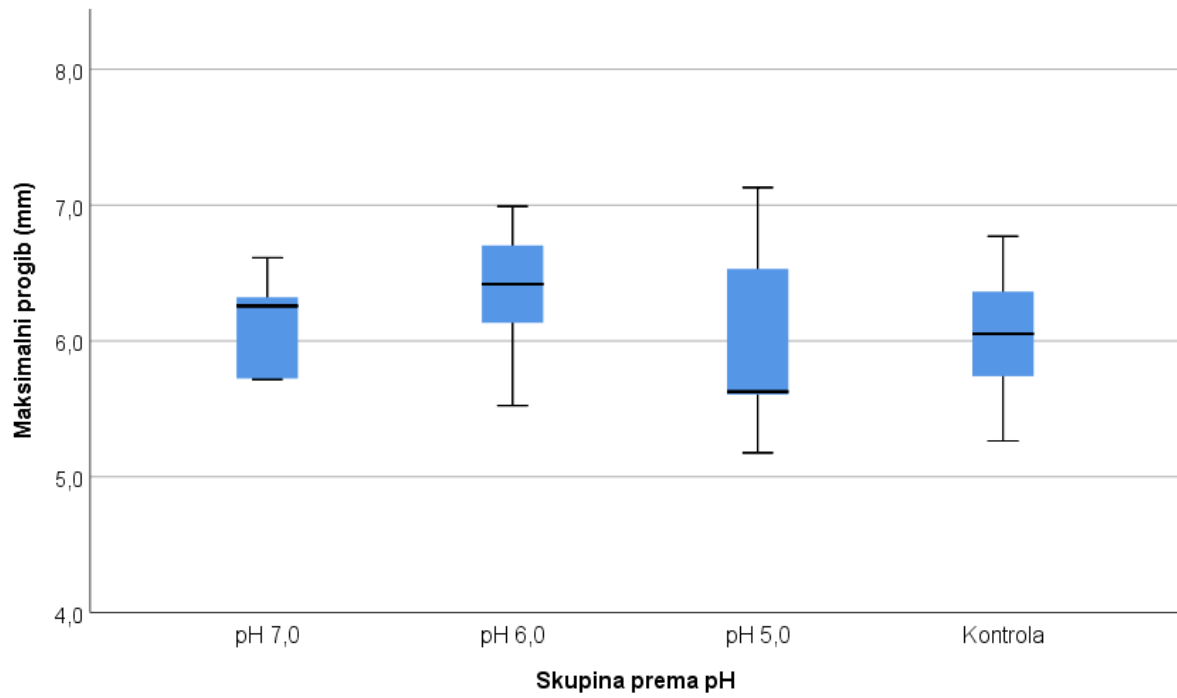
Slika 47. Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija

Razlike u maksimalnom progibu (mm) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija prikazane su u **tablici 13 i na slici 48**. Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima maksimalnog progiba između ispitivanih skupina ($p = 0,804$).

Tablica 13. Razlike u maksimalnom progibu (mm) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija: Kruskal-Wallisov test

Skupina prema pH		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Maksimalni progib (mm)	pH 7,0	5	6,13	0,39	5,718	6,612	5,72	6,26	6,47
	pH 6,0	5	6,35	0,56	5,524	6,991	5,83	6,42	6,85
	pH 5,0	5	6,01	0,80	5,177	7,130	5,39	5,63	6,83
	Kontrola	5	6,04	0,58	5,264	6,771	5,50	6,05	6,57

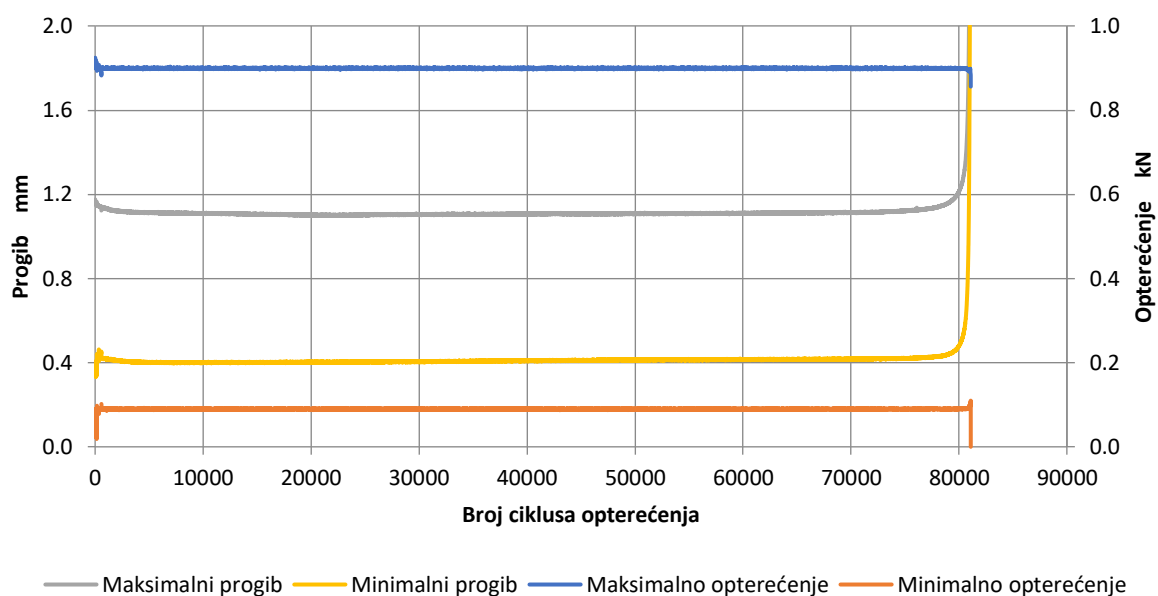
	Kruskal-Wallis H	df	P
Maksimalni progib (mm)	0,989	3	0,804



Slika 48. Razlike u maksimalnom progibu (mm) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija

5.2.2. Rezultati cikličkog ispitivanja

Iz podataka umaralice kao rezultat cikličkih ispitivanja dobiven je broj ciklusa opterećenja do loma pločica. Dijagram promjene maksimalnog i minimalnog progiba u sredini pločice i maksimalnog i minimalnog opterećenja u ovisnosti o broju ciklusa opterećenja do loma za četvrti uzorak iz skupine S4 prikazan je na **slici 49** kao primjer radi vizualnog pojašnjenja. Rezultati za broj ciklusa opterećenja do loma za sve skupine uzoraka dani su u **tablici 14**. Mjesto loma pločica u svakoj pojedinačnoj skupini tijekom cikličkog ispitivanja prikazan je na **slikama od 50 do 57**.



Slika 49. Dijagram promjene progiba i opterećenja u ovisnosti o broju ciklusa opterećenja za četvrti uzorak skupine S4

Tablica 14. Rezultati cikličkog ispitivanja uzoraka za svaku ispitivanu pločicu svih skupina nakon godinu dana od uranjanja u SBF, prikaz broja ciklusa do loma

Uzorak	Broj ciklusa do loma			
	Uzorci S1	Uzorci S2	Uzorci S3	Uzorci S4
1	75839	83911	77081	89918
2	77923	85917	84797	81089
3	90345	93508	83017	83097
4	92739	85346	90757	75104
5	86652	86465	91189	78445
6	88349	61199	80899	97850
7	125864	94681	85069	95885
Sred. vrijednost	91102	84432	84687	85913
Stand. devijacija	16561,4	11065,2	5070,6	8772,9

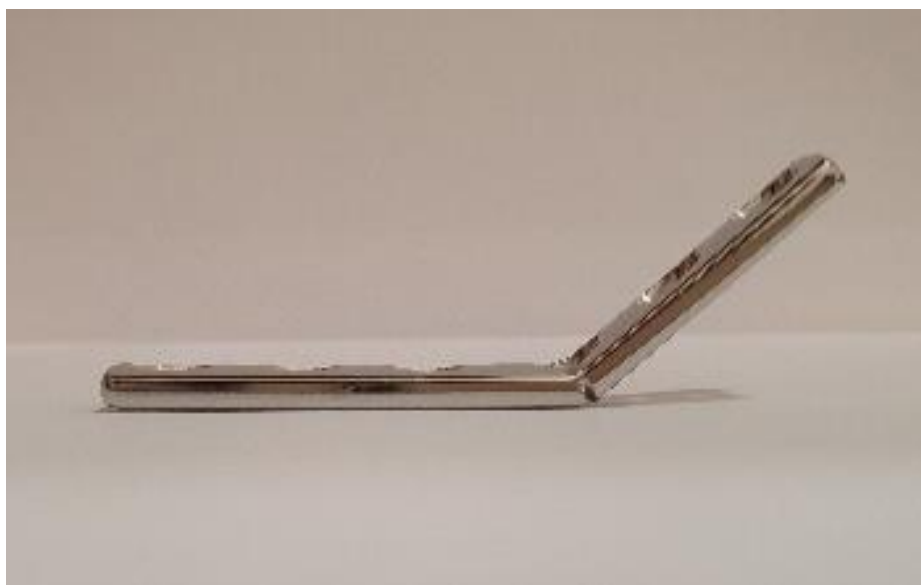
Slike od 50 do 57 prikazuju mjesto loma pločica po cikličkom ispitivanju; prikazane su slomljene pločice (po jedan uzorak iz svake skupine) i zorno prikazano mjesto loma nastalog po dinamičkom cikličkom ispitivanju.



