

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Nenad L. Ignjatović

**SINTEZA I DIZAJNIRANJE STRUKTURE I
OSOBINA HIDROKSIAPATIT/POLILAKTID
KOMPOZITNIH BIOMATERIJALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2001

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nenad L. Ignjatović

**SYNTHESIS AND DESIGNING OF THE
STRUCTURE AND PROPERTIES OF
COMPOSITE BIOMATERIALS
HYDROXYAPATITE-POLYLACTIDES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2001

Apstrakt

Koštani defekti mogu se reparirati biomaterijalima na bazi sintetskog hidroksiapatita (HAp). U slučaju reparacije koštanih defekata sa prekidom kontinuiteta, neophodno je da upotrebljeni biomaterijal zadovolji biomehaničke uslove. Pобоljšanje mehaničkih osobina HAp-a ostvareno je njegovim ojačavanjem biokompatibilnim polimerima.

Predmet ovih istraživanja je sinteza i dizajniranje strukture i osobina kompozitnih biomaterijala hidroksiapatit-polilaktida. Upotrebom bioresorbilnog poli-l-laktida (PLLA) i bioresorbilnog HAp-a dobijen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa mehaničkim osobinama bliskim prirodnom koštanom tkivu. Mešanjem potpuno rastvorenog PLLA sa komponentom HAp-a, a zatim vakuum uparavanjem, dobijen je visoko porozni kompozit. Ova vrsta kompozita je naknadno dizajnirana hladnim i toplim presovanjem. U ovim istraživanjima ispitan je uticaj presovanja na degradacione promene tokom kompaktiranja, molsku masu PLLA i kompresionu čvrstoću. Definisan je uticaj parametara presovanja, kao što su temperatura, pritisak i vreme na poroznost, kompresionu čvrstoću i modul elastičnosti. Ispitan je uticaj veličina čestica HAp-a i molske mase PLLA na analizirane osobine. Mogućnosti primene kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u realnim, *in vivo* uslovima ispitane su primenom FT-IR spektroskopije. Tokom procesa primene dolazi do formiranja novog vezivnog tkiva kolagena, uz stvaranje novih kolagenskih grupa koje su registrovane FT-IR spektroskopijom. Implanti od HAp/PLLA kompozita intraperitonealno su implantirani. a nakon 2, 7 i 12 nedelja od implantacije histopatološki analizirani. Mogućnosti zamene, do sada široko korišćene, primene autologne kosti u reparacijama koštanog tkiva, takođe je analizirana u ovoj doktorskoj disertaciji.

Ključne reči: hidroksiapatit-polilaktid, kompozitni biomaterijal, sinteza, osobine, toplo presovanje, poroznost, kompresiona čvrstoća, modul elastičnosti, *in vitro*, *in vivo* test

Abstract

Bone-defects can be repaired using biomaterials based on synthetic calcium-hydroxyapatite (HAp). The bone tissue repair, in the case of broken bone continuity, can successfully be made by a biomaterial of corresponding mechanical properties. Adequate mechanical properties of biocomposite blocks can be reached by reinforcing HAp with biocompatible polymers.

The research subject of this study are the synthesis and designing of the structure and properties of composite biomaterials hydroxyapatite-poly lactides Using biocompatible and bioresorptive poly-L-lactide (PLLA) polymer, HAp/PLLA composite biomaterial consisting of a non-bioresorptive HAp and bioresorptive PLLA component with mechanical properties similar to those of bones can be produced. Completely dissolved PLLA with HAp granules gives a mixture, from which, after evaporation in vacuum, HAp/PLLA composite biomaterial of high porosity is formed. The material obtained in this way can be compacted by hot and cold pressing. In order to investigate the influence of hot pressing time on the degradation changes, the molecular weight of PLLA and compressive strength of biocomposite before and after hot pressing have been analyzed. The effects of hot pressing parameters such as temperature, pressure and time, on the porosity, compressive strength, elasticity modulus and the mechanism of fracture formation of hot pressed blocks have been investigated, as well as their dependence on the HAp particle sizes and PLLA molecular weights. In this research the bone tissue repair process *in vivo* using HAp/PLLA composite biomaterial was studied by FT-IR spectroscopy. Implants made of HAp/PLLA biocomposites with PLLA were studied 2, 7 and 12 weeks after being implanted intraperitoneally. Also, a possible substitution of the autologous bone with HAp/PLLA biocomposites, in filling up bone defects, was investigated.

Keywords: hydroxyapatite-poly lactide, composite biomaterials, synthesis, properties, hot pressing, porosity, compressive strength, modulus, *in vitro*, *in vivo* tests

Naučna oblast: hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: nauka o materijalima

9A 17297

UNIVERZITET U BEOGRADU
1074/11

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Mentor: Prof. dr Milenko Plavšić
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Članovi komisije: Prof. dr Dragan Uskoković

Mr Nenad L. Ignjatović, dipl. ing

Prof. dr Radoslav Aleksić

Sinteza i dizajniranje strukture i osobina
hidroksiapatit-polilaktid kompozitnih biomaterijala

Prof. dr Srdjan Jovanović
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Doktorska disertacija

Prof. dr Vojin Savic
Medicinski fakultet, NIS

Datum odbrane: 24. IX 2001.

Datum promocije:

Beograd, 2001

UNIVERZITETSKA BIBLIOTEKA
SRPSKAR MARKSISTA - BEOGRAD
117502

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Mr Nenad L. Jgajstović, dipl. ing.

Sintexa i dizajnerske strukture i osobina
hidroksipatit-poliakrid kompozitnih biomaterijala



Beograd, 2001

Mentor: Prof. dr Milenko Plavšić
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

Milenko Plavšić

Članovi komisije: Prof. dr Dragan Uskoković
Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i
umetnosti, Beograd

Prof. Dragan Uskoković

Prof. dr Radoslav Aleksić
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

R. Aleksić

Prof. dr Slobodan Jovanović
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

S. Jovanović

Prof. dr Vojin Savić
Medicinski fakultet, Niš

V. Savić

Datum odbrane: 24. IX 2001.

Datum promocije:

Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksipoli(l)laktid kompozitnih biomaterijala

Apstrakt

Koštani defekti mogu se reparirati sa biomaterijalima kao što su hidroksipoli(l)laktid (HPLA). U slučaju reparacije koštanih defekata sa polikromnim materijalima, potrebno je da kompozitni biomaterijal zadovolji biološke i mehaničke zahtjeve. U ovom radu je opisano i analizirano njegovo dobivanje sa biokompatibilnim polimerima.

“Pogledaj cvet svoga srca i osmehni se. Bićeš u stanju da rešiš svoje najteže probleme.”

S. Chinmoy

Predmet ovog istraživanja je sinteza i dizajniranje strukture i osobina biomaterijala hidroksipoli(l)laktid kompozitnog biokompatibilnog polilaktida (PLLA) i biokompatibilnog HAP-a. Dobijen je kompozitni biomaterijal HAP/PLLA sa mehaničkim osobinama bliskim prirodnom koštanoj tkivu. Mešanjem potpuno rastvorenog PLLA sa kompozitom HAP-a u zlatni vakuum upravljanjem dobijen je visoko porozni kompozit. Ova vrsta kompozita je naknadno dizajnirana i izrađena toplim presovanjem. U ovim istraživanjima istražen je uticaj presovanja na degradacione promene tokom kompresivnog, mehaničkog i kompresivnog čvrstoću. Definisan je uticaj parametara presovanja kao što su temperatura, pritisak i vreme na poroznost, kompresivnu čvrstoću i modul elastičnosti. Ispitan je uticaj veličina čestica HAP-a i mase mase PLLA na analizirane osobine. Mogućnosti primene kompozitnog biomaterijala HAP/PLLA u realnim životnim uslovima opisane su primenom FT-IR spektroskopije. Tokom procesa primene dolazi do formiranja novog vezivnog matriksa kolagena, uz stvaranje nove kolagenske grupe koja su registrovana FT-IR spektroskopijom. Implantsi od HAP/PLLA kompozita intraperitonealno su implantirani, a nakon 2, 7 i 42 nedelja su implantacije histopatološki analizirani. Mogućnosti zaradnje, do sada široko korišćene, primene autologne kulture u reparacijama koštanoj tkivu, takođe je analizirana u ovoj doktorskoj disertaciji.

Ključne reči: hidroksipoli(l)laktid, kompozitni biomaterijal, sinteza, osobine, topli presovanje, poroznost, kompresivna čvrstoća, modul elastičnosti, in vivo, in vitro test



Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksiapatit/polilaktid kompozitnih biomaterijala

Abstrakt:

Koštani defekti mogu se reparirati sa biomaterijalima na bazi sintetskog hidroksiapatita (HAp). U slučaju reparacije koštanih defekata sa prekidom kontinuiteta, neophodno je da upotrebljeni biomaterijal zadovolji biomehaničke uslove. Pобољшanje mehaničkih osobina HAp-a ostvareno je njegovim ojačavanjem sa biokompatibilnim polimerima.

Predmet ovih istraživanja je sinteza i dizajniranje strukture i osobina kompozitnih biomaterijala hidroksiapatit-polilaktid. Upotrebom bioresorbilnog poli-l-laktida (PLLA) i bioresorbilnog HAp-a, dobijen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa mehaničkim osobinama bliskim prirodnom koštanom tkivu. Mešanjem potpuno rastvorenog PLLA sa komponentom HAp-a a zatim vakuum uparavanjem dobijen je visoko porozni kompozit. Ova vrsta kompozita je naknadno dizajnirana hladnim i toplim presovanjem. U ovim istraživanjima ispitan je uticaj presovanja na degradacione promene tokom kompaktiranja, molsku masu PLLA i kompresionu čvrstoću. Definisan je uticaj parametara presovanja kao što su temperatura, pritisak i vreme na poroznost, kompresionu čvrstoću i modul elastičnosti. Ispitan je uticaj veličina čestica HAp-a i molske mase PLLA na analizirane osobine.

Mogućnosti primene kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u realnim, *in vivo* uslovima ispitane su primenom FT-IR spektroskopije. Tokom procesa primene dolazi do formiranja novog vezivnog tkiva kolagena, uz stvaranje novih kolagenskih grupa koje su registrovane FT-IR spektroskopijom. Implanti od HAp/PLLA kompozita intraperitonealno su implantirani, a nakon 2, 7 i 12 nedelja od implantacije histopatološki analizirani. Mogućnosti zamene, do sada široko korišćene, primene autologne kosti u reparacijama koštanog tkiva, takođe je analizirana u ovoj doktorskoj disertaciji.

Ključne reči: hidroksiapatit-polilaktid, kompozitni biomaterijal, sinteza, osobine, toplo presovanje, poroznost, kompresiona čvrstoća, modul elastičnosti, *in vitro*, *in vivo* test

Key words: hydroxyapatite-polylactide, composite biomaterials, synthesis, properties, hot pressing, porosity, compressive strength, modulus, *in vitro*, *in vivo* tests

Synthesis and designing structure and properties of composite biomaterials hydroxyapatite-polyactides

Abstract:

Bone defects can be repaired using biomaterials based on synthetic calcium-hydroxyapatite (HAp). The bone tissue repair, in the case of broken bone continuity, can successfully be made by a biomaterial of corresponding mechanical properties. Adequate mechanical properties of biocomposite blocks can be reached by reinforcing HAp with biocompatible polymers.

The research subject of this study is synthesis and designing structure and properties of composite biomaterials hydroxyapatite-polyactides Using biocompatible and bioresorptive poly-L-lactide (PLLA) polymer, HAp/PLLA composite biomaterial consisting of a non-bioresorptive HAp and bioresorptive PLLA component with mechanical properties similar to those of bones can be produced. Completely dissolved PLLA with HAp granules gives a mixture, from which after evaporation in vacuum HAp/PLLA composite biomaterial of high porosity is formed. The material obtained in this way can be compacted by hot and cold pressing. In order to investigate the influence of hot pressing time on the degradation changes, the molecular weight of PLLA and compressive strength of biocomposite before and after hot pressing have been analyzed. The effects of hot pressing parameters such as temperature, pressure and time, on the porosity, compressive strength, elasticity modulus and the mechanism of fracture formation of hot pressed blocks have been investigated, as well as their dependence on the HAp particle sizes and PLLA molecular weights. In this research the bone tissue repair process *in vivo* using HAp/PLLA composite biomaterial was studied by FT-IR spectroscopy. Implants made of HAp/PLLA biocomposites with PLLA were studied 2, 7 and 12 weeks after being implanted intraperitoneally. Also, a possible substitution of the autologous bone with HAp/PLLA biocomposite, in filling up bone defects, was investigated.

Key words: hydroxyapatite-polyactide, composite biomaterials, synthesis, properties, hot pressing, porosity, compressive strength, modulus, *in vitro*, *in vivo* tests.

Predgovor

Ova doktorska disertacija je rađena u Institutu tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti u odeljenju za Nove materijale i procese. Tema ovog rada ostvarena je pod neposrednim rukovodstvom Prof. dr Dragana Uskokovića u čijoj sam nesebičnoj pomoći istovremeno nalazio dragocenu, značajnu i meni neophodnu ličnu podršku.

Doktorska disertacija je realizovana pri Katedri za polimerno inženjerstvo Tehnološko metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Posebnu zahvalnost dugujem Prof. dr Milenku Plavšiću za prihvatanje mentorstva ove disertacije i korisnim savetima i sugestijama koje su mi omogućile kompletnije sagledavanje ove problematike. Zahvaljujem Prof. dr Radetu Aleksiću i Prof. dr Slobodanu Jovanoviću na korisnim savetima i sugestijama pri finalizaciji ove disertacije. Prof. dr Vojinu Saviću zahvaljujem za omogućavanje *in vivo* ispitivanja koja predstavljaju veliku dragocenost u realnom sagledavanju kvaliteta primene sintetisanog kompozitnog biomaterijala.

Multidisciplinarnost problema postavljenog ovim radom uključila je angažovanost većeg broja eminentnih stručnjaka i saradnika čija je pomoć bila od velikog značaja. Veliku pomoć prilikom SEM i EDS analiza dugujem Prof. dr Ljiljani Živković i dipl. ing. Miroslavu Miljkoviću sa Elektronskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Zahvaljujem se Prof. dr Stevi Najmanu i Ass. Ljubiši Đorđeviću sa medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu za *in vivo* istraživanja. Zahvalnost dugujem Dr Miroslavu Dramićaninu, Dr Zoranu Stojanoviću i Dr Edinu Suljovrujiću iz Laboratorije za radijacionu hemiju Instituta "Vinča" u Beogradu za pomoć prilikom matematičkog modelovanja, rendgenostrukturne i DSC analize. Prilikom DT analiza pomoć i podršku pružila mi je Prof. dr Nadežda Petranović sa fakulteta za Fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu. DSC i TG analize obavljene su na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu uz pomoć Prof. dr Jovanke Filipović i Prof. dr Ivanke Popović. Za pomoć pri toplom presovanju zahvaljujem Prof. dr Miri Vukčević i Prof. dr Kemal Delijiću sa Metalurško-tehnološkog fakulteta Univerziteta u Podgorici. Dr Slobodanu Milonjiću i Dr Antoniji Onjia iz Laboratorije za dinamiku Instituta "Vinča" i Mirjani Matković dipl. fiz. iz Vojno-tehničkog Instituta u Beogradu zahvaljujem na pomoći pri određivanjima ugla kvašenja. Mr ing Simonidi Tomić sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu za pomoć u sintezi i karakterizaciji PLLA, najtoplije se zahvaljujem.

Posebna zahvalnost mojim ukućanima i najmilijima koji su mi dali podršku i omogućili ostvarenje ovog rada.



<i>Izvod</i>	I
<i>Predgovor</i>	III
<i>Sadržaj</i>	IV
Uvod	1
1. Teorijski deo	36
1.1 Biomaterijali	3
1.2 Vrste biomaterijala	4
1.2.1 Metalni biomaterijali	4
1.2.2 Polimerni biomaterijali	5
1.2.2.1 Bioneresorbilni polimeri	5
1.2.2.1.1 Elastomerni bioneresorbilni polimeri	6
1.2.2.2 Bioresorbilni polimeri	6
1.2.2.2.1. Polilaktid (PLA)	6
1.2.2.2.2 Kopolimeri i drugi bioresorbilni polimeri	9
1.2.3 Keramički i biomaterijali na bazi stakla	9
1.2.3.1 Kalcijum hidroksiapatit (HAp)	10
1.2.3.1.1 Dobijanje HAp	11
1.2.3.1.2 Porožna i gusta HAp keramika	12
1.2.3.1.3 HAp tanki slojevi i prevlake	13
1.2.4 Prirodni biomaterijali	13
1.3. Kompozitni biomaterijali	14
1.3.1. Kompozitni biomaterijali iz prirode - koštano tkivo	15
1.3.2. HAp/metal kompoziti	17
1.3.3. HAp/prirodni kompoziti	18
1.3.4. HAp/keramika kompoziti	19
1.3.5. HAp/bioaktivno staklo kompoziti	20
1.4. HAp/polimer kompoziti	21
1.4.1 HAp/bioneresorbilni polimer kompoziti	22
1.4.2 HAp/bioresorbilni polimer kompoziti	24
1.5. HAp/PLLA kompozitni biomaterijali	28
1.5.1 Dobijanje	28

1.5.2 Dizajniranje strukture (strukturiranje)	31
1.5.2.1 Submolekulski nivo	31
1.5.2.2 Molekulski nivo	32
1.5.2.3 Intermolekulski nivo	32
1.5.2.4 Supermolekulski nivo	34
1.5.2.5 Makro nivo	36
1.5.3 Mehaničke osobine i poroznost	37
1.5.3.1 Poroznost	39
1.5.4 <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> istraživanja	40
1.6. Interakcija okolno tkivo – biomaterijal	42
1.6.1 Hemijski sastav	42
1.6.2 Aktivnost ili inertnost	43
1.6.3. Biokompatibilnost	44
1.6.4 Površina	45
1.6.5 Stanje okolnog tkiva	45
1.6.6 Hirurška veština	45
1.6.7 Sterilizacija	46
2 Eksperimentalni rad	66
2.1 Dobijanje komponenata HAp, PLLA i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	47
2.1.1 Sinteza HAp komponente	47
2.1.2 PLLA komponenta	47
2.1.3 Dobijanje visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	48
2.1.4 Kompaktiranje hladnim i toplim presovanjem	48
2.1.5 Dobijanje visoko gustog HAp	51
2.1.6 Nanošenje prevlaka	51
2.2 Ispitivanje osobina HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala od značaja za primenu	51
2.2.1 <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> istraživanja	51
2.2.2 Patohistološka istraživanja	52
2.3 Karakterizacija sinteze, dizajniranja, <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ispitivanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	53
2.3.1 Rendgenostrukturalna analiza (X ray)	53

2.3.2	Određivanje molske mase PLLA	54
2.3.3	Određivanje ukupne gustine blokova	54
2.3.4	Infra crvena spektroskopija (IR)	55
2.3.5	Diferencijalna termijska analiza (DTA)	55
2.3.6	Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC)	56
2.3.7	Termo gravimetrijska analiza (TGA)	57
2.3.8	Kompresiona čvrstoća i modul elastičnosti (E)	57
2.3.9.	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i elektronska disperziona spektroskopija (EDS)	57
2.3.10	Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS)	58
2.3.11	Ugao kvašenja	59
3.	Rezultati	
3.1	Rezultati sinteze i dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	60
3.1.1.	Rezultati sinteze HAp i PLLA	60
3.1.2	Kompaktiranje visoko poroznog HAp/PLLA hladnim i toplim presovanjem	61
3.1.3	Uticaj vrste rastvarača na dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	66
3.2	Uticaj toplog presovanja na strukturu HAp i PLLA u kompozitnom biomaterijalu	68
3.2.1	Strukturne promene PLLA komponente tokom toplog presovanja	70
3.3	Dizajniranje osobina toplim presovanjem	75
3.3.1	Prevlake kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	77
3.4	<i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> istraživanja	78
3.4.1.	<i>In vitro</i> istraživanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	81
3.4.2.1.	Patohistološka istraživanja	84
4.	Diskusija rezultata	
4.1	Diskusija rezultata sinteze i dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	87
4.1.1	Sinteza HAp i PLLA	87
4.1.2	Kompaktiranje visoko poroznog HAp/PLLA	87
4.1.3	Uticaj rastvarača na dizajniranje kompozitnog biomaterijala	92

4.1.4 Uticaj toplog presovanja na strukturu HAp, PLLA i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	94
4.1.5 Uticaj toplog presovanja na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA	100
4.1.6 Diskusija rezultata deponovanih prevlaka	103
4.1.7 Modelovanje fenomena prenosa toplote tokom toplog presovanja	104
4.2 Diskusija <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> istraživanja	107
4.2.1 <i>In vitro</i> istraživanja	107
4.2.2 <i>In vivo</i> istraživanja	108
4.2.2.1 Diskusija patohistoloških istraživanja	111
5. Zaključak	116
6. Literatura	120



UVOD

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije usmerena su u pravcu sinteze i dizajniranja strukture i osobina kompozitnih biomaterijala hidroksiapatit/polilaktid (HAp/PLLA) koji se mogu upotrebiti za reparaciju humanog koštanog tkiva.

Do sada je izvršen niz reparacija koštanog i hrskavičavog tkiva sa prahom, granulama ili blokovima sintetisanog HAp-a. Veštački sintetisan HAp je veoma sličan prirodnom, koji predstavlja osnovnu komponentu prirodnog koštanog tkiva. Izuzetno dobra biokompatibilnost i osteokonduktivnost HAp keramike svrstala su je u sam vrh bioaktivnih keramika.

Prilikom reparacija gde je došlo do prekida koštanog kontinuiteta, sintetisana HAp keramika, zbog slabih mehaničkih karakteristika, pre svega krtosti, ne može da zadovolji biomehaničke uslove koji se od nje zahtevaju. Kombinovanjem granula ili praha HAp sa različitim polimerima pokušano je prevazilaženje ovih nedostataka. Različiti polimeri su korišćeni za poboljšavanje osobina HAp ali osnovni nedostatak predstavljala je njihova loša biokompatibilnost i neotpornost na starenje. Bioresorbilni polilaktid (PLA) do sada je imao široku upotrebu u medicini iz razloga što se njegovi produkti razgradnje u organizmu nesmetano uključuju u metabolizam produkujući pri tome CO_2 i H_2O koji nisu toksični za organizam. Određena istraživanja ukazuju na dobru adherenciju faktora rasta i osteoblasta na površini PLA.

Ojačavanjem granula ili praha HAp sa PLA dobijen je kompozitni biomaterijal HAp/PLA koji potencijalno može da zadovolji sve zahteve vezane za biokompatibilnost, netoksičnost i osteokonduktivnost. Kao rezultat dosadašnjih istraživanja razvijeni su različiti postupci sinteze kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa manje ili više uspeha. Za sintezu korišćen je HAp različitih veličina čestica kao i PLA različitih molskih masa. Struktura, a time i osobine kompozitnog biomaterijala umnogome zavise od postupka dobijanja. U dosadašnjim istraživanjima malo je analiziran uticaj načina sinteze i procesiranja na strukturu ove vrste kompozita. Razumevanjem načina uticaja sinteze može se omogućiti dobijanje željenih osobina kompozita bitnih za njegovu primenu u reparacijama koštanih defekata.

Pored biokompatibilnih zahteva neophodno je da blokovi kompozita imaju vrednosti čvrstoće koja je bliska prirodnom koštanom tkivu. U većem broju, do sada obavljenih istraživanja, kompresina čvrstoća dobijenog HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala imala je dosta nižu vrednost od prirodnog koštanog tkiva.

Stepen kristaliničnosti kao i molska masa PLLA, utiču na vreme bioresorpcije PLLA, a samim tim i na integraciju blokova kompozita. Izučavanju uticaja sinteze i dizajniranja kompozitnog



biomaterijala HAp/PLLA na kristaliničnost PLLA u dosadašnjim istraživanjima nije posvećena odgovarajuća pažnja.

Imajući ovo u vidu rad je koncipiran sa sledećim ciljevima:

1. Sinteza i priprema biokompatibilnog HAp u obliku bioneresorbibilnih granula ili praha, pogodnog za dobijanje kompozitnog biomaterijala na bazi HAp-a. Priprema bioresorbibilnog i biokompatibilnog PLLA pogodnog za kombinovanje sa granulama ili prahom HAp-a.
2. Sinteza, dizajniranje strukture i osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pogodnog za rekonstrukciju koštanog tkiva postupkom koji omogućava u što većoj meri kontrolu strukturnih promena konstitutivnih komponenata a time i osobina.
3. Optimizacija postupka toplog presovanja u cilju dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa mehaničkim osobinama sličnim prirodnom koštanom tkivu.
4. Analiza uticaja parametara toplog presovanja na strukturu, kako konstituenata, tako i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, u cilju razumevanja uticaja postupka dobijanja na krajnje osobine.
5. *In vitro* i *in vivo* istraživanja u cilju proučavanja interakcije organizma sa kompozitnim biomaterijalom HAp/PLLA sa biohemijskog i histopatološkog stanovišta.

Podjele biomaterijala su brojne i raznovrsne po različitim kriterijumima. Generalno sagledavajući veoma je teško izvršiti klasifikaciju biomaterijala na grupe, podgrupe i klase, jer se vrlo često jedna grupa različito definiše i menja u zavisnosti od vrste klasifikacije.

Prema mestu krajnje upotrebe biomaterijali mogu biti: ortopedski, dentalni, oftamološki, kardiovaskularni, dermatološki, pomoćni itd. Kao što i ime kaže, ortopedski se primenjuju u ortopediji, dentalni u stomatologiji, oftamološki u oftamologiji itd.

Na osnovu načina aplikacije biomaterijali se mogu koristiti kao blok, cement, funkcionalno – gradijentni, tanak sloj ili prevlaka i td.

Prema tipu odgovora implant – tkivo, biomaterijali mogu biti: toksični, netoksični biološki neaktivni, netoksični biološki aktivni i netoksični rastvorljivi.³

1.2 Vrste biomaterijala

Najčešća podela koja omogućava objedinjavanje gotovo svih ostalih je po hemijskom sastavu. Biomaterijali po hemijskom sastavu mogu biti: metalni, polimerni, keramički, prirodni i kompozitni.²⁻⁵

1.2.1 Metalni biomaterijali

Široku popularnost metalni biomaterijali su stekli u ortopediji zbog mogućnosti izrade implanata koji poseduju visoku jačinu na kidanje i zamor. Još je 1775. godine zabeležena upotreba metala kao biomaterijala, mada bez većih uspeha.² Početkom dvadesetog veka zabeležena je upotreba visoko ugljeničnih čelika kao biomaterijala, a od 1920. godine koriste se kobalt-hrom (Co-Cr) legure. Početkom 1940. godine titan počinje da zauzima ključno mesto u metalnim biomaterijalima.²

Nerdajući čelik (316L) se dosta koristi za izradu parcijalnih implanata, jer je jeftin i lako se oblikuje.⁴ U poređenju sa drugim metalnim biomaterijalima čelik ima optimalan modul elastičnosti potreban za obradu i visoku vrednost savojne jačine. Njegove osobine imaju praktičan značaj zbog toga što je često tokom operacije potrebno saviti profil prema potrebnom anatomskom zahtevu. Smatra se da je čelik biokompatibilan, mada nije integrativan sa tkivom. Ako se čelik implantira u kost, tanak sloj fibroznog tkiva stvara se između kosti i čelika. Integracija čeličnih implanata zbog stvaranja fibroznog sloja je onemogućena, pa se čelik kao metalni biomaterijal danas retko koristi.²

Legure Co-Cr smatraju se koroziono rezistentnim. U poređenju sa nerđajućim čelicima imaju više vrednosti jačine na kidanje, otpornost na zamor i veću gustinu. Legura Co-Cr ima visoku vrednost modula elastičnosti, što može da predstavlja teškoću prilikom obrade. Ova legura se ranije dosta koristila za izradu veštačkih kukova.^{2,4}

Titan (Ti) se koristi kao čist ili kao legura Ti-6Al-4V. Posедуje dosta malu gustinu u odnosu na druge metalne biomaterijale, što mu pored biokompatibilnih osobina omogućava širu upotrebu kao biomaterijala.^{2,6} Legura Ti-6Al-4V koristi se za izradu proteza velikih zglobova (kuk i koleno). Zbog manjeg modula elastičnosti koristi se za izradu žica za fiksaciju umesto čelika ili Co-Cr legura.^{1,6}

Veliki broj različitih metalnih biomaterijala našao je primenu u stomatologiji.⁷⁻¹⁴

1.2.2 Polimerni biomaterijali

Pod imenom polimerni biomaterijali podrazumevaju se sintetski polimeri, pošto prirodni biomaterijali koji u većini slučajeva predstavljaju prirodne polimere obrazuju posebnu grupu. Polimerni biomaterijali prema strukturi, osobinama i nameni obrazuju široku grupu biomaterijala. Prema osobinama u *in vitro* i *in vivo* sistemima oni mogu biti bioneresorbilni i bioresorbilni.

1.2.2.1 Bioneresorbilni polimeri

Polimetilmetakrilat (PMMA) do sada se dosta koristio u oftamologiji i ortopediji.² Fiksacija različitih vrsta proteza, tj. ispuna prostora između proteze i tkiva obavlja se sa PMMA cementom.

Široku primenu u izradi veštačkih krvnih sudova su našli poliuretani. Za ovu vrstu primene neophodno je da polimer ne izaziva trombozu i da enzimski procesi koji se odigravaju u kardiovaskularnom sistemu ne utiču na stabilnost poliuretana.² Prilikom kontakta krvi i biomaterijala može doći do procesa koagulacije, stvaranja tromba i drugih nepoželjnih faktora. Kinetike koagulacionih reakcija mogu se matematički modelovati i tako dobiti vremenska zavisnost stvaranja produkata. Svaka reakcija je uslovljena koeficijentom prenosa mase (k_f).¹⁵

Polietilen ultra visoke molske mase (UHMWPE) zbog odgovarajućih mehaničkih osobina kao i dobre otpornosti na trenje široko se koristi za izradu veštačkih zglobova.² Zbog niskog koeficijenta frikcije i dobre fizičke i hemijske stabilnosti od UHMWPE danas se izrađuju zglobovi kukova.^{2, 14} Od teflona se izrađuju ventilacione cevčice za drenažu zapaljenskih procesa srednjeg uva.¹⁶ Određeni broj totalnih ili parcijalnih proteza u maksilofacijalnoj hirurgiji izrađuje se od polivinilhlorida.²

1.2.2.1.1 Elastomerni bioneresorbilni polimeri

U okviru bioneresorbilnih polimera može se izdvojiti posebna grupa koju sačinjavaju elastomeri.^{17, 18} Polisiloksanski elastomeri, zbog biokompatibilnih osobina široko se upotrebljavaju u medicini.¹⁹⁻²¹ Kao elastomeri polisulfidi nalaze primenu u stomatologiji prilikom određenih reparacija. Polisulfidi u svom lancu sadrže -SH grupu koja se može nalaziti u osnovnom ili bočnom lancu. Oksidacijom -SH grupa sa olovoooksidom dobijaju se -S-S- veze koje utiču na osobine elastomera.¹⁷

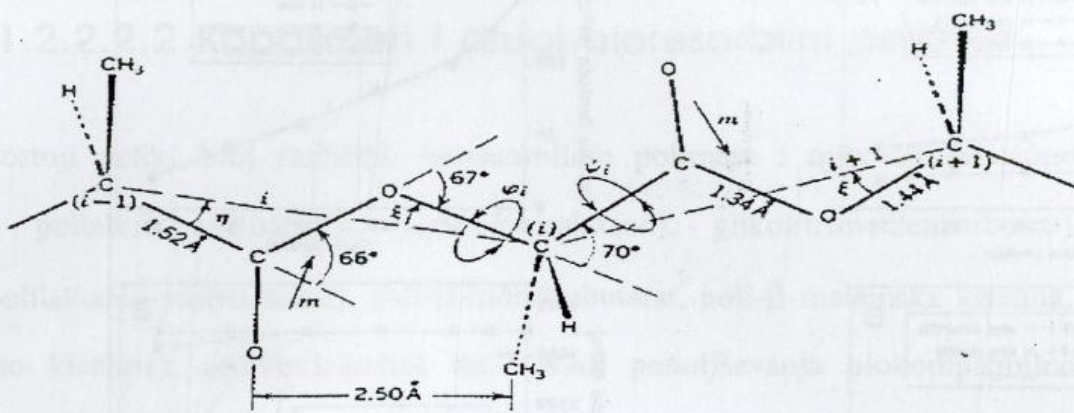
U estetskoj hirurgiji (veštačke grudi i sl) silikonski elastomeri nalaze široku upotrebu.^{14, 17, 20} Dobijanje silikonskih mreža, umrežavanjem silikonskih lanaca ostvareno je različitim postupcima. Jedan od uspešnih umrežavanja ostvaren je uz pomoć organohidrogensiloksana.¹⁷

1.2.2.2 Bioresorbilni polimeri

U poslednje dve decenije upotreba bioresorbilnih (biodegradabilnih) polimera beleži rast. Biodegradabilni polimeri koriste se za izradu sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, nosača u inženjerstvu tkiva, fiksaciju koštanih fraktura, konaca za ušivanje organa i rana itd.^{2, 22} Mehanizam biodegradacije obuhvata više koraka koji se mogu odvijati i paralelno a uključuju klasičnu i enzimsku hidrolizu.²³ Brzina i način degradacije zavisi od vrsta hidrofilnih grupa unutar i na krajevima lanaca, reaktivnosti hidrolitičkih grupa, udela amorfni i kristaliničnih regiona, poroznosti i molske mase polimera. Tokom biodegradacije dolazi do razgradnje polimera uz smanjenje mehaničkih osobina, a smatra se da prvo dolazi do razgradnje u amorfni područjima polimera.²⁴ Do sada su se kao bioresorbilni polimeri najčešće upotrebljavali polilaktidi, poliglikoli itd.

1.2.2.2.1. Polilaktid (PLA)

Krajnji produkti razgradnje PLA se nesmetano uključuju u metabolizam tkiva dajući pri tome netoksične produkte. Mehaničke osobine PLA zavise od strukture materijala na svim nivoima i mogu biti različite tako da se moduli elastičnosti PLA kreću od 0,5-10 GPa.² Dosta ispitivan polimer iz ove grupe je poli-l-laktid (PLLA) čija struktura lanca je prikazana na slici 1.2.



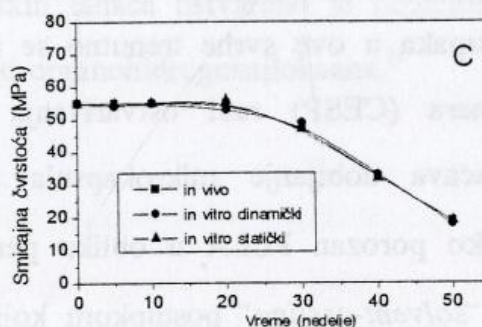
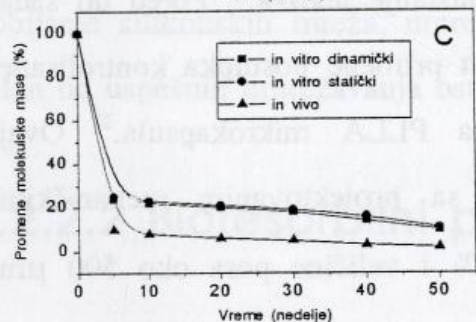
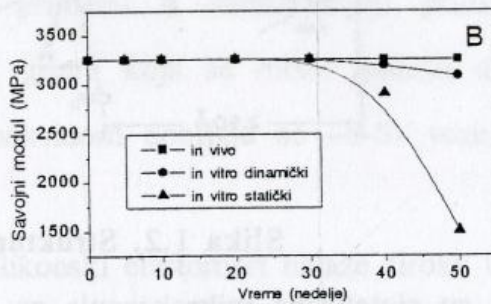
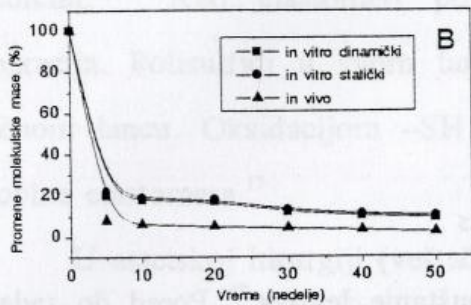
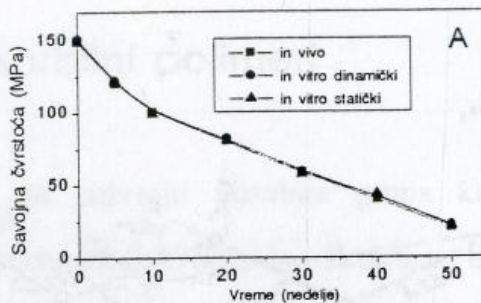
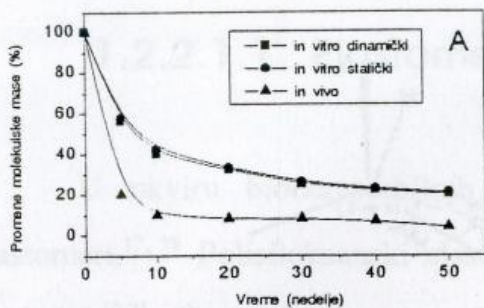
Slika 1.2. Struktura lanca PLLA²⁵

Od PLLA su sintetisane mikrokapsule za kontrolisano otpuštanje lekova.²⁶ Pored do sada primenjenih postupaka u ove svrhe trenutno se ispituje mogućnost primene postupka kontrolisane ekspanzije polimera (CESP) radi ostvarivanja kontrole osobina PLLA mikrokapsula.²⁷ Ovaj postupak omogućava dobijanje mikrokapsula ali i implanata sa projektovanim mehaničkim osobinama. Visoko porozan PLLA u obliku pene poroznosti 93% i veličine pora oko 500 μm može se dobiti "solvent-casting" postupkom koji omogućava dobijanje definisane veličine pora i regulaciju udela kristaliničnosti.²⁸ Ova vrsta pene našla je široku upotrebu u inženjerstvu tkiva kao polimerni nosač koji obezbeđuje dobru adherenciju i diferencijaciju osteoblasta u *in vivo* kulturama.²⁸

Postoji čitav niz različitih faktora koji utiču na strukturu i osobine sintetisanog PLLA. Počev od izbora rastvarača koji se koristi u sintezi PLLA i koji direktno utiče na interakcije PLLA-rastvarač, a stim i na daljnje osobine PLLA pa do načina i dinamike sušenja.²⁹ Ključni parametri koji utiču na molsku masu PLLA su: rekristalizacija monomera, koncentracija inicijatora i nivo vakuuma u procesu sušenja polimera.³⁰ Kontrola i upravljanje kinetikom kristalizacije polimera PLLA ostvarena je različitim načinima, od kojih je izotermalna kristalizacija pokazala zadovoljavajuće rezultate.³¹

Amorfna područja PLLA predstavljaju centre u kojima započinje biodegradacija i hidroliza. Smatra se da veličina PLLA sferulita u poređenju sa udelom amornog područja nema značajniju ulogu u procesu biodegradacije.³² Tokom procesa biodegradacije dolazi do smanjenja pH okoline, molske mase, modula i jačine na kidanje i povećanja kristaliničnosti PLLA. Na slici 1.3 prikazane su promene molske mase tri različita polilaktida tokom *in vitro* i *in vivo* statičkih i dinamičkih ispitivanja. Promene jačine na kidanje prilikom istraživanja iste vrste prikazane su na slici 1.4.





Slika 1.3. Promena molske mase: A-P(L)LA, B-P(L/D)LA, C-P(L/DL)LA³³

Slika 1.4. Promena mehaničkih osobina PLLA³⁴

Poređenjem *in vitro* i *in vivo* ispitivanja može se zaključiti da su promene drastičnije prilikom *in vivo* ispitivanja, što je i očekivano. Prilikom *in vivo* ispitivanja PLLA dolazi u dodir sa različitim enzimskim sistemima, što poštava uslove sredine, ali i daje realnu sliku osobina PLLA.³³ Tokom jednogodišnjih *in vivo* ispitivanja utvrđeno je da nakon 3 meseca analizirani PLLA zadržava 70% početne vrednosti savojne čvrstoće i 95% početne vrednosti jačine na kidanje.³⁴

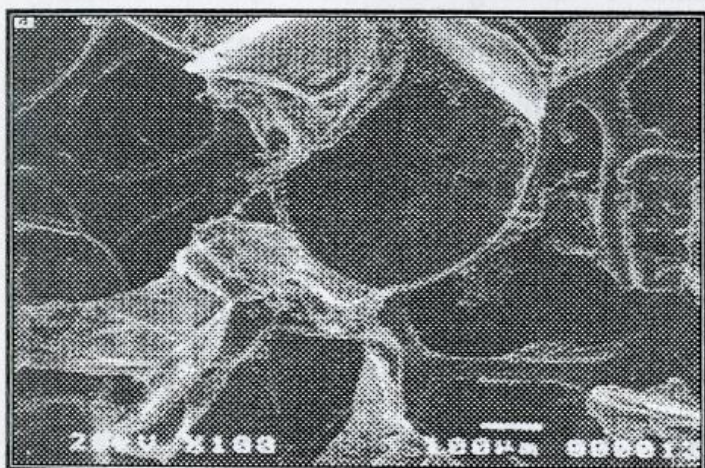
Sa membranama od PLLA izvršen je niz reparacija koštanih defekata.³⁵⁻³⁷ Adhezija ćelija i proliferacija tkiva kroz PLLA ispitana je i definisana u *in vivo* uslovima.³⁸ Od PLLA načinjena je trodimenzionalna porozna matrica u čije pore može se distribuirati želatin, polisaharidi, proteini i soli, a koja se može koristiti u reparacijama koštanog i hrshavičavog tkiva.³⁹ Visoko porozan PLLA pokazao se kao dobar nosač ćelijskih kultura u inženjerstvu tkiva.⁴⁰⁻⁴²

Pre upotrebe PLLA neophodno je izvršiti njegovu sterilizaciju koja ne sme da utiče na mehaničke osobine, molekulsku stabilnost, molsku masu, udeo amorfnih regiona itd. Ispitivanjem je utvrđeno da je za sterilizaciju PLLA, umesto do sada široko korišćenog etilenoksida, optimalnije upotrebiti nisko temperaturnu radio frekventnu plazmu kiseonika ili ugljendioksida (RF) koja bitnije ne utiče na strukturu i osobine PLLA.⁴³

1.2.2.2 Kopolimeri i drugi bioresorbilni polimeri

Postoji veliki broj različitih bioresorbilnih polimera i njihovih kopolimera: poli(laktid-co-glikolid), polialkil-2-cianoakrilat, poli(ϵ -kapralakton), glikol(trimetilenkarbonat), poli-l-laktid(dl-laktid), polilaktid(δ -valerolakton), poli- β -hidroksibutarat, poli- β -maleinska kiselina, poli-p-dioksanon, poli(amino kiseline), polivinilalkohol itd.⁴⁴ Radi poboljšavanja biokompatibilnosti monomeri za dobijanje biodegradabilnih polimera se kopolimerizuju sa monomerima bionedegradabilnih polimera. Jedan od takvih primera je blok kopolimer na bazi PLA (polilaktid-polietilenglikol blok kopolimer).^{45, 46} Ovakvom sintezom dobijen je kopolimer koji je pokazao dobra svojstva nosača koštanog morfogenetskog proteina (BMP) neophodnog za regeneraciju koštanog tkiva (poglavlje 7).⁴⁵ Iz monomera laktida i glikola može se dobiti kopolimer poli(laktid-co-glikol).²⁸ Na slici 1.5 prikazana je struktura ovog kopolimera dobijena SEM-om.

In vivo ispitivanja poli(laktid-co-glikol) kopolimera utvrdila su da ova vrsta kopolimera



može biti induktivna za stvaranje i adsorpciju kolagena, vezivne komponente tkiva.⁴⁷ Tokom ispitivanja registrovana je ne samo adsorpcija osteoblasta na kopolimeru već i njihova proliferacija i diferencijacija.⁴⁸

Slika 1-5. SEM 90% poroznog kopolimera poli(laktid-co-glikolid)²⁸

Graftovanjem PLLA sa aminokiselinama dobijen je poli(l-laktid-co-amino kiselina) graftovan polimer. Amino kiseline sa kojima je ispitana mogućnost graftovanja su lizin i alanin.⁴⁹

Za rekonstrukciju meniskusa uspešno je iskorišćen porozni bioresorbilni poliuretani.⁵⁰

1.2.3 Keramički i biomaterijali na bazi stakla

Reparacija tkiva uslovljena optimalnim mehaničkim karakteristikama može se izvršiti sa bioinertnom (cirkonijum, alumina), bioresorbilnom (TCP) ili bioaktivnom (bioaktivno staklo, hidroksiapatit) keramikom, koja se najčešće zove biokeramika.³

Cirkonijudioksid (ZrO_2) koristi se za izradu kompletnih delova zglobnih proteza.^{2, 5, 51} Upotrebljava se u tetragonalnoj formi, stabilizovanoj sa oksidima određenih elemenata. $ZrO_2 +$

3mol% Y_2O_3 je najčešće korišćen oblik ove keramike i označava se kao TZP.⁵¹ Dodatkom CaO ili MgO u količinama od 8-10 mol% ZrO_2 dobija se cirkonijumova keramika označena kao PSZ.⁵¹

Tokom *in vitro* ispitivanja utvrđeno je postojanje Zr-OH i Y-OH veza na međufaznoj površini sa okolnim tkivom, što može prouzrokovati negativne reakcije u okolnom tkivu.⁵¹

Visoko čista, polikristalna α -alumina (Al_2O_3) je biokeramika koja je prva našla širu upotrebu u izradi dentalnih implanta i koštanih proteza (kuka, zglobova itd). Niska korozivnost, dobra biokompatibilnost, nizak koeficijent frikcije i visoka jačina omogućavaju širu upotrebu ove keramike u medicini.^{2, 3, 5, 52}

Reparacija manjih defekata koštanog tkiva obavljena je sa trikalcijum fosfatom (TCP).^{3, 53} Različitu veličinu i oblik pora (od 100 – 800 μm) u blokovima TCP moguće je dizajnirati uz pomoć H_2O_2 , poliuretanske pene ili ugljeničnih vlakana.⁵³

Široku upotrebu u kliničkoj praksi zabeležilo je bioaktivno staklo (bioaktivna staklena keramika).^{2, 3, 5, 54, 55} Implant sačinjen od bioaktivnog stakla poseduje visoku površinsku aktivnost koja rezultira u formiranju jake veze između implanta i okolnog tkiva. Postoji više vrsta bioaktivnog stakla od kojih najveću primenu našao Bioglass 45S5, rezultat istraživanja L. Hench-a i saradnika.^{3, 5}

Zbog visoke rezistencije formiranja krvnih ugrušaka pirolitički ugljenik dosta se koristi kao biomaterijal za oblaganje veštačkih srčanih zalistaka. Pored pirolitičkog ugljenika takođe se koristi nisko gusti i staklasti ugljenik.^{3, 5}

1.2.3.1 Kalcijum hidroksiapatit (HAp)

Koštano tkivo sastoji se iz kalcijum fosfata (69 mas%), kolagena (20 mas%), vode (9 mas%) i ostalih elemenata (2 mas%). Kalcijum fosfat u formi kristalnog hidroksiapatita (HAp) ili amorfno kalcijum fosfata (ACP), obezbeđuje mehaničku čvrstoću kostima.⁵⁶ Hemijski sintetisan HAp je vrlo sličan prirodnom (tabela 1.1) HAp i iz ovih razloga široko se primenjuje kao keramički biomaterijal u reparacijama koštanog i hrskavičavog tkiva.

Tabela 1.1. Kristalografski parametri sintetisanog i prirodnog HAp¹

biomaterijal	parametar (nm)	
	a	b
dentalni HAp	0,944	0,688
sintetski HAp	0,942	0,688

Sa granulama ili prahom sintetskog HAp izvršen je niz reparacija koštanog tkiva.⁵⁷⁻⁶³

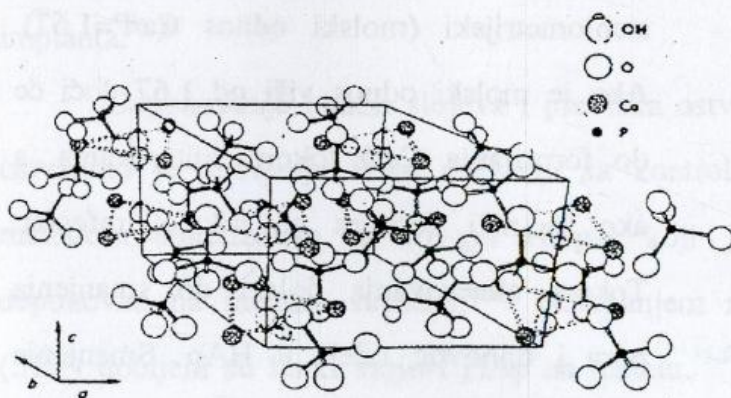
Analizom međufazne površine kost – hidroksiapatit, utvrđen je značaj bliskog kontakta HAp implanta i okolnog tkiva radi uspešnosti implantacije.⁶³ Pored hemiskog sastava i drugi faktori utiču na odgovor organizma među kojima je poroznost, veličina i raspored pora.⁶² Postoje različita mišljenja o optimalnom prečniku pora neophodnih za adherenciju, diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta. Tkivo ne može da prolifериše kroz pore čiji je prečnik manji od 100-150 μm .^{1,3} Smatra se da prečnik pora od 200-500 μm može biti optimalan za regeneraciju koštanog tkiva.^{64,65}

1.2.3.1.1 Dobijanje HAp

HAp se može dobiti u obliku praha, porozne ili guste keramike različitim sintezama. Sinteze su različite a takođe i krajnja morfologija i stehiometrija HAp.^{66,67}

Postoje dva osnovna načina za dobijanje HAp prahova i ona u sebi sadrže vlažne metode i reakcije u čvrstom stanju. U slučaju sinteze prahova HAp mokrim postupkom, postoje tri grupe postupaka: precipitacija, hidrotermalna obrada i hidroliza kalcijum fosfata.

Pri precipitaciji kalcijum fosfata iz visoko presićenih rastvora formira se amorfna faza koja se zatim transformiše u stabilnije kristalne forme.^{68,69}



Mineral hidroksiapatit ima heksagonalnu kristalnu strukturu (slika 1.6). Prema literaturnim podacima ose simetrije elementarne ćelije su $a(=b)$ između 0,9433 i 0,9421 nm i c 0,688 nm. Varijacije ovih vrednosti posledica su načina pripreme uzorka ili prisustva primesa.

Slika 1.6. Heksagonalna struktura kristala HAp⁷⁰

Najveći broj uzoraka HAp sintetisanih precipitacijom pri sobnoj temperaturi ima nestehiometrijsku strukturu sa molskim odnosom Ca/P od 1,33 do 1,67. Međutim difraktogrami i IR spektri HAp sa deficitarnim sadržajem kalcijuma i stehiometrijskog HAp su skoro indentični, što znači da nestehiometrijska jedinjenja zadržavaju osnovne karakteristike HAp-a.⁶⁷ Stehiometrijski HAp označen kao $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ poseduje odnos Ca/P od 1,67, dok HAp sa deficitarnim sadržajem kalcijuma označen kao $\text{Ca}_{(10-x)}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{OH})_{(2x)}$ ima odnos Ca/P ispod 1,5. Biološki apatiti su deficitarni sa sadržajem kalcijuma.⁷¹ Iz ovih razloga predmet određenih

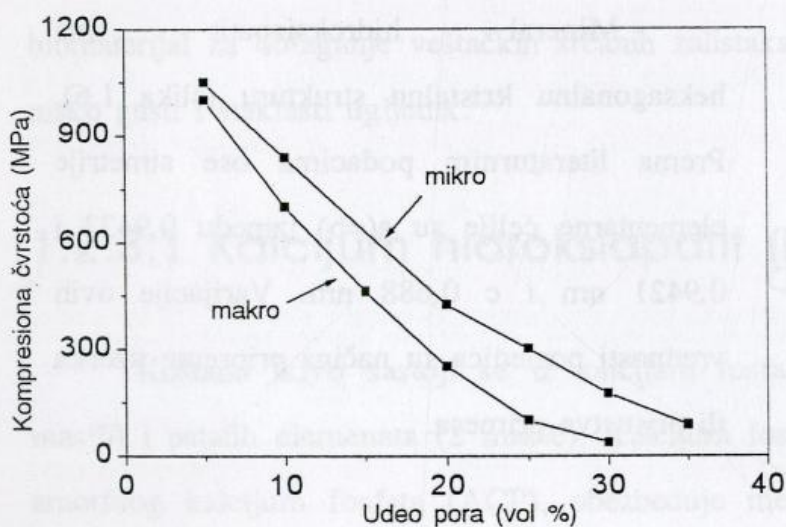
istraživanja je bila sinteza praha HAp-a sa deficitarnim sadržajem kalcijuma, pomoću modifikovane precipitacione metode.^{71,72}

Postoje brojne alternativne metode za dobijanje praha HAp, kao što je sol-gel sinteza, fluks metoda, sprej piroliza, elektrokristalizacija itd.⁵⁶ Posebno interesantnu grupu istraživanja predstavljaju postupci sinteze HAp iz veštački sintetisanih telesnih tečnosti (*Simulated Body Fluid – SBF*).^{73, 74} Nakon potapanja substrata u SBF najpre dolazi do formiranja nukleusa HAp, a u narednom koraku dolazi do rasta faze HAp.⁷³ Pored staklenog praha i silika gel se može koristiti kao supstrat. U tom slučaju silanolne grupe imaju ključnu ulogu u formiranju mesta nukleacije HAp.⁷⁴

1.2.3.1.2 Porozna i gusta HAp keramika

HAp keramika u poroznom stanju se često koristi kao zamena za kost. Koštano tkivo raste unutar pora, povećavajući jačinu HAp implanta. Međutim zbog neophodnog prisustva pora implant nema zadovoljavajuće mehaničke osobine, pa se ne može kao takav koristiti gde postoje zahtevi za povećanim mehaničkim osobinama implanta.⁵⁶

Dobijanje guste HAp keramike sa visokim vrednostima mehaničke čvrstoće moguće je



sinterovanjem, ako je polazni prah HAp stehiometrijski (molski odnos Ca/P=1,67). Ako je molski odnos viši od 1,67 doći će do formiranja CaO tokom sinterovanja, a ako je niži formira se trikalcijumfosfat. Tokom sinterovanja dolazi do smanjenja pora i njihovog udela u HAp. Smanjenje pora utiče na povećanje mehaničkih osobina HAp.⁷⁵

Slika 1.7. Zavisnost kompresione čvrstoće od udela mikro i makro pora.⁷⁵

Na slici 1.7 prikazana je zavisnost kompresione čvrstoće blokova HAp od udela makro i mikro pora.⁷⁵ Sinterovanje praha se može obaviti na različitim temperaturama, s tim što na visokim temperaturama može doći do preteranog rasta zrna i razlaganja HAp.^{56,76,77}

U zavisnosti od metode merenja modul elastičnosti guste HAp keramike nalazi se u intervalu od 35-120 GPa.⁵⁶

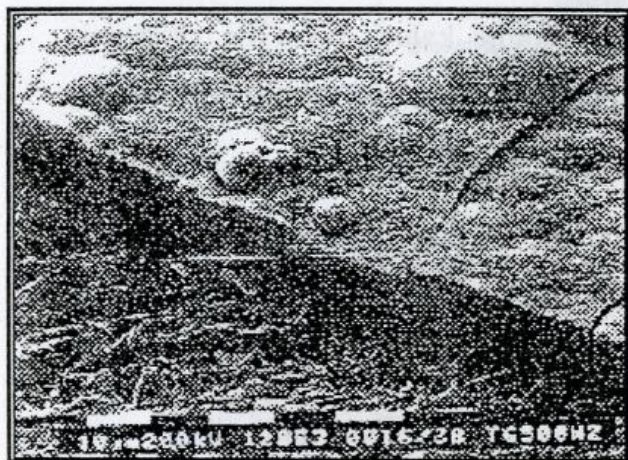
Temperatura sinterovanja utiče na mogućnost pojave trodimenzionalnih defekata u heksagonalnoj kristalnoj strukturi. Ova vrsta defekta ima bitan uticaj na ponašanje HAp u *in vivo* uslovima.⁷⁸

1.2.3.1.3 HAp tanki slojevi i prevlake

Depozicijom tankih slojeva na substrate metala, stakla ili polimera ostvorena je površinska modifikacija substrata u cilju poboljšanja biokompatibilnosti i drugih funkcionalnosti. Oblaganjem

metalnih implanata sa HAp tankim slojevima i prevlakama ne samo da je povećana biokompatibilnost metala uz očuvanje mehaničkih osobina implanta, već je i smanjeno oslobađanje metalnih oksida i jona u okolno tkivo.⁵⁶ Na slici 1.8 prikazan je SEM prevlake HAp na substratu od titana.

Slika 1.8. SEM deponovanog HAp na substratu od titana⁷⁹



Adhezija okolnog tkiva je značajnije uvećana kada je metalni implant obložen sa HAp. Ovakvim pristupom poboljšava se fiksacija proteze i implanta.^{80, 81}

Deponovanje tankih slojeva i prevlaka ostvaruje se različitim metodama. Sol – gel metodom ostvareno je dobijanje HAp prevlaka sa kontrolisanom kristalnošću i veličinom kristala. Ovom metodom sintetizovan je sol-gel HAp-a koji je pomoću *dip-coating* ili *spin-coating* tehnika deponovan na metalni supstrat.⁸²⁻⁸⁵ Natapanjem metalnog supstrata veštačkom telesnom tečnošću (SBF) dobijeni su tanki slojevi HAp na metalu.⁷³⁻⁷⁴ Istom metodom ostvareno je oblaganje substrata od prirodnog biomaterijala kolagena sa HAp.⁸⁶ Uočeno je da nakon vremena potapanja od 1 nedelje na 36,5°C dolazi do potpune pokrivenosti vlakana kolagena sa sfernim česticama HAp.⁸⁶

1.2.4 Prirodni biomaterijali

Ova grupa predstavlja materijale dobijene iz prirode. Zbog svojih osobina biomaterijali iz ove grupe sačinjavaju posebnu celinu, bez obzira što po svom hemijskom sastavu mogu biti polimeri, keramika ili kompoziti. Prirodni biomaterijali su najmanje toksični u poređenju sa svim ostalim biomaterijalima. Međutim, posebno polimerni prirodni biomaterijali mogu izazvati različite

negativne imunološke reakcije nakon implantacije. Oni su termički vrlo osjetljivi, zbog mogućnosti denaturacije na povišenim temperaturama.²

Reparaciju koštanog tkiva moguće je obaviti sa koralnim kalcijumkarbonatom ili hidroksiapatitom.^{2, 87, 88} Uz pomoć koralala vrše se reparacije koštanog tkiva koje zahtevaju nadoknadu izgubljene keramičke komponente kostiju.

Kolagen u ovom trenutku predstavlja prirodni biomaterijal koji se dosta široko koristi u medicini, a i šire. Upotrebljava se u različite svrhe u prirodnom ili hidrolizovanom obliku.²

Prilikom aplikacije kolagena tokom reparacije koštanog i hrskavičavog tkiva može se upotrebiti smeša kolagena i glukosaminoglukana koja inicira stvaranje kalusa i krajnje zarastanje koštanih defekata. Glukosaminoglukan se može koristiti kao biomaterijal i samostalno, ali ne tako uspešno kao u kombinaciji sa drugim polimerima.⁸⁹ Ovi razlozi su doveli do sinteze posebne vrste kopolimera tipa kolagen – glukosaminoglukan i njihove upotrebe sa ciljem ubrzavanja procesa reparacije. Kopolimeru kolagen – glukosaminoglukan se dodaje triplet amino kiselina Gly-His-Lys (GHL), koji nakon aplikacije do određene mere može da ubrza reparaciju koštanog tkiva.⁹⁰ Reparacija manjih hrskavičavih defekata uspešno je obavljena i sa polisulfonovanim glukosaminoglukanom.⁹¹ Kopolimer kolagen – glukosaminoglukan modifikivan je sa silikonom u cilju dobijanja kolagen – glukosaminoglukan- silikon membrane koja se koristi u procesima fiksacije koštanih i hrskavičavih defekata.⁹²

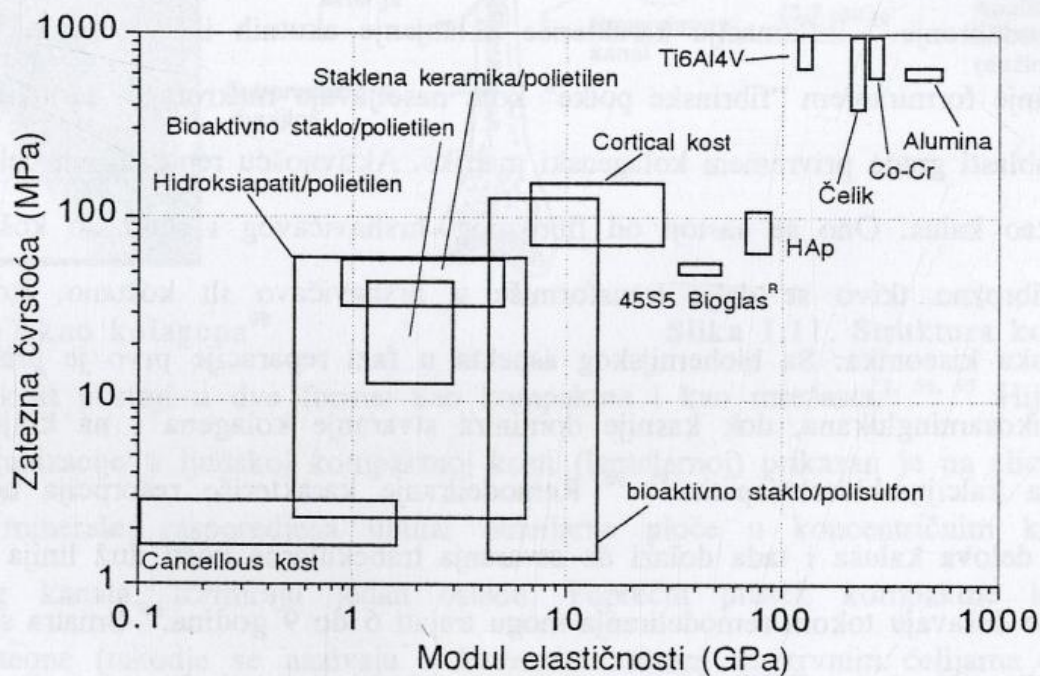
Porast broja bolesti kardiovaskularnog sistema u poslednje dve decenije, posebno broja izvršenih hirurških intervencija zamene srčanih arterija (baj-pas), postavio je zahtev za primenu veštački dobijenih arterija u te svrhe. Arterija se sastoji od tri osnovna sloja koja ispunjavaju mehaničke i biohemijske zahteve. U ovom trenutku minimalna inflamatorna, infektivna i tromboresistentna svojstva ostvarena su dobijanjem arterija od sintetskih vlakana koja su obložena kolagenom. Pored kolagena i elastin kao prirodni biomaterijal se koristi u ove svrhe.⁹³

1.3. Kompozitni biomaterijali

Postoji veliki broj vrsta i grupa kompozitnih biomaterijala sa različitim namenama. Do sada je ostvarena sinteza kompozitnih biomaterijala tipa metal/metal, metal/polimer, metal/keramika, keramika/keramika, keramika/polimer, keramika/prirodni, polimer/polimer kao i sve varijante njihovih kombinacija. Kompozitni biomaterijali trenutno predstavljaju najinteresantnije biomaterijale sa kojima bi se mogla izvršiti reparacija koštanog tkiva. Posebno interesantnu vrstu predstavljaju

kompozitni biomaterijali na bazi HAp, jer kao što je naznačeno u poglavlju 1.2.3.1, on predstavlja glavni sastojak prirodnog koštanog tkiva.

Osnovne grupe kompozitnih biomaterijala na bazi HAp su: HAp/metal, HAp/keramika, HAp/prirodni, HAp/polimer ili kombinacije navedenih grupa.^{3, 5, 56} Kompozitni pristup povećao je mehaničke osobine HAp i omogućio dobijanje biomaterijala na bazi HAp sa širokim intervalom vrednosti modula elastičnosti. Na slici 1.9 prikazana je zavisnost modula elastičnosti od zatezne čvrstoće, različitih grupa kompozitnih biomaterijala.



Slika 1.9. Modul elastičnosti i zatezna čvrstoća kompozita na bazi HAp⁵

Komponente kompozita direktno utiču na biokompatibilnost kompozitnog biomaterijala na bazi HAp-a. U zavisnosti koje faze su prisutne u kompozitu, metal, keramika, polimer ili prirodni, dobija se kompozit sa različitim stepenom biokompatibilnosti.

1.3.1. Kompozitni biomaterijali iz prirode – koštano tkivo

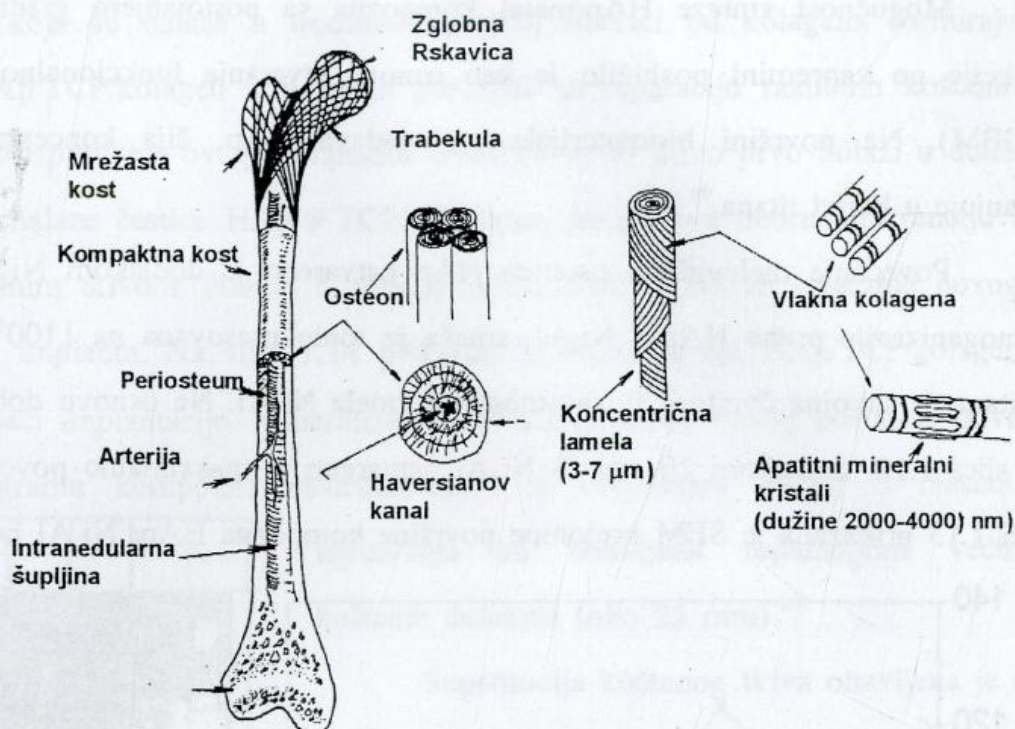
Koštano tkivo (kost) predstavlja kompozitni materijal koji je formirala i dizajnirala priroda. Kost se sastoji iz neorganske komponente koju predstavlja kalcijum fosfatna keramika (69 mas%), proteinske komponente kolagenske prirode (20 mas%), vode (9 mas%) i ostalih elemenata (2 mas%). Kalcijum fosfatna komponenta uglavnom se nalazi u formi kristalnog hidroksiapatita (HAp) ili amorfno kalcijum fosfata (ACP), i ona obezbeđuje mehaničku čvrstoću.⁵⁶ Kristali HAp su prosečne dužine od 40-60 nm, širine 20 nm i debljine 1,5-5 nm i kao takvi formiraju se na kolagenskim vlaknima koja takode utiču na mehaničke osobine kostiju.⁵⁶ Kompresiona čvrstoća kostiju nalazi se u intervalu od 49-174 MPa, a prosečna savojna čvrstoća iznosi oko 160 MPa.⁵⁶

Ekstracelularni koštani matriks sastoji se od 90% kolagenskih proteina (kolagen tip I 97% i kolagen tip V 3%) i 10% nekolagenskih proteina (osteokalcin 20%, osteonektin 20%, koštani sialoprotein 12%, proteoglikan 10%, osteopontin, fibronektin, faktori rasta, koštani morfogogenetski protein (BMP) itd). Sve navedene proteine sintetizuju osteoblasti i oni učestvuju u adheziji ćelija na biomaterijalima.⁹⁴

Prelom kosti pokreće čitav niz reparativnih mehanizama koji na kraju dovode do zarastanja kosti. U mnogim istraživačkim radovima ovi mehanizmi su svrstani u tri stupnja: inflamacija, reparacija i remodeliranje.⁹⁵ Inflamaciju karakteriše uklanjanje akutnih inflamatornih faktora, dok reparacija započinje formiranjem "fibrinske potke" koju naseljavaju makrofage, edotelijalne ćelije i fibroblasti. Fibroblasti grade privremeni kolagenski matriks. Aktivnošću reparatornih ćelija stvara se tkivo poznato kao kalus. Ono se sastoji od fibroznog, hrshavičavog i staklasto koštanog tkiva. Novostvoreno fibrozno tkivo se dalje transformiše u hrshavičavo ili koštano, što zavisi od parcijalnog pritiska kiseonika. Sa biohemijskog aspekta u fazi reparacije prvo je prisutna visoka koncentracija glikosaminglukana, dok kasnije dominira stvaranje kolagena i na kraju dolazi do stvaranja kristala kalcijumhidroksiapatita.^{95, 96} Remodeliranje karakteriše resorpcija nepotrebnih i nefunkcionalnih delova kalusa i tada dolazi do stvaranja trabekularne kosti duž linija opterećenja. Fenomeni koji se dešavaju tokom remodeliranja mogu trajati 6 do 9 godina.⁹⁵ Smatra se da koštani sialoprotein (BSP) i fosforin (DPP) imaju odlučujuću ulogu u inicijaciji mineralizacije kosti i početne nukleacije hidroksiapatita, dok osteopontin (OPN) inhibira nukleaciju hidroksiapatita. BSP, DPP i OPN su proteinske prirode.⁹⁷

Sinteza kolagena sastoji se iz niza kompleksnih reakcija. Prvo dolazi do enzimske sinteze pro- α 1 i pro- α 2 lanaca uz pomoć serina, prolina i hidroksiprolina, koje su ujedno i najčešće amino kiseline u kolagenu. Triplet polipeptidnih lanaca formira prokolagen koji se enzimski transformiše u tropokolagen.^{96, 98} Iz tropokolagena se formiraju kolagenska vlakna (slika 1.10).

Vlakna kolagena predstavljaju mesta na kojima dolazi do formiranja hidroksiapatita, neorganske komponente kostiju (slika 1.11).¹ Kolagen predstavlja gradivnu komponentu kostiju, kože, ligamenat, tetiva itd.² Iz navedenih razloga on predstavlja trenutno najviše korišćeni biomaterijal prirodnog porekla. U zavisnosti u kojoj vrsti tkiva se nalazi postoje različite vrste kolagena označene kao kolagen tipa I, II, III, IV itd. Tip I uglavnom se nalazi u koži, kostima i tetivama, a tipa II u hrskavici. U koži novorođenčeta i u aortama odraslog čoveka može se naći tip III. U određenim membranama organa nalazi se tip IV.⁹⁸



Slika 1.10. Vlakno kolagena⁹⁸

Slika 1.11. Struktura kosti¹

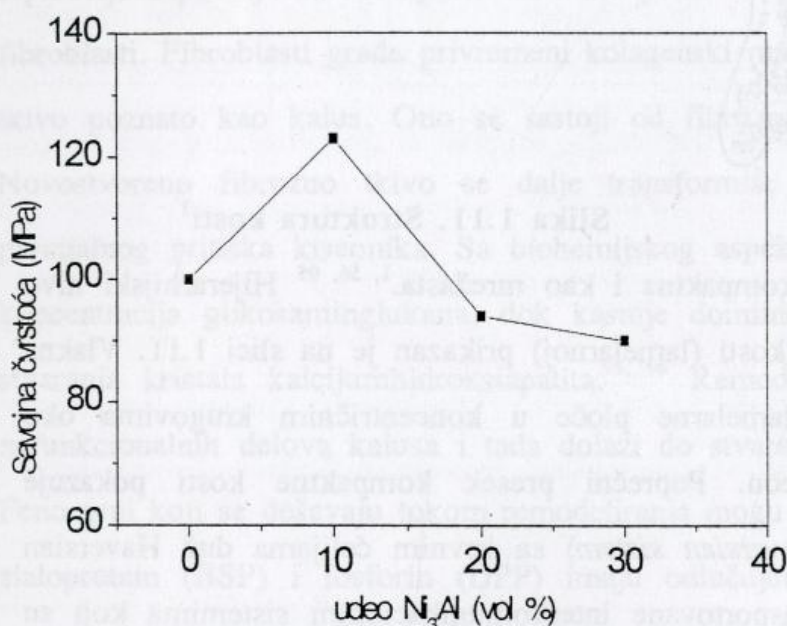
Zrela kost postoji u dve forme: kao kompaktna i kao mrežasta.^{1, 56, 95} Hijerarhijski nivo strukturne organizacije u ljudskoj kompaktnoj kosti (lamelarnoj) prikazan je na slici 1.11. Vlakna koja sadrže minerale, raspoređena unutar lamelarne ploče u koncentričnim krugovima oko Haversianovog kanala, formiraju jedan osteon. Poprečni presek kompaktne kosti pokazuje cilindrične osteone (takodje se nazivaju i *Haversian sistem*) sa krvnim ćelijama duž Haversian kanala. Metaboličke supstance mogu biti transportovane interkomunikacionim sistemima koji su povezani sa šupljinom koštane srži. Različiti medjusobno povezani sistemi, popunjeni su telesnim fluidima i njihova zapremina se kreće do 19 %. Mrežasta kost (trabekularna ili sundjerasta kost) je ćelijski materijal koji se sastoji od povezane mreže štapića i tanjirića. Mala gustina i struktura u obliku štapića dolaze do izražaja u oblastima delovanja niskog pritiska na kost, dok velika gustina i struktura u obliku tanjirića dominiraju u oblastima visokih opterećenja.

1.3.2. HAp/metal kompoziti

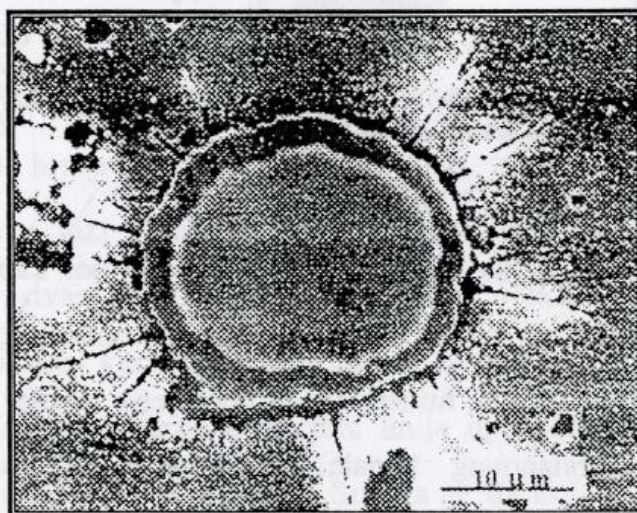
Kompoziti tipa HAp/metal najčešće se javljaju kod tankih slojeva ili prevlaka HAp na metalnim substratima.³ Kao što je i ranije naznačeno (poglavlje 1.2.3.1.3) moguće tehnike depozicije su brojne, a takode i supstrati mogu biti različiti. Natapanjem substrata od zlata u SBF uz pomoć piezoelektričnog kvarcnog oscilatora ostvarena je nukleacija i rast kristala HAp na substratu.⁷³ Promenom frekvence oscilatora tokom vremena potapanja optimizovan je nukleacioni period.