Slika 50. Pločica broj 5 iz prve skupine prikazana sa strane (pH 7,0) po puknuću uslijed cikličkog opterećenja



Slika 51. Ista pločica broj 5 prikazana straga (pH 7,0) po puknuću uslijed cikličkog testiranja; zorno se prikazuje mjesto loma u području otvora pločice najbližoj mjestu primjene opterećenja



Slika 52. Pločica broj 17 iz druge skupine prikazane sa strane (pH 6,0) po puknuću uslijed cikličkog opterećenja



Slika 53. Ista pločica broj 17 prikazana straga (pH 6,0) po puknuću uslijed cikličkog testiranja; zorno se prikazuje mjesto loma u području otvora pločice najbližoj mjestu primjene opterećenja



Slika 54. Pločica broj 33 iz treće skupine prikazana sa strane (pH 5,0) po puknuću uslijed cikličkog opterećenja



Slika 55. Ista pločica broj 33 prikazana straga (pH 5,0) po puknuću uslijed cikličkog testiranja; zorno se prikazuje mjesto loma u području otvora pločice najbližoj mjestu primjene opterećenja



Slika 56. Pločica broj 42 iz četvrte skupine prikazana sa strane (kontrolna skupina) po puknuću uslijed cikličkog opterećenja



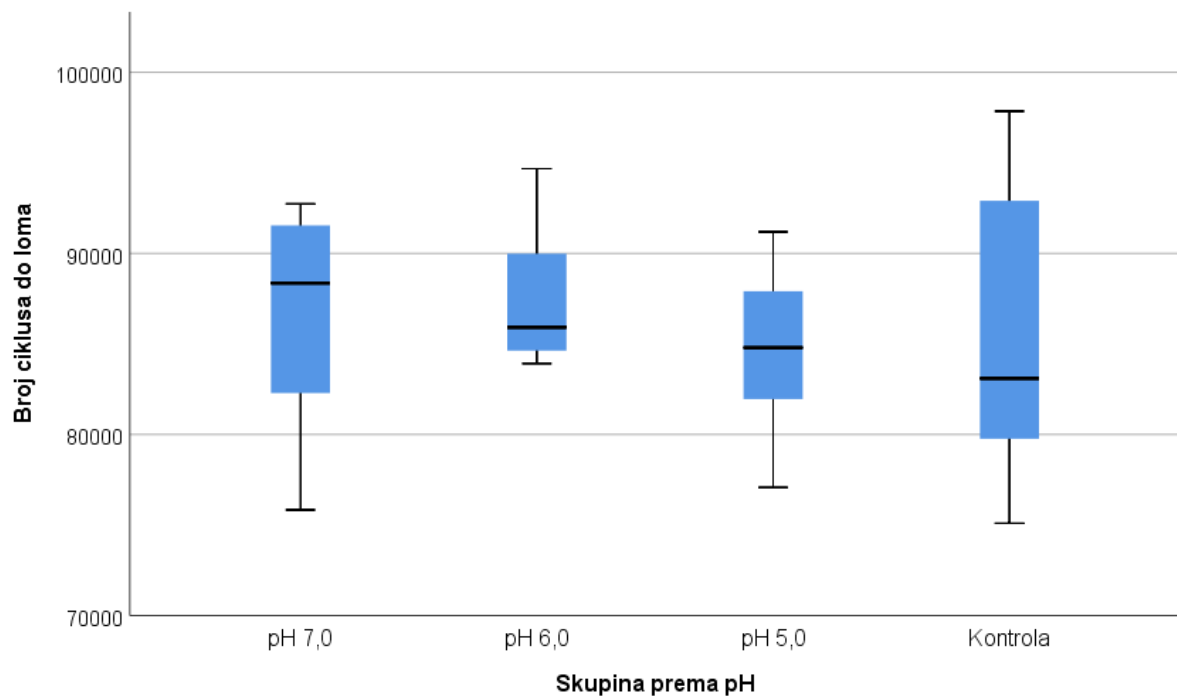
Slika 57. Ista pločica broj 42 prikazana straga (kontrolna skupina) po puknuću uslijed cikličkog testiranja; zorno se prikazuje mjesto loma u području otvora pločice najbližoj mjestu primjene opterećenja

Razlike u broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija prikazane su u **Tablici 15 i na Slici 58**. Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija ($p=0,853$).

Tablica 15. Razlika u broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija: Kruskal-Wallisov test

Skupina prema pH		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Broj ciklusa do loma	pH 7,0	7	91101,57	16561,38	75839	125864	77923,00	88349,00	92739,00
	pH 6,0	7	84432,43	11065,21	61199	94681	83911,00	85917,00	93508,00
	pH 5,0	7	84687,00	5070,63	77081	91189	80899,00	84797,00	90757,00
	Kontrola	7	85912,57	8772,87	75104	97850	78445,00	83097,00	95885,00

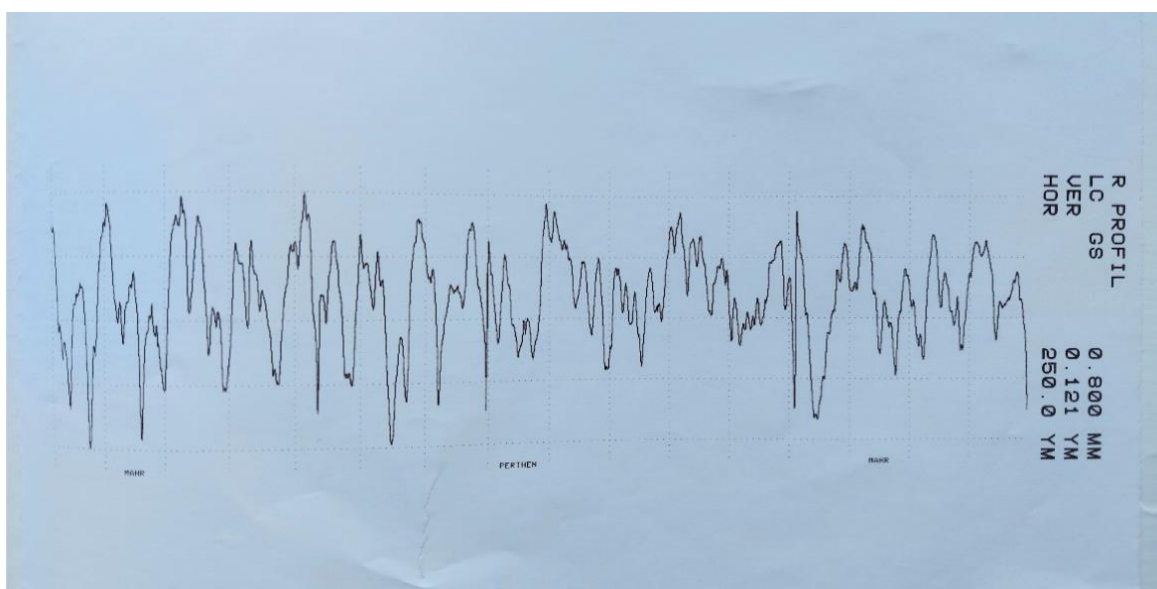
	Kruskal-Wallis H	df	P
Broj ciklusa do loma	0,783	3	0,853



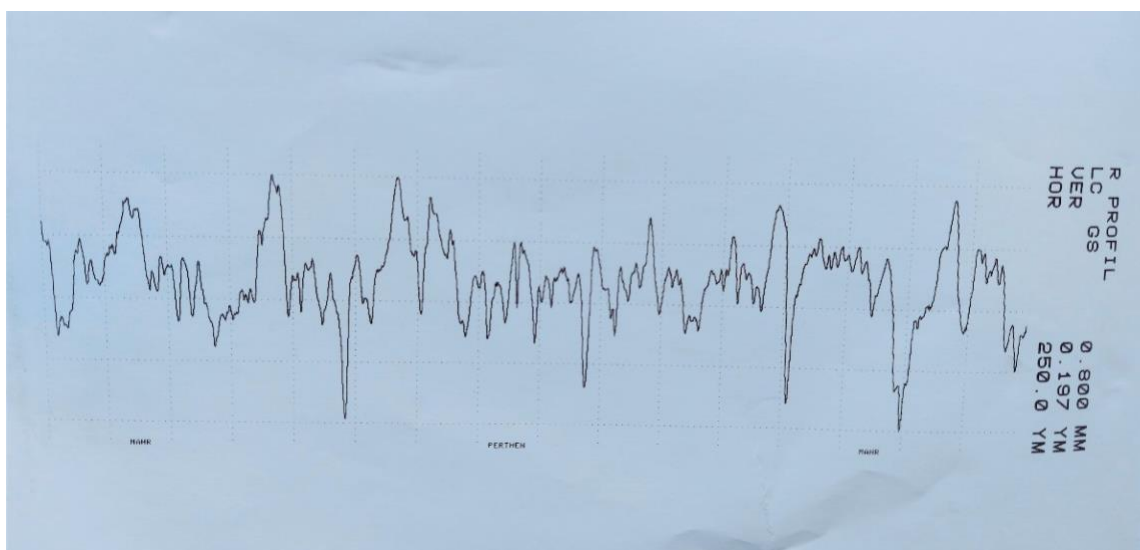
Slika 58. Razlika u broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija

5.3. Rezultati mjerenja hrapavosti pločice i određivanje dubine najdublje jamice

Prikazane su slike (od 59 do 63) grafova dobivenih po mjerenju hrapavosti pločica te je zabilježena dubina najdublje jamice u μm . S obzirom da nema većeg odstupanja u različitim rezultatima mjerenja kod sve četiri pojedinačne skupine, prikazuje se pet slika grafova s najvećim dubinama jamica nevezano iz koje su skupine.