Mogućnost sinteze HAp/metal kompozita sa postojanjem gradijenta hemijskog sastava i funkcije po zapremini poslužilo je kao osnova stvaranja funkcionalno gradijentnih biomaterijala (FGBM). Na površini biomaterijala preovladava HAp, čija koncentracija se ka unutrašnjosti smanjuje u korist titana.⁹⁹

Povećanje mehaničkih osobina HAp ostvareno je dodatkom Ni₃Al u prah HAp.¹⁰⁰ Nakon homogenizacije praha HAp i Ni₃Al, smeša je toplo presovana na 1100°C a dobijenom kompozitu ispitana je savojna čvrstoća u zavisnosti od udela Ni₃Al. Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih na slici 1.12, dodatkom 10 vol % Ni₃Al ostvareno je maksimalno povećanje savojne čvrstoće. Na slici 1.13 prikazana je SEM prelomne površine kompozita HAp/ Ni₃Al koji sadrži 10 vol% Ni₃Al.



Slika 1.12. Zavisnost savojne čvrstoće HAp/ Ni₃Al od udela Ni₃Al¹⁰⁰



Slika 1.13. SEM kompozita HAp/ Ni₃Al sa 10 vol% Ni₃Al¹⁰⁰

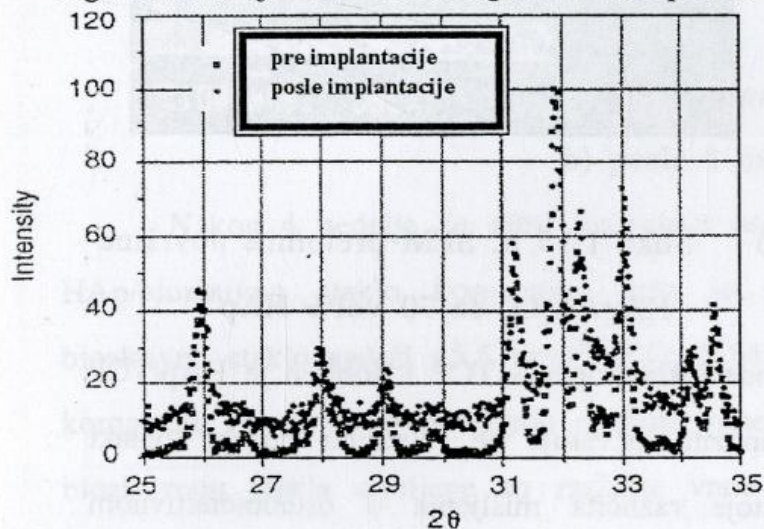
Središnja kružna površina na slici 1.13 potiče od Ni₃Al koji je okružen komponentom HAp. Međufaznu površinu karakteriše niz pukotina koje se nastavljaju ka komponenti HAp. Najverovatnije da su pukotine rezultat naprezanja koja se javljaju usled različitih osobina faza tokom procesiranja kompozita.

HAp se može ojačati i metalnim vlaknima, a takva vrsta vlaknastog HAp/metal kompozita sa 20-30% metalnih vlakana, može da ima žilavost od 6 – 7,4 MPam^{1/2}.⁵⁶

1.3.3. HAp/prirodni kompoziti

HAp/prirodni kompoziti označeni kao bioaktivni kompoziti u najvećoj meri se odnose na HAp/kolagen kompozite.^{3, 101} U poređenju sa čistim HAp, HAp/kolagen kompoziti izazivaju minimalnu inflamatornu reakciju, koja nakon 16 nedelja *in vivo* ispitivanja potpuno nestaje.¹⁰¹

Čestice HAp i TCP koje se nalaze u trodimenzionalnoj matrici od kolagena formiraju trokomponentan kompozit HAp/TCP/kolagen koji može poslužiti za reparaciju različitih koštanih defekata.^{102, 103} Tokom *in vivo* ispitivanja ovog kompozita utvrđeno je da tkivo prvo dolazi u dodir sa kolagenom ispod koga se nalaze čestice HAp i TCP. Kolagen omogućava dobru adherenciju i integraciju kompozita sa okolnim tkivom. Nakon 6 nedelja ispitivanja uočava se stvaranje novog tkiva i kompletna integracija implanta. Na slici 1.14 prikazan je difraktogram HAp/TCP/kolagen kompozita pre i nakon 6 meseci implantacije. Mineralizacija tkiva i stvaranje novog koštanog tkiva registrovano je na difraktogramu kompozita ekstrahovanom iz organizma nakon 6 meseci.



Ispitivanja su obavljena reparacijom većih koštanih defekata (oko 25 mm).¹⁰²

Supstitucija koštanog tkiva obavljena je i sa HAp/elastin kompozitom, kod koga su čestice HAp fino dispergovane u osnovi od elastina. Tokom ispitivanja *in vivo* utvrđena je dobra adherencija osteoblasta na kompozitu, kao i njihova proliferacija.¹⁰⁴

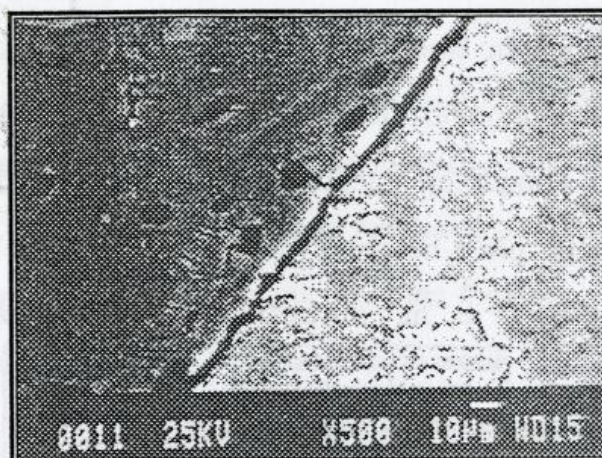
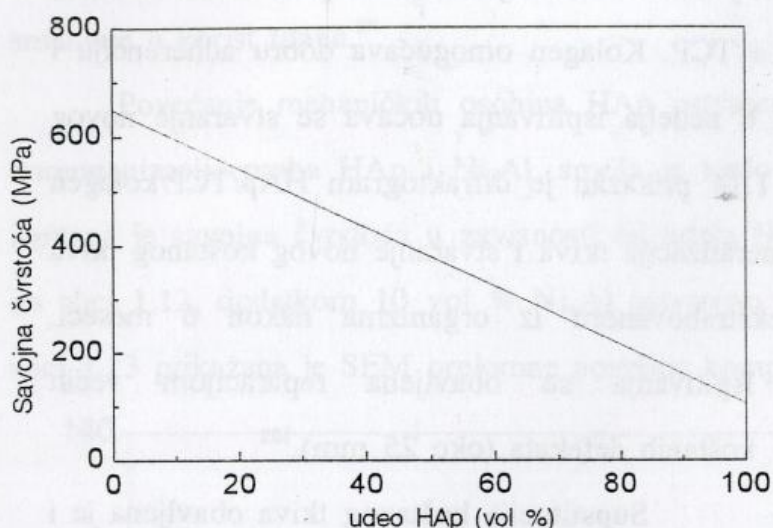
Slika 1.14. Difraktogram HAp/TCP/kolagen kompozita pre i posle 6 meseci od implantacije¹⁰²

K. Nishihara u svojim istraživanjima predložio je postupak dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/kolagen koji bazira na mešanju HAp i predhodno pripremljenog kolagen-fosfatnog rastvora.¹⁰⁵ Smeša se zatim sinteruje na temperaturi koja je ispod 100°C. U okviru HAp/kolagen kompozita mogu biti dispergovani različiti molekuli faktora rasta, antibiotika ili proteina odgovornih za adheziju. S. Jefferies u svojim istraživanjima predložio je sintezu takve vrste kompozita koja u sebi sadrži maksimum 20 mas% HAp komponente.¹⁰⁶

1.3.4. HAp/keramika kompoziti

Povećanje mehaničkih karakteristika HAp ostvareno je sintezom HAp/keramika kompozita sa Al₂O₃ keramikom kao ojačavajućom komponentom.⁵ Na slici 1.15a. prikazana je zavisnost savojne čvrstoće HAp/Al₂O₃ od zapreminskog udela HAp u kompozitu, a na slici 1.15b prelomna površina kompozita sa 70 vol% HAp. Uočava se da savojna čvrstoća raste sa povećanjem vol% Al₂O₃ u kompozitu i obrnuto. U međufaznoj površini ne postoji blizak kontakt HAp i Al₂O₃

(slika 1.15 b), ali se ne uočava pojava pukotina ka komponenti HAp (kao kod HAp/Ni₃Al kompozita).



Slika 1.15 a. Zavisnost savojne čvrstoće od vol% HAp u HAp/ Al₂O₃ kompozitu¹⁰⁷

Slika 1.15 b. SEM prelomne površine HAp/Al₂O₃ sa 70 vol% HAp¹⁰⁷

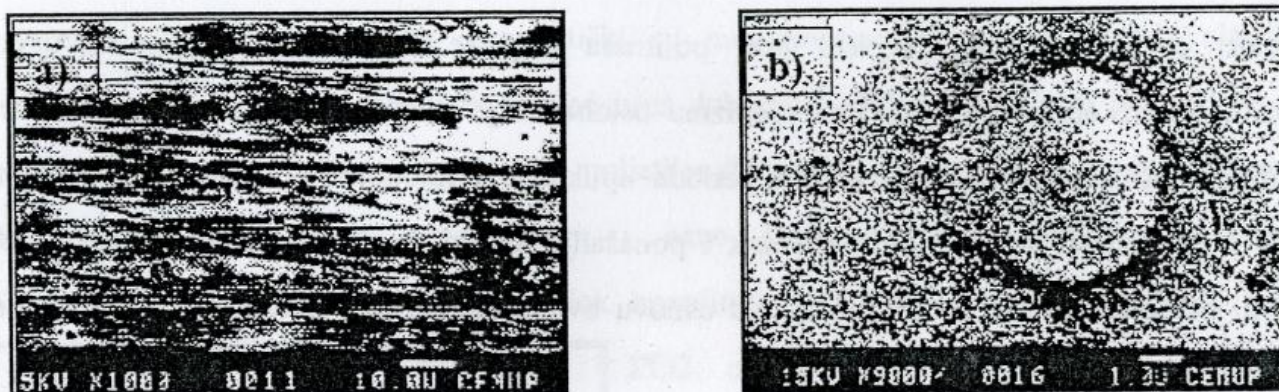
Zbog sličnog hemijskog sastava HAp-u je dodata komponenta TCP i dobijen je HAp/TCP kompozit.^{56, 108} U međufaznoj površini ovog kompozita ostvaruje se relativno blizak kontakt komponenti, bez pojava pukotina. Međutim postoje različita mišljenja o osteoinduktivnom potencijalu i biokompatibilnim osobinama ovog kompozita. Y. Harada i saradnici su ispitali mogućnost adhezije, proliferacije i diferencijacije različitih faktora odgovornih za proces inflamacije kod kompozita HAp/TCP.¹⁰⁸ Razmatrani faktori su interleukin 1 β (IL-1 β) i tumorski nekrotični faktor α (TNF- α). Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da se stvaranje TNF- α kod HAp/TCP kompozita odvija na isti način kao i kod čistog HAp dobijenog sinterovanjem na 900°C i 1200°C. Iste zavisnosti su uočene i kod stvaranja IL-1 β .

Keramičku komponentu u HAp/keramika kompozitima može da predstavlja i ZrO₂, SiO₂, CaSO₄ ili vlakna HAp.⁵⁶ Dodatkom različitih vrsta keramike u HAp povećavaju se njegove mehaničke karakteristike ali ujedno se smanjuje biokompatibilnost kompozita i povećavaju teškoće procesiranja zbog čega ova vrsta kompozita nije našla širu kliničku upotrebu.⁵⁶

1.3.5. HAp/bioaktivno staklo kompoziti

HAp/bioaktivno staklo kompoziti zauzimaju visoko mesto kao biomaterijali koji se trenutno najviše koriste za zamenu malih kostiju srednjeg uva. Ova vrsta kompozita pokazuje visoku biokompatibilnost i bioaktivnost, što rezultira čvrstom vezom implant-tkivo.⁵⁶ Na slici 1.16

prikazana je mikrostruktura površine HAp/bioaktivno staklo kompozita pre i posle 4 nedelje *in vitro* ispitivanja.



Slika 1.16. Površina HAp/bioaktivno staklo kompozita: a) pre;
b) posle 4 nedelje *in vitro*¹⁰⁹

Nakon 4 nedelje *in vitro* ispitivanja uočava se indukcija i rast kristala HAp na površini HAp/bioaktivno staklo kompozita, koja je potvrđena rendgenskom analizom.¹⁰⁹ Analizirano bioaktivno staklo sadrži 45,5 mol% P₂O₅ i 54,5 mol% CaO. Bioaktivnu staklenu komponentu u kompozitu mogu da predstavljaju različite vrste bioaktivnih stakala. U zavisnosti od udela i vrste bioaktivnog stakla dobijene su različite vrste kompozita HAp/bioaktivno staklo.⁵ U tabeli 1.2 prikazane su osobine najčešće do sada korišćenih kompozita.

Tabela 1.2. Osobine komercijalnih kompozita HAp/bioaktivno staklo⁵

Osobina	Ceravital	Cerabone A/W	Implant I	Bioverit
gustina (g/cm ³)	-	3,07	-	2,8
tvrdoća (HV)	-	680	-	500
kompresiona jačina (MPa)	500	1080	-	500
savojna čvrstoća (MPa)	-	215	160	100 – 160
Jungov modul (GPa)	100 – 150	218	-	70 – 88
jačina na kidanje (MPam ^{1/2})	-	2,0	2,5	0,5 – 1,0

1.4. HAp/polimer kompoziti

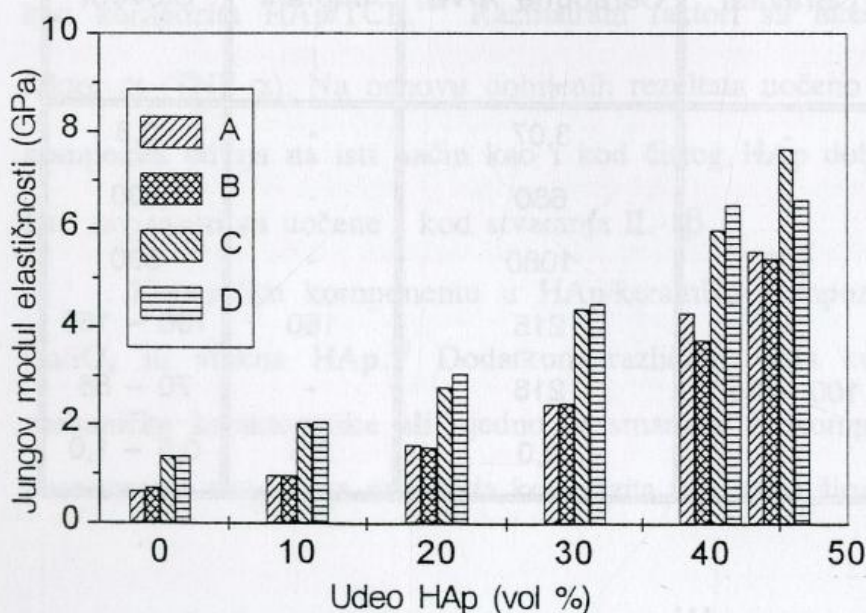
HAp/polimer kompoziti su po mehaničkim osobinama najpribližniji osobinama prirodnog koštanog tkiva (slika 1.9).^{5, 56} Struktura kompozita HAp/polimer najviše podražava strukturu prirodnog koštanog tkiva. Kontinualna matrica od polimera u kojoj je raspoređena HAp komponenta podseća na kolagensku komponentu u kojoj su fino distribuirane čestice kristala HAp.

Kompoziti HAp/polimer imaju Jungov modul elastičnosti vrlo blizak modulu prirodnog koštanog tkiva. Najveći problem kod ove vrste kompozita predstavlja toksičnost polimera i njegova postojanost tokom starenja. Najveći broj polimera koji se koristio za sintezu HAp/polimer kompozita, tokom aplikacije u živom organizmu oslobađao je produkte koji su negativno uticali na metabolizam okolnog tkiva ili je tokom perioda aplikacije umnogome menjao strukturu a time i osobine. U zavisnosti od strukture, osobina i ponašanja tokom *in vitro* i *in vivo* uslova, polimeri mogu biti bioneresorbilni i bioresorbilni. Na osnovu ovih osobina izvršena je i podela HAp/polimer kompozita.

1.4.1 HAp/bioneresorbilni polimer kompoziti

Različite vrste bioneresorbilnih polimera se koriste za sintezu HAp/bioneresorbilni polimer kompozita. Sa poli(bis(carboxylatophenoxy)phospazan)-om i HAp sintetisan je kompozit poroznosti od oko 65%.¹¹⁰ Kompoziti sa masenim udelom polimera od 5, 10 i 20% imali su više vrednosti mehaničkih karakteristika nego čist HAp, pa se je odmah mogla uočiti činjenica da se HAp-u mogu u velikoj meri izmeniti mehaničke osobine dodatkom polimera.

HAp/polietilen kompoziti (HAp/PE), rezultat istraživanja W. Bonfield-a i saradnika, upotrebljavaju se za zamenu koštanog tkiva pod komercijalnim nazivom HapexTM.^{5, 111, 112} Granule



ili prah HAp su mešane sa polimerom PE visoke gustine. Odnos udela polimera i HAp-a ima odlučujuću ulogu u formiranju mehaničkih karakteristika kompozita. U zavisnosti od udela PE kompozit poseduje različite mehaničke karakteristike. Na slici 1.17 prikazana je zavisnost Jungovog modula elastičnosti od udela HAp u kompozitu HAp/PE.

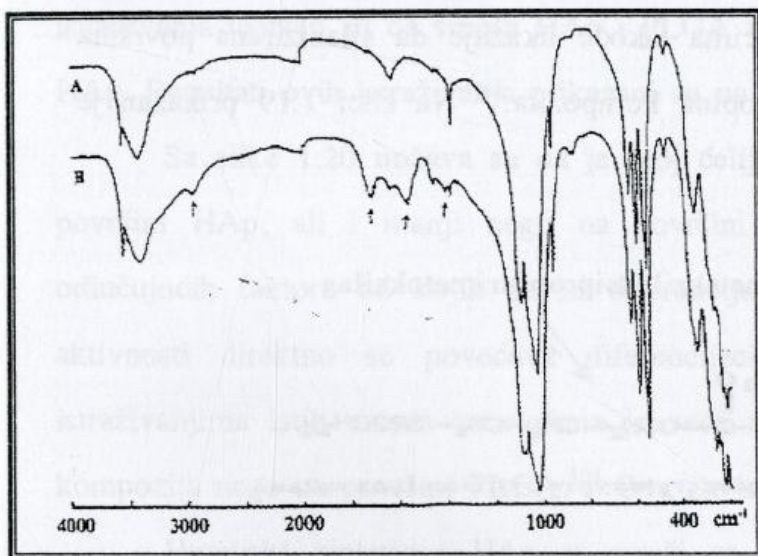
Slika 1.17. Uticaj udela HAp u kompozitu HAp/PE na Jungov modul smicanja za kompozite A, B, C i D¹¹³

Na osnovu rezultata sa slike 1.17 uočava se da modul elastičnosti raste sa povećanjem udela HAp u kompozitu. Uzorci kompozita C i D sačinjeni su od PE niže molske mase (200000 g/mol) dok uzorci A i B sadrže viši (270000 g/mol). Srednja veličina čestica HAp kod uzoraka A i

C (4,14 μm) je niža nego kod uzoraka B i D (7,32 μm). Pored povećanja vrednosti modula elastičnosti sa udelom HAp u kompozitu HAp/PE raste i njegova biokompatibilnost.⁵⁶

Osobine HAp/PE kompozita matematički su modelovane a rezultati modula elastičnosti dobijeni teorijskim proračunima bliski su vrednostima dobijenim eksperimentalnim putem.¹¹²

Kopolimerizacijom etilena dobijen je polietilenglikol/poli(butilentetraftalat) blok kopolimer (PEG/PBT).¹¹⁴ Sa ovim blok kopolimerom i nano česticama HAp dobijen je kompozit HAp/PEG/PBT. Nano čestice su u okviru blok kopolimera PEG/PBT fino raspoređene, a odnos



PEG : PBT iznosi 70 : 30 respektivno. Kopolimeru koji je potpuno rastvoren dodaju se uz mešanje nano čestice HAp. Nakon uklanjanja rastvarača smeša je presovana na 190°C. Maseni udeo HAp u kompozitu iznosio je od 50 – 100 %. Sintetisani su kompoziti sa česticama HAp koje su predhodno obložene poliakrilnom kiselinom (PAA) i čistim HAp. Na slici 1.18 prikazan je IR ove dve vrste čestica HAp.

Slika 1.18. IR spektar a) HAp; b) HAp obložen PAA¹¹⁴

Kompoziti kod kojih su čestice HAp obložene sa PAA (HAp-PAA) imali su različit modul elastičnosti nego kompoziti koji sadrže “čiste” čestice HAp (HAp). Sa povećanjem udela polimerne komponente u kompozitu modul elastičnosti raste, dok smicajna čvrstoća opada što se i uočava iz tabele 1.3.

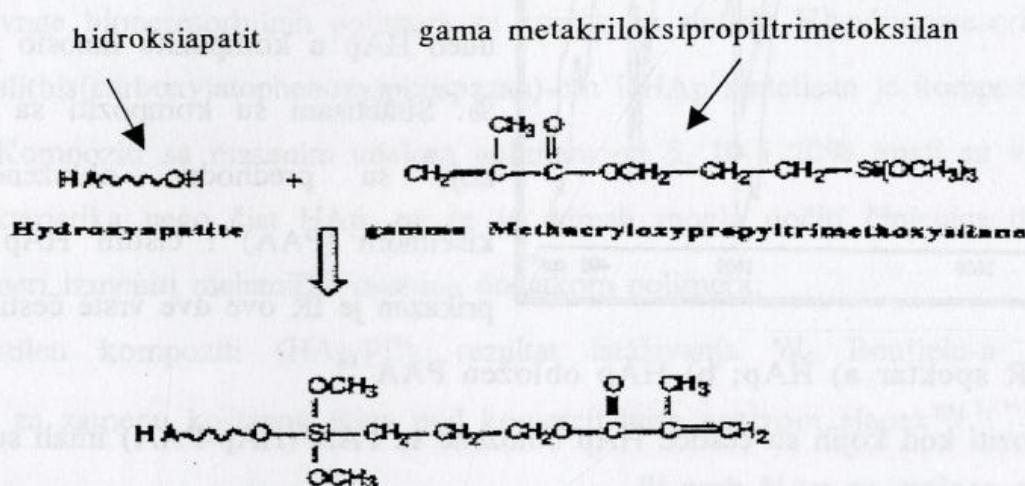
Tabela 1.3. Mehaničke osobine nano kompozita HAp/PEG-PBT¹¹⁴

Sadržaj polimera (%)	E-modul (MPa)		Zatezna jačina (MPa)	
	HAp	PAA-HAp	HAp	PAA-HAp
0	30,5	30,5	7,0	7,0
10	49,1	56,0	6,8	6,5
25	82,1	79,2	5,8	6,0
50	242	-	4,8	-

U istraživanjima Q. Liua i saradnika¹¹⁴ zaključeno je da se čestica HAp može obložiti slojem drugog polimera u cilju promene adhezije u kompozitu. PAA koji je adsorbovan na površini

HAp gradi intermolekulski kompleks sa PEG i na taj način značajno utiče na međufaznu površinu između HAp i polimerne matrice.

R. Labella sa saradnicima¹¹⁵ utvrdio je da se površina čestice HAp u kompozitima HAp/polimer može uspešno modifikovati (silanizirati) slojem koji pospešuje adheziju u kompozitu. Ovakvim pristupom obezbeđuje se potencijalno jaka veza između HAp i polimera preko polimerne prevlake. Polimer ostvaruje jaču vezu sa polimernom prevlakom, a prevlaka sa HAp-om. Sistem HAp-prevlaka-polimer koji tada postoji u kompozitu omogućava više vrednosti mehaničke čvrstoće nego sistem HAp-polimer.¹¹⁶ A. Dupraz sa saradnicima takođe ukazuje da silanizirana površina HAp-a može da utiče na povećanje mehaničkih osobina kompozita.¹¹⁷ Na slici 1.19 prikazan je jedan od načina silaniziranja površine čestice HAp-a.



Slika 1.19. Mehanizam dobijanja silanske prevlake¹¹⁵

Polimernu komponentu u kompozitima HAp/bioneresorbilni polimer mogu sačinjavati i drugi polimeri kao što je npr. 2,2-bis-4(2-hidroksi-3-metakrilolpropano)fenil propan ili poli(etilmetakrilat)-om.^{115, 118}

1.4.2 HAp/bioresorbilni polimer kompoziti

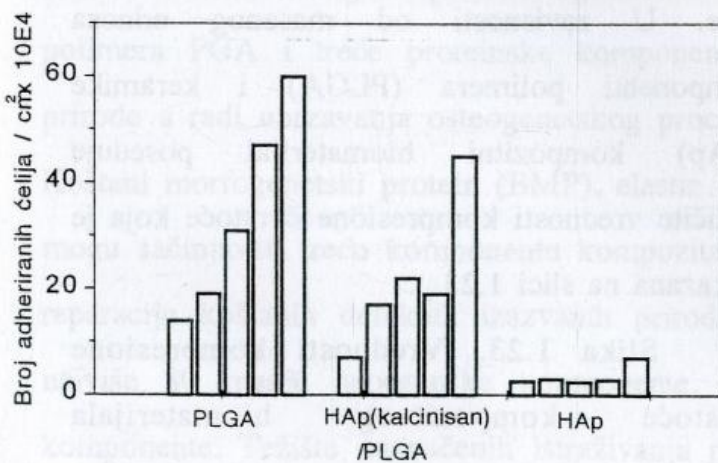
Sintezom i dizajniranjem kompozitnog biomaterijala sa HAp i bioresorbilnim polimerom ostvaren je sasvim nov koncept biomaterijala. Biomaterijali ovog tipa postaju "živi", vremenski se razvijaju i menjaju, a nakon završenog procesa reparacije defekta nestaju i "umiru". Osnovna ideja sadržana je u tome da se nakon implantacije u koštani defekt polimerna komponenta sa kojom je ojačan HAp, bioresorbuje ustupajući na taj način mesto novoformiranom tkivu. Keramička komponenta HAp može da bude bioresorbilna ili bioneresorbilna, pa samim tim ona može a i ne mora da ostane u tkivu.

T. Otsuka sa saradnicima ispitao je mogućnost primene smeše HAp i PGA.¹¹⁹ Porozni blokovi HAp su popunjeni puniocem koji predstavlja PGA. Dobijeni kompozitni biomaterijal može poslužiti za reparaciju koštanih defekata, a tokom perioda eksploatacije komponenta HAp ostaje dok se komponenta PGA bioresorbuje. Detaljniji prikaz sinteze, karakterizacije i osobina ove vrste kompozita u ovim istraživanjima nije prikazan.

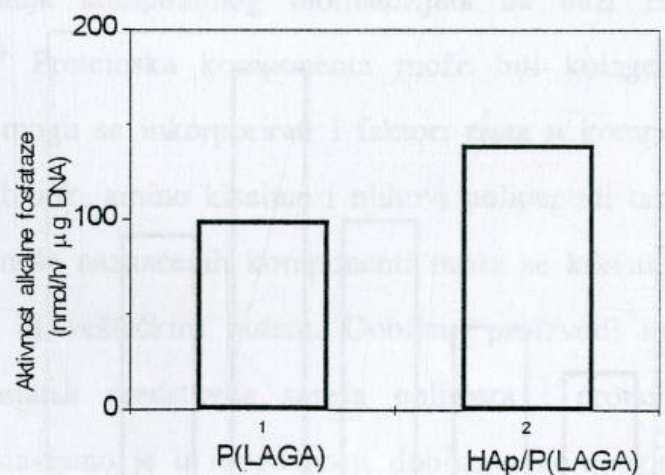
H. Elgendy i saradnici ispitali su diferencijaciju i promenu broja ćelija osteoblasta u *in vivo* uslovima na površini granula HAp i smeše HAp i polilaktid-co-glikolida (PLGA).¹²⁰ Rezultati istraživanja ukazali su da smeša HAp i PLGA indukuje stvaranje većeg broja osteoblasta nego sam HAp. Rezultati ovih istraživanja prikazani su na slici 1.20.

Sa slike 1.20 uočava se da je broj ćelija veći na površini HAp/PLGA kompozita nego na površini HAp, ali i manji nego na površini PLGA. Aktivnost alkalne fosfataze je jedan od odlučujućih faktora od kojih zavisi diferencijacija osteoblasta i ekspresija gena. Sa povećanjem aktivnosti direktno se povećava diferencijacija osteoblasta i ubrzava process reparacije. U istraživanjima istih autora zabeležena je veća aktivnost alkalne fosfataze na površini HAp/PLGA kompozita nego na površini PLGA.¹²⁰ Ova zavisnost prikazana je na slici 1.21.

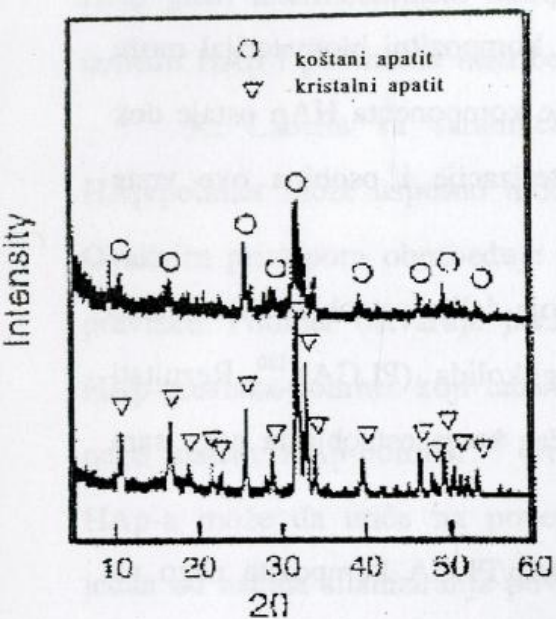
Hemijski sintetisan HAp u smeši sa kopolimerima l-laktida može da omogući dobru adherenciju osteoblasta koji aktivno učestvuju u procesima reparacije. *In vitro* istraživanja, mada ne prikazuju realne osobine biomaterijala mogu ukazati na njegove nedostatke ili prednosti. S. Cho sa saradnicima ispitao je mogućnosti indukovanja novog koštanog HAp na površini veštački sintetisanog HAp/kopoli-l-laktid kompozita u *in vitro* uslovima.¹²¹ Rendgenostrukturnom analizom utvrđena je bioresorpcija kopoli-l-laktida tokom 7 dana ispitivanja uz istovremeno nastajanje novog HAp. Rezultati ovih istraživanja prikazani su na slici 1.22.



Slika 1.20. Broj ćelija na površini PLGA, HAp/PLGA i HAp nakon 1, 2, 3, 5, i 7 dana *in vitro* ispitivanja¹²⁰



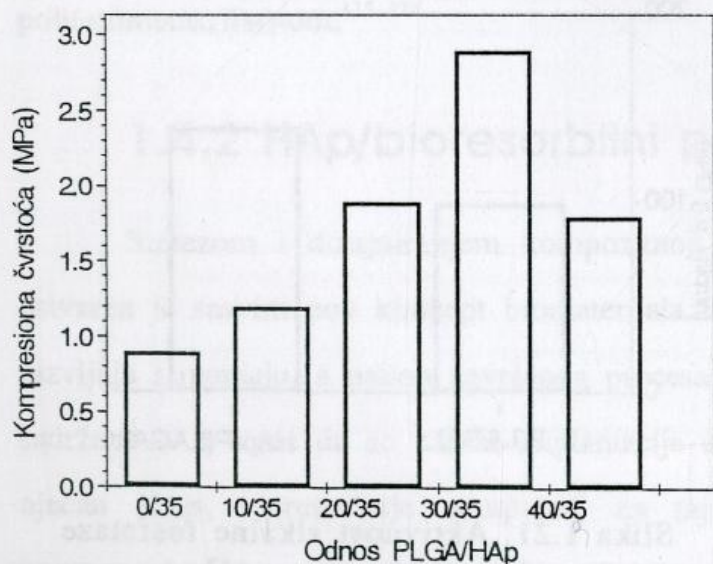
Slika 1.21. Aktivnost alkalne fosfataze u okolini 1-polimera; 2-kompozitnog biomaterijala HAp/P(LAGA)¹²¹



Najverovatnije je da tokom 7 dana ispitivanja dolazi do adhezije osteoblasta na površini kompozita, koji nakon diferencijacije i proliferacije proizvode proteinske komponente na kojima dolazi do nukleacije koštanog HAp i njegove produkcije. Predpostavka je u skladu sa ranije predstavljanim mehanizmima reparacije koštanog tkiva, a da bi se potvrdila neophodno je detaljno analizirati stvaranje HAp u *in vivo* uslovima primenom histomorfoloških, stereoloških i drugih metoda.

Slika 1-22. Difraktogram HAp/kopoli-l-laktid-a pre i nakon 1 nedelje *in vitro* ispitivanja¹²¹

L. Lu i A. Mikos su u svojim istraživanjima sintetisali HAp/PLGA kompozitni biomaterijal kod koga se HAp komponenta u kompozitu nalazi u obliku vlakana.²⁸ Kratka vlakna HAp prosečne dužine 45 μm i prečnika 15 μm pomešana su sa rastvorenim biokompatibilnim polimerom PLGA i želatinom. Ova smeša podvrgnuta je vakuum uparavanju, nakon čega je presovana. Dobijeni krajnji proizvod je dosta porozan, pa se iz tih razloga može uspešno primeniti u inženjerstvu tkiva kao nosač različitim ćelijskim kulturama. Kratka vlakna HAp koja se nalaze u kompozitu mogu da poboljšaju osteokondukciju, ali zbog malih vrednosti mehaničke čvrstoće ova vrsta kompozita se ne može uspešno primeniti u reparaciji tvrdog koštanog tkiva. Veličina pora ovog kompozita se može po želji formirati dodatkom soli NaCl ili želatina i ona se nalazi u intervalu od 300-500 μm. NaCl se nakon "solvent-casting" postupka ekstrahuje iz sistema, a na njegovo mesto ostaju naznačene



pore. U zavisnosti od masenog odnosa komponenti polimera (PLGA) i keramike (HAp) kompozitni biomaterijal poseduje različite vrednosti kompresione čvrstoće koja je prikazana na slici 1.23.

Slika 1.23. Vrednosti kompresione čvrstoće kompozitnog biomaterijala HAp/PLGA u zavisnosti od odnosa PLGA/HAp²⁸

Kompresiona čvrstoća ove vrste kompozitnog biomaterijala poseduje vrednosti od 1-3,0 MPa (sl. 1.23) što je niska vrednost u odnosu na kompresionu čvrstoću prirodnih kostiju koja najčešće iznosi od 100-150 MPa.^{6, 28} Najviša vrednost kompresione čvrstoće zabeležena je za udeo PLGA od 30% i HAp od 35%, dok ostatak sačinjava želatin ili NaCl pomoću koga se formira poroznost sistema.

Formiranje veličina i udela pora moguće je i dodavanjem metilenhlorida u smešu HAp i PLGA pre procesiranja, nakon čega se ova komponenta ekstrahuje i za sobom ostavlja poroznost.

C. Laurencin i saradnici ukazali su na važnost poroznosti kompozita i mogućnosti projektovanja ukupne poroznosti kompozita HAp/PLGA uz ostvarenu relativno uniformnu raspodelu komponentata.¹²² Za sintezu su korišćene čestice HAp veličina od 74 – 104 μm i PLGA molske mase 50000 g/mol. U ovim istraživanjima ukazano je na važan uticaj pora kompozita na process reparacije defekta i integracije implanta. Dobijeni su kompozitni biomaterijali sa različitim vrednostima poroznosti koja je formirana sinterovanjem smeše HAp, PLGA i NaCl. Nakon sinteze blokova NaCl je uklonjen a na njegovo mesto ostale su pore. Dobijene su dve vrste blokova sa poroznošću od 33 i 22 %, a veličina dijametra pora nalazila se u intervalu od 50 – 450 μm . Maksimalni dobijeni modul elastičnosti kompozita u ovim istraživanjima iznosio je oko 1,5 GPa.¹²² Ostale mehaničke osobine u ovim istraživanjima nisu analizirane niti ispitane. Dobijeni modul elastičnosti od 1,5 GPa je dosta niži od vrednosti modula elastičnosti prirodnih kostiju koji se nalazi u intervalu od 10-20 GPa.⁶ *In vitro* sprovedena istraživanja ukazala su na adherenciju ćelija osteoblasta na površini blokova HAp/PLGA kompozitnog biomaterijala kao i na njihovu proliferaciju.

S. Jefferies je ispitao mogućnost dobijanja kompozitnog biomaterijala na bazi HAp, polimera PGA i treće proteinske komponente.¹²³ Proteinska komponenta može biti kolagenske prirode a radi ubrzavanja osteogenetskog procesa mogu se inkorporirati i faktori rasta u kompozit. Koštani morfogenetski protein (BMP), elastin, antibiotik, amino kiseline i njihovi polipeptidi takođe mogu sačinjavati treću komponentu kompozita. Smeša naznačenih komponenti može se koristiti za reparaciju koštanih defekata izazvanih prirodnim ili veštačkim putem. Dobijeni proizvodi imaju najviše 80 mas% neorganske komponente, a ostatak predstavlja smeša polimera i proteinske komponente. Težište naznačenih istraživanja predstavljeno je u mogućnosti dobijanja kompozitnog biomaterijala na bazi HAp i bioresorbilnog polimera sa proteinskim komponentama, dok sam postupak sinteze nije analiziran. U okviru ovih istraživanja nisu ispitivane osobine kompozitnog biomaterijala kao i mogućnost njihove kontrole tokom sinteze.

S. Cho sa saradnicima ukazao je na mogućnost dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/CPLA toplim presovanjem smeše HAp i CPLA (kopolimer polilaktida) na temperaturi od 180°C.¹²¹ Mehaničke osobine dobijenih blokova zavise od masenog udela HAp i CPLA u njima a najviše vrednosti su postignute za udeo HAp od 75%. Rezultati istraživanja ukazali su da mehničke osobine blokova zavise i od molske mase CPLA, tako da one sa povećanjem molske mase polimera rastu. U okviru ovih istraživanja nisu prikazane dobijene vrednosti mehničkih karakteristika kao ni vrednosti poroznosti kompozita. *In vitro* istraživanja ukazala su da kompozitni biomaterijal HAp/CPLA indukuje stvaranje koštanog hidroksiapatita na svojoj površini što nedvosmisleno ukazuje na njegovu bioaktivnost i biokompatibilnost.

1.5. HAp/PLLA kompozitni biomaterijali

Bioresorbilni sintetski polimeri na bazi poli-l-laktida (PLLA) imali su do sada široku primenu u medicini iz razloga što krajnji produkti njihove razgradnje su netoksični i pri tome ne remete metabolizam okolnog tkiva. Biodegradabilni polimeri na bazi PLLA na svojoj površini omogućavaju dobru adheziju osteoblasta kao i adheziju proteina i faktora rasta odgovornih za reparaciju koštanog tkiva.¹²⁴ Sintetski HAp, vrlo sličan prirodnom koštanom HAp, takode je pokazao izuzetna osteokonduktivna svojstva tokom predkliničkih i kliničkih istraživanja. Iz ovih razloga istraživanja u pravcu sinteze kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA mogu se opravdati.

Različite grupe autora su sa manje ili više uspeha ispitale mogućnost sinteze kompozitnih biomaterijala HAp/PLLA. Mada su istraživanja ove vrste relativno nova, ipak su postignuti određeni rezultati koji mogu ukazati na mogućnost reparacije prirodnog koštanog tkiva sa ovom vrstom kompozita.

1.5.1 Dobijanje

Morfologija dobijenih kompozitnih biomaterijala HAp/PLLA je različita. Komponente HAp i PLLA u okviru kompozita mogu biti ponaosob kontinualne i diskontinualne. Posebna vrsta kompozita predstavljena je jednom kontinualnom komponentom (najčešće PLLA) u kojoj se nalazi druga (najčešće HAp). Geometrijski posmatrano najjednostavniji način je ostvaren dobijanjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA kod koga se smenjuju slojevi HAp i PLLA, tzv direktni ili kontakti laminati.^{125, 126}

P. Tormala sa saradnicima je ispitao mogućnosti dobijanja kompozitnog biomaterijala na bazi HAp i polilaktida.¹²⁶ Blokovi HAp sa niskim mehaničkim osobinama su ojačavani sa različitim polimerima od kojih jednu grupu sačinjavaju polimeri na bazi PLA. Ojačavanje je obavljeno povezivanjem blokova HAp sa poli-l-laktidom (PLLA), a ovako dobijeni kompozit je lamelarne strukture. U bloku se komponente HAp i PLLA sukcesivno smenjuju, a njihov međusobni maseni odnos se može unapred definisati. Naznačena struktura se dobija tako što se tanki slojevi polimera u vidu folije slažu na površinu bloka HAp, a nakon toga pod uticajem pritiska kompaktiraju. Ovakav postupak se može ponoviti više puta, u zavisnosti od željenog broja slojeva. Za nanošenje polimernih folija na površinu hidroksiapatita P. Tormala sa saradnicima predlaže još jedan postupak koji se sastoji u premazivanju površine sa rastvorom polimera.¹²⁶ Nakon premazivanja sa rastvorenim polimerom rastvarač se ukloni a preostali polimerni sloj poseduje debljinu od oko 0,5 mm. U cilju dobijanja cilindričnih blokova dužine 30 mm i prečnika 2,6 mm oni su smešu praha HAp veličine čestica 10 i 200 μm i PLLA podvrgli injekcionom brizganju.¹²⁶

Dobijanje kompozita sa matricom od PLLA u kojoj se nalazi komponenta HAp čiji se maseni udeo menja ostvario je C. Verheyen sa saradnicima.¹²⁷ Ispitana je mogućnost dobijanja HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala sa česticama HAp veličine 45 μm koje se nalaze u trodimenzionalnoj osnovi od PLLA molske mase oko 200000 g/mol. Sinteza kompozita je ostvarena dodavanjem čestica HAp u monomer l-laktid i naknadnom polimerizacijom smeše.

Y. Shikinami i M. Okuno opisali su postupak dobijanja kompozitnog biomaterijala kovanjem smeše HAp/PLLA sa nekalcinisanom i nesinterovanom komponentom HAp.¹²⁸ Smeša HAp i PLLA sa masenim udelima HAp od 20 – 50% je ekstrudovana u listiće koji se toplim kovanjem prevode u blokove. Kovanje se odvija na temperaturama nižim od temperature topljenja PLLA. Komponentu HAp koja je u obliku agregata veličina od 5 – 50 μm sačinjavaju čestice HAp širine 0,3 – 0,5 μm i visine 2 – 3 μm .

A. Polson sa saradnicima u svojim istraživanjima opisao je dobijanje kompozitnog biomaterijala pogodnog za reparaciju mekog i tvrdog koštanog tkiva koji u svom osnovnom sadržaju poseduje HAp i PLLA.¹²⁹ U okviru prikazanih istraživanja dobijanje kompozita zahteva proces sinteze u dva stepena. U prvom stepenu se sintetiše tzv. implant prekursor. Organski rastvarač (N-metil-2-pirolidon, 2-pirolidon ili dimetil sulfoxid) dodaje se polimeru PLLA, radi njegovog potpunog rastvaranja. Rastvoreni PLLA se meša sa HAp koji omogućava osteokondukciju.

Dobijanje kompozitnog biomaterijala sa PLLA matricom i česticama HAp koje su smeštene u njoj, C. Laurencin sa saradnicima prikazao je u svojim istraživanjima.¹³⁰ Postupak podrazumeva mešanje rastvorenog PLLA sa česticama HAp, a dobijena smeša se zatim podvrgava zagrevanju na 45°C radi uparavanja rastvarača. Kompozit se može dobiti u visoko poroznoj formi (pena) postupkom smrzavanja u tečnom azotu.

Y. Imai sa saradnicima analizirao je postupak dobijanja trokomponentnog kompozitnog biomaterijala na bazi HAp i PLLA.¹³¹ Kompozit se sastoji iz tri komponente: A, B i C. Komponentu A predstavlja PLLA, a B kalcijum fosfatna keramika HAp. Komponenta C može biti polietilenglikol, poli-N-vinilpirolidon ili njihova smeša. Maseni odnos A/B+C je u intervalu od 99/1 do 50/50. Najoptimalniji odnos koji se preporučuje je od 95/5 do 60/40. Smeša komponenti A, B i C u željenom odnosu se rastvori u rastvaraču, nakon čega se komponenta HAp disperguje u rastvoru. Rastvor se podvrgava sušenju pod normalnim ili smanjenim pritiskom. Kompozitni biomaterijal se može dobiti i drugim postupkom koji obuhvata mešanje smeše komponenata A, B i C u željenom odnosu na temperaturi koja nije niža od temperature topljenja PLLA. Kompozit se može ekstrudovati na ekstruderu sa željenim parametarima procesa.

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dobijen je u obliku praha ili blokova posebnim procesom u istraživanjima K. Cooper-a i saradnika.¹³² Osnova postupka podrazumeva da se mešanjem homogenizuje smeša HAp i PLLA na temperaturi od 150-220°C u toku od 5-90 minuta. Dobijena smeša se hladi do sobne temperature, melje i suši. Kompozit se može ekstrudovati u različite oblike ili vlakna. Kao i u ranijim istraživanjima drugih autora i u ovim nisu definisane strukturne promene koje se dešavaju tokom dobijanja kompozita.

D. Lee i saradnici u svojim istraživanjima definisali su stepen kristalnosti HAp koji se koristi za dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.¹³³ Slabo kristalni apatitni kalcijum fosfat se meša sa smešom fiziološkog rastvora i suplementarnog materijala. PLLA i slični polimeri mogu da predstavljaju suplementarni materija, a u zavisnosti od njihovog međusobnog udela kompozitni biomaterijal se može dobiti u formi paste ili gita.

U našim predhodnim istraživanjima dvostepenim postupkom sintetisani su blokovi visoke čvrstoće i tanki slojevi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa visoko kristalnom HAp komponentom. U prvom stepenu optimalnim procesiranjem dobija se visoko porozni kompozit sa željenim odnosom komponenti, veličinom čestica HAp i molskom masom PLLA. Sušenje u prvom stepenu odvija se pod smanjenim pritiskom ($P=10$ KPa) na sobnoj temperaturi. Drugi stepen obuhvata dizajniranje osobina blokova kompozita kompaktiranjem hladnim i toplim presovanjem. Toplim presovanjem je moguće uticati na promene poroznosti, molske mase PLLA i odnosa

kristalinično/amorfno.¹³⁴⁻¹⁴⁷ Dobijene mehaničke karakteristike blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA su bliske prirodnom koštanom tkivu. Tokom dizajniranja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dolazi do manjih ili većih strukturnih promena u okviru kompozita, bez obzira na vrstu i način primenjenog postupka dobijanja. U tim istraživanjima analizirani su osnovni strukturni fenomeni koji karakterišu dizajniranje toplim presovanjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, što predstavlja osnovu ove doktorske disertacije.

1.5.2 Dizajniranje strukture (strukturiranje)

Krajnja svrha kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA je njegova aplikacija u živi organizam u cilju različitih vrsta reparacija. Iz ovih razloga tkivo i organizam u koji se implantira biomaterijal sadrže niz zahteva za strukturom i osobinama kompozitnog biomaterijala. Istraživači su u svojim ispitivanjima pokušali na različite načine da omoguće optimalnu strukturu, a sa njom i osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Načini dizajniranja strukture od koje zavise osobine, tj načini strukturiranja se dosta razlikuju međusobno. Da bi se uspešno mogla analizirati obavljena istraživanja uticaja različitih načina dizajniranja na strukturu kompozita, izvršena je podela prema nivou organizacije strukture na koju se dizajniranjem (strukturiranjem) utiče. Organizacija strukture je analizirana hijerarhijski od nižih ka višim nivoima. U okviru nivoa strukturne organizacije na koji se utiče navedeni su vidovi i načini strukturiranja koji su ostvareni u ispitivanjima raznih istraživača.

1.5.2.1 Submolekulski nivo

Submolekulska struktura kompozitnog biomaterijala sačinjena je od hemijskih elemenata komponenata HAp i PLLA u kompozitu, kao i veza u njima. Kvalitativan sastav komponenata je konstantan i ova vrsta kompozita sačinjena je isključivo od HAp i PLLA. Neophodno je da se u kompozitu ne nalaze elementi teških metala koji nakon aplikacije mogu da izazovu negativne promene u metabolizmu organizma u koji se kompozitni biomaterijala implantira.

U okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA mogu se dispergovati molekuli faktora rasta, antibiotika ili hormona, koji u svojoj submolekulskoj strukturi poseduju elemente različite od elemenata HAp i PLLA.^{129-131, 136, 148}

1.5.2.2 Molekulski nivo

Molska masa PLLA ima odlučujući uticaj na tačke ostakljivanja i topljenja polimera, kao i na mehaničku čvrstoću. PLLA više molske mase ima više mehaničke osobine nego PLLA sa nižom molskom masom. Oblik molekula PLLA, tokom dizajniranja takođe utiče kako na strukturu tako i na osobine kompozita.

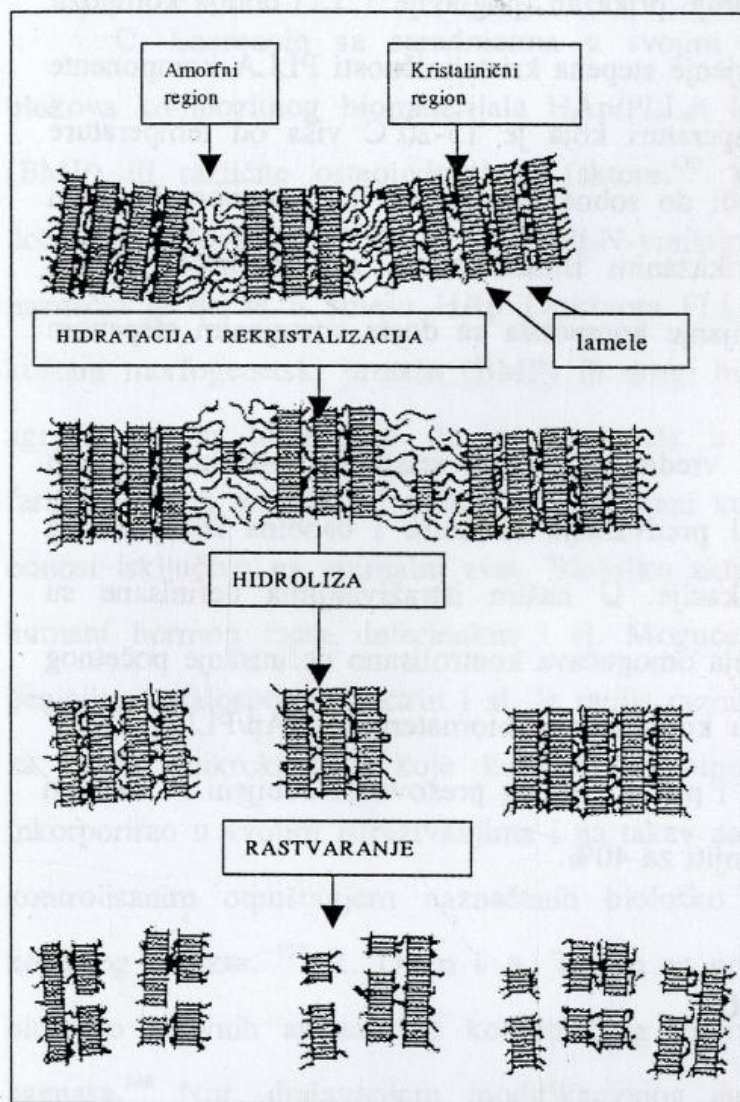
Za dobijanje kompozitnog biomaterijala različiti autori su koristili PLLA različitih molskih masa koja se nalazila u intervalu od 10000-500000 g/mol.^{126-132, 148} U našim istraživanjima korišćen je PLLA niske (50000 g/mol), visoke (430000 g/mol) i srednje vrednosti (100000 g/mol) molske mase jer je smatrano da se korišćenjem ovih PLLA može analizirati uticaj molske mase na strukturu i osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Tokom dizajniranja kompozitnog biomaterijala dolazi do promene molske mase PLLA i u najvećem broju istraživanja pokazano je da se ona smanjuje.

1.5.2.3 Intermolekulski nivo

Stepen kristalnosti komponente HAp ima odlučujući uticaj na osobine tokom *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Generalno posmatrajući ako je HAp komponenta visoko kristalna onda je ona bioneresorbilna. Stepem kristalnosti HAp zavisi od temperature termičkog tretmana i vremena zadržavanja na toj temperaturi. Iz ovih razloga pojedini autori govore o bioresorbilnom i bioneresorbilnom HAp-u. D. Lee sa saradnicima za sintezu kompozitnog biomaterijala predlaže korišćenje slabo kristalnog apatitnog kalcijum fosfata ($\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1,7}(\text{OH}, \text{CO}_3)_{0,3}$) sa amorfnošću od preko 75% koji se brzo resorbuje.¹³³

U slučajevima kada u kompozitu HAp egzistira u visoko kristalnoj formi stepen kristaliničnosti PLLA ima odlučujuću ulogu u bioresorpciji. Kao što je i ranije naznačeno bioresorpcija počinje u amorfnim regionima PLLA, pa je neophodno poznavati odnos amorfno/kristalinično u polimeru. Iz ovih razloga može se zaključiti da vreme bioresorpcije PLLA, a samim tim i proliferacija novo formiranog tkiva i integracija implanta od HAp/PLLA zavisi od odnosa kristalinično/amorfno u PLLA. Na slici 1.24 prikazan je mehanizam biorazgradnje PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala. U prvom koraku dolazi do razgradnje u amorfnim regionima PLLA (kao što je napomenuto a i uočava se na slici 1.24), a zatim i u kristaliničnim.

Pored odnosa kristalinično/amorfno u PLLA njegova orijentacija molekuskog lanaca ima bitan uticaj na mehaničke osobine kompozita, ali i na njegovu bioresorpciju. Generalno posmatrajući orijentacija lanaca se vrši u pravcu delovanja mehaničke sile, kojom se deluje tokom procesiranja. Na ovom nivou strukture bitno je izučiti intermolekulske efekte (interakcije) koji se



javljaju između molekula HAp i PLLA. Izučavanje ove vrste efekata bitno je za analizu međupovršine između komponenti HAp i PLLA. Interakcije se mogu javiti u vidu fizičkih ili hemijskih veza između HAp i PLLA u međufaznoj površini i one predstavljaju osnovu mehaničkih karakteristika kompozita koje se registruju na makro nivou. Ova vrsta interakcija u kompozitnim biomaterijalima HAp/PLLA je veoma malo ili nimalo analizirana u dosadašnjim publikovanim radovima istraživača. Veličina čestica HAp u kompozitnom biomaterijalu direktno se odražava na ukupnu međufaznu površinu. Sa smanjenjem veličine čestica HAp, povećava se površina na kojoj dolazi do interakcija HAp i PLLA i obrnuto.

Slika 1-24. Šematski prikaz morfoloških promena tokom biorazgradnje PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala.¹⁴⁹

Y. Shikinami i M. Okuno u svojim istraživanjima prikazali su mogućnost dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA postupkom kovanja sa stepenom kristaliničnosti koji se povećava nakon potencijalne aplikacije.¹²⁸ U njihovim istraživanjima stepen kristaliničnosti PLLA određen je uz pomoć DSC merenja. Utvrđeno je da procesom kovanja dolazi do smanjenja stepena kristaliničnosti PLLA od početne vrednosti do 46-48%. Naznačeni autori smatraju da se tokom kovanja smanjuje stepen kristaliničnosti PLLA pod uticajem čestica HAp. Delovanjem visokog pritiska, tokom kovanja, čestice HAp raslojavaju kristalinične regione PLLA, što rezultira u formiranju kompozitnog biomaterijala sa PLLA manje kristaliničnosti. U prikazanim istraživanjima

napomenuto je da dobijeni blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA imaju kompleksnu orijentaciju koju je teško definisati.

C. Laurencin sa saradnicima ukazao je važnost uticaja vrednosti stepena kristaliničnosti kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA na bioresorpciju i integraciju implanta.¹³⁰ U okviru njegovih istraživanja pokazano je da se postupkom koji je ranije prikazan (poglavlje 1.5.1) dobija kompozit sa visokom vrednošću stepena kristaliničnosti. Smanjenje stepena kristaliničnosti PLLA komponente moguće je naknadnim tretmanom uzoraka na temperaturi koja je 15-20°C viša od temperature topljenja PLLA. Nakon zagrijavanja uzorak se hladi do sobne temperature konstantnom brzinom hlađenja (najoptimalnije 5-20°C/min). Mada u prikazanim istraživanjima nije naznačen stepen smanjenja kristaliničnosti postupak omogućava dobijanje kompozita sa dosta smanjenim stepenom kristaliničnosti.

Značaj poznavanja i projektovanja početne vrednosti stepena kristaliničnosti kompozitnih biomaterijala kao što je i naznačeno je velik kod predviđanja strukture i osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA nakon potencijalne aplikacije. U našim istraživanjima definisane su mogućnost takve vrste procesiranja i dizajniranja koja omogućava kontrolisano definisanje početnog stepena kristaliničnosti komponente PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.^{138, 139} Postupkom toplog presovanja uz varijaciju vremena i pritiska toplog presovanja dobijeni su blokovi u kojima se stepen kristaliničnosti PLLA može smanjiti za 40%.

1.5.2.4 Supermolekulski nivo

Kristaliti polimera PLLA mogu se organizovati u viši nivo strukture, sferulite. Formiranje sferulita je uslovljeno različitim faktorima od kojih brzina hlađenja nakon zagrevanja i masa dominiraju. Tanki slojevi PLLA drugačije kristališu od masivnih zapremina PLLA, pa samim tim i formiranje sferulita zavisi od toga.

Supermolekulsku strukturu srećemo i kod heterogenih smeša sa PLLA matricom i fino dispergovanim česticama HAp, koje mogu aglomerisati u njoj. Na taj način struktura nekih kompozitnih biomaterijala HAp/PLLA smatra se tipom supermolekulske strukture. Organizacija strukture blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji je dobio P. Tormala sa saradnicima ne može se smatrati kompozitom na supermolekulskom nivou (prikazan na slikama u narednom poglavlju 1.5.2.5).¹²⁶ U cilju matematičkog modelovanja osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA neophodno je da njegova struktura odgovara polifaznom sastavu na supermolekulskom

nivou. I. Balać sa saradnicima je u analizama napona koji se javljaju tokom opterećivanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA analizirao kompozit u kome su male čestice HAp fino rasporedene u trodimenzionalnoj matrici od PLLA na supermolekulskom nivou.¹⁵⁰ Ovakvim načinom modelovanja vrednosti dobijene matematičkim putem bliske su eksperimentalnim podacima svojstava modula elastičnosti koji smo dobili u našim istraživanjima.^{137, 146}

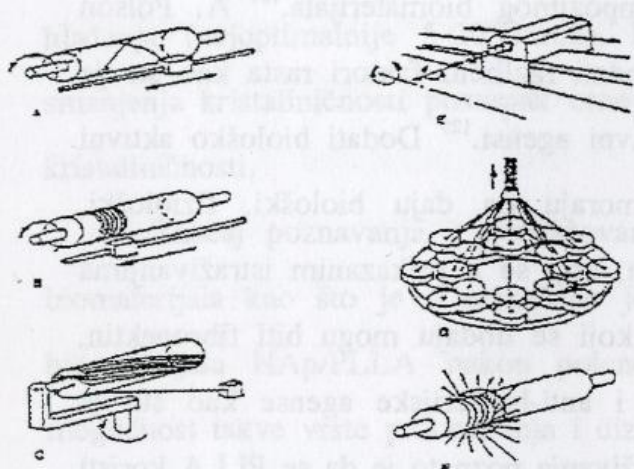
C. Laurencin sa saradnicima u svojim istraživanjima prikazao je mogućnost dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji u sebi sadrže koštani morfogenetski protein (BMP) ili različite osteoinduktivne faktore.¹³⁰ Y. Imai sa saradnicima naznačio je mogućnost dobijanja HAp/PLLA/PNV (PNV poli-N-vinilpirolidon) kompozitnog biomaterijala.¹³¹ A. Polson naznačio je da se u smešu HAp i rastvora PLLA mogu dodati različiti faktori rasta kao što je koštani morfogenetski protein (BMP) ili drugi biološko aktivni agensi.¹²⁹ Dodati biološko aktivni agensi moraju homogeno da se rasporede u smeši i moraju da daju biološki, fiziološki, farmakološki i terapijski efekat na reparisani koštani defekt, koji se u prikazanim istraživanjima odnosi isključivo na animalni svet. Biološko aktivni agensi koji se dodaju mogu biti fibronektin, humani hormon rasta, interleukin i sl. Moguće je dodati i anti-bakterijske agense kao što je penicilin, cefalosporin, baktrin i sl. Iz ranije razmatranih istraživanja poznato je da se PLLA koristi za izradu mikrokapsula koje kontrolisano otpuštaju lekove.²⁶ A. Polson je isti dati princip inkorporirao u svojim istraživanjima i na takav način omogućio dobijanje kompozita HAp/PLLA sa kontrolisanim otpuštanjem naznačenih biološko aktivnih agenasa nakon potencijalne reparacije koštanog defekta.¹²⁹ R. Dunn i A. Tipton su pokazali mogućnost projektovanja brzine otpuštanja biološko aktivnih agenasa iz kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dodavanjem modifikacionih agenasa.¹⁴⁸ Npr. dodavanjem modifikacionog agenasa naltrekson-a ili doksiciclin-a u polimernu matricu PLLA omogućava se kompletno otpuštanje biološko aktivnih agenasa iz kompozita u toku dva do tri dana, *in vivo*. Ako se u polimernu matricu doda etilheptanoat, do kompletnog otpuštanja sadržaja biološko aktivnih agenasa doći će u toku sedam dana.

Kao što je već naznačeno u našim istraživanjima su prilikom sinteze kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA korišćene sferne čestice HAp, veličina oko 100 nm, koje su posebnim načinom procesiranja fino rasporedene u trodimenzionalnoj matrici od PLLA. Naknadnim dizajniranjem toplim presovanjem dobijene su kompozitne strukture na supermolekulskom nivou.^{137,}

1.5.2.5 Makro nivo

Struktura kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA nije homogena po čitavoj zapremini. U zavisnosti da li je dobijen tanak sloj, vlakno ili trodimenzionalni blok može se analizirati specifičnost njegove makrostrukture.¹²⁵ Takođe struktura PLLA nije uniformna po celoj njegovoj zapremini posebno kod vlakana.

P. Tormala i saradnici su uz primenu modifikovanog postupka koji se primenjuje u tekstilnoj industriji, ojačali blok HAp sa vlaknima PLLA.¹²⁶ Beskonačno dugo vlakno PLLA se



namotava oko bloka HAp u željenom smeru. Namotavanje može biti u jednom smeru, ali se vlakna PLLA mogu namotavati normalno jedna na druga (slika 1.25). Ovakvim postupkom moguće je dobijanje cilindričnih oblika kompozita sa različitom orijentacijom vlakana. Debljina polimerne komponente zavisi od debljine vlakna i najčešće se nalazi u intervalu od 0,1 – 2 mm.

Slika 1.25. Različiti način namotavanja PLLA vlakana na HAp¹²⁶

Ista grupa istraživača prikazala je mogućnosti dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala koji su prikazani na slici 1.26.

Blokovi su makro dimenzija (30 x 10 x 4 mm) a debljina slojeva polimera iznosi od 0,5 -

2 mm. Ukupna otvorena poroznost ovako dobijenih kompozita

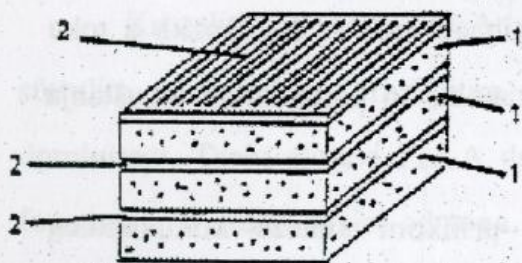
nalazi su u granicama od 20 – 70 %. Upotrebom visoko guste

HAp keramike moguće je dobiti isti blok u besporoznom

stanju (sa beznačajnom poroznošću čija vrednost u prikazanim

istraživanjima nije navedena). PLLA povezuje blokove HAp i

ima ulogu adheziva u kompozitu.



Slika 1.26. Blok kompozita HAp/PLLA, 1-HAp, 2-PLLA¹²⁶

C. Verheyen i saradnici su prema ranije izloženom postupku dobili kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa česticama HAp koje su smeštene u matricu od PLLA u obliku trodimenzionalnih blokova dimenzija 15 x 10 x 3 mm.

U našim istraživanjima prikazali smo dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u vidu tankog sloja ili bloka različitih dimenzija. U slučaju dobijanja blokova kompozitnog

biomaterijala njihova dimenzija je ograničena oblikom i dimenzijama kalupa u kome se vrši dizajniranje, a zbog uniformne raspodele faza u okviru bloka njegova struktura je uniformna. Debljina i površina dobijenih tankih slojeva nema ograničenja.^{136, 137}

1.5.3 Mehaničke osobine i poroznost

Osnovna teškoća u istraživanjima razvoja biomaterijala kao zamene tvrdog koštanog tkiva je dobiti kompozitni biomaterijal HAp/PLLA koji bi po svojim mehaničkim karakteristikama bio blizak mehaničkim osobinama prirodnog koštanog tkiva. Pored navedenog zahteva neophodno je omogućiti takvu vrstu dizajniranja koja omogućava projektovanje što više osobina kompozita bitnih za njegovu aplikaciju. Mehanička čvrstoća, modul elastičnosti kao i udeo i raspodela poroznosti imaju značajnu ulogu u periodu implantacije i eksploatacije biomaterijala. U cilju optimalne raspodele napona koji se javljaju tokom naprezanja i opterećenja implanta neophodno je da kompozitni biomaterijal HAp/PLLA poseduje mehaničke osobine bliske koštanom tkivu koje zamenjuje. Mehaničke osobine prirodnog koštanog tkiva prikazane su u tabeli 1.4.

Tabela 1.4. Mehaničke osobine prirodnog koštanog tkiva⁶

Tkivo	Pravac ispitivanja	Modul elastičnosti [GPa]	Zatezna čvrstoća [MPa]	Kompresiona čvrstoća [MPa]
<u>Nožna kost</u>				
Butna	longitudinalno	17,2	121	167
cevanica	-II-	18,1	140	159
fibula (manja kost)	-II-	18,6	146	123
<u>Kosti ruku</u>				
humerus (ramena)	-II-	17,2	130	132
radijalna	-II-	18,6	149	114
ulna	-II-	18,0	148	117
<u>Kičma</u>				
vrat	-II-	0,23	3,1	10
krsta	-II-	0,16	3,7	5
sundjerasta (spongy)	-II-	0,09	1,2	1,9
<u>Zubi</u>				
gledj		48		241
dentin		13,8		138

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dobijen postupkom kovanja, u zavisnosti od masenih udela HAp u kompozitu, poseduje mehaničke karakteristike prikazane u tabeli 1.5. Molska masa PLLA iznosila je oko 200 KDa, a veličina čestica HAp od 20 – 30 μm .

Tabela 1.5. Uticaj sadržaja HAp u kompozitu na mehaničke karakteristike¹²⁸

materijal	HAp/PLLA	S _b	E _b	S _t	E _t	S _c	E _c	S _c	T _s	S _i	H _v
PLLA	0/100	258	6,5	154	1,3	123	4,8	93	6,6	76	20,2
HAp 20	20/80	252	7,0	152	2,0	114	5,3	127	6,8	-	20,8
HAp 30	30/70	269	7,6	121	2,3	106	5,6	126	6,6	166	22,9
HAp 40	40/60	270	9,1	110	2,3	107	6,1	127	6,0	90	23,8
HAp 50	50/50	267	12,3	103	2,4	115	6,5	143	4,0	30	26,3

S_b (MPa)- savojna čvrstoća, E_b (GPa)- modul savijanja, S_t (MPa)- zatezna čvrstoća, E_t (GPa)- modul zatezanja, S_c (MPa)- kompresiona čvrstoća, E_c (GPa)- kompresioni modul, S_s (MPa)- smicajna čvrstoća, T_s (kgcm)- torziona čvrstoća, S_i (kJ/cm²)- udarna jačina, H_v Vickersova tvrdoća

Na osnovu rezultata iz tabele 1.5 može se zaključiti da se variranjem masenih udela HAp i PLLA u kompozitu može ostvariti različita vrednost mehaničkih karakteristika blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Kao što se uočava iz rezultata prikazanih u tabeli 1.5 sa povećanjem sadržaja HAp u kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA vrednosti savojne i kompresione čvrstoće se povećavaju, kao i vrednosti njihovih modula. T. Furukawa sa saradnicima je kompozitni biomaterijal koji su Y. Shikinami i M. Okuno¹²⁸ sintetizovali kovanjem primenio za reparaciju koštanih defekata.¹⁵¹⁻¹⁵³ Zbog visokih vrednosti mehaničkih karakteristika (tabela 1.5) T. Furukawa predlaže naziv ultra visoko jaki kompozitni biomaterijala HAp/PLLA za ovu vrstu blokova.¹⁵¹⁻¹⁵³

P. Tormala i saradnici su u svojim istraživanjima polimernu komponentu PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA ojačali i tako dobijenu nazivali samoojačana polimerna komponenta.¹²⁶ Samoojačavanje se postiže dodavanjem (40 mas%) vlakana PGA u PLLA. Uticaj samoojačavanja polimerne komponente je znatan na mehaničke karakteristike kompozitnog biomaterijala. U tabeli 1.6 prikazana je zavisnost mehaničkih karakteristika blokova kompozitnog biomaterijala sa i bez samoojačane polimerne komponente.

Tabela 1.6. Mehaničke karakteristike blokova sa i bez samoojačanog polimera¹²⁶

Materijal	Relativna udarna jačina	Relativna savojna čvrstoća
Porozni HAp + polimer	3,5 – 40	1,1 – 2
Porozni HAp + samoojačani polimer	120 – 240	1,6 – 6
Neporozni HAp + polimer	1,1 – 4,2	1,1 – 1,6
Neporozni HAp + samoojačani polimer	1,8 – 20	1,1 – 3,5

Na osnovu rezultata iz tabele 1.6 može se zaključiti da samoojačavanje polimerne komponente u kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA rezultira u povećanju mehaničkih osobina koje je značajnije prilikom korišćenja poroznih blokova HAp u kompozitu. U naznačenim istraživanjima nisu prikazane apsolutne vrednosti udarne i savojne čvrstoće, već relativne usled čega je otežano poređenje mehaničkih osobina ovako dobijenih blokova sa vrednostima mehaničkih karakteristika prirodnog koštanog tkiva.

Kompozitni biomaterijal dobijen u istraživanjima C. Laurencina i saradnika, koji je sadržavao 50mas% HAp imao je modul elastičnosti blizak *cancellous* kostima.¹³⁰ Ispitani modul elastičnosti ovog kompozita iznosio je 1,459 GPa, dok druge mehaničke osobine u ovim istraživanjima nisu definisane.

U našim predhodnim istraživanjima ispitane su mogućnosti dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA postupkom koji omogućava dizajniranje mehaničke čvrstoće i modula elastičnosti.¹³⁴⁻¹³⁶ Postupak omogućava dobijanje blokova sa širokim spektrom vrednosti mehaničkih osobina i modula elastičnosti koje su bliske prirodnom koštanom tkivu.¹³⁷ U radovima prikazana je mogućnost dobijanja blokova toplim presovanjem do forme ultra visoko jakih sa kompresionom čvrstoćom do 140 MPa i modulom elastičnosti do 10 GPa.

1.5.3.1 Poroznost

Poroznost direktno utiče na mehaničke osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA tako da se mehaničke osobine smanjuju sa porastom poroznosti i obrnuto. Zbog značaja ove veličine, njena vrednost u istraživanjima postaje nezaobilazna.

P. Tormala i saradnici su u okviru dobijanja lamelnog tipa kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA čiju strukturu obeležavaju makro slojevi HAp i PLLA ostvarili delimično projektovanje poroznosti tako što se čestice natrijumhlorida prosečne veličine 100 μm dodaju polimeru u količini od 60 mas% pre dejstva pritiska. Nakon dobijanja višeslojne forme kompozitnog biomaterijala blok se tretira destilovanom vodom u toku 6 časova, a nakon sušenja on poseduje otvorenu poroznost od 20%.¹²⁶

A. Polson sa saradnicima je u svojim istraživanjima naznačio važnost dobijanja željene poroznosti i naveo mogućnosti da se poroznost kompozitnog biomaterijala može dobiti u intervalu od 5 – 95 %.¹²⁹ Veličina pora se takođe može projektovati i njena veličina može biti od 1 – 1000 μm . Poroznost se ostvaruje dodavanjem nove komponente, tzv. agenas za formiranje pora. Nakon aplikacije kompozitnog biomaterijala agensi se uklanjaju, a prostor u kome su se nalazili ostaje

prazan. Agensi za formiranje pora su različiti i u najvećem broju slučajeva dekstroza, natrijumhlorid, natrijumkarbonat, hidroksipropilceluloza i polietilenglikol se koriste u te svrhe.

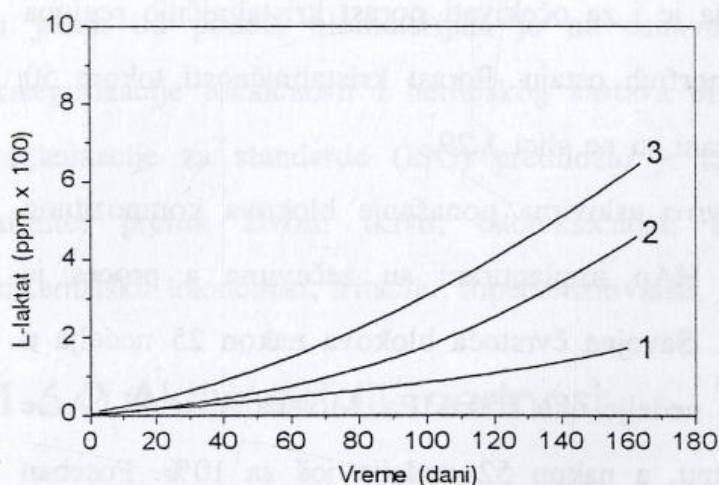
Dobijanje željenog prečnika pora sa veličinama od 100-250 μm , C. Laurencin sa saradnicima, ostvario je dodavanjem agenasa za formiranje pora kao što je natrijumhlorid i/ili polivinilalkohol (PVA).¹³⁰ R. Dunn i A. Tipton prikazali su mogućnost dobijanja prosečnog prečnika pora od 10-1000 μm , takođe korišćenjem agenasa za formiranje pora koji najčešće mogu biti natrijumhlorid, hidroksilpropilceluloza, natrijum karbonat ili karboksimetilceluloza.¹⁴⁸

Mogućnost dobijanja željene poroznosti sistema bez dodavanja agenasa za formiranje pora prikazan je našim, ranije pomenutim istraživanjima.¹³⁴⁻¹³⁷ Istim postupkom sa kojim se omogućava dizajniranje mehaničkih osobina, omogućeno je i dobijanja željene poroznosti. U ovim istraživanjima dobijene su različite vrste blokova sa intervalom ukupne poroznosti od 0,4-40 %. Prosečan prečnik pora u prikazanim istraživanjima može da se nalazi u intervalu od 500 μm – 100 nm i manje.

1.5.4 In vitro i in vivo istraživanja

Sva ispitivanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koja su bitna za njegovu aplikaciju uglavnom su analizirana u *in vitro* uslovima.^{121, 126} *In vitro* istraživanja mogu poslužiti kao bitna osnova za kliničku primenu kompozita. Realno ponašanje kompozita dobija se u *in vivo* uslovima. Kada se kompozit implantira u organizam on biva izložen dejstvu složenih enzimskih sistema i metabolizmu organizma. Definisane ovog procesa prikazuje realnu sliku kvaliteta kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Promene koje se dešavaju u *in vivo* uslovima do sada su se uglavnom odnosile na definisanje promena u mikrostrukturi površine uz korišćenje skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM).¹²¹ Pojava makrofaga i osteoblasta kao i njihova adhezija i proliferacija na kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA u *in vivo* uslovima nije dovoljno ispitana u do sada publikovanim istraživanjima. *In vivo* ispitivanja nose u sebi niz kompleksnih medicinskih ali i pravnih problema, pa je nekada i opravdano što ih je teško sprovesti.