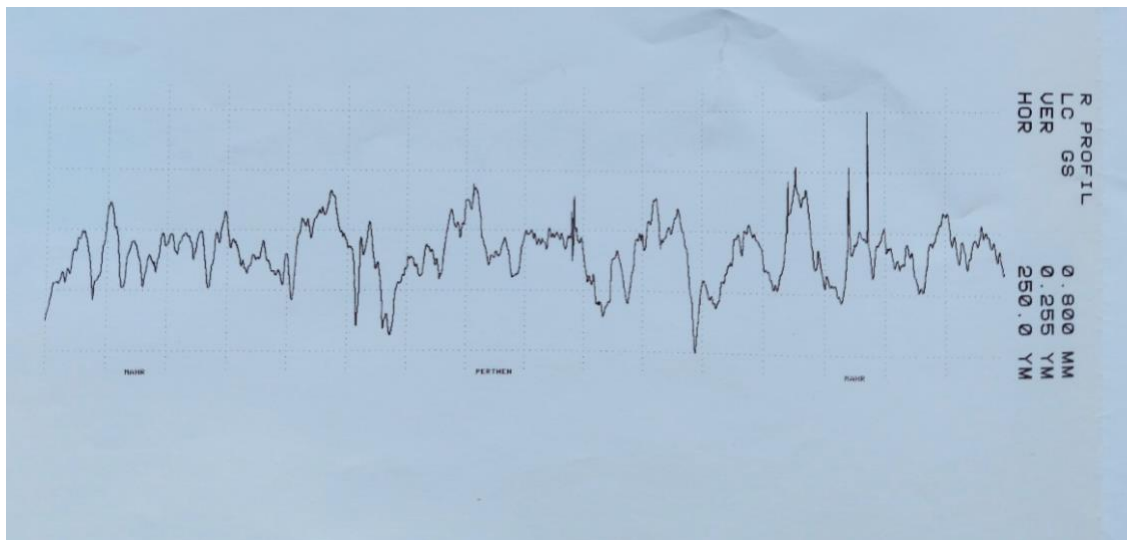
Slika 59. Najveća dubina jamice na prikazanoj slici grafa mjeri 0,121 μm



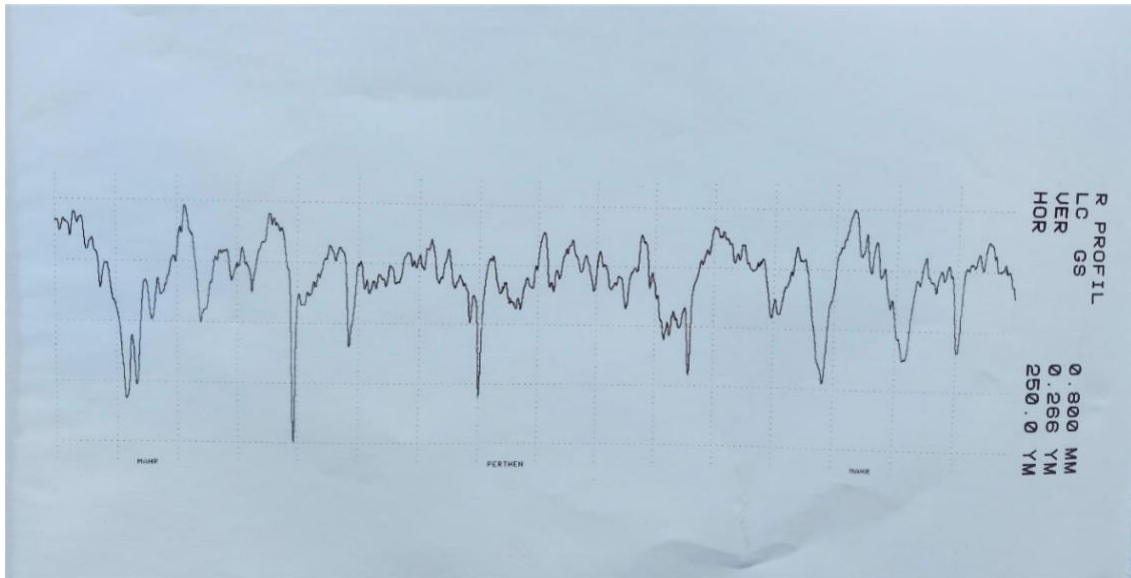
Slika 60. Najveća dubina jamice na prikazanoj slici grafa mjeri 0,197 μm



Slika 61. Najveća dubina jamice na prikazanoj slici grafa mjeri 0,229 μm



Slika 62. Najveća dubina jamice na prikazanoj slici grafa mjeri 0,255 μm



Slika 63. Najveća dubina jamice na prikazanoj slici grafa mjeri 0,266 μm (najdublja izmjerena)

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja su odbacili hipotezu da zbog promjene u mikrostrukturi implantata posljedično dolazi do slabljenja mehaničkih svojstva osteosintetskih implantata izrađenih od nehrđajućeg čelika 316L, iako je potvrđeno da biološka okolina utječe na te implantate zbog pojave jamičaste korozivne promjene.

U sistemu ovog mjerenja se pokazalo da je površina uzoraka pločica izrađenih od nehrđajućeg čelika 316L hrapava u istoj mjeri te da izmjerena najdublja jamica nije referentna za daljnja određivanja mjerenja koja bi utjecala na postavljanje optimuma debljine pločice i pasivnog sloja (94, 95), a koji je bio jedan od specijalnih ciljeva. Određivanje dubine najdublje jamice mjerenjem hrapavosti pokazalo je da je najdublja jamica izmjerena bila 0,266 μm . Smatramo da je potrebno nastaviti daljnja istraživanja za postavljanje predloženog optimuma; i to iz više razloga koja su detaljnije pojašnjena u daljnjem tekstu ove disertacije.

Prilikom prijeloma ili osteotomije kostiju kod ljudi u koštano-zglobnoj kirurgiji koriste se različiti implantati za stabilizaciju odnosno fiksaciju ulomaka. Postoje raznorazni modeli i materijali koji se koriste za izradu implantata, a u ovoj doktorskoj disertaciji se istražuju pločice nehrđajućeg čelika 316L kao najrasprostranjenijeg u svijetu. Kao i u svakoj metodi stabilizacije pa tako i u ovoj, nailazi se na poteškoće i moguće komplikacije kao što je neuspjeh, odnosno puknuće pločica dugo nakon ugradnje, a katkada se to dogodi i prije izvršenja cilja osteosinteze, tj. stabilizacije, koja za posljedicu ima produljeno cijeljenje kosti ili da se cijeljenje uopće ne dogodi.

Jamičasta korozija je jedan od potencijalnih razloga posljedičnog neuspjeha. Ta pojava kod nehrđajućeg čelika 316L je poznata i opisana te se tijekom povijesti usavršavaju tehnike kako bi eliminirale taj faktor, no i dalje predstavlja neizbježnu nesavršenost u implantatima izrađenim od tih materijala, kao što se i potvrdilo u ovom istraživanju. Također je poznato da te korozijske promjene propagiraju uz prisutnost iona vodika koji su sveprisutni u biološkom mediju, a naročito u kiselijem mediju, što se upravo i bilježilo u ovom istraživanju.

Utjecaj SBF na jamičastu koroziju implantata od nehrđajućeg čelika 316L

U kontaktu bilo koja dva ili više materijala koji imaju različite sastojke, a naročito ako su u različitim fizičkim stanjima, neizbježna je interakcija, pa tako i kod interakcije nehrđajućeg čelika 316L i okolnog ljudskog tkiva koji okružuje implantat tijekom i nakon dinamičkog procesa zarašćivanja mekog tkiva i same kosti. Uspoređujući korozijske promjene koje su mjerene tijekom istraživanja ove doktorske disertacije, statističko značajna razlika se načelno pokazala u broju korozijskih jamica, i to kod onih implantata koji su uronjeni u najkiseliju otopinu što je bila pretpostavka u hipotezi. S obzirom da je koštano cijeljenje dinamički proces koji traje između 1 - 2 godine, a prema nekim autorima i znatno dulje, može nastati diskusija oko pitanje redovne pregradnje kosti i stvarnog cijeljenja u užem smislu značenja te je tako i medij oko prijelomnog/osteotomiranog područja dinamičan. Ova disertacija se usredotočila na promjenu pH vrijednosti kao dinamički faktor te su se analizirale promjene koje su nastale u otopinama s 3 različite pH vrijednosti koje simuliraju različite faze kiselosti, odnosno različite pH vrijednosti tijekom cijeljenja. Dosadašnje *in vitro* studije nisu uključivale tu dinamiku, a studije koje su retrogradno analizirale implantate SEM-om na mjestu neuspjeha/loma su utemeljene isključivo na pretpostavkama o tome što je kao razlog moglo dovesti do dotičnog loma. S obzirom da je jamičasta korozija jedna od dviju najčešćih korozija u nehrđajućem čeliku uz pukotinsku koroziju, namjera je bila baš tu vrstu nesavršenosti istražiti u simuliranom biološkom mediju.

Čini se da su se stvorile brojne nove jamice u svim mjerenjima (1. - 4.), no činjenica je da je najveći broj jamica nastao nakon 6 i 12 mjeseci, uz to što su najizraženije promjene bile u skupini pločica koja je bila uronjena u otopinu s pH vrijednosti 5 kao što smo već naveli.

U kiselijem mediju nastaje znatno više iona vodika koji su, čini se, glavni razlog za ovakve rezultate.