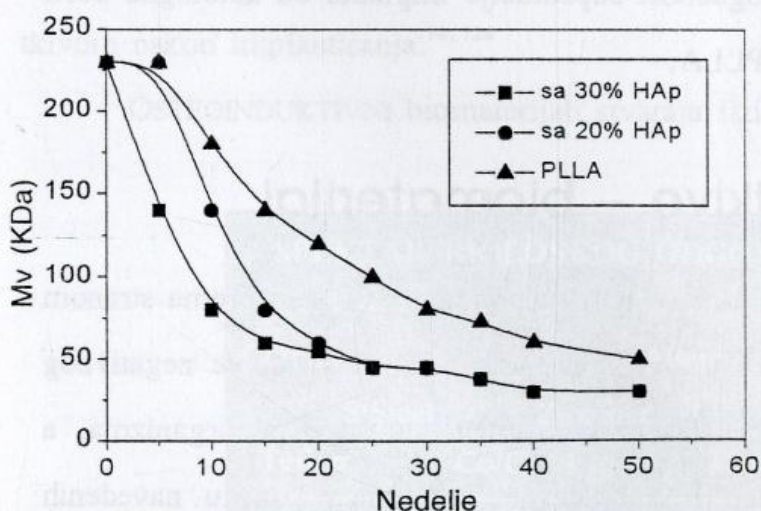
Rezultati *in vitro* istraživanja C. Verheyen-a i saradnika utvrdila su da tokom vremena potencijalne eksploatacije dolazi do promena pH sredine i molske mase PLLA.¹²⁷ Hidroliza PLLA tokom ispitivanja definisana je merenjem koncentracije oslobođenog monomera l-laktida iz PLLA u ispitivanom rastvoru, što je prikazano na slici 1.27.



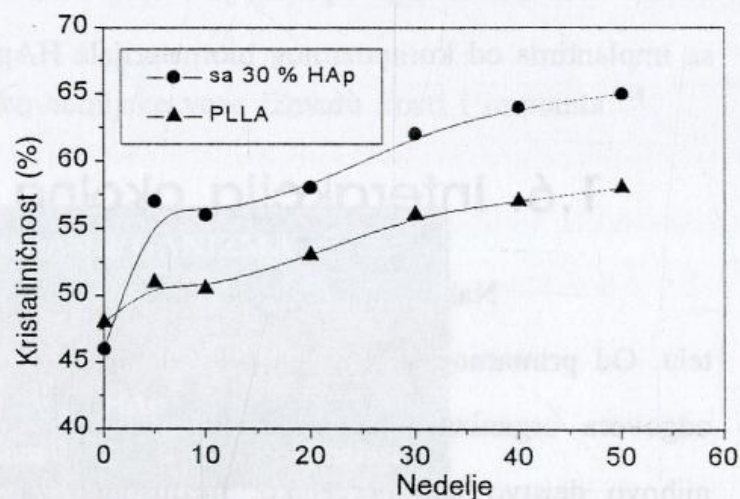
Slika 1.27. Oslobađanje l-laktida iz HAp/PLLA kompozita tokom *in vitro* ispitivanja: (1) sa 50 mas% HAp, (2) sa 30 mas% HAp, (3) čist PLLA¹²⁷

Komponenta HAp u kiselim sredinama je nestabilna i počinje da se rastvara. Iz tih razloga koncentracija Ca^{2+} jona se u ispitivanom rastvoru povećava, a njegovo poreklo je iz komponente HAp. Tokom 180 dana *in vitro* ispitivanja utvrđeno je da dolazi do površinskog rastvaranja komponente HAp i da fenomeni rastvaranja zavise od okolne sredine. U puferkim sistemima rastvaranje HAp je kontrolisano i omogućeno je njegovo zaustavljanje.¹²⁷

Blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji su dobijeni kovanjem sa nekalcinisanom HAp komponentom, u istraživanjima Y. Shikinam-a i M. Okuno-a ispitani su u *in vitro* uslovima.¹²⁸



Slika 1.28. Promene molske mase PLLA iz kompozita sa 20 i 30 mas% HAp¹²⁸



Slika 1.29. Promena kristaliničnosti

PLLA iz kompozita sa 30% HAp¹²⁸

Na slikama 1.28 i 1.29 prikazana je promena molske mase i kristaliničnosti PLLA tokom 60 nedelja istraživanja. Tokom tretmana blokova na 37°C u SBF rastvoru (slika 1.28) dolazi do smanjenja molske mase PLLA sa različitim brzinama koje zavise od masenog sadržaja HAp u HAp/PLLA kompozitnom biomaterijalu. U vremenskom periodu do 25 nedelja brzina smanjenja

molske mase je najviša kod kompozita sa 50% HAp. Kao što je i šematski prikazano na slici 1.24 degradacija počinje u amorfnim regionima PLLA pa je i za očekivati porast kristaliničnih regiona tokom vremena ispitivanja koji nakon nestanka amorfnih ostaju. Porast kristaliničnosti tokom 50 nedelja istraživanja je potvrđen a ovi rezultati prikazani su na slici 1.29.

T. Furukawa i saradnici ispitivali su u *in vivo* uslovima ponašanje blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.¹⁵¹ Blokovi sa 30mas% HAp implantirani su zečevima a proces je analiziran u vremenskom intervalu od 2-52 nedelje. Savojna čvrstoća blokova nakon 25 nedelja u *in vivo* uslovima iznosila je 200 MPa, a nakon 52 nedelje oko 150 MPa. Molska masa PLLA se za 8 nedelja smanjila za 45% u odnosu na početnu, a nakon 52 nedelje još za 10%. Poseban akcenat u ovim istraživanjima pridaje se značaju da je brzina resorpcije umnogome veća u slučaju HAp/PLLA kompozita kod koga je HAp komponenta nekalcinirana. U toku analiziranog perioda nije registrovana pojava inflamatornih ćelija (fagocita).

Ponašanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa kalcinisanom komponentom HAp u *in vitro* i u *in vivo* uslovima takođe je ispitano u našim ranijim istraživanjima.^{140, 141} Pri *in vivo* uslovima ispitana je mogućnost primene FT-IR spektroskopije za analizu procesa reparacije, što je omogućilo da se uz pomoć relativno jednostavne metode dobiju informacije neophodne za realno sagledavanje interakcije okolnog tkiva sa implantom. Proces nakon implantacije je takođe kvalitativno analiziran sa biohemijskog aspekta. Primenjena *in vivo* ispitivanja vršena su do pojave novog vezivnog tkiva – kolagena, što predstavlja krajnje stadijume procesa reparacije defekta. U okviru ovih istraživanja ispitana je i opravdana mogućnost supstitucije implanta od autologne kosti sa implantima od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

1.6. Interakcija okolno tkivo – biomaterijal

Nakon ugradnje biomaterijala organizam se ponaša prema njemu kao prema stranom telu. Od primarnog je značaja prihvatanje biomaterijala od strane organizma i svođenje negativnog odgovora organizma na minimum. Postoje brojni faktori koji utiču na odgovor organizma, a njihovo dejstvo je sinergetsko, međusobno zavisno i kompleksno.¹⁵⁴ Granice između navedenih faktora nisu oštre, već se nekada i preklapaju.

1.6.1 Hemijski sastav

Neophodno je da primenjeni biomaterijal kada se nađe u agresivnoj sredini (čovečiji organizam) ne bude toksičan, ne stvara hronične inflamatorne reakcije, ne poseduje kancerogeni

potencijal, tokom sterilizacije bude hemijski stabilan i ne stvara alergijske reakcije.¹⁵⁴ Po L. Hench-u jedna od podela biomaterijala je na osnovu toksičnosti.³ Postoje brojna neslaganja u vezi kategorizacije toksičnosti i hemijskog sastava biomaterijala. Međunarodni komitet Internacionalne organizacije za standarde (ISO) predložio je kriterijume za ocenu toksičnosti koji obuhvataju: afinitet prema živom tkivu, citotoksičnost, teratogeni efekat, karcinogenost, indukovanu i sistematsku toksičnost, iritaciju, hipersenzitivnost, humoralni afinitet i lokalni odgovor tkiva.⁴

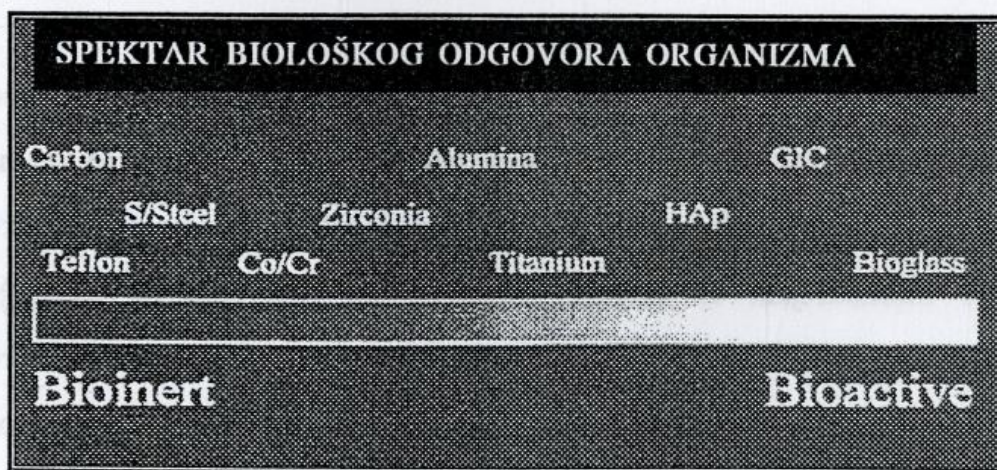
1.6.2 Aktivnost ili inertnost

Biomaterijali mogu na različite načine da učestvuju u procesu reparacije defekta i izazovu različit biološki odgovor organizma. Po G. Willmann-u biomaterijali mogu biti bioaktivni (HAp, bioaktivno staklo), biotolerantni (PMMA, čelik) i bioinertni (cirkonijum, alumina).⁸⁰ Na slici 1.30. prikazan je spektar biološkog odgovora organizma na različite biomaterijale.

Bioaktivni biomaterijali dolaze u vrlo aktivnu interakciju sa okolnim tkivom, a prema P. Hatton i L. Hench-u zbog pozitivnog uticaja na osteogenezu nazivaju se i OSTEOKONDUKTIVNI biomaterijali.¹⁴ Bioaktivni biomaterijali ostvaruju hemijsku vezu između koštanog tkiva i implanta a takođe omogućavaju proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta.^{124, 155} Ovi procesi rezultiraju u mineralizaciji koštanog defekta.¹⁵⁵

OSTEOINTEGRATIVNE biomaterijale prema P. Hatton-u i A. Letić-Gavrilović sačinjava titan sa svojim legurama, koji se koriste za izradu dentalnih implanata i koji se integrišu sa okolnim tkivom nakon implantiranja.^{14, 124}

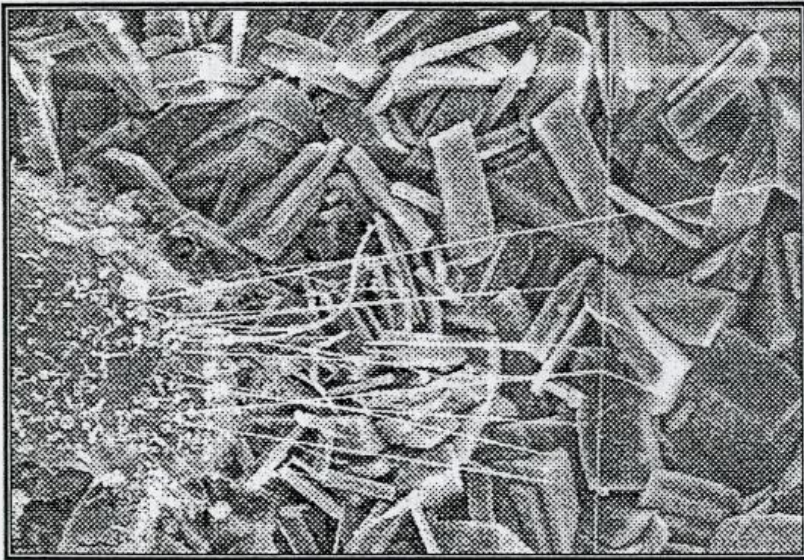
OSTEOINDUKTIVNI biomaterijali stvaraju fizičko-hemijske veze između kosti i implanta.¹²⁴



Slika 1.30. Spektar biološkog odgovora organizma na biomaterijale¹⁴

1.6.3. Biokompatibilnost

Biološka kompatibilnost usko je povezana sa hemijskim sastavom i aktivnošću ili inertnošću biomaterijala. Biokompatibilni materijali izazivaju slab odgovor tkiva ili potpuni izostanak istog. Bionekompatibilni biomaterijali izazivaju jak odgovor organizma koji rezultira odbacivanjem implanta kao stranog tela.¹⁵⁴ Y. Ikada je predložio podelu biokompatibilnosti na mehaničku i međupovršinsku biokompatibilnost.²² Biomaterijal koji se koristi mora da poseduje vrlo slične mehaničke osobine tkiva u koje se implantira, tj. oni moraju da budu mehanički biokompatibilni. Međupovršinska biokompatibilnost vezana je za mikrostrukturu i poroznost površine biomaterijala pri čemu mikrostruktura površine implantiranog biomaterijala mora biti slična mikrostrukturi površine tkiva. Kada se biomaterijal implantira u prvom trenutku dolazi do interakcija ćelija okolnog tkiva sa biomaterijalom. Od vrste i načina interakcija u međusloju implant tkivo zavisi odgovor organizma.¹⁵⁶



Proteine ekstracelularnog matriksa sintetizuju osteoblasti i oni omogućavaju adheziju ćelija na biomaterijalima.⁹⁴ Na slici 1.31 prikazana je dobro adherirana ćelija osteoblasta na površini biomaterijala monetita (CaHPO_4) nakon 24 časa inkubacije.

Slika 1.31. Ćelija osteoblasta na površini biomaterijala¹⁵⁷

Kao što je i ranije naznačeno formiranje novog koštanog tkiva uslovljeno je prisustvom osteoblasta i njihovom dobrom adhezijom. Fenomen adhezije ćelija sastoji se od više manjih fenomena. U početku neophodno je da dođe do približavanja ćelija i formiranja fizičko-hemijskih veza između ćelije i biomaterijala uključujući jonske i van der Valsove veze. Nakon toga neophodno je prisustvo ekstracelularnih, matriks, membranskih i citoskeletnih proteina koji omogućavaju pričvršćivanje ćelije na biomaterijal, indukuju transdukciju, transkripciju i regulišu ekspresiju gena, neophodnih za proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta.^{124, 157} Osnovni osteoinduktivni signal je stvaranje faktora rasta i BMP-a.¹²⁴ Diferencijacija osteoblasta vezana je za prisustvo i aktivnost alkalne fosfataze.⁹⁴

Osobine dobre adherencije i nosača faktora rasta pored prirodnih (kolagen tip I i II) ispoljili su i određeni sintetski biomaterijali (HAp, PLLA).¹²⁴

Osteoblast – biomaterijal interakcije zavise i od površinske energije biomaterijala. Adsorpcija proteina značajnih za adheziju zavisi od površinske energije biomaterijala. Adhezija ćelija je generalno bolja na hidrofiličnijim površinama.⁹⁴

1.6.4 Površina

Nakon implantacije biomaterijala okolno tkivo dolazi u dodir sa njegovom površinom. Pored ranije navedenog hemijskog sastava, aktivnosti i biokompatibilnosti, dimenzije i oblik površinskih pora direktno utiču na ponašanje okolnog tkiva. Hrapavost površine uslovljava adheziju okolnog tkiva, a prema K. Anselme-u optimalna vrednost hrapavosti iznosi oko 4 μm .⁹⁴ Smicajna čvrstoća u međusloju implant-tkivo zavisi od hrapavosti površine implanata. K. Hayashi sa saradnicima utvrdio je da smicajna čvrstoća u među sloju koštano tkivo - HAp implant umnogome zavisi od hrapavosti implanta.⁸¹ Smicajna čvrstoća ima skoro duplo višu vrednost u slučaju hrapavosti implanta od 8,4 μm nego za 3,4 μm . U istim istraživanjima je utvrđeno da nakon 3 meseca *in vivo* ispitivanja ova se razlika povećava u korist implanta sa hrapavošću od 8,4 μm .

1.6.5 Stanje okolnog tkiva

Zdravstveno stanje pacijenta kao i stanje tkiva u koje se implantira biomaterijal utiču na uspešnost integracije implanta i opšti odgovor organizma. Proces pripajanja okolnog tkiva kod mlađih osoba odvija se znatno brže nego kod starijih.¹⁵⁴ Ako je fiziologija okolnog tkiva negativno poremećena usled patološkog procesa ili ako uzročnik procesa nije uklonjen, bez obzira na visok kvalitet primenjenog biomaterijala, krajnji odgovor organizma biće negativan.

1.6.6 Hirurška veština

Tehnika operativnog zahvata obuhvata pripremu pacijenta, samu hiruršku intervenciju (operaciju) i postoperativni tretman. Hirurška intervencija pored izbora načina i tehnike zahvata zavisi i od veštine i uigranosti hirurških timova i pojedinaca. Dinamika opterećivanja implanta ima ključnu ulogu u odgovoru organizma u postoperativnom periodu. Neophodno je definisati statična i

dinamična opterećenja koja će implant prenositi tokom procesa implantacije, kao i kontrolisano opterećenje nakon ugradnje.¹⁵⁴

1.6.7 Sterilizacija

Najčešće se za sterilizaciju biomaterijala koriste postupci inaktivacije mikroorganizama pri kojima se uništava fiziološka i biohemijska aktivnost mikroorganizama. U te svrhe najčešće se upotrebljava sterilizacija toplotom, hemijskim agensima, elektromagnetnim zračenjem itd.^{158, 159}

Toplotna inaktivacija mikroorganizama može se opisati jednačinom $-dN/dt=kN$ u kojoj N predstavlja broj mikroorganizama, k konstantu brzine inaktivacije a t vreme sterilizacije. Spore su za nekoliko reda veličine termički otpornije od bakterija, kvasaca i sl. Inaktivacija spora sledi nelogaritamsku kinetiku koja se uprošćeno može prikazati $N_r \rightarrow N_s \rightarrow N_d$. Rezistentne spore (N_r) prelaze u inaktivne (N_d), kroz prelazni stadijum osetljivih spora (N_s).

Hemijski agensi koji se najčešće primenjuju za sterilizaciju su fenoli, etilen oksid, ozon itd. Veoma je značajno da biomaterijal neposredno pre aplikacije ne sadrži zaostale hemijske agense koji bi negativno uticali na okolno tkivo zbog svoje toksičnosti.

Za sterilizaciju se često upotrebljavaju UV zraci, γ zračenje ili hladna plazma.⁴³ Polimerni i kompozitni biomaterijali mogu podleći destrukciji ili značajnim promenama tokom toplotne ili hemijske sterilizacije.

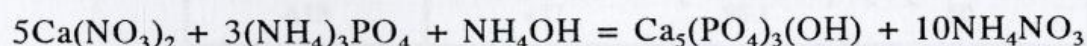
Najčešće korišćeni kriterijumi sterilizacije su "decimalno vreme" i stepen sterilizacije. "Decimalno vreme" predstavlja potrebno vreme tokom sterilizacije da bi se koncentracija mikroorganizama smanjila za 10 puta. Stepen sterilizacije predstavlja odnos broja mikroorganizama posle i pre sterilizacije (N/N_0).^{158, 159}

2. Eksperimentalni rad

2.1 Dobijanje komponenata HAp, PLLA i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

2.1.1 Sinteza HAp komponente

Granule HAp dobijene su precipitacionom metodom (između $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$) i naknadnim termičkim tretmanom dobijenog gela na 1373K. Rastvor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ energično je mešan magnetnom mešalicom brzinom 100 obr/min, dok mu je dodan rastvor $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ tokom 180 minuta. Dobijene suspenzija je zagrejana do ključanja a izdvojeni talog nakon 18h odležavanja je filtriran kroz Bihnerov levak. Talog je dobijen prema reakciji:



Dobijeni filter kolač je ispiran toplom destilovanom vodom do nestanka mirisa amonijaka i sušen na sobnoj temperaturi. Iz osušenog gela formirane su granule HAp koje su kalcinisane na 1373K tokom 6 časova. Polazne komponente za dobijanje HAp su proizvedene od strane Fluca, (Germany) proizvođača.

Ovako sintetisan HAp poslužio je kao konstitutivna komponenta kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. U zavisnosti od načina formiranja granula, sušenjem gela na PVC sitima sa prečnikom pora od 1-1,5 mm, dobijene su granule veličina prečnika od 0.1-1.2 mm. Sprašivanjem granula u keramičkom tučku sa avanom dobijene su čestice HAp sa prosečnom veličinom od 100 ± 30 nm, što je i utvrđeno kasnijom skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

2.1.2 PLLA komponenta

Korišćen je već sintetisani PLLA iz monomera L-laktida (Aldrich Chemical Company, USA) i netoksičnog inicijatora staniomoktoata (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) molskih masa 430000 i 50000 g/mol.³⁰ Za određeni broj eksperimenata korišćen je komercijalni PLLA (Fluca, Germany) molske mase 100000 g/mol.

2.1.3 Dobijanje visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dobijen je mešanjem HAp i rastvorenog PLLA, nakon čega je smeša podvrgnuta vakuum uparavanju.

PLLA se potpuno rastvori (rastvarač hloroform, metilen hlorid ili benzen) na 293K u toku 120 minuta. U rastvor PLLA unete su granule ili prah HAp (masen udeo PLLA od 10 – 25%) uz mešanje u toku od 15 minuta na 293K. Nakon homogenizacije suspenzija je razlivena u stakleni kalup (d=100 mm, h=150 mm), nakon čega je podvrgnuta vakuum uparavanju. Uparavanje je obavljeno na 313K i P=10 Pa do potpunog otparavanje rastvarača. Dobijeni visoko porozni kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dalje je dizajniran hladnim i toplim presovanjem sa dvostranim dejstvom sile. Za određenu grupu istraživanja visoko poroznom kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA je dodato 10 mas% kolagena (Krka, Slovenija) pre hladnog i toplog presovanja. Uprošćena šema dobijanja prikazana je na slici 2.1.



Slika 2.1. Šema dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

2.1.4 Kompaktiranje hladnim i toplim presovanjem

Visoko porozni kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dizajniran je presovanjem u opsegu temperatura od sobne do temperature topljenja upotrebljenog PLLA. Osnovni parametri presovanja prikazani su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Osnovni parametri presovanja visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Oznaka kompozita	Temperatura (K)	Pritisak (MPa)	Vreme (min)
A1	293	98.1	-
A2	353	98.1	15
A3	403	98.1	15
A4	433	98.1	15
A5	457	98.1	15
A6	457	49.0	15
A7	457	98.1	15
A8	457	196.2	15
A9	457	294.3	15
A10	457	98.1	15
A11	457	98.1	30
A12	457	98.1	45
A13	457	98.1	60

U cilju ispitivanja uticaja molske mase PLLA na kompresionu čvrstoću kompozitnog biomaterijala kao i uticaja dodatka kolagena u kompozit toplo je presovan kompozitni biomaterijal čiji su sastavi kao i uslovi toplog presovanja prikazani u tabeli 2.2 Pritisak toplog presovanja za uzorke B1-B6 bio je isti i iznosio je 98,1 MPa, a vreme presovanja 15 minuta. Veličina čestica HAp faze bila je takođe ista za sve uzorke (oko 0,6-1,1 mm).

Tabela 2.2. Sastav i uslovi presovanja kompozita sa i bez kolagena

Oznaka kompozita	Maseni udeo HAp (%)	Maseni udeo PLLA (%)	Maseni udeo kolagena (%)	Molska masa PLLA (g/mol)	Temperatura presovanja (K)
B1	80	20	0	430000	457
B2	80	10	10	50000	457
B3	80	10	10	430000	457
B4	80	10	10	50000	457
B5	80	20	0	50000	457
B6	80	10	10	50000	313

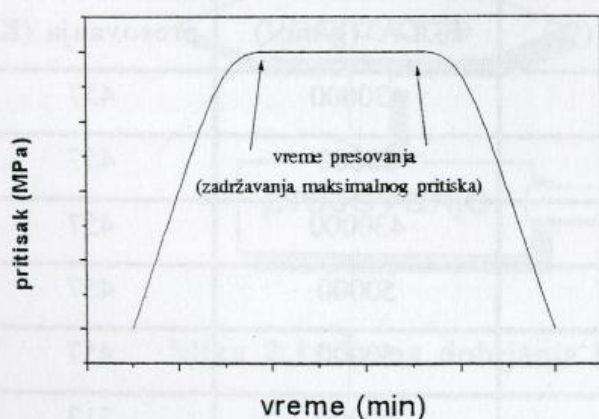
U daljem radu u cilju ispitivanja uticaja vremena, temperature i pritiska presovanja, presovanje je vršeno na različitim pritiscima uz variranje molskih masa PLLA i veličina čestica HAp. Maseni odnos HAp : PLLA iznosio je 80 : 20 u svim uzorcima. U tabeli broj 2.3 prikazani

su uslovi na kojima je vršeno toplo presovanje i definisan sastav faza kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji se dizajnira. Toplo presovanje je izvršeno tokom 0-60 minuta.

Tabela 2.3. Sastav i uslovi toplog presovanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Oznaka kompozita	Veličina čestice HAp	Molska masa PLLA (g/mol)	T presovanja (K)	P presovanja (MPa)
C1	100 nm	430000	467	98,1
C2	100 nm	430000	457	98,1
C3	100 nm	100000	459	98,1
C4	100 nm	100000	449	98,1
C5	0,5-0,7 mm	430000	457	294,3
C6	0,5-0,7 mm	430000	457	98,1
C7	0,5-0,7 mm	100000	449	294,3
C8	0,5-0,7 mm	100000	449	98,1

Visoko porozni HAp/PLLA kompozitni biomaterijal je presovan u cilindričnim čeličnim kalupima prečnika 10 mm na presi CARVER, Inc. Auto "C" Model 3889. Presa omogućava podešavanje temperature, pritiska i vremena presovanja. U već zagrejan kalup do zadate temperature presovanja, unešeno je 2g kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Nakon unošenja materijala zadati pritisak presovanja je dostignut za 30 sekundi, nakon čega je vršeno presovanje, a vreme zadržavanja zadatog pritiska (definisano u tabeli 2.1) je definisano kao vreme presovanja. Na slici 2.2 prikazana je zavisnost pritiska tokom vremena presovanja.



Slika 2-2. Promena pritiska presovanja tokom vremena toplog presovanja

Nakon izvršenog presovanja, vreme za koje je pritisak vraćen na atmosferski iznosilo je 20 sekundi. Nakon toga uzorci su istisnuti iz kalupa u toku 1 minuta. Svi uzorci su na isti način ohlađeni do sobne temperature nakon istiskivanja.

Radi jednostavnijeg uvida koja je molska masa polimera upotrebljena, kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa PLLA molske mase 430000 g/mol označen je kao HAp/PLLA(430), sa 100000 g/mol HAp/PLLA(100) a sa 50000 g/mol kao HAp/PLLA(50).

2.1.5 Dobijanje visoko gustog HAp

Tokom dobijanja visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA (poglavlje 2.1.3) komponenta HAp se meša sa rastvorom PLLA. U cilju određivanja ugla kvašenja površine HAp sa različitim rastvorima PLLA sintetisane su tablete visoko gustog HAp.

Granule HAp su usitnjene do veličine čestica od 100 nm koje su zatim presovane na pritisku 98,1 MPa u čeličnom kalupu ($d=10$ mm). Dobijene tablete ($d=10$ mm, $h=2$ mm) su sinterovane na 1473°C tokom 3 časa. Sinterovanje je vršeno u *Heraeus* peći (ROF 7/50) sa automatskom regulacijom temperature ($\pm 1\text{K}$). Nakon sinterovanja površina tableta je sukcesivno brušena šmirglom granulacija 800, 1000, 1200 i 1600, a zatim isprane rastvorom 98% etanola i osušene u sušnici na 80°C .

2.1.6 Nanošenje prevlaka

Nakon vakuum uparavanja (poglavlje 2.1.3) visoko poroznom kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA dodat je hloroform u masenom odnosu od 30% pa je tako dobijena suspenzija jednostepenim premazivanjem deponovana na substrat od titana i teflona. Dobijena prevlaka je sušena na relativnoj vlazi vazduha od 65%, tokom 5 časova na sobnoj temperaturi. Dobijene prevlake HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala sa PLLA molskih masa 100000 i 430000 g/mol analizirane su SEM-om.

2.2 Ispitivanje osobina HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala od značaja za primenu

2.2.1 In vitro i in vivo ispitivanja

In vitro ispitivanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA ($d=10$ mm i $h=10$ mm) vršena su tako što su blokovi HAp/PLLA stavljeni u polietilenske ampule (1 uzorak / 1 ampuli) sa fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl). Količina fiziološkog rastvora iznosila je 30g. fiziološkog rastvora/1g. HAp/PLLA. Polietilenske ampule držane su u inkubatoru na $310 \pm 0,4$ K 80 dana, a merenja su izvođena nakon 1, 3, 7, 15, 21, 28, 35, 50, 62, 71 i 80 dana. Ampule su uzimane u naznačenim vremenskim intervalima, nakon čega je rastvoru određivana pH i koncentracija kalcijuma, a uzorcima stepen bubrenja i kompresiona čvrstoća.

In vivo ispitivanja su vršena na miševima singenog soja *Balb/c*. Za intraperitonealne implantacije korišćene su dve vrste kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430). U svim slučajevima korišćen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa 80mas% HAp i 20mas% PLLA. Obe vrste su implantirane u obliku cilindričnih blokova prečnika 1mm i visine 1.5 mm. Eksperimenti su urađeni na 40 mladih mužjaka *Balb/c* koji su podeljeni u četiri eksperimentalne grupe. Prvoj grupi implantirani su blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) a drugoj HAp/PLLA (430). Trećoj grupi miševa implantiran je materijal koji se sastojao od 50mas% HAp/PLLA(50) i 50mas% koštanog praha dobijenog mlevenjem femura singenih miševa i četvrtoj materijal od 50mas% HAp/PLLA(430) i 50mas% koštanog praha, što je simuliralo autolognu implantaciju kosti. Nakon jedne i tri nedelje svim miševima su ekstrahovani implantati, kojima je zatim uklonjen spoljašnji sloj vezivnog tkiva. Nakon sušenja uzorci su samleveni i pomešani sa KBr-om. Uzorci su presovani u obliku pastila pogodnih za FT-IR spektroskopsku analizu. Mikrostruktura površine uzoraka kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre i posle implantiranja analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) a uzorci pre snimanja su fiksirani u 0.4% gluteraldehidu 24 sata, nakon čega ispirani u 0,2 M PBS-u (pH 7,2 do 7,4). Postfiksacija je vršena sa 1% osmium tetroksidom u veronalnom puferu (pH 7,2 do 7,4) tokom 2 sata. Pre SEM snimanja preparata oni su sušeni na kritičnoj tački sa CO₂ i u vakumskom evaporatoru presvučeni zlatom.

2.2.2 Patohistološka istraživanja

U okviru istraživanja uradjene su patohistoloske analize tkiva sa implantima i hemiluminescentni odgovor peritonealnih fagocita nakon 2, 7 i 12 nedelja od intraperitonealne implantacije.

Za patološku analizu u eksperimentu su korišćeni singeni miševi soja *Balb/c*, muškog pola, starosti oko 3 meseca i mase 24-26 g životinje su hranjene i pojene ad libidum i držane na stalnoj temperaturi od 296K.

Implantirani materijal: Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dobijen hladnim presovanjem visoko poroznog kompozitnog biomaterijala prema postupku koji je ranije detaljno opisan. U svim slučajevima korišćen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430). Kao materijal B za koštani implantat su uzete granule dijafize femura mladog *Wistar* pacova. Koštano tkivo je devitalizovano kuvanjem, a zatim je takođe usitnjeno u avanu. Svi materijali su pre implantacije sterilisani u formalinu, zatim isprani u sterilnom fiziološkom rastvoru i osušeni.

Intraperitonealna implantacija je urađena tako što je 50 mg kompozitnog biomaterijala uneto kroz široku sterilnu iglu 4/18 u suprapubičnom delu peritoneuma miša sa leve strane. Pre implantacije trbušni deo životinje je dezinfikovano alkoholom.

U grupama implantiranih, životinjama je unet samo jedan od tri materijala. Ove grupe su označene prema oznaci implantata, tj. HAp/PLLA(50), HAp/PLLA(430) i B za usitnjenu kost. Ekstrakcija implantata i žrtvovanje životinja je rađeno posle 2, 7 i 12 nedelja od implantiranja. Miševima je prvo uzeta krv iskrvavljenjem iz retroorbitalnog pleksusa u hepariniziranu epruvetu, a zatim su životinje ubijene cervikalnom dislokacijom. Posle toga je peritoneum ispran hepariniziranim rastvorom *Hanks* pH 7,4 i napravljen je obdukcijski nalaz.

Patohistološka analiza uzoraka implantata i okolnog peritoneuma je vršena tako što su uzorci prvo fiksirani u *Brasil-Bouin*-om fiksativu 3 sata i postfiksirani u 4% puferovanom formalinu preko noći. Fiksirani implantati su dekalcinisani elektrolitički u vodenom rastvoru 8 vol% HCl i 10 vol% mravlje kiseline. Proces dekalcinacije provoden je dva sata pri naponu od 100 V i jačini struje 50 mA. Tkivo je potom dehidrirano u alkoholu i uklapano u paraplant. Preseci debljine 3-6 mikrometara su bojeni metodama HE i PAS. Za bojenje rehidrirani parafinski rezovi su inkubirani u perjodnoj kiselini 30 min., a onda bojeni *Shiff*-ovim reagensom još 30 min. Kontrastiranje je vršeno hematoksilinom 8 min. Dehidrirani isečci montirani su na predmetnom staklu, a potom analizirani na svetlosnom mikroskopu. Posebno je posmatrana veza između implantata i okolnog tkiva.

2.3 Karakterizacija sinteze, dizajniranja, in vitro i in vivo ispitivanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

2.3.1 Rendgenostrukturalna analiza (X-ray)

Rendgenostrukturnom analizom karakterisan je sastav komponenti HAp i PLLA kao i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) pre i nakon 30 i 60 minuta toplog presovanja. Za ispitivanje korišćena je kvalitativna fazna analiza u cilju identifikacije faza i određivanja udela kristalnog i kristaliničnog (za PLLA) u njima. Ispitivani uzorci izloženi su rendgenskim zracima, koji nakon interakcije sa fazom uzorka u obliku difraktovanih zraka se detektuju. Dobijeni impulsi se pojačavaju a nakon prolaska kroz analizator i filter beleže. Prikupljeni podaci prikazuju intenzitet u zavisnosti od ugla (2θ), a vrednosti za međuravanska rastojanja se mogu izračunati iz

Braggove jednačine ($n\lambda=2d\sin\theta$). Sve funkcije su kontrolisane mikroprocesorom, što omogućava jednostavnost analize.

Sastav komponente HAp ispitan je metodom praha, dok je komponenta PLLA ispitana metodom folije polimera na nosaču. Položaji difrakcionih maksimuma mereni su na vrhu svakog pika. Rendgenostrukturalna istraživanja izvršena su difrakcijom X zraka na uređaju PW 1710, Philips, Germany sa $\text{CuK}\alpha$ zračenjem i grafitnim monohromatorom. Snop x zraka je CuK-Ni filtriran na talasnu dužinu 0,1542 nm, a brzina snimanja iznosila je 0,2 °/min. Analiza je vršena za uglove od 4-90°. Zbog širine intervala uglova ova vrsta karakterizacije naziva se široko ugaona rendgenostrukturalna analiza (WAXS).

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100) pre i nakon toplog presovanja takođe je rendgenostrukturalno analiziran. Dobijeni blokovi su sprášeni, i snimljen je njihov difraktogram u intervalu uglova $2\theta = 4-90^\circ$. Posebno je analiziran interval uglova od 15-18° iz razloga što se karakteristični pik PLLA koji ima maksimalni intenzitet (16,66°), pored pikova HAp (16,81° i 16,94°), nalazi u tom intervalu. Analiza pikova u navedenom intervalu uglova izvršena je uz pomoć posebno napisanog kompjuterskog programa (*Peak Fit 4*) u te svrhe.

2.3.2. Određivanje molske mase PLLA (M_v)

Molska masa PLLA je određena viskozimetrijski korišćenjem *Mark-Houwink*-ove jednačine: $[\eta] = 5.72 \times 10^{-4} M_v^{0.72}$.

Nakon toplog presovanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100), PLLA iz njih je potpuno rastvoreni u hloroformu. Rastvor PLLA je prečišćen sa aktivnim ugljem, nakon čega se pristupilo određivanju viskoznosti na Osvaldovom viskozimetru. Grafičkom metodom je određena viskoznost rastvorenog PLLA, a nakon toga računskim putem uz upotrebu *Mark-Houwink*-ove jednačine molska masa.

2.3.3 Određivanje ukupne gustine blokova

Gustina blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA određena je iz odnosa mase i zapremine bloka. Zapremina je određena geometrijski uz upotrebu mikrometarskog zavrtnja, a masa uzoraka na analitičkoj vagi. Relativna gustina blokova predstavlja % teorijske gustine dobijene računskim putem za neporozan blok. Relativna poroznost blokova predstavlja razliku 1-relativna gustina.

2.3.4 Infra crvena spektroskopija (IR)

Uloga IR spektroskopije svodi se na identifikaciju funkcionalnih grupa, principom apsorpcije IR zračenja od strane funkcionalne grupe određenog molekula. Na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju se apsorpcione trake svojstvene samo tim molekulima. U zavisnosti od vrste vibracije naziv dobijaju apsorpcione trake: valencione (ν) i deformacione (δ u ravni i γ van ravni). Apsorpcione trake deformacionih vibracija uvek su na nižim frekvencama u spektru u poređenju sa valencionim. Od frekvence vibracije hemijske veze zavisi položaj apsorpcione trake, a od veličine promene dipolnog momenta njen intenzitet. Preporučuje se da u spektru se analiziraju prvo funkcionalne grupe koje se najlakše prepoznaju (CO, OH, NH itd).¹⁶⁰

Polazne komponente HAp i PLLA su pre procesiranja analizirane IR spektroskopijom. Analiza je izvršena metodom KBr pastile u intervalu talasnih brojeva $4000-400\text{ cm}^{-1}$ na uređaju Specord 75R. Odnos mase uzorka i KBr iznosio je 2 : 100. Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100) dizajniran tokom 30 i 60 minuta toplog presovanja je istom metodologijom analiziran IR spektroskopijom. Svrha IR analize je ispitati uticaj vremena toplog presovanja na položaj, intenzitet i oblik apsorpcionih traka HAp i PLLA, a u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Ovakvim postupkom ispitan je uticaj vremena toplog presovanja na kvalitativne promene komponenata.

Veća osetljivost (do 10^{-9} g.), preciznost frekvencije i bolje razlaganje (do $0,01\text{ cm}^{-1}$) ostvaruje se primenom FT-IR spektroskopije. *Fourier*-ova transformacija interferograma direktno daje intenzitet zračenja (propuštenog kroz uzorak) u zavisnosti od frekvencije što odgovara IR spektru.¹⁵⁹ Tokom *in vivo* ispitivanja kompozitnog biomaterijala zbog definisanja vrlo finih promena korišćena je metoda FT-IR spektroskopije. Za analizu korišćen je uređaj Perkin-Elmer 782 a analizirano je područje od $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Za pripremu uzorka korišćena je metoda KBr pastile sa odnosom uzorka i KBr-a 2: 100.

2.3.5 Diferencijalna termijska analiza (DTA)

HAp, PLLA i kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100) pre i nakon toplog presovanja podvrgnuti su diferencijalnoj termijskoj analizi.

Uz pomoć DT analize registruju su temperaturske razlike koje se javljaju kao posledica različitih fizičkih ili hemijskih procesa praćenih promenama entalpije, u uzorku tokom

temperature, pa se temperaturna osa može nazvati i vremenska. Osnovna svrha DT analiza je ispitivanje termičkih osobina supstanci poznatog hemijskog sastava, pa je iz tih razloga analiziran uticaj temperature, vremena i pritiska toplog presovanja na termičku stabilnost kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA i njegovih konstitutivnih faza.

DT analiza izvršena je na uređaju Du Pont 1090 pri brzini grejanja od 20°C/min i u temperaturnom intervalu od 20-600°C. Ispitivanja uzoraka su izvršena u atmosferi vazduha.

2.3.6 Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC)

Polimer PLLA i kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100) pre i nakon toplog presovanja analizirani su metodom neizotemske skanirajuće kalorimetrije (DSC).

DSC metoda kao i DTA služi za ispitivanje termičkih osobina supstanci na bazi razlike toplotnog fluksa ka uzorku i ka etalonu prilikom njihovog jednovremenog zagrevanja.¹⁶¹ Struja upotrebljena za grejanje uzoraka izaziva otklon u jedinicama toplotnog fluksa (dQ/dt) koji se nalazi na y osi, dok je x osa temperaturna.

Masa svakog uzorka iznosila je oko 5 mg. DSC analiza izvršena je u atmosferi azota na uređaju Perkin Elmer DSC-2, u temperaturnom intervalu 320-520 K sa brzinom grejanja od 20 K/min. Kompjuterskom analizom (*Origin 6.0*) izračunata je površina ispod pika koji karakteriše topljenje. Entalpija topljenja i kristaliničnost je izračunata prema metodologiji koju su predložili S. Sandler i saradnici.¹⁶²

Entalpija procesa topljenja dobijena DSC merenjima srazmerna je površini ispod pika koji definiše topljenje:

$$\Delta H = \int \frac{H}{t} dt = 1/v_g \int_n^m \frac{H}{t} dt, \text{ gde je } v_g \text{- brzina grejanja}$$

Stepen kristaliničnosti polimera PLLA definisan je odnosom entalpije topljenja ispitivanog PLLA i entalpije topljenja 100% kristaliničnog PLLA:

$$\chi_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_f}, \text{ gde je } \chi_c \text{- stepen kristaliničnosti PLLA, } \Delta H \text{- entalpija topljenja ispitivanog PLLA,}$$

ΔH_f - entalpija topljenja 100% kristaliničnog PLLA (93,7 J/g)

2.3.7 Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijskom analizom određuje se masa uzorka u zavisnosti od temperature, pri čemu je temperatura linerno rastuća.¹⁶¹ S toga se TG analizom omogućava praćenje različitih vidova transformacije uzoraka vezane za promenu mase. Promena mase je izražena u % od polazne mase uzoraka.

Polimer PLLA i kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100) pre i nakon toplog presovanja analizirani su termogravimetrijom u cilju ispitivanja uticaja vremena toplog presovanja na termostabilnost blokova. Na osnovu TGA krivih određen je interval temperatura u kojima se odigravaju detektovani stupnji termičke degradacije. TG merenja izvršena su u atmosferi azota na uređaju Perkin Elmer TGA-2, u temperaturskom intervalu od 20-500°C sa brzinom grejanja 20 °C/min. Masa svakog uzorka iznosila je oko 5 mg. Gubitak mase čistog PLLA u ispitivanom temperaturskom intervalu je 100%, a HAp neznatan. Iz tih razloga promene mase kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) u ispitivanom intervalu temperatura potiču isključivo od promena mase PLLA.

2.3.8 Kompresiona čvrstoća i modul elastičnosti (E)

Nakon hladnog i toplog presovanja dobijenim blokovima kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA određivana je kompresiona čvrstoća i modul elastičnosti. Kompresiona čvrstoća je određena na cilindričnim blokovima dimenzija $h=10$ mm, $d=10$ mm na uređaju INSTRON M 1185. Brzina opterećivanja uzoraka prilikom određivanja kompresione čvrstoće iznosila je 1 mm/min. Grafičkom metodom iz dijagrama napon-deformacija određen je modul elastičnosti kao tangens ugla koji zauzima tangenta sa apcisom.

2.3.9 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i elektronska disperziona spektroskopija (EDS)

Mikrostruktura površine HAp, PLLA, kao i prelomnih površina blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) uz upotrebu elektronske disperzione analize (EDS). Veličina čestica HAp faze je takođe određena primenom SEM-a.

Slika površine uzoraka prilikom SEM analize se formira od reflektovanih upadnih elektrona.¹⁶¹ Elektronski snop koji se formira pomoću elektronskog topa, ubrzava se do konstantne energije od 5-50keV. Dijametar snopa može da se kreće u granicama od 10 μm do 10 nm. Zbog male termičke stabilnosti polimer PLLA pri većim rezolucijama i intenzitetu snopa postaje nestabilan i počinje da se razgrađuje. Iz ovih razloga prilikom SEM analize kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA kod veće rezolucije (uveličanje veće od 35000) dobijena slika je nestabilna sa malo izraženom oštrinom.

Mikrostrukturna ispitivanja su izvršena (SEM) na uređaju JEOL-JSM-5300 Japan. Pošto uzorak mora biti elektroprovodan, svi uzorci su napareni tankim slojem zlata u jonskom nparivaču JFC 1100E JEOL.

Kvalitativan sastav komponenti prilikom SEM analiza ispitan je pomoću energetski disperzivne spektroskopske analize (EDS). Fino fokusirani snop elektrona, koji prilikom SEM analize u prvoj fazi služi za posmatranje površine uzoraka, u drugoj fazi je iskorišćen za pobuđivanje emisije rendgenskog zračenja. Analizom spektara rendgenskog zračenja brzo se utvrđuje prisustvo i koncentracija pojedinih hemijskih elemenata u uzorku.

Prilikom ED spektroskopije korišćen je sistem QX2000 (Oxford Instruments, UK) sa Si(Bi) detektorom zračenja povezanog sa skenirajućim elektronskim mikroskopom i kompjuterizovanim multikanalnim analizatorom, koji vrši analizu u oblasti X-zračenja od 0.5-20 keV sa 10 eV po kanalu.

2.3.10 Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS)

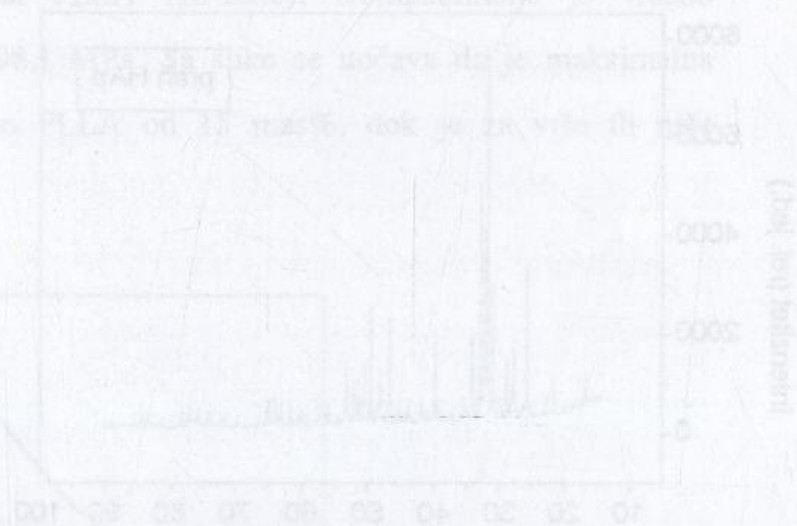
Ako zračenje određene talasne dužine prolazi kroz sloj pare koja sadrži slobodne atome, jedan deo energije zračenja može biti apsorbovan (atom apsorbuje energiju $h\nu$, istu koju bi emitovao), što rezultira smanjenju intenziteta i zračenja. Smanjenje odgovara energiji apsorbovanog zračenja, a intenzitet propuštenog zračenja se detektuje. Različiti atomi apsorbuju zračenje na određenim talasnim dužinama karakterističnim za svaki element ponaosob. Veličina apsorpcionog signala koji se detektuje, direktno je uslovljena koncentracijom specifičnog atoma, što predstavlja osnovu kvantitativnog merenja u atomskoj apsorpcionoj spektroskopiji.

Određivanje koncentracije kalcijuma u fiziolološkom rastvoru tokom *in vitro* istraživanja izvršeno je atomskom apsorpcionom spektrometrijom na uređaju Atomic Absorbtion Spectrometer, Perkin Elmer M 5000. Merenje koncentracije kalcijuma izvršeno je na talasnoj dužini od 422,7 nm.

2.3.11 Ugao kvašenja

Radi analize uticaja vrste rastvarača na kvašenje površine HAp, sa rastvorenim PLLA ispitan je ugao kvašenja nestandardnom metodom.

Na površinu visoko gustog HAp (poglavlje 2.1.5) nanešena je kap veličine oko 1 mm³, 1% rastvora PLLA molske mase 430000 g/mol sa mikrošpicem Hemilton (Swiss). Merenja su vršena u prostoriji temperature 301K i relativne vlage vazduha 68%. Vreme očitavanja ugla kvašenja bilo je 1-2 sekunde (nestandardno). PLLA je rastvoren u tri različita rastvarača: 1- metilenhlorid, 2- hloroform i 3- benzen. Očitavanje kontaktnog ugla obavljeno je na uređaju Universal & Messmicroscop, Veb Carl Zeiss Jena.

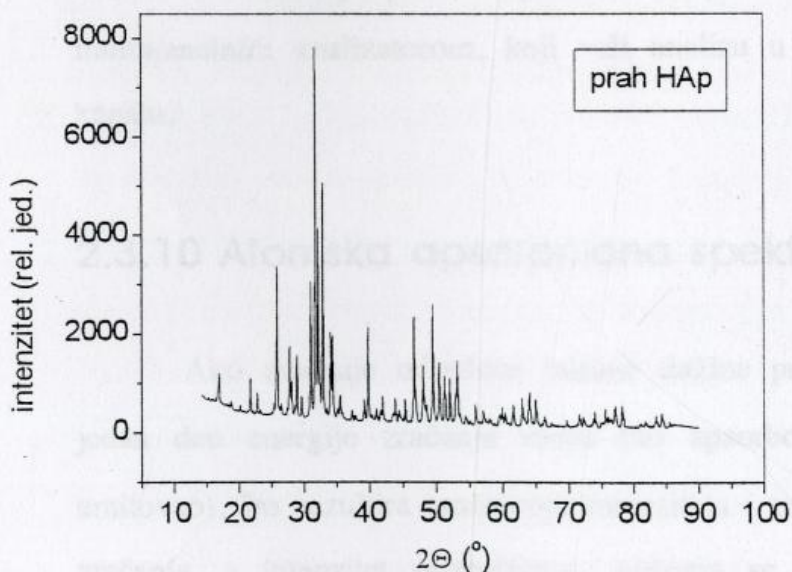


3. Rezultati

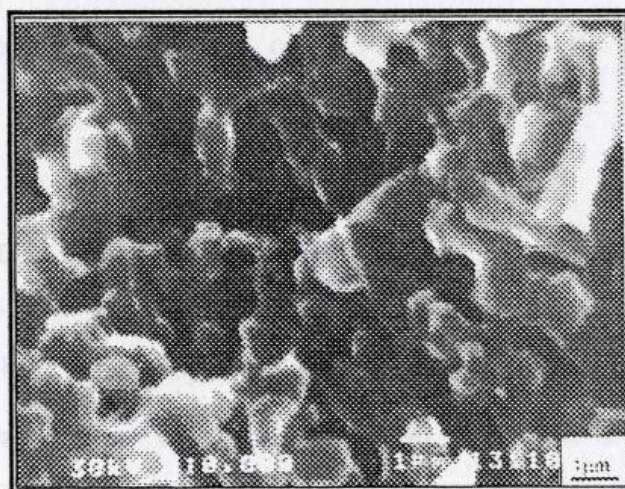
3.1. Rezultati sinteze i dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

3.1.1. Rezultati sinteze HAp i PLLA

Na slici 3.1 prikazan je rendgenogram komponente HAp koja je sintetisana za potrebe sinteze i dizajniranja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Na osnovu slike 3-1 uočava se da je HAp u visoko kristalnoj formi, (sa sadržajem primesa: stroncijum 200 ppm, gvožđe 106 ppm, barijum 15 ppm, bakar 11 ppm, hrom 10 ppm, mangan 5 ppm). Gustina kalcijum-hidroksiapatita određena piknometarskom metodom iznosi 3.15 g/cm^3 . Mikrostruktura sintetisane granule HAp prikazana je na slici 3.2 odakle se uočava da sintetisane granule HAp imaju zaobljenu, zrnastu i grozdastu formu. Medusobno kontinualno povezani aglomerati čine osnovnu strukturu HAp, između kojih se nalazi prazan prostor veličine od $0,1- 3 \mu\text{m}$ koji predstavlja "unutrašnju" poroznost granula HAp.

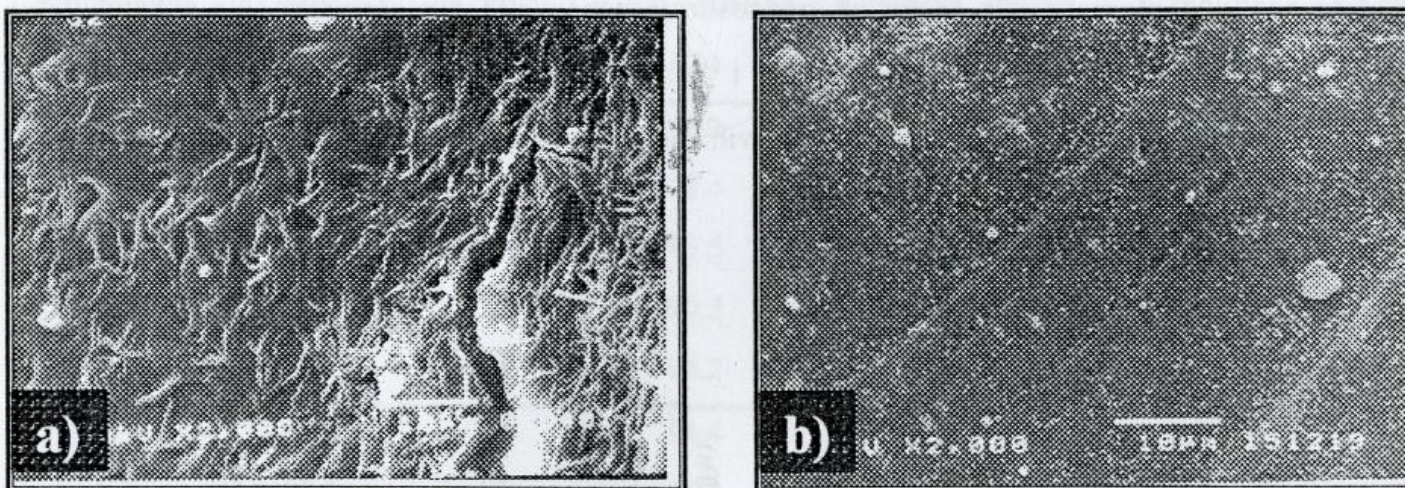


Slika 3.1. Difraktogram praha HAp-a



Slika 3.2. Izgled površine granule HAp dobijen SEM-om

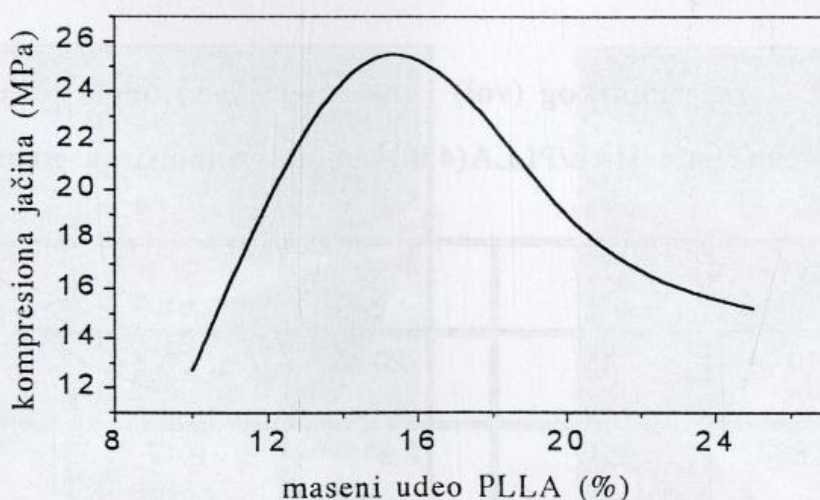
Na slici 3.3 prikazana je mikrostruktura površine PLLA koji se koristi kao komponenta za sintezu i dizajniranje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Površina PLLA molske mase 430000 g/mol prikazana je na slici 3.3a, a PLLA molske mase 50000 g/mol na slici 3.3b. Kvalitativan sastav PLLA potvrđen je NMR analizom u ranijim istraživanjima.¹³⁴



Slika 3.3. Izgled površine PLLA dobijen SEM-om: a) molske mase 50000 g/mol, b) molske mase 430000 g/mol

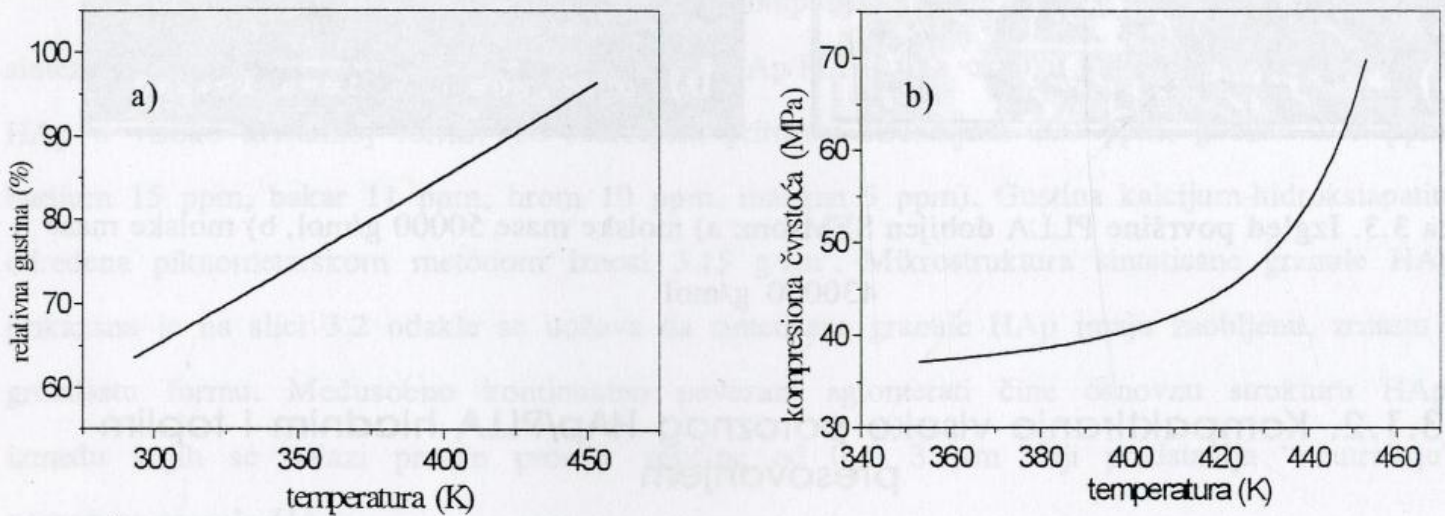
3.1.2. Kompaktiranje visoko poroznog HAp/PLLA hladnim i toplim presovanjem

Na slici 3.4 prikazana je zavisnost kompresione čvrstoće blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) od masenog udela PLLA (10-25%). Kompaktiranje je vršeno presovanjem na sobnoj temperaturi i pritisku od 98,1 MPa. Sa slike se uočava da je maksimalna vrednost kompresione čvrstoće postignuta za udeo PLLA od 15 mas%, dok je za više ili niže udela PLLA kompresiona čvrstoća niža.



Slika 3.4. Zavisnost kompresione čvrstoće kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) od udela PLLA

Povećanjem temperature presovanja i ulaskom u režime toplog presovanja dobijaju se blokovi kompozitnog biomaterijala sa višim vrednostima mehaničkih karakteristika. Na slikama 3.5 a i b prikazana je zavisnost relativne gustine i kompresione čvrstoće od temperature toplog presovanja. U ovim eksperimentima kao i kod svih sledećih, maseni udeli HAp i PLLA iznosili su 80 : 20 respektivno,



Slika 3.5. Uticaj temperature toplog presovanja na: a) relativnu gustinu; b) kompresionu čvrstoću kompozita HAp/PLLA(430)

Maseni odnos HAp i PLLA, zbog razlika u njihovoj gustini, razlikuje se od zapreminskog odnosa. U tabeli broj 3.1 prikazana je zavisnost masenog i zapreminskog udela HAp i PLLA u kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA(430). U istoj tabeli prikazane su računski dobijene gustine koje se odnose na potpuno gusta stanja.

Tabela 3.1. Upporedni prikaz zapreminskog (vol) i masenog (mas) udela HAp i PLLA u kompozitnom biomaterijalu HAp/PLLA(430) i njihova teorijska gustina.

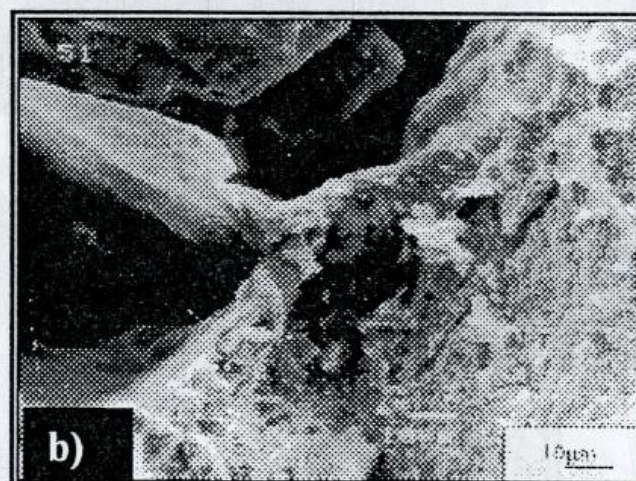
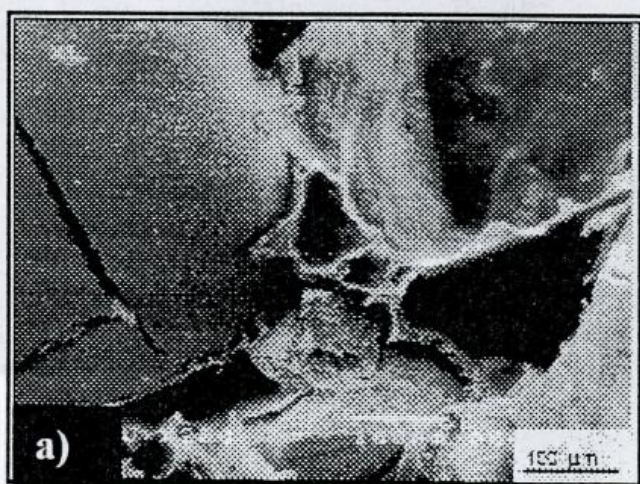
PLLA (vol %)	23.7	33.2	41.2	48.3	54.0
PLLA (mas%)	10	15	20	25	30
Gustina (g/cm ³)	2.66	2.47	2.31	2.17	2.04

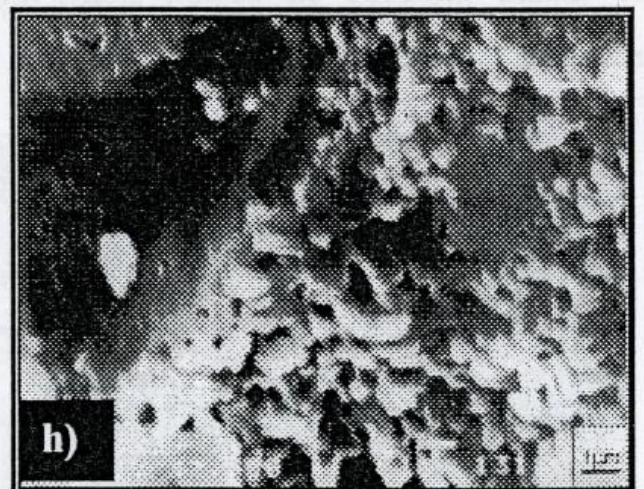
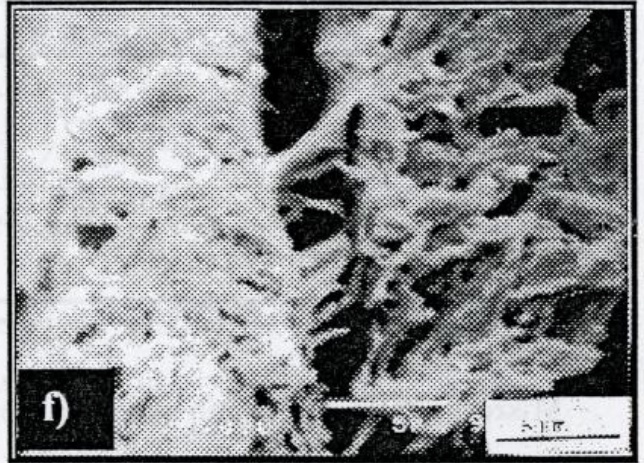
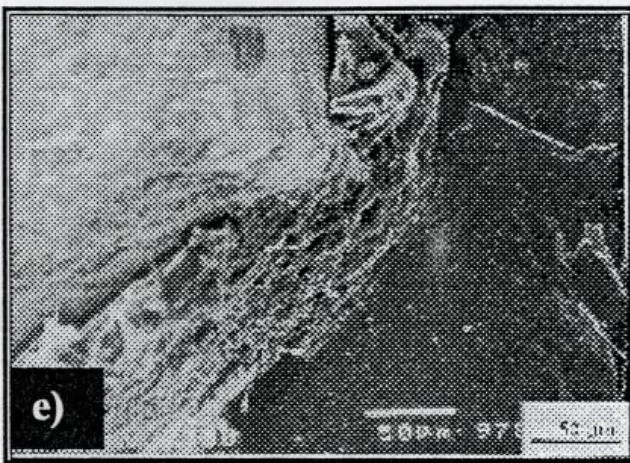
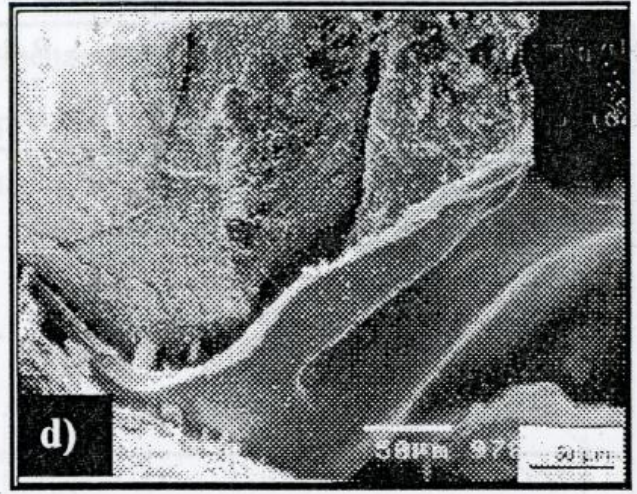
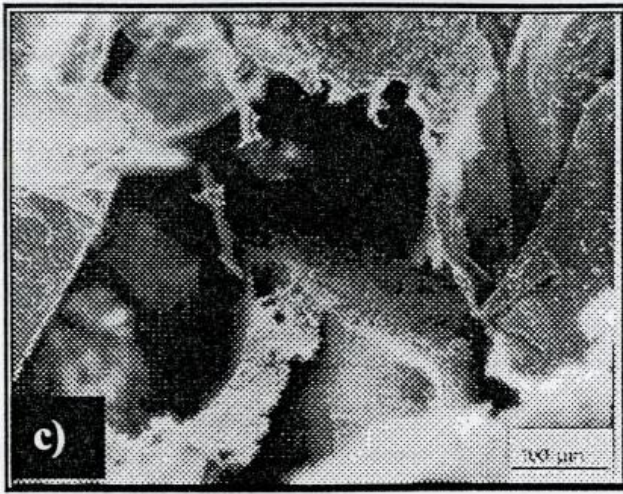
U tabeli broj 3.2 prikazane su vrednosti relativne gustine, kompresione čvrstoće i modula elastičnosti blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, u zavisnosti od temperature, pritiska i vremena presovanja (uzoraka A1-A6 dobijenih prema tabeli 2.1).

Tabela 3.2. Uslovi kompaktiranja i osobine dobijenih blokova kompozitnog biomaterijala

Temperatura (K)	Pritisak (MPa)	Vreme (min)	Relat. gustina (%)	Kompres. jačina (MPa)	E modul (GPa)	Oznaka kompozita
293	98.1	-	62.2	-	-	A1
353	98.1	15	78.4	36.1	0.296	A2
403	98.1	15	85.5	44.8	0.563	A3
433	98.1	15	90.2	46.2	0.749	A4
457	98.1	15	96.2	70.7	1.44	A5
457	49.0	15	94.4	70.0	1.24	A6
457	98.1	15	96.2	70.7	1.44	A7
457	196.2	15	96.5	80.1	1.55	A8
457	294.3	15	98.7	83.0	1.68	A9
457	98.1	15	96.2	70.7	1.44	A10
457	98.1	30	99.6	90.2	1.77	A11
457	98.1	45	99.6	92.7	2.14	A12
457	98.1	60	99.6	93.2	2.48	A13

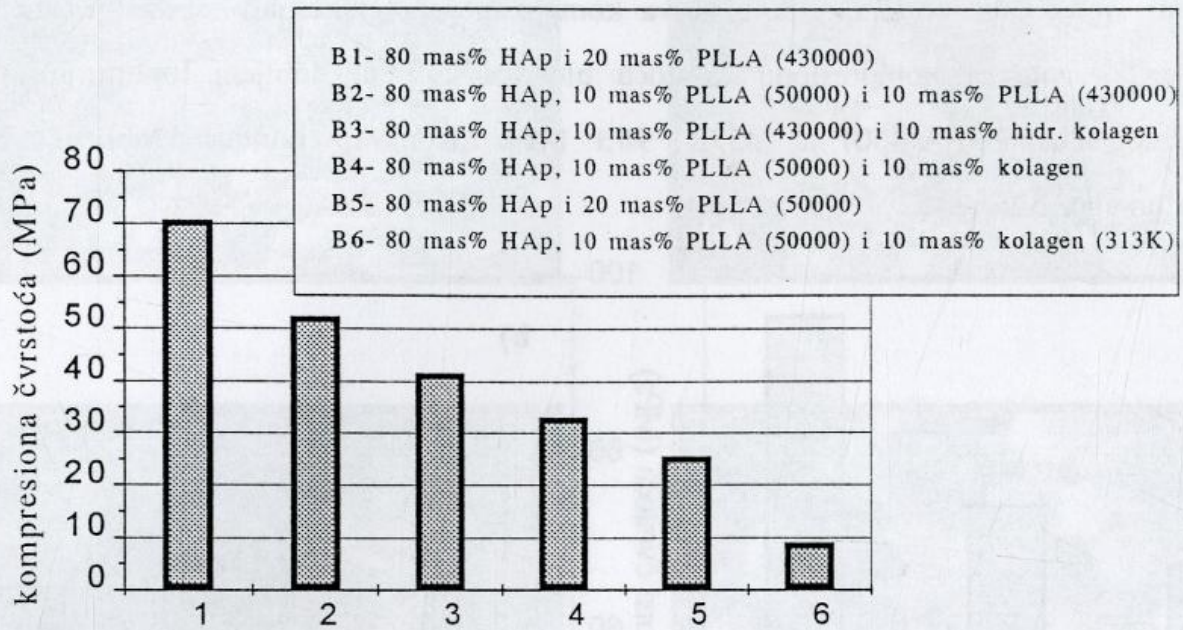
Mikrostrukture prelomnih površina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dobijenog hladnim i toplim presovanjem (čije su osobine naznačene u tabeli 3.2) analizirane su SEM-om. Prelomne površine dobijene su nakon određivanja kompresione čvrstoće naznačenih uzoraka, a neposredno pre analize naparene su tankim slojem zlata. Na slici 3.6 prikazane su slike dobijene SEM analizom.





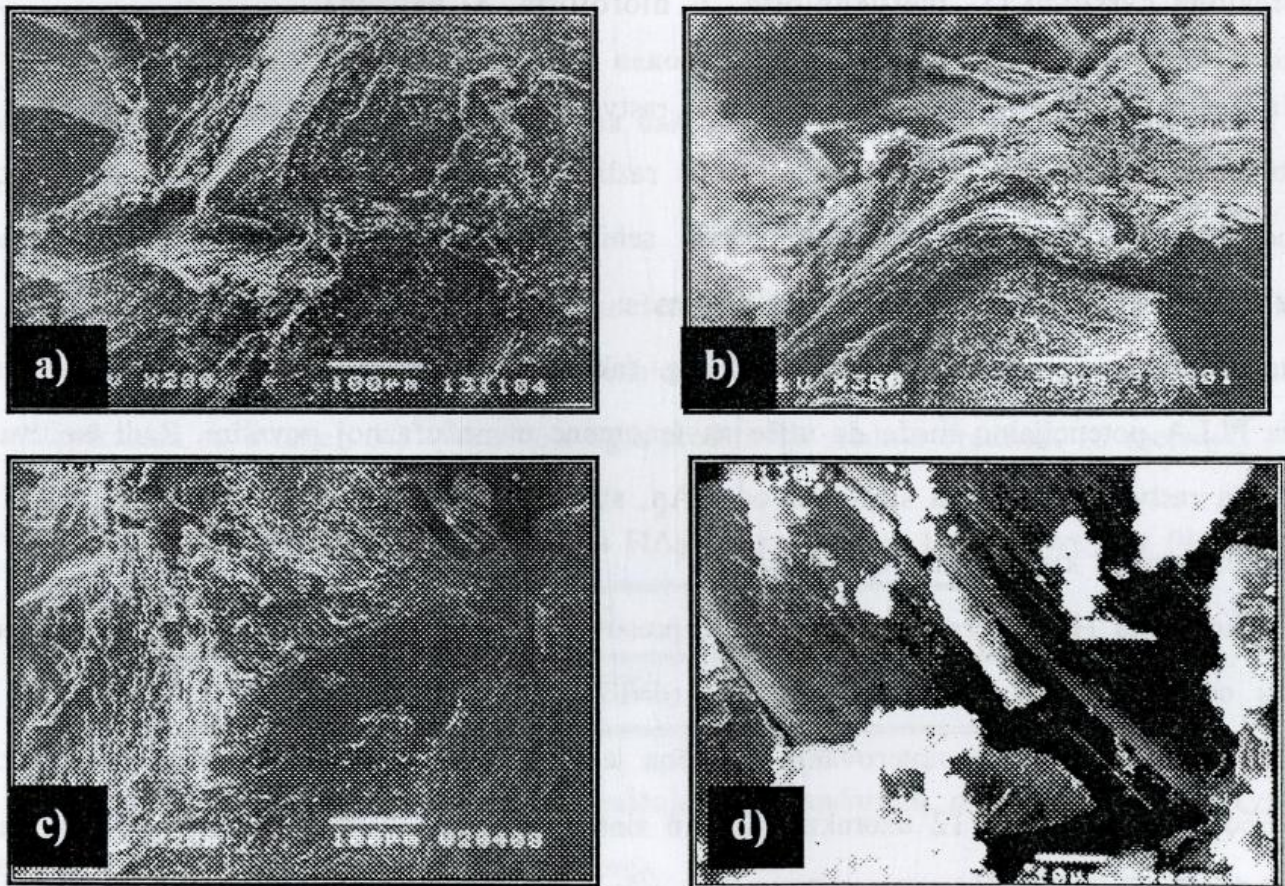
Slika 3.6. SEM prelomnih površina blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dobijenih pri različitim uslovima kompaktiranja: a) $T=20^{\circ}\text{C}$, $p=98.1\text{ MPa}$ sa 30 mas% rastvarača, b) kompozit A1, c) kompozit A2, d) kompozit A3, e) kompozit A5, f) kompozit A5, g) kompozit A9, h) kompozit A12

Uticaj molske mase PLLA na kompresionu čvrstoću kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, kao i uticaj dodatka kolagena prikazan je na slici 3.7. Različite vrste kompozita (B1-B6) dobijene su prema postupku koji je ranije opisan u tabeli 2.2.