Utjecaj jamičaste korozije na promjenu mehaničkog svojstva implantata

Kada se govori o koroziji metala, neizbježno je razmišljati o pogoršanju kvalitete istih te smanjenju vijeka trajnosti. Kao što je poznato, jamičasta korozija interferira u savršenost pasivnog filma, i kao što se dokazalo u ovom istraživanju, nesavršenosti jamičastom korozijom progrediraju te na taj način implantat postaje manjkave kvalitete. Iako promjene u ovom istraživanju nisu statistički značajne kod rezultata ovog dijela, postoji tendencija ka smanjenju praga potrebne sile koja uzrokuje slabljenje pločica koje su bile uranjane u otopini niže pH vrijednosti, a također je znatno uži raspon vrijednosti tih sila kod iste skupine pločica. Jasno je ovdje kako kiseliji medij neizravno vodi sigurnijem neuspjehu implantata na način da smanjuje upravo prag i raspon potrebne sile. Svakako se razmišljalo i o tome

kako porozitet novijih implantata nehrđajućeg čelika ima veću otpornost na silu zbog veće površine, kao i zbog bolje oseintegracije, te se pokušala povući paralela u tumačenju te tendencije u proizvodnji i u ovim rezultatima. Može se reći da ovakva vrsta „poroziteta“, koja se proučavala u ovoj doktorskoj disertaciji, nije tvornički planirana te slijedom događaja smatra se nesavršenostima koje su nejednake za razliku od onih kod poroznih implantata. Nadalje, ovdje se radi o dinamičkom procesu, tj. te jamičaste nesavršenosti ne miruju, ni u broju ni u veličini kao što se ovdje pokazalo. Sve su to razlozi koji ih jasno razlikuju od tvorničkog poroznog proizvoda. Postoje mnogobrojna istraživanja koja su detaljno analizirala mjesto puknuća implantata te su se postavljale pretpostavke o razlozima puknuća, kao i okidač tog samog procesa pucanja. Jasno je da je sila opterećenja faktor koja može dovesti do puknuća u određenom stadiju, no zasigurno je da prethode mikro razlozi, kao što su u ovoj disertaciji oštećenja jamičaste korozije.

Promjena pH vrijednosti kod mjesta cijeljenja loma

Provodeći istraživanje ove disertacije, jedna od ključnih stavki koja se razmatrala jest da se kiselost, odnosno pH vrijednost lokalnog okruženja mjesta cijeljenja kosti mijenja ovisno o fazama cijeljenja. Jasno je da postoji različitost unutar vrsta cijeljenja kao što je u uvodnom dijelu pojašnjeno, te da primjerice kod viševrsta prijeloma kosti, postoji komponenta sekundarnog cijeljenja uz ono primarno, a to je bitno naglasiti kako bi se uzela u obzir različitost u dinamici cijeljenja, kao i različita vremena izloženosti različitim vrijednostima pH medija. U svakom slučaju, mijenja se pH vrijednost okolnog područja koji izravno utječe na sastav implantata.

U početku kada je medij kiseliji zbog hematoma, dolazi do sniženja pH vrijednosti upravo zbog hematoma i zbivanja tijekom upalne faze koje traju 10 - 14 dana (1. mjerenje) te na taj način značajno interferira s površinom implantata nehrđajućeg čelika 316L u slučaju ove doktorske disertacije, na početku s pasivirajućim slojem, a kasnije, ukoliko se nastavi agresivniji kiseliji medij, interferira sve do same legure metala. Osteoklasti i osteoblasti uzajamno sudjeluju u sljedećim fazama cijeljenja kosti (2. - 4. mjerenje) te se njihova koncentracija u danim razdobljima različito mijenja. Na taj način razdoblja kada dominiraju osteoklasti su ona razdoblja kada je kiselija okolina s obzirom na lizozimske enzime koje luče osteoklasti (96) i ione vodika budući da pH vrijednost, prema nekim autorima, može dosegnuti i lokalni minimum od pH 4,0 (79). S druge strane, razdoblja kada dominiraju osteoblasti su ta kada vladaju manje kisela razdoblja zbog izlučivanja alkalne fosfataze i ostale manje kisele sekrecije osteoblasta te u tom slučaju nadvlada veća pH vrijednost lokalno. Također su brojni faktori koji

općenito mijenjaju pH vrijednost tjelesnog medija, a to su primjerice izraženi stresni faktori, iscrpna tjelovježba, acido-bazni disbalans kod metaboličkih bolesti itd.

Dovršetak cijeljenja loma ili osteotomije kosti nastaje nakon 1 - 2 godine, što je najčešće vrijeme kada se u praksi odstranjuje osteosintetski materijal uz pretpostavku da je zaista kost zacijelila. No kako se ranije u ovoj doktorskoj disertaciji navodi, katkada ne dolazi do cijeljenja kosti te katkada osteosintetski materijal (implantat) preuranjeno oslabi do trenutka puknuća, i to je upravo tema ovog istraživanja.

Kako je ranije spomenuto, nije u potpunosti razjašnjen tijek cijeljenja kosti nakon osteotomije, ali se pretpostavlja da slijedi isti tijek kao i kod cijeljenja kosti prilikom loma. Tako se u ovom istraživanju uključuje i cijeljenje kod osteotomije kao supstrat za promjenu kiselosti (pH vrijednosti) biološkog medija u čijoj se uskoj blizini koriste implantati izrađeni od nehrđajućeg čelika. U konačnici, sami koštani sustav je u konstantnoj pregradnji u kojoj sudjeluje kao ključni faktor; osteoblasti i osteoklasti koji su istovremeno prisutni na različitim mikrolokacijama te aktivno izlučuju svoje tvari koje utječu na bezbroj zbivanja pa tako i na pH vrijednost upravo te iste mikrookoline.

Statistička obrada rezultata je podijeljena u 5 dijelova kako slijedi:

1. Razlike u ukupnom broju jamica između pojedinih mjerenja ovisno o kiselosti medija
2. Površina jamica (μm^2) ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih mjerenja
3. Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija
4. Razlike u maksimalnom progibu (mm) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija
5. Razlika u broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija.

1. Razlike u ukupnom broju jamica između pojedinih mjerenja ovisno o kiselosti medija

Analiza varijanci pokazuje da je značajna razlika u broju jamica u najkiselijem mediju (pH 5,0) u odnosu na broj jamica u onom pH vrijednosti 7,0 i 6,0 ($p = 0.005$, $p = 0.003$ redom) u četvrtom mjerenju, a koje se vršilo nakon godinu dana uranjanja.

Vremenska komponenta je jedan od ključnih faktora kod uranjanja implantata u SBF kako se ovdje dokazalo te je ta činjenica istraživana u prethodnim studijima no ne u ovako specifičnim intervalima kao kod ove doktorske disertacije (tablica 4).

Tek se kod 2. mjerenja, što je mjesec dana nakon uranjanja uzoraka u otopinama različitih pH vrijednosti, primjećuje razlika koja ukazuje na to da utjecaj medija od pH 5,0 na implantate zamjetno uvećava broj korozivskih jamica, a taj trend se nastavlja i kod 3. i 4. mjerenja i to sa statistički značajnom razlikom ($p = 0,006$, $p = 0,003$ redom). Kako se ranije u uvodnom dijelu ove disertacije pojašnjavao utjecaj kiselog medija i slobodnih vodikovih iona na inicijaciju, ali i na propagaciju jamica, može se reći da je gotovo nemoguće očekivati značajno oštećenje po tipu jamičaste korozije ispod mjesec dana od osteosinteze. Ovu spoznaju podupiru istraživanja u kojoj su se analizirali neuspjesi u ortopedsko-traumatološkim implantatima izrađenima od nehrđajućeg čelika 316L. Nadalje, u ovom dijelu rezultati ukazuju na određenu pojavu, a ta je da bi implantat vjerojatno bio najugroženiji na jamičastu koroziju pod utjecajem biološkog medija te je nastajanje takvog oštećenje neminovno nakon godine dana od uranjanja u SBF.

Niža pH vrijednost

Kako se pokazalo u ovom istraživanju, niža pH vrijednost značajno utječe na stvaranje novih jamica, ali i na njihovu propagaciju. S obzirom da je brojanje jamica bilo na limitiranom neponovljivoj vidnom polju, te je najvjerojatnije da se na prilagođenom uvećanju SEM-a nisu pokazale brojne manje jamice kao što je pojašnjeno u dijelu metoda ove disertacije, moguće je da je brojanje jamica bilo u različitom polju koji je jatrogeno imao manji broj korozivskih jamica, ili da su novostvorene jamice zapravo već postojeće jamice koje su se samo uvećale s vremenom po uranjanju pločica, te su tek kasnije postale vidljive na prilagođenom uvećanju korištenog SEM-a. U bilo kojem od navedenih slučajeva ili čak u slučaju njihove kombinacije, pokazalo se da pH vrijednost od 5,0 stvara znatno veći broj oštećenja po tipu jamičaste korozije već nakon 6 mjeseci od takvog izlaganja. Postavlja se pitanje je li ta pH vrijednost realna tj. je li postojana u tom razdoblju u okolišu kostiju i mišića našeg tijela. Pretpostavlja se da je moguće, s obzirom na utjecaj osteoklasta i lizozimskih enzima kao što je ranije pojašnjeno u uvodnom dijelu, stvoriti mikrookoliš čak do 4,0 pH vrijednosti, iako nije jasno koliko ta razina kiselosti može trajati (79).

2. Površina jamica (μm^2) ovisno o kiselosti medija tijekom pojedinih mjerenja

Značajne statističke razlike su se zabilježile tek u četvrtom, odnosno zadnjem mjerenju u ukupnoj površini uzoraka pločica te se nije našla značajna razlika u izmjerenim ukupnim površinama po uzorku a ovisno o skupini različitih kiselosti. Površine jamica nisu slijedile određeni trend koji bi se mogao povezati s medijima različitih pH vrijednosti, a koje su mjerene u kvadratnim mikrometrima (μm^2).