Slika 3.7. Kompresiona čvrstoća različitih vrsta blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

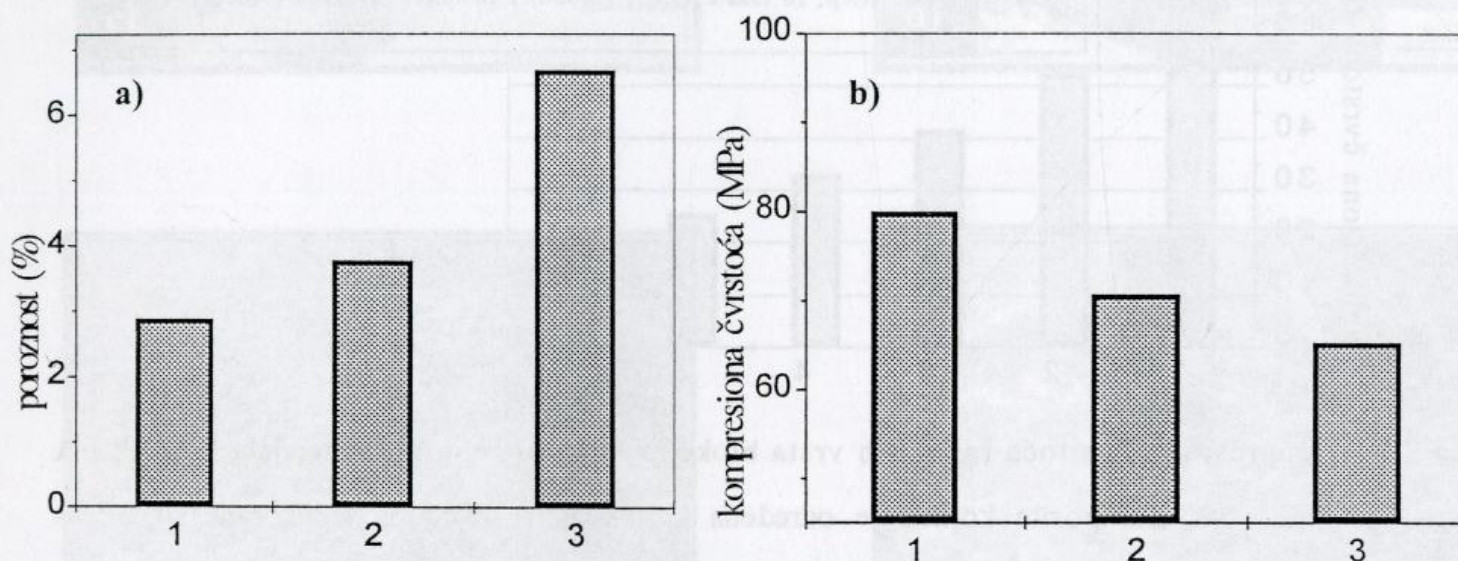
Dobijene vrste kompozita kojima je određena kompresiona čvrstoća analizirane su SEM-om. Na slici 3.8 prikazana je prelomna površina kompozita B1, B2, B5 i B6. .



Slika 3.8. SEM kompozitnih biomaterijala HAp/PLLA: a) kompozit B1, b) kompozit B2, c) kompozit B5, d) kompozit B6

3.1.3 Uticaj vrste rastvarača na dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

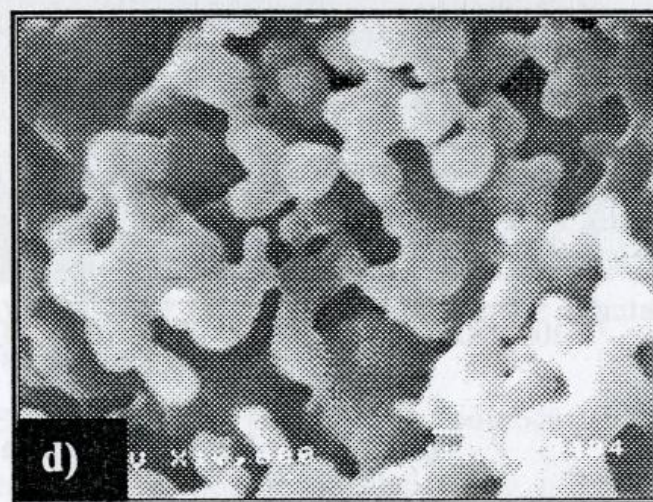
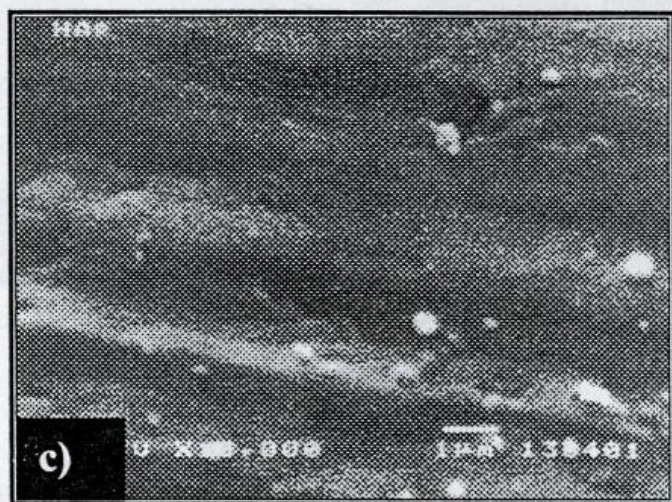
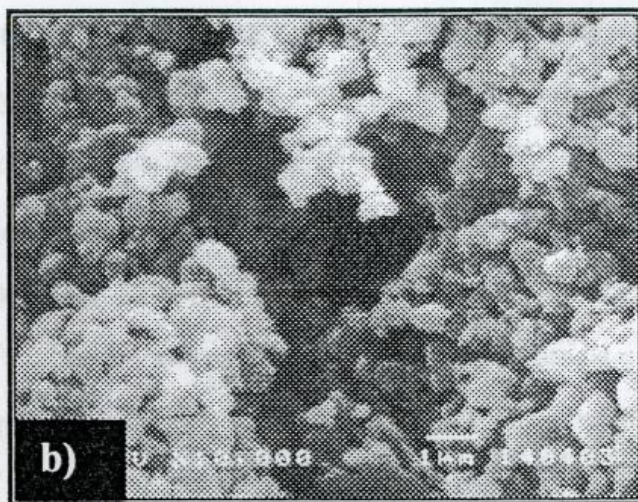
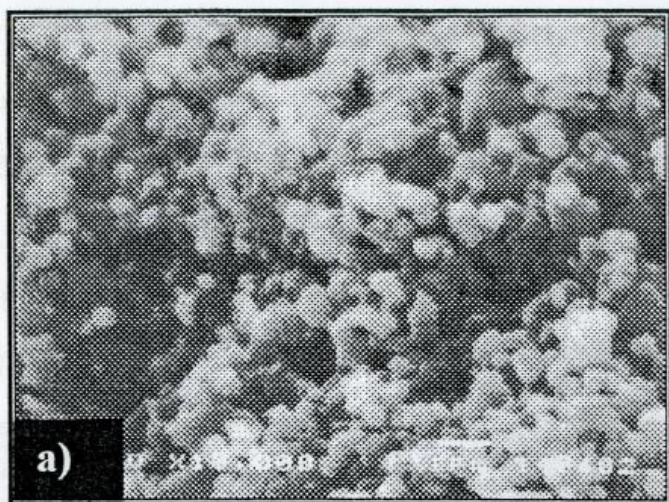
Tokom sinteze visoko poroznih blokova kompozitnog biomaterijala ispitan je uticaj vrste rastvarača na poroznost i kompresionu čvrstoću blokova koji su dobijeni toplim presovanjem visoko poroznog HAp/PLLA(430) na 457K, 98,1 MPa tokom 15 minuta. Dobijene vrednosti prikazane su na slici 3.9.



Slika 3.9. Uticaj vrste rastvarača na osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA: a) poroznost, b) kompresionu čvrstoću (1- metilenhlorid, 2- hloroform, 3- benzen)

Na osnovu slike 3.9 uočava se da vrsta rastvarača sa kojim se rastvara PLLA utiče na osobine blokova koje su uslovljene najverovatnije različitom strukturom i odnosom komponenti u međufaznoj površini. Različiti rastvarači imaju sebi svojstven uticaj na PLLA (interakcioni parametar rastvor-PLLA) koji rezultiraju razlikom u međufaznoj površini koja se odražava na mehaničke osobine kompozita. Pored navedenog faktora i ugao kvašenja HAp sa različitim rastvorima PLLA potencijalno može da utiče na fenomene u međufaznoj površini. Radi ispitivanja ugla kvašenja rastvora PLLA na supstratu od HAp, sintetisani su blokovi visoko gustog HAp na kojima je ispitan ugao kvašenja rastvora PLLA.

Visoko gusta HAp keramika dobijena je presovanjem čestica HAp (veličine oko 100 nm) na pritisku od 98,1 MPa u čeličnim kalupima ($d=10$ mm). Dobijeni blokovi su sinterovani na 1473K tokom 3 časa. Nakon sinterovanja dobijena je gusta HAp keramika gustine $3,020 \text{ g/cm}^3$ (srednja vrednost dobijena iz 12 uzoraka). Tokom sinterovanja registrovano je linearno skupljanje od oko 13-15 %. Površina HAp keramike nakon sinterovanja je brušena sukcesivno sa šmirglom (400, 600, 1200, 1600). Na slici 3.10 prikazana je mikrostruktura HAp keramike pre i posle sinterovanja dobijena SEM-om.



Slika 3.10. SEM površine blokova HAp pre i nakon sinterovanja: a) površina pre sinterovanja, b) prelomna površina pre sinterovanja, c) površina nakon sinterovanja, d) prelomna površina nakon sinterovanja

Na površinu HAp (sa slike 3.10 c) nanešena je kap 1% rastvora PLLA. Polimer PLLA je rastvoren u tri različita rastvarača: 1- metilenhlorid, 2- hloroform i 3- benzen. Rezultati ugla kvašenja prikazani su u tabeli 3.3. (Vrednost ugla predstavlja srednju vrednost 10 merenja).

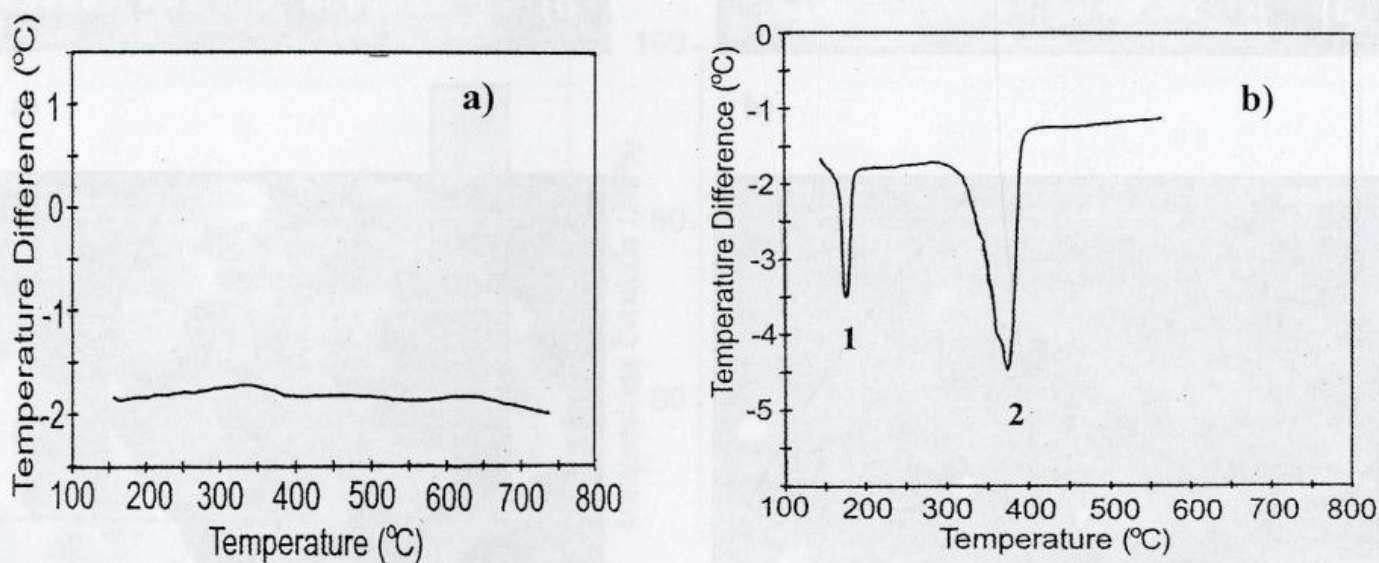
Tabela 3.3. Vrednosti ugla kvašenja HAp sa različitim 1% rastvorima PLLA.

rastvor PLLA	1	2	3
ugao kvašenja	15°58'	18°19'	22°28'

Primenjena metoda određivanja ugla kvašenja je nestandardna, pa se iz dobijenih rezultata ne može usvojiti apsolutna vrednost ugla kvašenja.

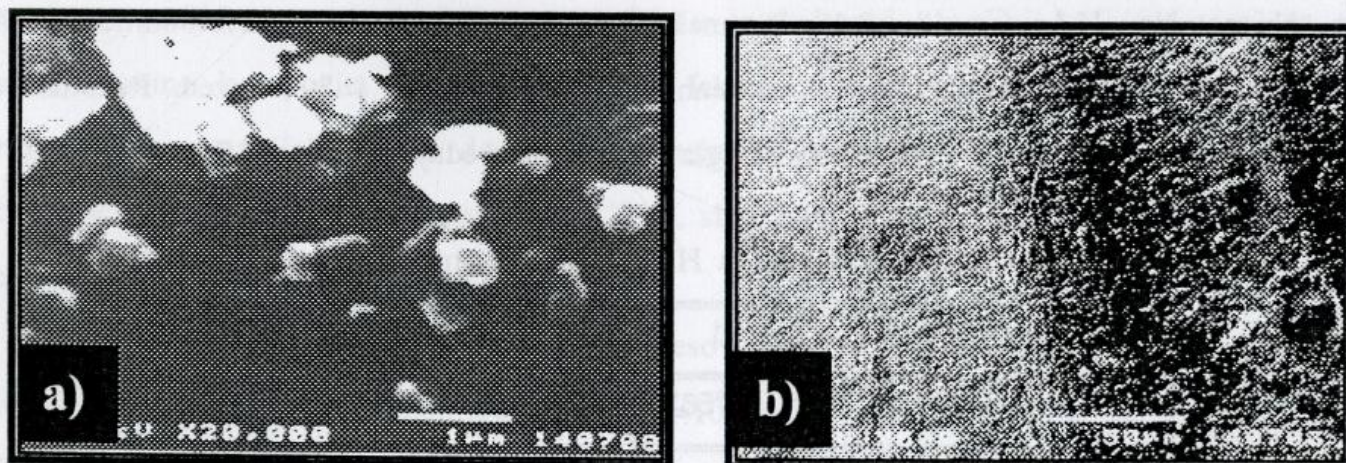
3.2 Uticaj toplog presovanja na strukturu HAp i PLLA u kompozitnom biomaterijalu

U svim prikazanim ispitivanjima u okviru poglavlja 3.2 molska masa ispitivanog PLLA iznosila je 100000 g/mol. Na slici 3.11 prikazani su DTA dijagrami HAp i PLLA od kojih je načinjen kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(100), označen kao C3 u tabeli 2.3.



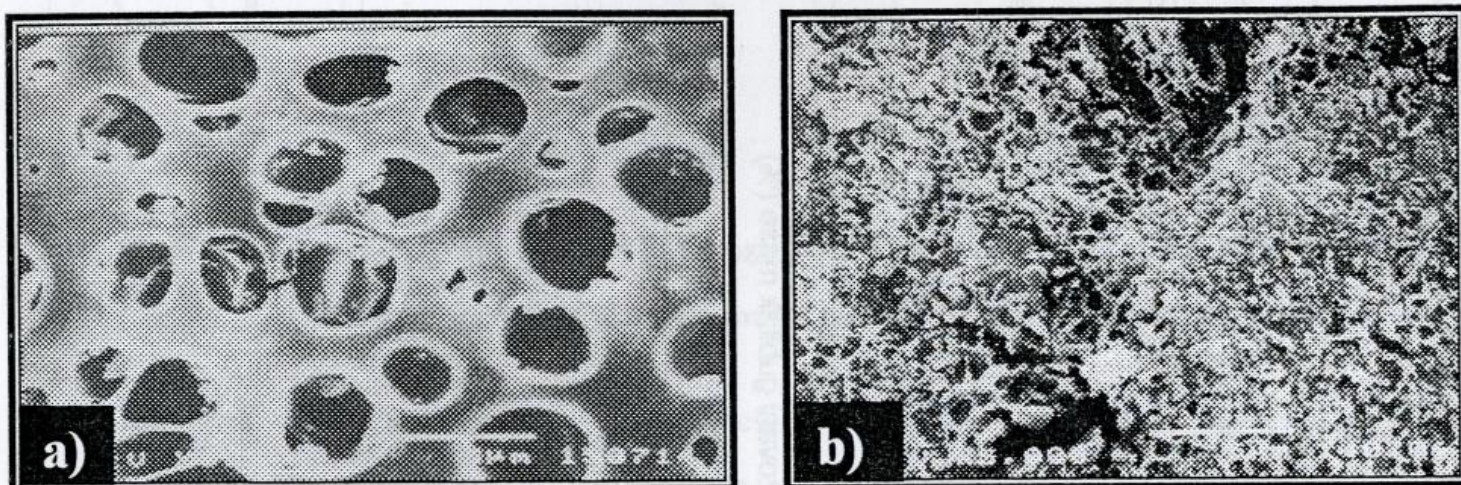
Slika 3.11. DTA dijagram: a) HAp; b) PLLA molske mase 100000 g/mol

Mikrostruktura površine i veličina čestica HAp dobijena SEM analizom prikazana je na slici 3.12a, pri čemu su čestice veličine oko 100 ± 30 nm. Uočava se da dolazi do aglomeracije čestica u grozdaste oblike veličine do 500 nm. Mikrostruktura površine komercijalnog polimera PLLA prikazana je na slici 3.12b.



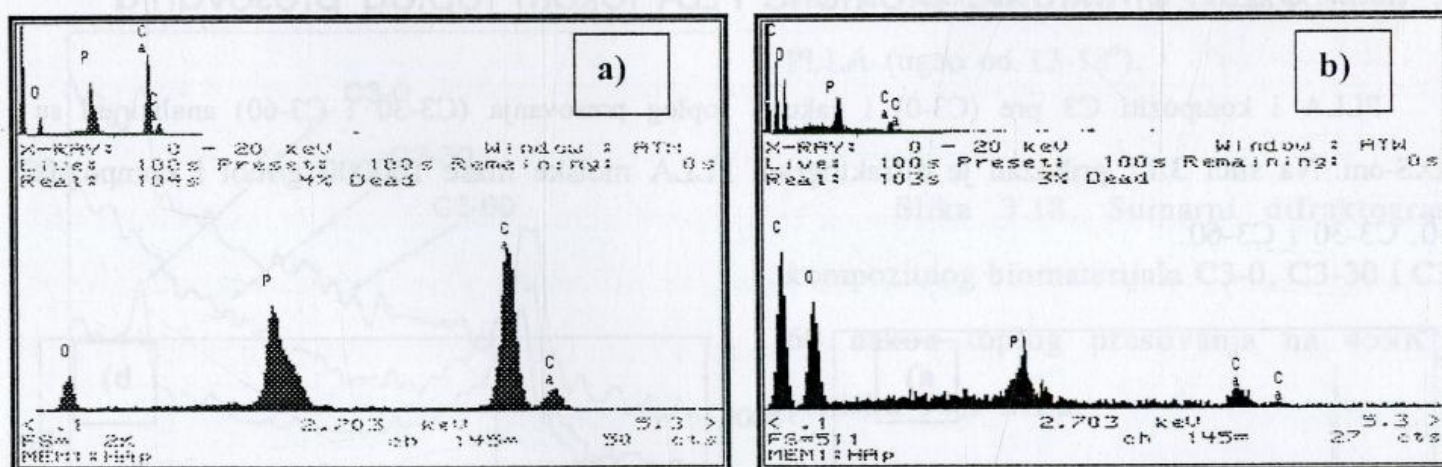
Slika 3.12. SEM površine: a) HAp; b) PLLA

Na slici 3.13a prikazana je mikrostruktura površine visoko poroznog kompozitnog biomaterijala C3 pre toplog presovanja, dobijena SEM-om. Na slici se uočava kontinualan sloj sačinjen od PLLA perforiranog oblika sa kružnim otvorima prosečnog prečnika oko $2.5\mu\text{m}$. U okviru polimerne komponente PLLA uočavaju se sferne čestice HAP. Nakon toplog presovanja na 459 K, pri pritisku od 98,1 MPa tokom 15 minuta, dobijena je mikrostruktura prikazana na slici 3.13b.



Slika 3.13. SEM prelomne površine kompozita C3: a) pre toplog presovanja; b) nakon 15 minuta toplog presovanja

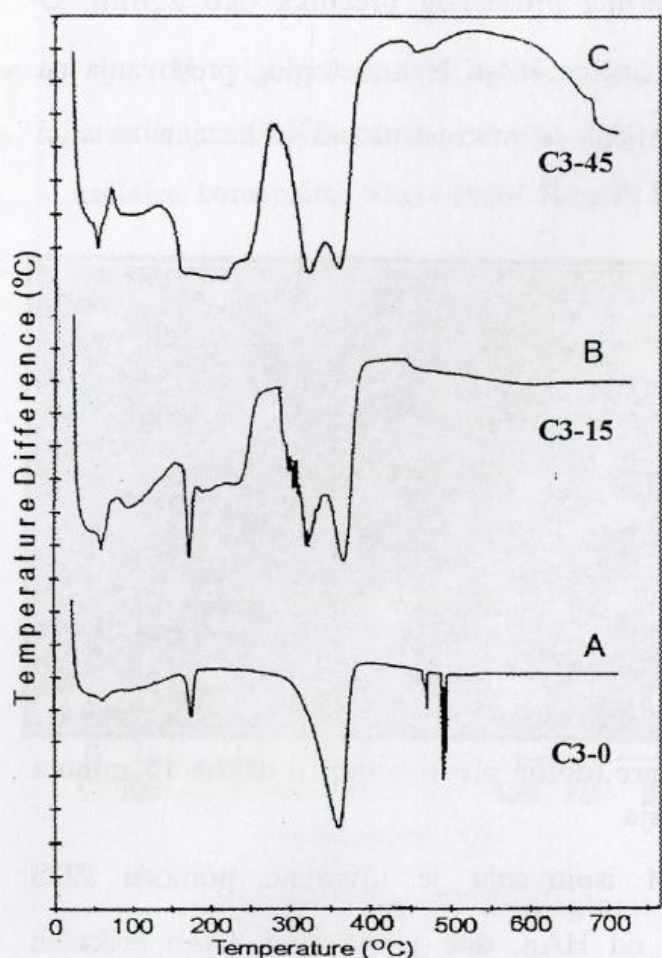
Kvalitativno definisanje komponentata pri SEM ispitivanju je utvrđeno pomoću EDS analize. Na slici 3.14a prikazan je spektar koji potiče od HAP, dok je na slici 3.14b prikazan spektar od PLLA. Uz pomoć ovih spektara izvršena je analiza kvalitativne raspodele komponentata pri narednim tumačenjima SEM-a.



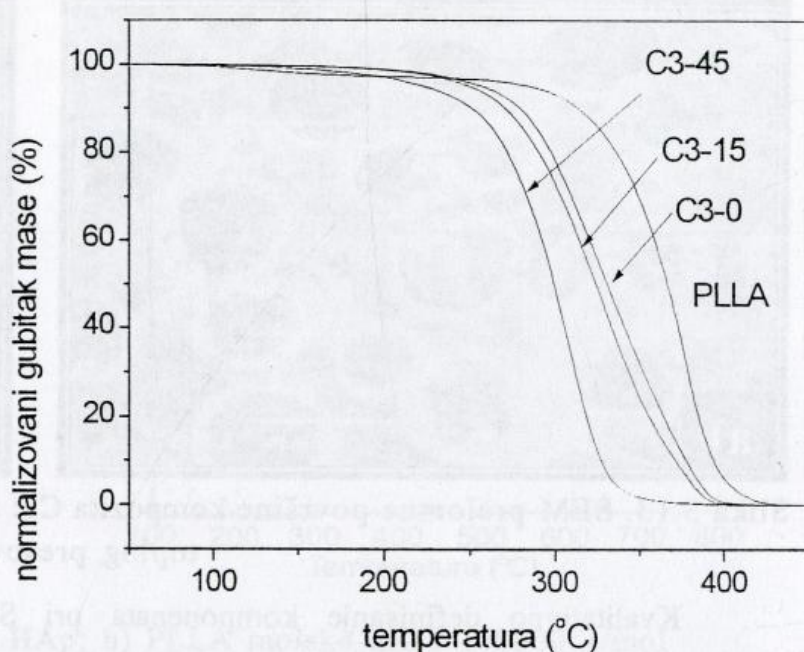
Slika 3.14 EDS spektri: a) HAP; b) PLLA

Sumarni DTA dijagrami kompozita C3 pre toplog presovanja, nakon 15 i 45 minuta toplog presovanja prikazani su na slici 3.15. Uzorak C3-0 predstavlja kompozitni biomaterijal HAP/PLLA(100) pre toplog presovanja, C3-15 nakon 15 minuta i C3-45 nakon 45 minuta toplog presovanja. Na krivama se uočava i pik koji potiče od ostakljivanja PLLA na oko 65°C .

TGA dijagrami istih blokova kompozitnog biomaterijala prikazani su na slici 3.16 Na slici pored TGA krivih uzoraka C3-0, C3-15 i C3-45 prikazana je i TGA kriva čistog PLLA



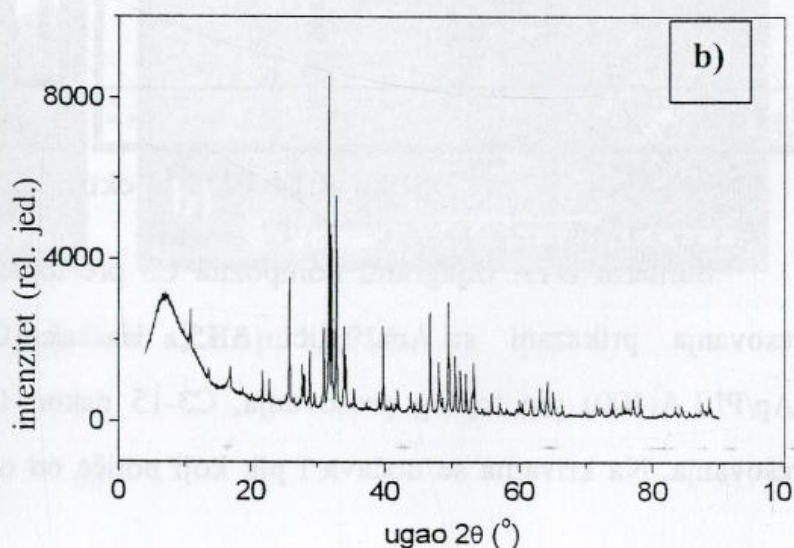
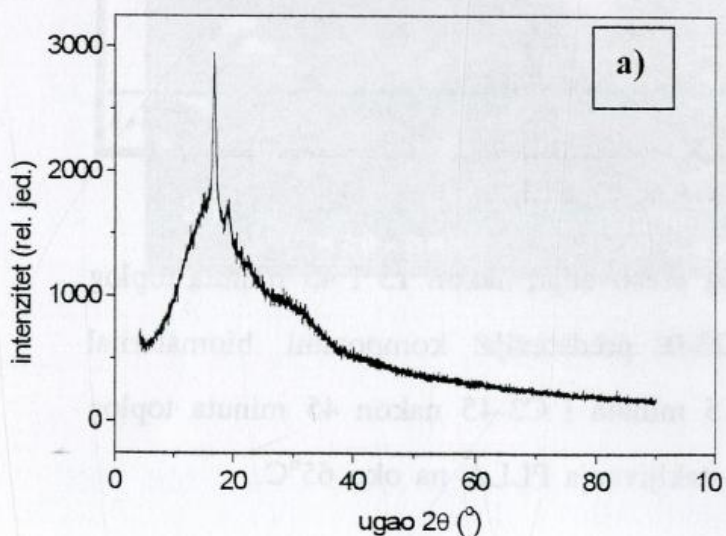
Slika 3.15. DTA dijagram kompozita C3

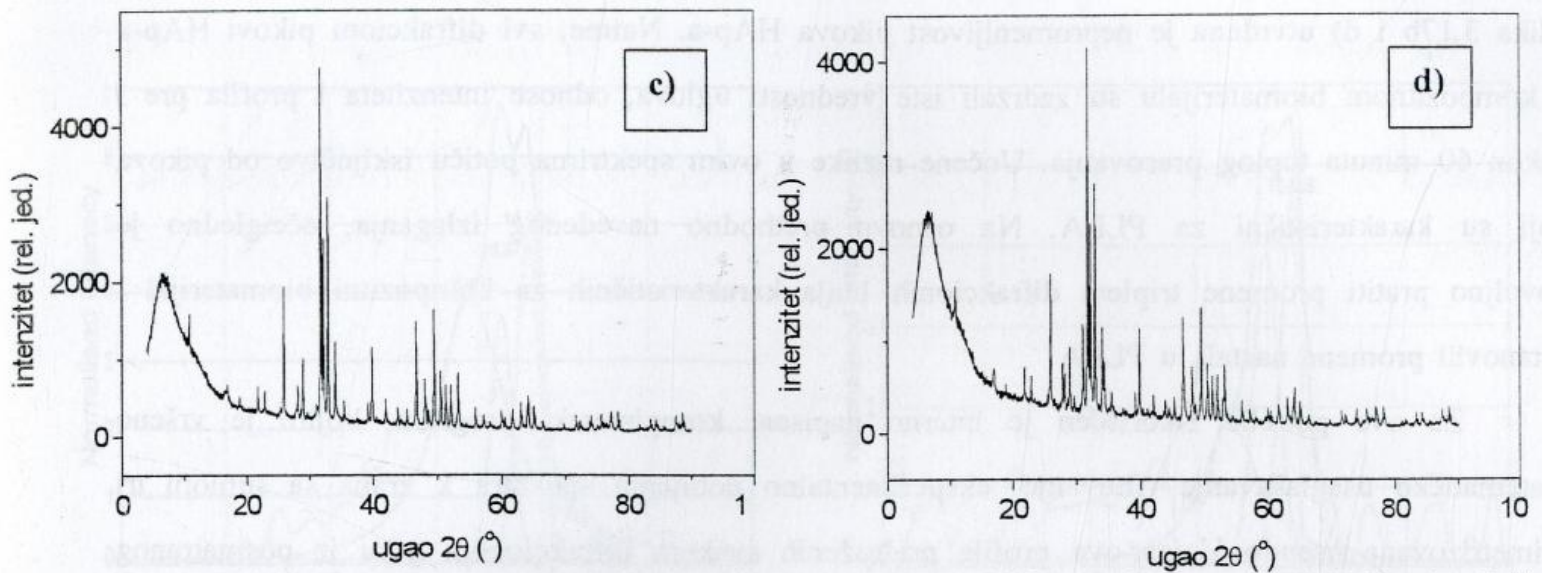


Slika 3.16. TGA dijagram kompozita C3

3.2.1. Strukturne promene PLLA tokom toplog presovanja

PLLA i kompoziti C3 pre (C3-0) i nakon toplog presovanja (C3-30 i C3-60) analizirani su WAXS-om. Na slici 3.17 prikazan je difraktogram PLLA molske mase 100000 g/mol i kompozita C3-0, C3-30 i C3-60.

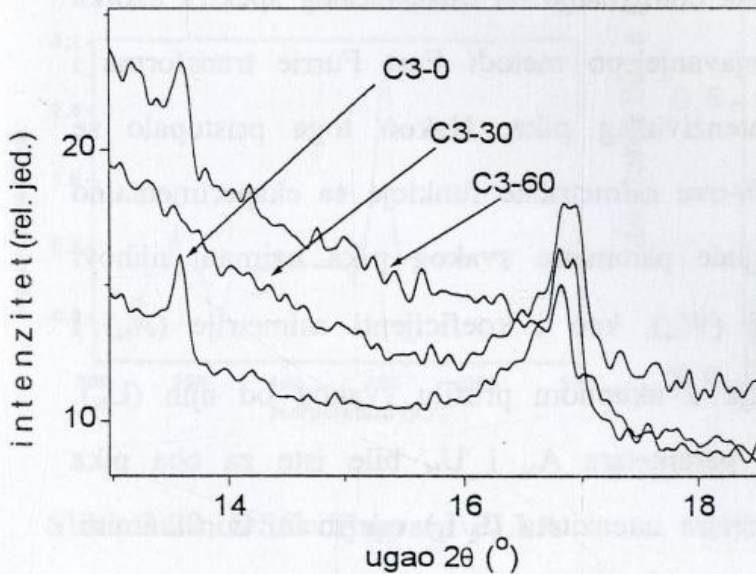




Slika 3.17. Difraktogram PLLA i kompozita C3: a) PLLA molske mase 100000 g/mol, b) kompozita C3-0, c) kompozita C3-30, d) kompozita C3-60

Kompozit C3-0 okarakterisan je difrakcionim spektrom prikazanim na slici 3.17 b. Očigledno je da zbog mnogo manjeg difrakcionog odziva PLLA (njegova tri slabija pika) kao i to da se najdominantniji pik PLLA nalazi u veoma uskom intervalu uglova zajedno sa dubletom difrakcionih linija HAp-a, difrakcionom analizom su praćene promene najdominantnijeg pika PLLA, kao i dva pika HAp-a u odnosu na njegov ceo spektar, koje se nalaze u intervalu od 13-18°.

Na slici 3.18 prikazani su sumarni difraktogrami kompozita C3 dobijeni WAXS-om u intervalu koji je karakterističan za PLLA (ugao od 13-18°).



Slika 3.18. Sumarni difraktogram kompozitnog biomaterijala C3-0, C3-30 i C3-60 nakon toplog presovanja na 459K i pritisku 98,1 MPa.

Poređenjem difrakcionih spektara kompozita C3 pre i posle 60 minuta toplog presovanja (slika 3.17b i d) utvrđena je nepromenljivost pikova HAp-a. Naime, svi difrakcioni pikovi HAp-a u kompozitnom biomaterijalu su zadržali iste vrednosti uglova, odnose intenziteta i profila pre i nakon 60 minuta toplog presovanja. Uočene razlike u ovim spektrima potiču isključivo od pikova koji su karakteristični za PLLA. Na osnovu prethodno navedenog izlaganja, očigledno je dovoljno pratiti promene tripleta difrakcionih linija karakterističnih za kompozitni biomaterijal i ustanoviti promene nastale u PLLA.

Za ove potrebe iskorišćen je interno napisani kompjuterski program, kojim je vršeno matematičko usaglašavanje (fitovanje) eksperimentalno dobijenih spektara x zraka sa sumom tri asimetrizovana pseudo-*Voight*-ova profila pridruženih svakom difrakcionom piku iz posmatranog tripleta, a u odgovarajućem intervalu uglova (2Θ). Matematički posmatrano, eksperimentalno dobijeni difrakcioni spektar simuliran je zbirom triju funkcija kao u jednakosti 3.1:

$$I = \sum_{N=1}^3 I_N \left[U_N \exp(-\ln 2 F_{N,J}^2) + \frac{(1-U_N)}{(1+F_{N,J}^2)} \right] \quad (3.1)$$

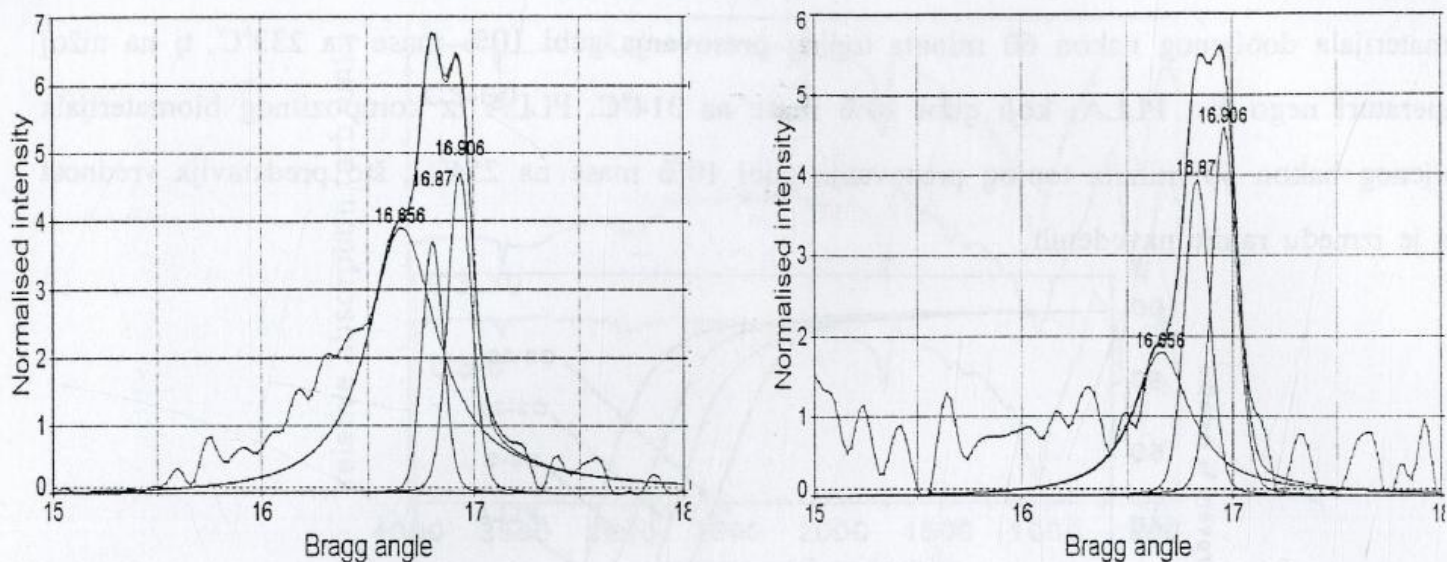
$$F_{N,M} = \sum_M \left[2 \frac{(\theta^M - \Theta_N)}{W_N} + A_N (\theta_M - \Theta_N) / \Theta_N \right]$$

I predstavlja sumarni intenzitet tri pika (prebrojanih indeksom N) za ceo interval uglova u difrakcionom spektru (prebrojanih indeksom M). Svaki od ova tri pika su predstavljena sumom asimetrizovanih pseudo *Voight*-ovih funkcija, koje u sebi objedinjuju procentualne udele asimetričnog *Gauss*-ovog i *Cachy*-jevog profila.