Ako promatramo dinamiku promjena unutar pojedinih skupina, značajne razlike su zabilježene samo u skupini s pH 6,0 ($p = 0,001$). Nije sasvim jasan razlog ove dinamike s obzirom da je hipoteza bila ta da što je kiselij medij uronjenih implantata, to je veća promjena mikrostrukture. S obzirom na značajnu statističku razliku u samom broju nastalih korozivskih jamica koja se našla u najvećoj količini u skupini najkiselijeg medija, smatramo da je najvjerojatniji razlog ovome da površina jamice, tj. površina otvora jamice, a jamica je sama po sebi trodimenzionalna struktura, nije egzaktna mjera kojom se mogu referirati stvarne promjene veličine jamice. Smatra se da bi bilo najadekvatnije mjeriti volumen jamice ne bi li se mjerila promjena jamice u cijelosti, a ne samo otvor jamice, no s obzirom na nepravilnost korozivskih jamica i na neproporcionalnost otvora, vjerojatno je da bi za ovakvo mjerenje bilo nužno zasebno istraživanje koje bi se posvetilo isključivo tim mjerenjima. Također se predlaže da se ta mjerenja povežu s mehaničkim opterećenjima, bilo statički ili ciklički te bi se na temelju toga mogla naći potencijalna statistička značajnost. U odnosu na mehanizam propagacije korozivskih jamica kojima je najbitnija stavka da imaju ulaz, tj. otvor jamice, navedena pretpostavka se smatra prihvatljivom.

3. Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija

Nije se našla statistički značajna razlika ($p = 0,398$) u maksimalnoj sili tijekom statičkog opterećenja pločica uronjenih u različitim otopinama različite kiselosti. Unatoč tomu, jasno je da ipak u najkiselijem mediju, tj. u 3. skupini (pH 5,0), maksimalna sila koja je iznosila 1419,60 N manja od maksimalne sile 2. i 1. skupine (pH 6,0 i 7,0 redom) tijekom statičkog opterećenja pločica, a iznosi su 1422,00 N i 1444,80 N redom. Također je maksimalna sila tijekom statičkog opterećenja bila manja u 2. skupini u usporedbi s onom u 1. skupini, a koja je najmanje kisela.

Analizirajući minimalnu odnosno maksimalnu silu opterećenja unutar skupina, minimalna potrebna sila je također slijedila sličan trend, tako je ta sila bila najmanja u najkiselijoj trećoj skupini (pH 5,0), a iznosila je 1366 N, dok je najveća bila u prvoj skupini s najmanjom kiselošću (pH 7,0), a iznosila je 1409 N. Paradoksalno, kod maksimalnih sila koje su se bilježile, čak je u trećoj skupini (pH 5,0)

maksimalna sila iznosila 1480 N, koja je bila veća od iste u drugoj i četvrtoj skupini (pH 6,0 i kontrolna skupina) koje su iznosile 1451 N i 1418 N redom, dok je za prvu skupinu (pH 7,0) ta sila bila najveća te je iznosila 1503 N. Hipoteza da bi implantati izrađeni od nehrđajućeg čelika 316L mehanički oslabjeli uslijed promjene mikrostrukture po tipu jamičaste korozije, a koja ovisi o kiselosti medija u kojima se nalaze, u ovom dijelu se nije dokazala. Ovdje se mora naglasiti da bi se trebalo provesti istraživanje koje analizira implantate ovog materijala nakon vremenskog razdoblja duljeg od ovog od godinu dana. U ovoj doktorskoj disertaciji se smatra da se hipoteza nije dokazala unutar zadanog vremena te se ne odbacuje ista ukoliko se vremensko razdoblje produlji na razdoblje dulje od godinu dana.

Svakako se smatra da bi opisane promjene koje nastaju mogle utjecati na stvaranje „slabe točke“ koje sa statičkim tipom mehaničkog opterećenja uzrokuju potencijalni lom. Gornji ekstremiteti se većinom izlažu mehaničkim statičkim opterećenjima, dok se donji ekstremiteti u većoj mjeri izlažu cikličkim opterećenjima, te se ova stavka svakako treba uzeti u obzir kod budućeg istraživanja s obzirom da se u ovoj disertaciji nije posebno naglašavala razlika u različitim mehaničkim opterećenjima ovisno o potencijalnom smještaju implantata.

4. Razlike u maksimalnom progibu (mm) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina ovisno o kiselosti medija

Također nije bilo značajnih razlika između maksimalnog opterećenja progiba i kiselost medija u kojima su implantati bili uronjeni bez obzira na značajnu opisanu promjenu mikrostrukture koja je bila najznačajnija kod skupine najkiselijeg medija (pH 5,0). Čini se da slabljenje osteosintetskog materijala izrađenog od nehrđajućeg čelika 316L nakon godinu dana uranjanja u otopinama različitih pH vrijednosti nije utjecalo na vrijednost potrebnog opterećenja na progib. Dinamičke promjene (promjene u vremenu) po tipu jamičaste korozije koje su rezultirale prilikom promjene pH vrijednosti tijekom godine dana uranjanja, pokazale su se beznačajne kada je u pitanju njihov utjecaj na slabljenje osteosintetskog materijala. Tako srednja vrijednost maksimalnog progiba u skupinama 1 - 4 redom je mjerila 6,127 mm, 6,354 mm, 6,014 mm i 6,038 mm. Unatoč tomu, detaljnijom analizom se pokazalo da je maksimalni progib ipak bio najveći kod treće najkiselije skupine (pH 5,0), a mjerio je 7,130 mm kod pojedinačnog uzorka pločice, dok je ta vrijednost postupno opadala kako se pH vrijednost povećavala, tj. u manje kiselom mediju, tako mjereći maksimalni progib 6,991 mm u drugoj skupini (pH 6,0) i 6,612 mm u prvoj skupini (pH 7,0). Kod kontrolne 4. skupine izmjeren je maksimalni progib 6,771 mm, što se ne može uklopiti u navedeni slijed. Također srednja vrijednost maksimalne sile slijedi sličan trend, tako ta vrijednost iznosi 1445 N u prvoj skupini, 1422 N u drugoj, i 1420 N u trećoj

najkiselijoj skupini. I u ovoj analizi se kontrolna skupina ne može uklopiti s obzirom da srednja vrijednost maksimalne sile iznosi 1408 N.

Kao što je to u prvoj točki navedeno, i ovdje se može zaključiti da se hipoteza o utjecaju promjene mikrostrukture implantata zbog promjene jamičaste korozije na slabljenje istih nije potvrdila. Mehaničke statičke sile kojima su izloženi i gornji i donji ekstremiteti u sličnoj mjeri, utječu samo u neznatnoj mjeri na slabljenje odnosno progib implantata od nehrđajućeg čelika 316L nakon godinu dana po uranjanju u različite otopine pH vrijednosti kao što se pokazalo u ovoj disertaciji, no svakako se preporučuje daljnje istraživanje ove točke tijekom duljeg razdoblja, također uz uključivanje mehaničkog cikličkog opterećenja simulirajući donje ekstremitete te tako pretpostavljamo da bi bilo značajne razlike zbog više uključenih čimbenika kao što su vrijeme i dodavanje različitih sila. Ukoliko se utvrdi budućim eventualnim istraživanjima, postavljali bi pitanje odstranjivanje implantata po izvršenju svoje svrhe, tj. potpunom cijeljenju prijeloma ili osteotomije.

5. Razlika u broju ciklusa do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrijednostima broja ciklusa koje dovode do loma tijekom cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija ($p = 0,853$).

Broj ciklusa. Srednja vrijednost broja ciklusa do loma je bila slična u svim skupinama iako su zabilježene manje razlike, no te razlike nisu jasno slijedile trend koji se hipotetski postavljao, a to je da što je uzorak uronjen u medij veće kiselosti, to je manji broj ciklusa opterećenja potreban da bi se dovelo do loma uzoraka pločica. Srednja vrijednost broja ciklusa do loma uzorka u najkiselijoj skupini (pH 5,0) bila je 84687, a ta vrijednost je iznosila 85913 kod kontrolne neuronjene skupine. Za ista mjerenja u prvoj i drugoj skupini (pH 7,0 i 6,0 redom) vrijednosti su iznosile 91102 i 84432 redom. Može se zaključiti da značajne promjene mikrostrukture uzoraka pločica ne utječu na slabljenje istih bez obzira na opsežnost tih promjena, a koja je ovisna o kiselosti medija u kojem se implantat uranja.

Lom pločica je nastao nakon određenog broja ciklusa ovisno o pojedinačnoj pločici bez obzira na skupinu kojoj pripada pa se tako zabilježilo da je najveći broj ciklusa do loma kod pojedinačne pločice prve skupine (pH 7,0) iznosio 125864, što je znatno veći broj te znatno odskače od bilo kojeg broja ciklusa potrebnog do loma pločica kontrolne skupine ili ostale dvije skupine uronjenih pločica. Osim te iznimke zanimljivo je da pločica koja se slomila nakon najmanjeg broja ciklusa, a to je 61199, pripada drugoj skupini (pH 6,0). Hipoteza je da bi se taj najmanji broj ciklusa koji dovodi do loma

pločice testiranih uzoraka nalazio u uzorcima treće najkiselije skupine (pH 5,0), a koja se jasno odbacila iako je odbacivanje osnovano na srednjim vrijednostima, a ne ovim iznimkama.

Lom pločica je u svim uzorcima nastao na sličnoj lokaciji bez obzira na potreban broj ciklusa koji prethodi; na mjestu otvora za vijke u jednom od šest otvora koji je najbliži sredini pločice, odnosno mjestu same sile. Ovaj rezultat ne iznenađuje s obzirom na strukturu pločice u tom dijelu, iako je u realnom kliničko-biološkom stanju ta raspodjela sile vjerojatno drugačija te pretpostavljamo da, ukoliko se slijede ispravni principi postavljanja pločice i vijaka koje ih fiksiraju za kost, raspodjela sile je značajno ujednačena kroz pločicu te je vjerojatno da bi realno trebao veći broj cikličkog opterećenja koji bi doveo do loma.

Također se u ovoj disertaciji istraživanje provelo isključivo promatrajući promjene mikrostrukture po tipu jamičaste korozije te se nisu promatrali ostali oblici korozije po tipu korozije u procijepu i habanje koji također dodatno mijenjaju mikrostrukturu ovih implantata.

7. ZAKLJUČAK

Svojstva implantata od nehrđajućeg čelika 316L koji imaju široku primjenu u koštano-zglobnoj kirurgiji se i dalje analiziraju te i dalje postoje brojna pitanja kojima je potrebno posvetiti istraživanja. U ovoj disertaciji se analizirala povezanost promjene po tipu jamičaste korozije koja je jedna od najčešćih promjena ovog tipa implantata te slabljenje samog implantata tijekom različitih faza cijeljenja kosti u simuliranom biološkom mediju. Ova tema se do sada nije istražila na ovaj sveobuhvatni način koji je najbliži događajima u pravom vremenu tijekom cijeljenja kosti.

- SEM-om se potvrdilo da **jamičasta korozija** utječe značajno na **promjenu mikrostrukture** ovih implantata od nehrđajućeg čelika 316L uronjenih u simulirani biološki medij različitih pH vrijednosti koje ovise o fazi cijeljenja prelomljenih ili osteotomiranih kostiju. Statistički značajne promjene mikrostrukture su se bilježile tek pri 3. i 4. mjerenju (nakon 6 i 12 mjeseci redom), a u početnoj fazi ispitivanja ove promjene nisu bile statistički značajne. Broj i površina korozijskih jamica su se odvojeno promatrali i statistički obradili kao dva nadopunjavajuća entiteta koji opisuju te promjene mikrostrukture. Pri analizi broja jamica, a pri 3. mjerenju p-vrijednost je iznosila 0,006 te se povećavala značajnost pri 4. i zadnjem mjerenju do p-vrijednosti 0,003. Statistički značajne promjene prilikom analize površine korozijskih jamica su se bilježile tek pri 4. mjerenju te je p-vrijednost iznosila 0,027.
- Potvrdilo se da **vrijeme uranjanja** implantata u simuliranom biološkom mediju utječe poticajno na **progresiju jamičaste korozije**. To se bilježi u značajnoj mjeri nakon 6 i 12 mjeseci mjerenja SEM-om. Kao što je već prethodno navedeno p-vrijednost je iznosila 0,006 pri 3. mjerenju (nakon 6 mjeseci uranjanja), a ta se vrijednost nastavila povećavati značajno pri 4. i zadnjem mjerenju (nakon 12 mjeseci uranjanja) do p-vrijednosti 0,003. S obzirom da je u ovoj doktorskoj disertaciji analiza provedena u ograničenom vremenskom razdoblju od godinu dana, a to je vrijeme kada se često implantat odstranjuje kirurški, mišljenje je da se ne može sa sigurnošću predvidjeti što se događa s dinamikom tih promjena ukoliko se implantat ne odstrani u tom vremenu, tj. postoji li značajna progresija u stvaranju tih promjena po tipu jamičaste korozije nakon godinu dana, ili se dosegne tzv. plato zbog repasivacije površine implantata i istovremene stabilizacije pregradnje kosti na mjestu ranijeg prijeloma. Smatra se

da bi daljnja istraživanja bila nužna da bi se odredile promjene koje vremenski prelaze godinu dana, a koji je izvan okvira ovog istraživanja.

- Pretpostavka da **kiseliji mediji** imaju veći utjecaj na **pojavu i brzinu nastajanja jamičaste korozije** se potvrdila. Najveći utjecaj na samo stvaranje te brzinu nastajanja jamičaste korozije izmjerio se u skupini uzoraka pločica koja je bila uronjena u otopini s pH 5,0, iako taj rezultat nije statistički značajan, ali se dokazalo da je razlika u broju jamica u 3. ($p = 0,006$) i 4. mjeranju ($p=0,003$) od statističke značajnosti. U oba slučaja se zabilježilo više promjena jamičaste korozije onih implantata koji su bili uronjeni u kiselijem mediju, tj. onih uronjenih u otopini pH vrijednosti 5,0. Kod analize površine promjene po tipu jamičaste korozije, zamjećuje se jasna razlika pri 2. mjeranju i to između prve (pH 7,0) i treće skupine (pH 5,0), također prilikom 4. mjerenja kod druge (pH 6,0) i treće skupine. Dinamika promjene unutar pojedinih skupina kod mjerenja površine jamičaste korozije bila je od statističke značajnosti jedino u drugoj skupini (pH 6,0) te je p-vrijednost 0,001, iako se i u ostale dvije skupine bilježila jasna progresija površine jamičastih korozija. Može se zaključiti da kod remodeliranja i upalnih procesa, ali i kod pregradnje kosti na mjestu implantata, a koje samo po sebi stvara mikrookoliš s kiselijim medijem, dolazi do značajnijih promjena mikrostrukture po tipu jamičaste korozije. U budućnosti bi se moglo razmotriti odstranjivanje osteosintetskog materijala iz navedenog razloga.
- Nije se dokazalo da su **mehanička svojstva** osteosintetskog materijala izrađenog od nehrđajućeg čelika 316L značajno oslabjela nakon promjene jamičaste korozije nakon godinu dana po uranjanju u otopini različitih pH vrijednosti u smislu stvaranja novih i povećanja broja i veličine već postojećih korozijskih jamica, a koje su se pokazale kao statistički značajne promjene. Analizirajući testiranje mehaničkih svojstva tijekom dinamičkog cikličkog i statičkog opterećenja nije bilo značajnih razlika u vrijednostima broju ciklusa do loma tijekom dinamičkog cikličkog opterećenja ovisno o kiselosti medija ($p = 0,853$). Također nije se našla značajna razlika kod statičkog testiranja u vrijednostima maksimalnog progiba između ispitivanih skupina, unatoč značajnim razlikama već dokazane promjene mikrostrukture povezane s kiselošću medija.

Ovaj rezultat dolazi kao poticaj za daljnje razmišljanje o preuranjenom slabljenju implantata izrađenih od ovog materijala.

- Konačno, **dubina najdublje jamice** izmjerena je 0,266 μm . Zaključno, u ovom istraživanju nema dodatnih preporuka o izrađivanju pločica s optimalnom debljinom implantata/pasivnog sloja s obzirom da se nije dokazala značajna povezanost između promjena po tipu jamičaste korozije i slabljenja osteosintetskog materijala.

No i bez prethodno navedenog razloga koji je specifičan za ovu doktorsku disertaciju, a s obzirom da je dubina korozijskih jamica neznatna u odnosu na debljinu samih pločica koje se smatraju među tanjima, te s obzirom na rezultate koji su pokazali nesavršenost površine analiziranih pločica, smatramo da ne postoji potreba za daljnjim istraživanjima.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Svrha rada: Ispitivanjem implantata od nehrđajućeg čelika 316L utvrditi djeluje li biološka tekuća (SBF-Simulated Body Fluid) sredina na biomehaničko slabljenje implantata kao posljedica jamičaste korozije.

Očekivani znanstveni doprinos: Ovim istraživanjem nastoje se optimizirati svojstva implantata od čelika 316L koji se koristi u ortopedskoj i traumatološkoj kirurgiji.

Materijali i metode: Četrdeset i osam ($n = 48$) uzoraka od nehrđajućeg čelika 316L, podijeljeni u četiri skupine od 12 uzoraka; prva skupina uronjena u SBF pH vrijednosti 7,0, druga uronjena u puferiranoj otopini mliječne kiseline pH vrijednosti 6,0, treća skupina uronjena u puferiranoj otopini mliječne kiseline pH vrijednosti 5,0 i četvrta skupina koja je kontrolna skupina te nije bila uronjena u otopine. Putem Skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) analizirao se broj po jedinici površine i dimenzije korozivnih promjena te su se pločice biomehanički testirale prije početka kod kontrolne skupine, i po završetku pokusa u ostalih skupina, kao i hrapavost.

Rezultati: Za sve tri skupine koje su bile uronjene u SBF bilo je postupne progresije u promjenama po tipu jamičaste korozije i to najviše u skupini s najnižim pH (pH 5,0), odnosno s najvišom kiselošću i to od trećeg mjerenja nadalje ($p = 0,003$). Ako se gledaju vrijednosti unutar pojedinih vremena mjerenja, značajne razlike su između skupina pH 5,0 i pH 6,0 u četvrtom mjerenju kao i pH 5,0 i pH 7,0 u drugom mjerenju. U oba slučaja, vrijednosti površine jamica su bile najveće kod medija s najnižim pH vrijednostima. Ako promatramo dinamiku promjena unutar pojedinih skupina, značajne razlike su zabilježene samo u skupini s pH 6,0 ($p = 0,001$). Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima maksimalnog progiba između ispitivanih skupina ($p = 0,804$). Razlike u maksimalnoj sili (N) tijekom statičkog mehaničkog opterećenja između pojedinih skupina koje su ovisno o kiselosti medija, pokazuje da je najniži medijan vrijednosti maksimalne sile bio kod kontrolne skupine: 1407 N (IQR: 1400 – 1471,5 N), a najviši kod pH 7,0: 1421,0 N (IQR: 1410,0 – 1491,5 N) iako između skupina nije bilo značajnih razlika.

Zaključak: Implantati od nehrđajućeg čelika 316L u biološki simuliranom mediju razvijaju promjene po tipu jamičastih korozija, a kod onih već postojećih, znatno propagiraju u kiselijim uvjetima (najviše pH 5,0). Povezanost između jamičaste korozije i slabljenja implantata nije statistički značajna te se iz navedenog razloga nije nastavilo u stvaranju preporuka za optimizaciju debljine implantata ne bi li se izbjeglo oštećenje jamičastom korozijom.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

The role of pitting corrosion in weakening osteosynthetic implants made of 316L stainless steel

May Labidi, 2023.

Aim: Assessing surgical 316L stainless steel to confirm the effect of biological media fluid (SBF-simulated body fluid) in weakening the implant due to pitting corrosion. Expected scientific contribution: This research is aimed to optimize the properties of implants made of 316L stainless steel used in orthopedic and trauma surgery.

Materials and methods: Using forty-eight (n=48) 316L stainless steel implant samples divided into four groups of twelve samples each; the first immersed in SBF (saline 0.9% NaCl), second group immersed in a buffered lactic acid solution of pH 6.0, third group immersed in a buffered lactic acid solution of pH 5.0, and the fourth group is not immersed. The morphology and dimensions of corrosion defects analysed by a Scanning electron microscope (SEM), biomechanical tests performed at the beginning and end of the study.

Results: There was a gradual increase in corrosion pits in all three groups that were immersed in SBF, with the most significant noted in the strongest acidic group (pH = 5.0), which was the case from the third measure onward (P=0.003). Upon inspecting the individual measurement times, there is a significant difference between groups of pH 5.0 and pH 6.0 in the fourth measurement, and also between the pH 5.0 and pH 7.0 groups. In both cases the surface area of the pits was the largest in the group immersed in the pH 5.0 solution. There was a significant statistical difference in the dynamics of change in only the group immersed in the pH 6.0 solution (P=0.001).

There was no significant difference in maximal bending among the groups (P=0.804). The difference in the maximal force (N) during static mechanical testing of the groups was dependant on the acidity of the solution; the lowest median of maximal force was found in the control group: 1407 N (IQR: 1400 – 1471.5 N), the highest in the group of pH 7.0: 1421.0 N (IQR: 1410.0 – 1491.5 N); nonetheless, there was no significant difference between the groups.

Conclusion: In concluding, 316L stainless steel implants in simulated body fluid with the lowest pH value develop corrosion pits, and additionally in existing ones, significantly progress in acidic conditions. There is no statistical significance in the relationship between pitting corrosion and the weakening of implants. The ideal thickness of the implant that would prevent pitting corrosion damage was not defined due to the irrelevance as mentioned above.

10. POPIS LITERATURE

1. Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM. Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80(2):268-282.
2. Uhtoff HK, Poitras P, Backman DS. Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. *J Orthop Sci* 2006;11(2):118-126.
3. Griffin CD, Buchanan RA, Lemons JE. In vitro electrochemical corrosion study of coupled surgical implant materials. *J Biomed Mater Res* 1983;17:489-500.
4. Manivasagam G, Dhinasekaran D, Rajamanickam A. Biomedical implants: Corrosion and its prevention-a review. *Recent Pat Corros Sci* 2010;2:40-54.
5. Pazzaglia UE, Minoia C, Ceciliani L, Riccardi C. Metal determination in organic fluids of patients with stainless steel hip arthroplasty. *Acta Orthop Scand* 1983;54(5):574-579.
6. Jones DA. Principles and Prevention of Corrosion. 2. izd. New York: MacMillan; 1992, str. 45.
7. Mahapatro A, Johnson Dm, Patel DN, Feldman MD, Ayon AA, Agrawal CM. Surface modification of functional self assembled monolayers on 316L stainless steel via lipase catalysis. *Langmuir* 2006;22(3):901-905.
8. Beddoes J, Bucci K. The influence of surface condition on the localized corrosion of 316L stainless steel orthopaedic implants. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10(7):389-394.
9. Zainali K, Danscher G, Jakobsen T, Jakobsen SS, Baas J, Møller P i sur. Effects of Gold Coating on Experimental Implant Fixation. *J Biomed Mater Res A* 2009; 88(1):274–280.
10. Zainali K, Danscher G, Jakobsen T, Baas J, Møller P, Bechtold JE i sur. Assessment of Modified Gold Surfaced Titanium Implants on Skeletal Fixation. *J Biomed Mater Res A* 2013;101(1):195–202.
11. Jacobs JJ, Gilbert JL, Robert M. Current Concepts Review Corrosion of Metal Orthopaedic Implants. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80(2):268-282.
12. Black J. Orthopedic Biomaterials in Research and Practice. New York: Churchill Livingstone; 1988, str. 292-295.
13. Black J. Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility. 2. izd. New York: Marcel Dekker; 1992, str. 55-56.
14. French HG, Cook SD, Haddad RJ Jr. Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices. *J Biomed Mater Res* 1984;18(7):817-828.
15. Li Z, Gan F, Mao X. A study on cathodic protection against crevice corrosion in dilute NaCl solutions. *Corros Sci* 2002;44(4):689-701.

16. Michel R, Hofmann J, L er F, Zilkens J. Trace element burdening of human tissues due to corrosion of hip-joint prostheses made of cobalt-chromium alloys. *Arch Orthop Trauma Surg* 1984;103(2):85-95.
17. Winter GD. Tissue reactions to metallic wear and corrosion products in human patients. *J Biomed Mater Res* 1974;8(3):11-26.
18. Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R. Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1990;261:82-95.
19. Ferguson AB Jr., Laing PG, Hodge ES. The ionization of metal implants in living tissues. *J Bone Joint Surg Am* 1960;42-A:77-90.
20. Lim YS, Kim JS, Ahn SJ, Kwon HS, Katada Y. The influences of microstructure and nitrogen alloying on pitting corrosion of type 316L and 20 wt.% Mn-substituted type 316L stainless steels. *Corros Sci* 2001;43(1):53-68.
21. Qidwai SM, DeGiorgi VG, Leung, AC. A Review of Microstructural Effects on Pitting Corrosion in Stainless Steels. *ASME* 2011;2:161–169.
22. Talha M, Behera CK, Sinha OP. A review on nickel-free nitrogen containing austenitic stainless steels for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33(7):3563-3575.
23. Weinstein A, Amstutz H, Pavon G, Franceschini V. Orthopedic implants - a clinical and metallurgical analysis. *J Biomed Mater Res* 1973;7(3):297-325.
24. Walczak J, Shahgaldi F, Heatley F. In vivo corrosion of 316L stainless-steel hip implants: morphology and elemental compositions of corrosion products. *Biomaterials* 1998;19(1-3):229-237.
25. Colangelo VJ, Greene ND. Corrosion and fracture of type 316 SMO orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1969;3:247-265.
26. Black J. Does corrosion matter? *J Bone Joint Surg Br* 1988;70(4):517-520.
27. Russell RGG. Bone cell biology: The role of cytokines and other mediators. U: Cooper C, Harrison J, Smith R, ur. Shared care for osteoporosis. London: Taylor & Francis Group; 1998, str. 21.
28. Ibboston KJ, Twardzik DR, D'Souza SM, Hargreaves WR, Todaro GJ, Mundy GR. Stimulation of bone resorption in vitro by synthetic transforming growth factor-alpha. *Science* 1985;228(4702):1007-1009.
29. Butterworth A, Goodship AE, Preece AW. A carbon chamber for vital microscopy of bone healing. *Acta Orthop Scand* 1987;58(5):545-548.
30. Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res* 1977;123:177-196.

31. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1995, str. 143.
32. Waddington RJ, Embery G, Last KS. Glycosaminoglycans of human alveolar bone. *Arch Oral Biol* 1989;34(7):587-589.
33. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 1980;66(5):878-883.
34. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 2015;13(5):327-335.
35. Botushanov NP, Orbetzova MM. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Folia med* 2009;51(4):12–17.
36. Brighton CT, Hunt RM. Histochemical localization of calcium in the fracture callus with potassium pyroantimonate: possible role of chondrocyte mitochondrial calcium in callus calcification. *J Bone Joint Surg Am* 1986;68(5):703-715.
37. Koržinek K, Delimar D. Normalno i poremećeno cijeljenje kosti. U: Pećina M i sur, ur. *Ortopedija*. 3. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2004, str. 108-114.
38. Perren SM. Biomechanical basis of fracture treatment. *Orthopade* 1992;21(1):3-10.
39. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res* 1998;16(4):475–481.
40. Karpouzou A, Diamantis E, Farmaki P, Savvanis S, Troupis T. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing. *J Osteoporos* 2017;2017:4218472.
41. Brighton CT, Hunt RM. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 1997;11(4):244-253.
42. Cruess RL, Dumont J. Fracture healing. *Can J Surg* 1975;18(5):403-413.
43. Wolff J, ur. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: August Hirschwald; 1892, str. 1222-1224.
44. Pfeiffenberger M, Damerau A, Lang A, Buttgerit F, Hoff P, Gaber T. Fracture Healing Research—Shift towards In Vitro Modeling? *Biomedicines* 2021;9(7):748.
45. Williams G, Kukreja S, Bowser E, Hargis G, Greenberg C, Henderson W. Prolonged effect of estradiol on calcitonin secretion. *Bone Miner* 1986;1(5):415-420.
46. Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(7):673–681.
47. Ketenjian AY, Jafri AM, Arsenis C. Studies on the mechanism of callus cartilage differentiation and calcification during fracture healing. *Orthop Clin North Am* 1978;9(1):43–65.

48. Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, McLean J, Krothapalli N, Faibish D i sur. TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis Through FOXO1. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1604–1615.
49. Bahney C, Hu D, Miclau T, Marcucio R. The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015;6:4.
50. Chang CJ, Jou IM, Wu TT, Su FC, Tai TW. Cigarette smoke inhalation impairs angiogenesis in early bone healing processes and delays fracture union. *Bone Joint Res* 2020;9(3):99-107.
51. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 2010;191(6):453–465.
52. Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2007;8(5):519–525.
53. Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1988;232:210–216.
54. Kenzora JE, Steele RE, Yosipovitch ZH, Glimcher MJ. Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1978;130:8-46.
55. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45(8):1353-1358.
56. Wahlström O, Linder C, Kalén A, Magnusson P. Variation of pH in lysed platelet concentrates influence proliferation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-like cells. *Platelets* 2007;18(2):113-118.
57. pH. Hrvatska enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 25. 2. 2022. Dostupno na : <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=48063>.
58. Cruess RL, Dumont J. Fracture healing. *Can J Surg* 1975;18(5):403-413.
59. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg* 2012;20(5):273-282.
60. Sheen JR, Garla VV. Fracture Healing Overview. [Ažurirano 2021 May 12]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan [pristupljeno 2022 Jun 2]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
61. Uthoff HK. Fracture healing. U: Gustilo RB, Kyle RF, Templeman DC, ur. *Fractures and dislocations*. St. Louis: C. V. Mosby; 1993.
62. Adams PH, Jowsey J, Kelly PJ, Riggs BL, Kinney VR, Jones JD. Effect of hyperthyroidism on bone and mineral metabolism. *Q J Med* 1967;36:1-15.

63. Kung MH, Yukata K, O'Keefe RJ, Zuscik MJ. Aryl hydrocarbon receptor-mediated impairment of chondrogenesis and fracture healing by cigarette smoke and benzo(a) pyrene. *J Cell Physiol* 2012;227(3):1062-1070.
64. El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res* 2006;24(12):2150-2158.
65. Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H i sur. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med* 2001;137(3):208-219.
66. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110(4):447-452.
67. Wong LS, Martins-Green M. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen.* 2004;12(4):471-484.
68. Geringer J, Mathew MT, Wimmer MA, Macdonald DD. Synergism effects during friction and fretting corrosion experiments – focusing biomaterials used as orthopedic implants. U: Davim JP, ur. *Biomaterials and Medical Tribology*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2013, str. 133-180.
69. Kaysinger KK, Ramp WK. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem* 1998;68(1):83–89.
70. Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hoellen I, Rübenacker S i sur. Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF β -release in response to cyclic strain. *J Biomech* 1995;28(12):1411-1418.
71. Tuncay OC, Ho D, Barker MK. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994;105(5):457-463.
72. Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 2003;36(1):73-80.
73. Roelofsen J, Klein-Nulend J, Burger E. Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* 1996;28(12):1493-1503.
74. Ramp WK, Lenz LG, Kaysinger KK. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone Miner* 1994;24(1):59-73.

75. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM i sur. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220(2):366-371.
76. Yamaguchi DT, Huang JT, Ma D. Regulation of gap junction intercellular communication by pH in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1995;10(12):1891-1899.
77. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):188-192.
78. Zhang Z, Lai Q, Li Y, Xu C, Tang X, Ci J i sur. Acidic pH environment induces autophagy in osteoblasts. *Sci Rep* 2017;7:46161.
79. Arnett TA. Extracellular pH Regulates Bone Cell Function. *J Nutr* 2008;138(2):415S–418S.
80. Proverbio E, Bonaccorsi LM. Microstructural analysis of failure of a stainless steel bone plate implant. *Pract Fail Anal* 2001;1(4):33–38.
81. Kokubo T, Takadama H. Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants. U: Bäuerlein E, ur., *Handbook of Biomineralization: biological aspects and structure formation*. New York: Wiley; 2007, str. 97-109.
82. Galante J, Rostoker W. Corrosion-related Failures in Metallic Implants. *Clin Orthop Relat Res* 1972;86:237–244.
83. Dugal A, Thakur G. Surface analysis of indigenous stainless steel miniplates used in facial fractures. *J Maxillofac Oral Surg* 2010;9(4):403-406.
84. Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 2012;22(2):167–177.
85. Alghazali KM, Nima ZA, Hamzah RN, Dhar MS, Anderson DE, Biris AS. Bone-tissue engineering: Complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies. *Drug Metab Rev* 2015;47(4):431-454.
86. Dewidar MM, Khalil KA, Lim JK. Processing and mechanical properties of porous 316L stainless steel for biomedical applications. *Trans Nonferrous Met Soc China* 2007;17(3):468-473.
87. Davis JR, ur. *Stainless steel*. USA: ASM International; 1994, str. 3-88.
88. Sudhakar KV. Metallurgical investigation of a failure in 316L stainless steel orthopaedic implant. *Eng Fail Anal* 2005;12(2): 249–256.
89. Yue X, Zhang L, Hua Y, Wang J, Dong N, Li X i sur. Revealing the superior corrosion protection of the passive film on selective laser melted 316L SS in a phosphate-buffered saline solution. *Appl Surf Sci* 2020;529:147170.

90. Grubb JF, DeBold T, Fritz JD. Corrosion of Wrought Stainless Steels. U: Cramer SD, Covino BS Jr, ur. Corrosion: materials. United States: ASM International; 2005, str. 54-75.
91. Xu W, Yu F, Yang L, Zhang B, Hou B, Li Y. Accelerated corrosion of 316L stainless steel in simulated body fluids in the presence of H₂O₂ and albumin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018;92:11-19.
92. Yamanoglu R, Fazakas E, Ahnia F, Alontseva D, Khoshnaw F. Pitting Corrosion behaviour of Austenitic Stainless-Steel Coated on Ti6Al4V Alloy in Chloride Solutions. *Adv Mater Res-Switz* 2021;21:5-15.
93. Banovetz JM, Sharp R, Probe RA, Anglen JO. Titanium plate fixation: a review of implant failures. *J Orthop Trauma* 1996;10(6):389-394.
94. Fredriksson W, Malmgren S, Gustafsson T, Gorgoi M, Edström K. Full depth profile of passive films on 316L stainless steel based on high resolution HAXPES in combination with ARXPS. *Appl Surf Sci* 2012;258(15):5790-5797.
95. Heuer AH, Kahn H, Ernst F, Michal GM, Hovis DB, Rayne RJ i sur. Enhanced corrosion resistance of interstitially hardened stainless steel: Implications of a critical passive layer thickness for breakdown. *Acta Mater* 2012;60(2):716-725.
96. Alsina M, Guise TA, Roodman GD. Cytokine regulation of bone cell differentiation. *Vitam Horm* 1996;52:63-98.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

May Labidi rođena je 19. svibnja 1981. godine u Benghaziju, u Libiji. U istom je mjestu završila gimnaziju na arapskom jeziku te je nakon toga pohađala nultu godinu medicine, koja je prema američkom sustavu preduvjet za upis na Medicinski fakultet na engleskom jeziku. Diplomirala je medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2008. godine.

Stručni poslijediplomski studij iz Kliničke farmakologije s toksikologijom pohađala je u razdoblju od 2009. do 2010. godine, a 2013. godine upisala je doktorski studij Biomedicina i zdravstvo kao razlikovnu godinu na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Stručni poslijediplomski studij Ortopedija i traumatologija na istom fakultetu pohađala je u razdoblju od 2015. do 2016. godine.

Pripravnički je staž završila u siječnju 2010. godine u Kliničko bolničkom centru Zagreb, gdje je i radila u razdoblju od 2010. do 2011. godine volontirajući na Katedri za kirurgiju.

May Labidi je 25. travnja 2018. godine specijalizirala Ortopediju i traumatologiju, položivši ispit na Klinici za traumatologiju Kliničko bolničkog centra Sestre milosrdnice te tako postala prvi ženski ortoped i traumatolog u Republici Hrvatskoj, za što je primila zahvalnicu od Hrvatskog liječničkog zbora. May se trenutno usko specijalizira za područje ortopedske kirurgije stopala i gležnja u sveučilišnim bolnicama u Southamptonu i u Birminghamu, u Engleskoj.

Također, članica je Hrvatskog traumatološkog društva, Hrvatskog ortopedskog društva, udruge za osteosintezu u traumatologiji (AO Trauma), internacionalne zajednice ortopedije i traumatologije (SICOT) i prestižnog Britanskog ortopedskog društva (BOA). Ujedno, 2018. godine dobila je stipendiju Hrvatske liječničke komore za inozemno stručno usavršavanje.

Dodatno se stručno educirala u Sloveniji, Austriji, Češkoj, Švicarskoj, Francuskoj i Engleskoj. Aktivno je sudjelovala na brojnim regionalnim i međunarodnim kongresima, većinom na kongresima internacionalne zajednice ortopedije i traumatologije te od travnja 2021. godine organizira lokalne stručne sastanke u Engleskoj. Također je održala usmeno predavanje na regionalnoj engleskoj godišnjoj ortopedskoj konferenciji Gauvain Wessex.