Procedura usaglašavanja prvo je podrazumevala oduzimanje od difrakcionog spektra uzorka signale dobijene sa praznim nosačem, zatim uravnjavanje po metodi Fast Furrie transformi i konačno normalizaciju na 100 % vrednosti najintenzivnijeg pika. Nakon toga pristupalo se matematičkom usaglašavanju sume tri pseudo *Voight*-ove asimetrične funkcije sa eksperimentalno snimljenim delom spektra, pri čemu su za varirajuće parametre svakog pika uzimani njihovi intenziteti (I_N), uglovi (Θ_N) i širine na poluvisini (W_N), kao i koeficijenti asimetrije (A_N) i procentualnog udela *Gauss*-ove i *Cachy*-jeve funkcije u ukupnom profilu svakog od njih (U_N). Napomenimo da su tokom usaglašavanja promene parametara A_N i U_N bile iste za oba pika potekla od HAp-a, a da su količnici njihovih parametara intenziteta (I_2/I_3) održavani konstantnim. Preostalim parametrima ostavljena je slobodna promena u realno utvrđenim intervalima. Kvalitet matematičkog usaglašavanja praćen je funkcijom ostatka koja se definiše relacijom 3.2:

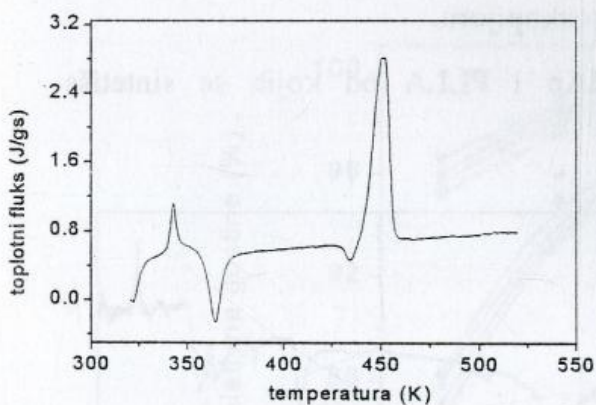
$$R = \sqrt{\sum_I^{2\Theta} (\Delta I_I)^2}; \quad \Delta I_I(\theta_I) = I_I^{\text{exp}}(\theta_I) - I_I^{\text{fit}}(\theta_I) \quad (3.2)$$

Nakon fitovanja dobijeni su rezultati koji su prikazani na slici 3.19.

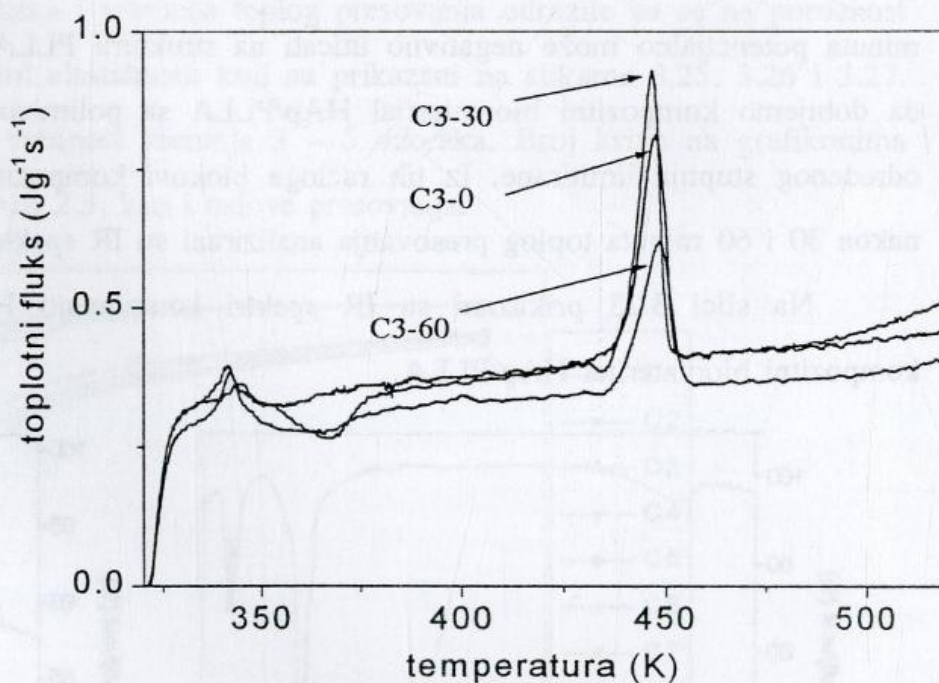


Slika 3.19. Fitovani rezultati WAXS analize za kompozit C3-0 i C3-60: a) pre toplog presovanja, b) nakon 60 minuta toplog presovanja

Da bi se dobila potpunija analiza uočene kvantitativne promene stepena kristaliničnosti, sa vremenom toplog presovanja, urađena su DSC merenja na čistom PLLA kao i kompozitu C3-0, C3-30 C-60. Rezultati dobijenih istraživanja prikazani su na slikama 3.20 i 3.21.



Slika 3.20. DSC dijagram PLLA

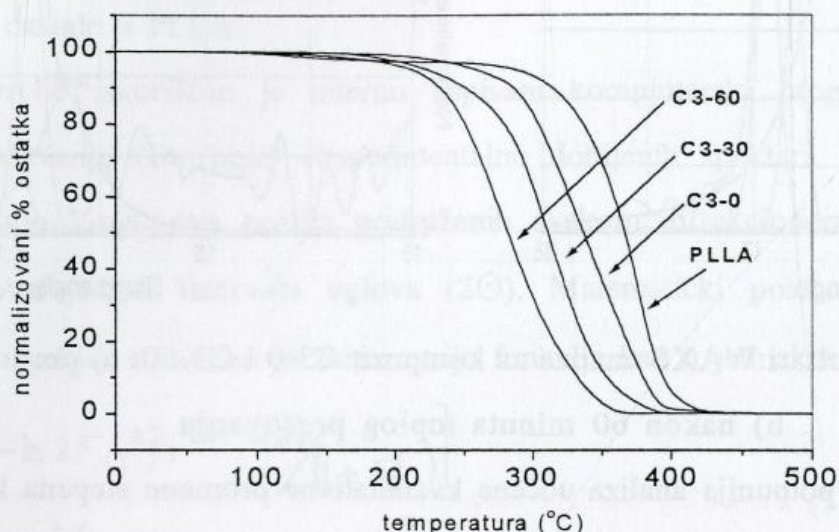


Slika 3.21. Sumarni DSC dijagram kompozita C3 pre i nakon 30 i 60 minuta toplog presovanja na temperaturi 459K i pritisku 98,1MPa

Sa slike 3.21 uočavaju se karakteristični pikovi koji potiču od topljenja PLLA unutar kompozita (446-451K). Oblici i zavisnosti dobijenih DSC krivih su slični onima koji su dobijeni za čist PLLA od strane drugih autora.^{43, 46}

Na slici 3.22 prikazane su TGA krive PLLA dobijenog iz kompozita C3-0, C3-30 i C3-60.

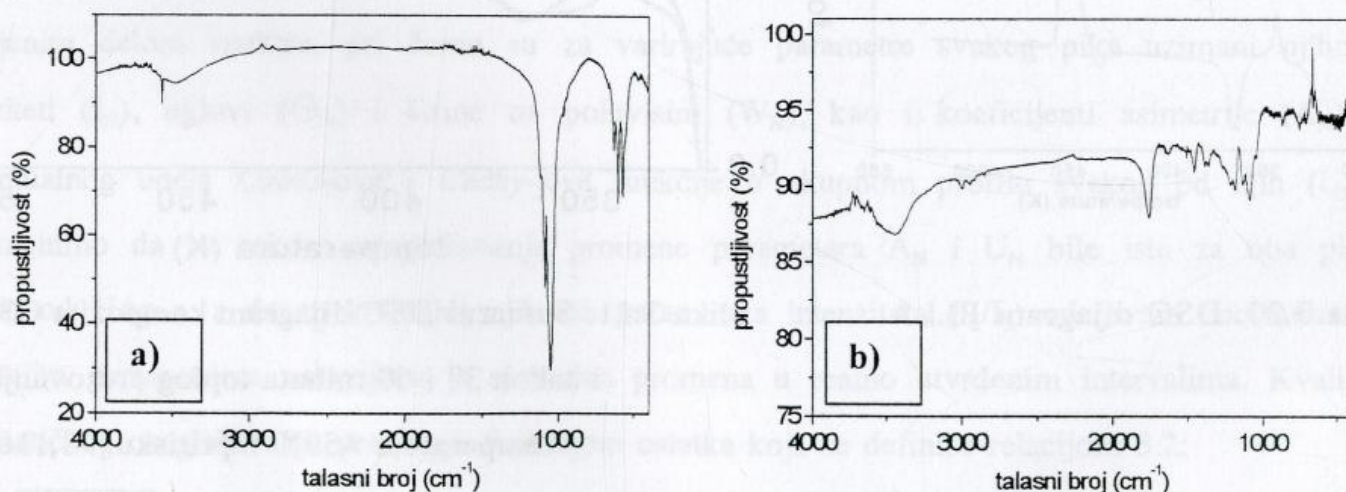
Na osnovu TGA krivih sa slike 3.22 može se uočiti da PLLA iz bloka kompozitnog biomaterijala dobijenog nakon 60 minuta toplog presovanja gubi 10% mase na 233°C, tj na nižoj temperaturi nego čist PLLA, koji gubi 10% mase na 314°C. PLLA iz kompozitnog biomaterijala dobijenog nakon 30 minuta toplog presovanja gubi 10% mase na 254°C, što predstavlja vrednost koja je između ranije navedenih.



Slika 3.22. TGA dijagram kompozita C3 pre (C3-0) i nakon 30 (C3-30) i 60 (C3-60) minuta toplog presovanja na temperaturi 186°C i pritisku 98,1MPa

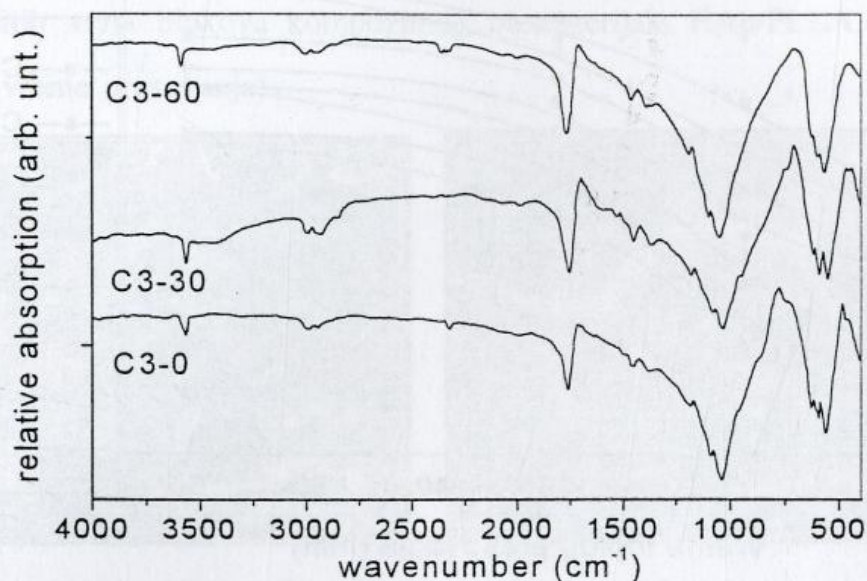
U izvršenim istraživanjima smatrano je da povećanje vremena toplog presovanja preko 60 minuta potencijalno može negativno uticati na strukturu PLLA. U ovim istraživanjima želeli smo da dobijemo kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa polimerom PLLA na kome su promene do određenog stupnja limitirane. Iz tih razloga blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre i nakon 30 i 60 minuta toplog presovanja analizirani su IR spektroskopijom.

Na slici 3.23 prikazani su IR spektri komponenti HAp i PLLA od kojih se sintetiše kompozitni biomaterijal HAp/PLLA.



Slika 3.23. IR spektri: a) HAp, b) PLLA

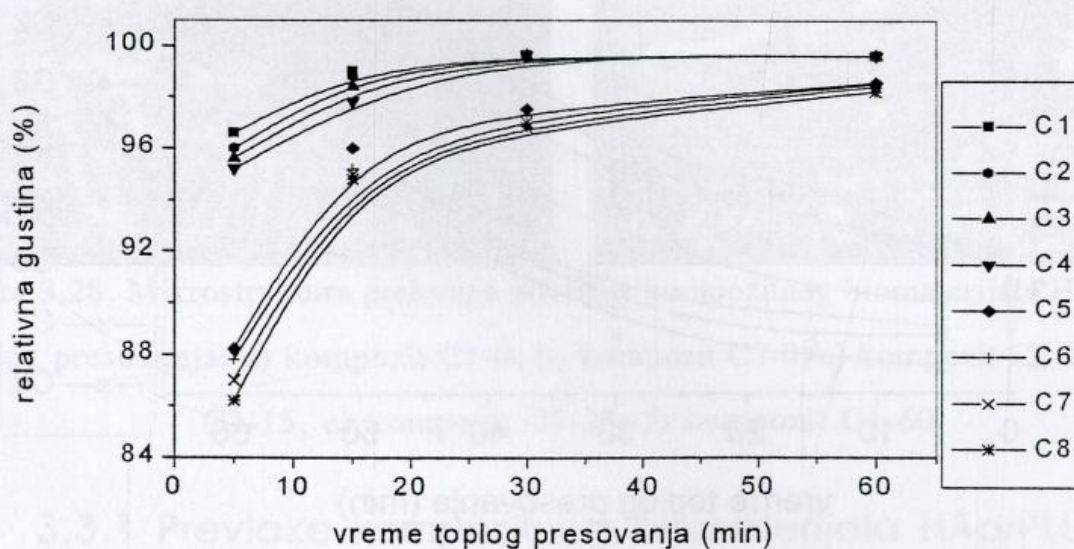
Na slici 3.24 prikazan je IR spektar kompozita C3-0, C3-30 i C3-60. Spektri kompozita B3-30 i B3-60 neznatno se razlikuju u odnosu na isti kompozit pre toplog presovanja.



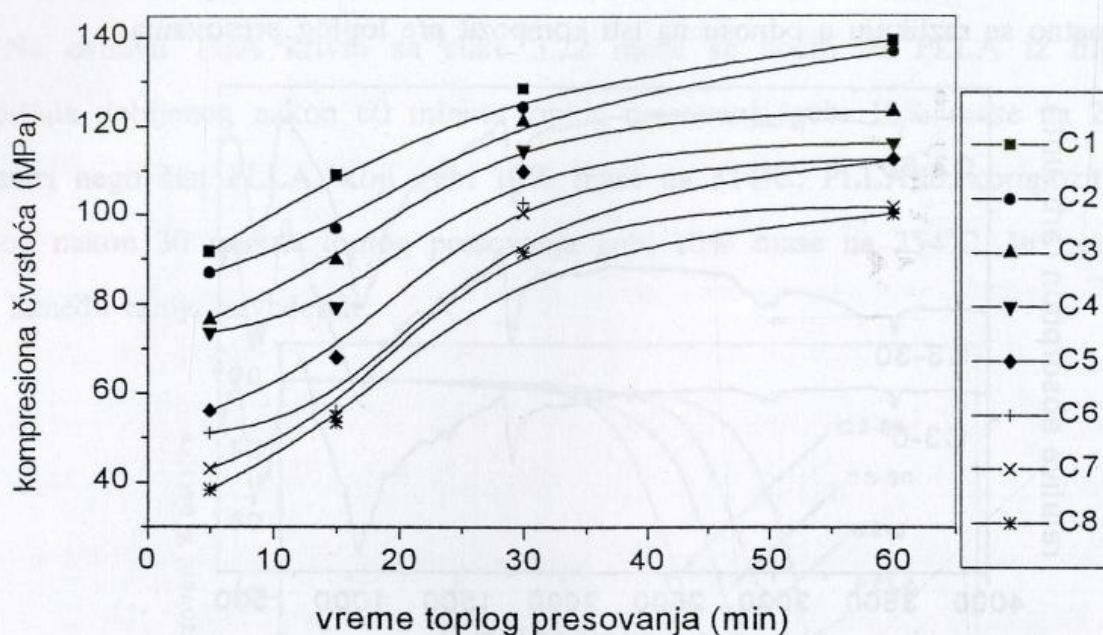
Slika 3.24. IR kompozita C3-0, C3-30 i C3-60

3.3 Dizajniranje osobina toplim presovanjem

Varijacijom osnovnih parametara toplog presovanja dobijen je čitav spektar blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa različitim osobinama. Promene temperature presovanja (u okolini tačke topljenja PLLA), pritiska i vremena toplog presovanja odrazile su se na poroznost blokova, kompresionu čvrstoću i modul elastičnosti koji su prikazani na slikama 3.25, 3.26 i 3.27. Dobijene tačke predstavljaju srednju vrednost merenja 3 – 5 uzoraka. Broj krive na grafikonima ujedno predstavlja i oznaku datu u tabeli 2.3, kao i uslove presovanja.

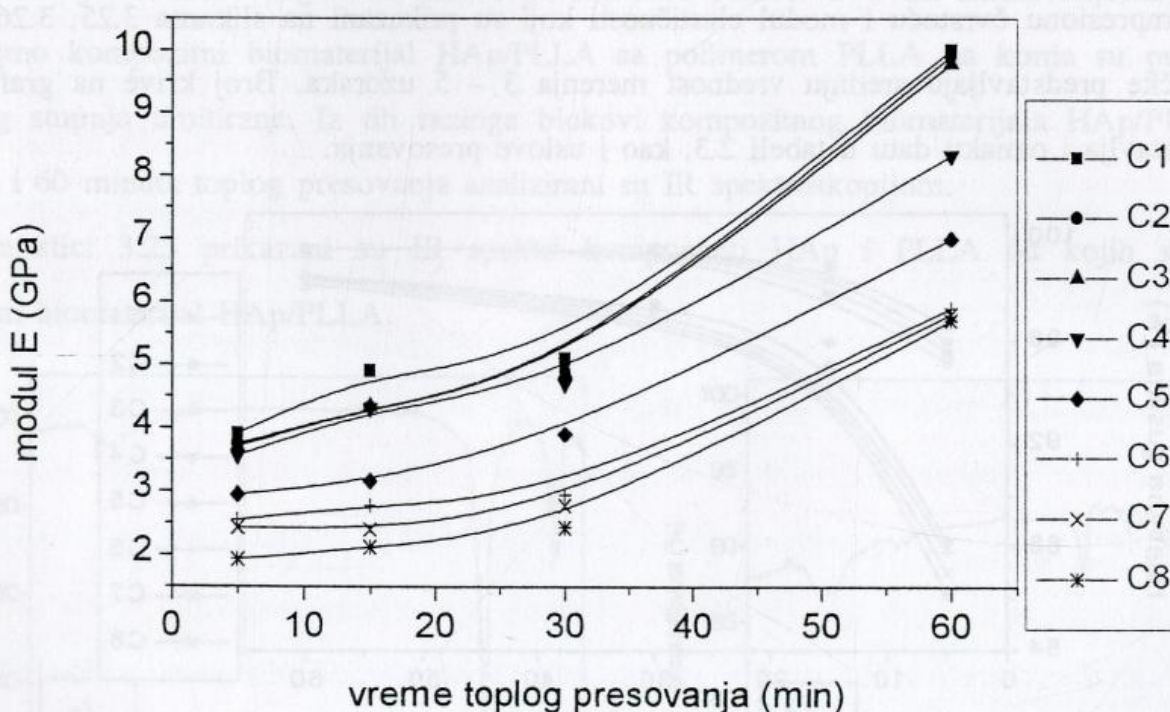


Slika 3.25. Relativne gustine blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u zavisnosti od vremena toplog presovanja



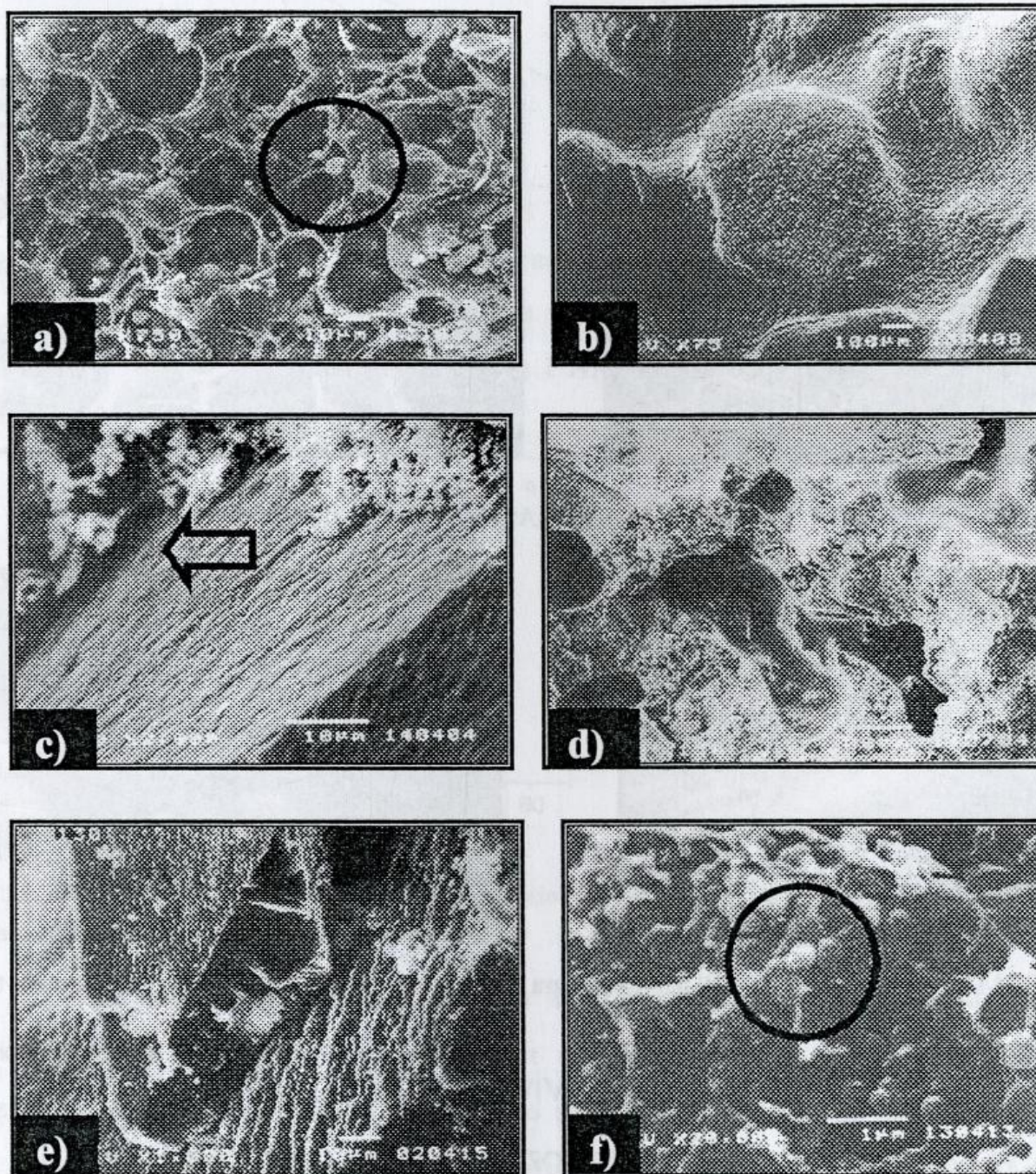
Slika 3.26. Zavisnost kompresione čvrstoće blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA od vremena toplog presovanja

Iz dijagrama napon – deformacija prilikom određivanja kompresione čvrstoće grafičkom metodom (nagiba krive) određeni su moduli elastičnosti dobijenih blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Zavisnost dobijenih modula elastičnosti (kompresioni modul elastičnosti) od vremena toplog presovanja prikazana je na slici 3.27.



Slika 3.27. Zavisnost modula elastičnosti blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA od vremena toplog presovanja

Mikrostruktura prelomne površine blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, nakon određivanja kompresione čvrstoće analizirana je SEM-om. Na slici 3.28 prikazane su mikrostrukture različitih vrsta blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA (broj pored oznake kompozita označava vreme presovanja).

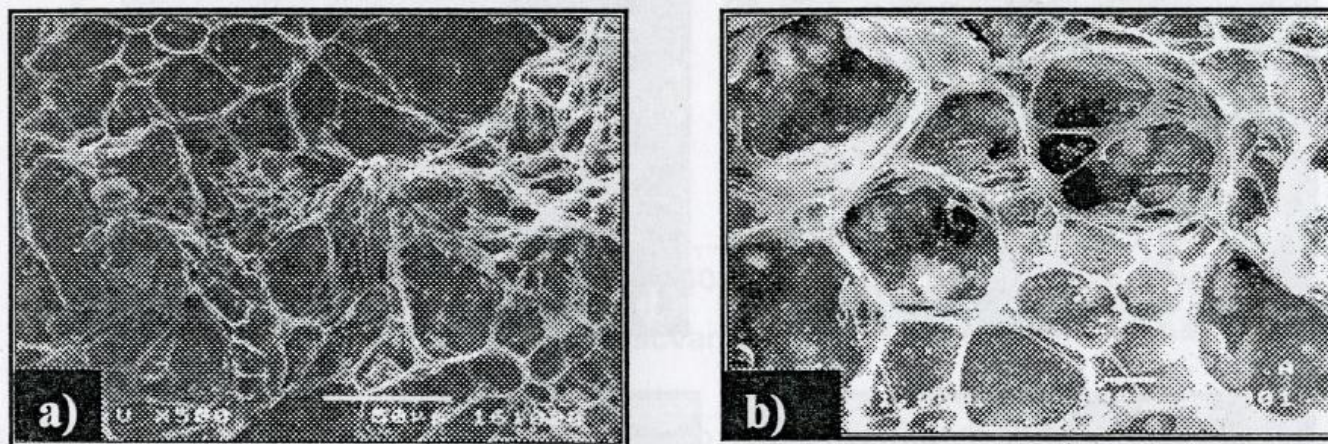


Slika 3.28. Mikrostruktura prelomne površine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre i nakon toplog presovanja: a) kompozit C1-0, b) kompozit C7-0, c) kompozit C7-15, d) kompozit C3-15, e) kompozit C7-30, f) kompozit C1-60

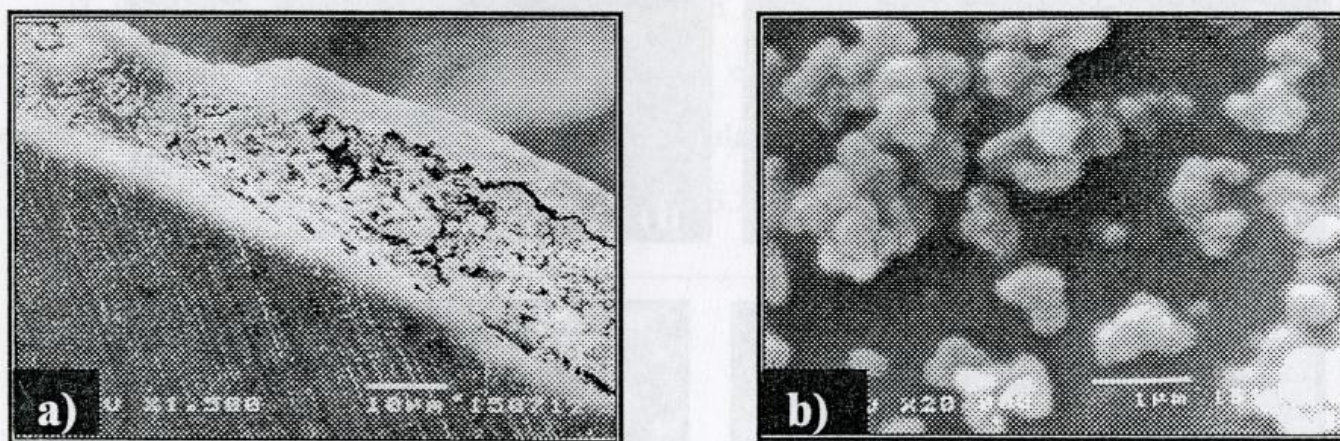
3.3.1 Prevlake kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA nanešen je premazivanjem na metalni (titan) i polimerni (teflon) supstrat. Prevlaka je nanešena jednostepenim premazivanjem tečnog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) ili HAp/PLLA(100). Nakon mešanja HAp i

rastvorenog PLLA, a pre postupka vakuum uparavanja, dobijeni kompozit je u tečnom stanju (poglavlje 2.1.3). Na slici 3.29 prikazan je SEM površine prevlake HAp/PLLA(430) na supstratu od titana i teflona. Na slici 3.30a prikazan je poprečni presek prevlake kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) na teflonu. Izgled površine prevlake HAp/PLLA(100)/kolagen kompozitnog biomaterijala na titanu, prikazan je na slici 3.30b.



Slika 3.29 SEM prevlake HAp/PLLA(430) na: a) titanu; b) teflonu

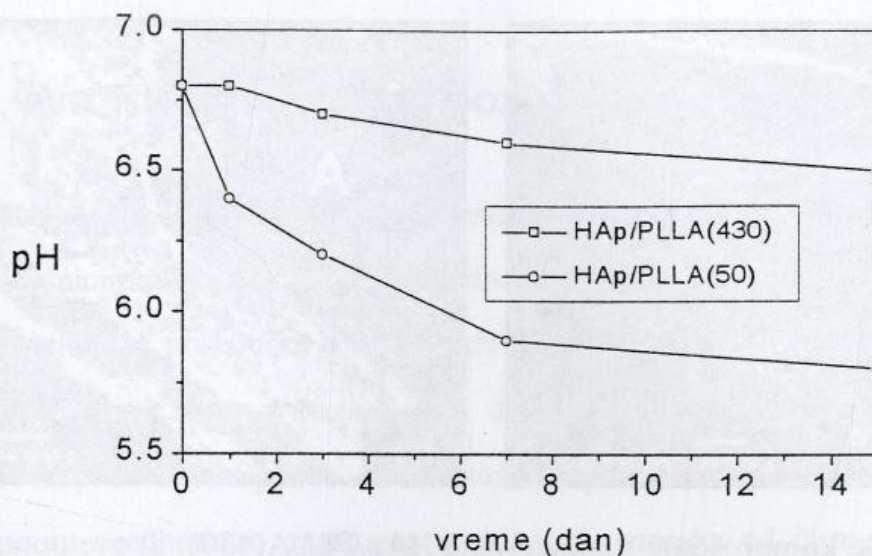


Slika 3.30. SEM prevlake: a) HAp/PLLA(100) na teflonu; b) HAp/PLLA(100)/kolagen na titanu

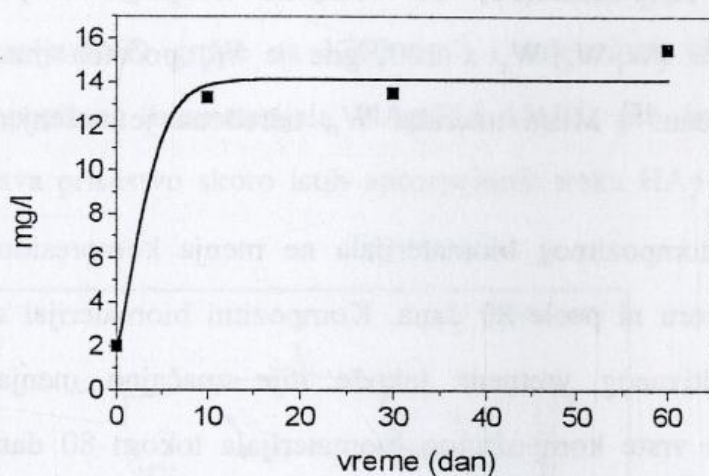
3.4 In vitro i in vivo istraživanja

3.4.1 In vitro istraživanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Vremenska promena pH fiziološkog rastvora u kome su se nalazili blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430) prikazana je na sl. 3.31. Uočava se da se u prvih 15 dana povećava kiselost rastvora. Produkti razgradnje polimera PLLA su kiselog karaktera i za očekivati je da smanjuju pH rastvora. Na sl. 3.31 uočava se da je smanjenje pH u prvih 15 dana različito za svaki kompozitni biomaterijal. Opadanje pH kod kompozitnog biomaterijala sa PLLA molske mase 430000 g/mol je dosta sporije nego kod PLLA molske mase 50000 g/mol.



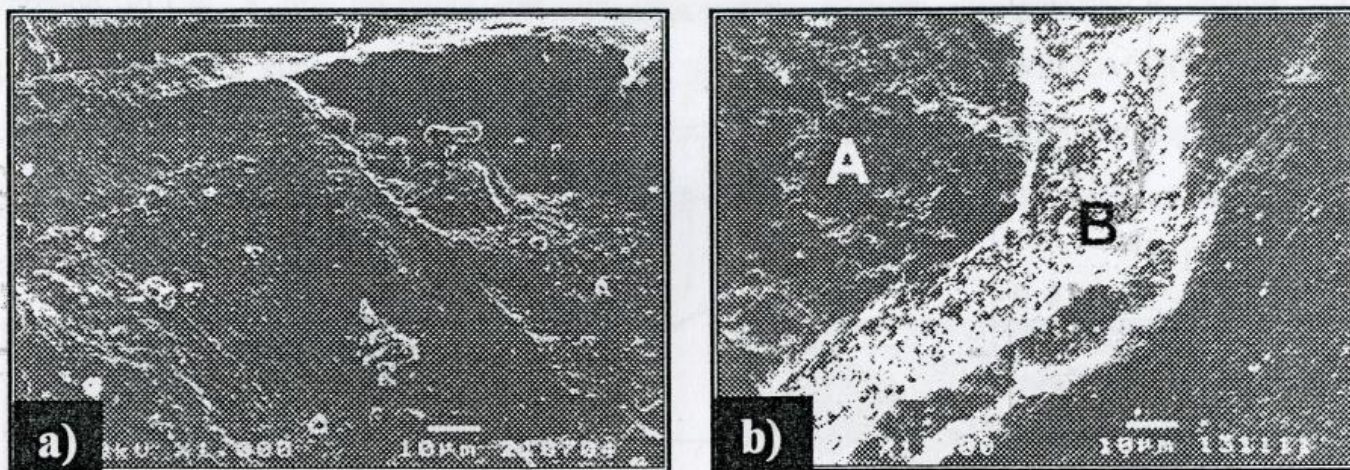
Slika 3.31. Promena pH fiziološkog rastvora u kome je potopljen kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(430) i HAp/PLLA(50)



Na slici 3.32 prikazana je promena koncentracije kalcijumovih jona u fiziološkom rastvoru tokom vremena u kome je bio potopljen kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(430).

Slika 3.32. Promena koncentracije kalcijuma u fiziološkom rastvoru u zavisnosti od vremena stajanja

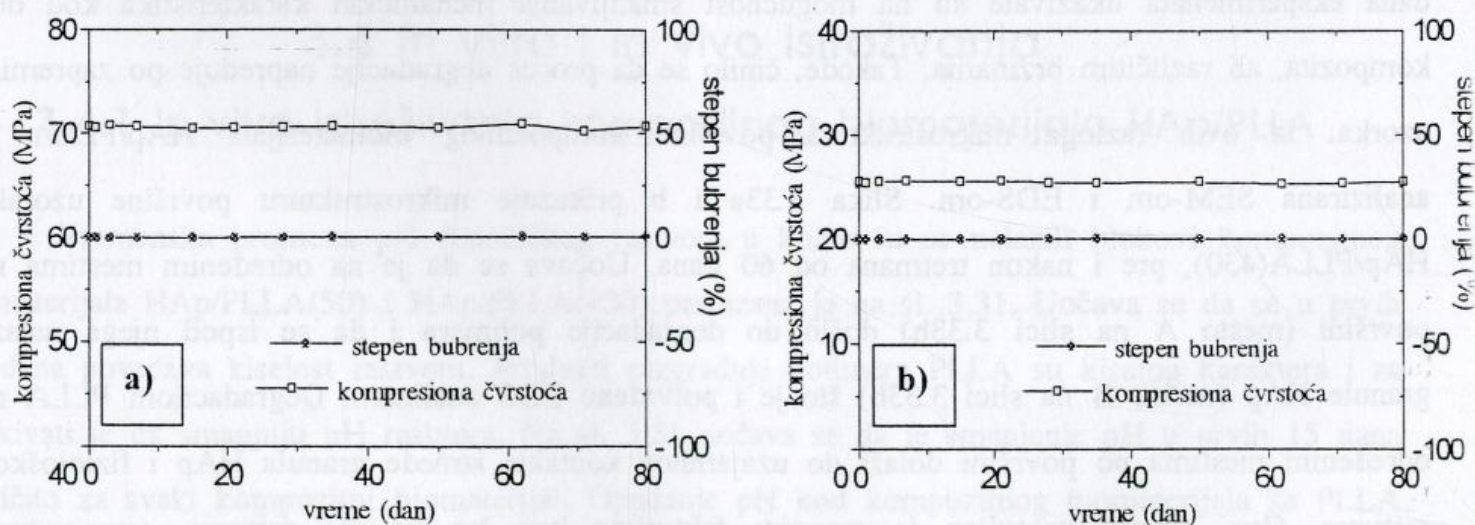
Promene pH fiziološkog rastvora kod oba kompozitna biomaterijala tokom prvih dana eksperimenata ukazivale su na mogućnost smanjivanja mehaničkih karakteristika kod oba kompozita, ali različitim brzinama. Takođe, činilo se da proces degradacije napreduje po zapremini uzorka. Iz ovih razloga mikrostruktura površine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA je analizirana SEM-om i EDS-om. Slika 3.33a i b prikazuje mikrostrukturu površine uzorka HAp/PLLA(430), pre i nakon tretmana od 60 dana. Uočava se da je na određenim mestima na površini (mesto A na slici 3.33b) došlo do degradacije polimera i da se ispod njega nalaze granule HAp (mesto B na slici 3.33b) što je i potvrđeno EDS analizom. Degradacijom PLLA na određenim mestima po površini dolazi do uzajamnog kontakta između granula HAp i fiziološkog rastvora. Ovaj proces uslovljen je mnogim faktorima kao što su pH rastvora, temperatura, količinski odnos HAp-fiziološki rastvor itd.



Slika 3.33. SEM površine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430): a) pre potapanja, b) nakon 60 dana od potapanja

Na slici 3.34a i b prikazana je zavisnost kompresione čvrstoće i stepena bubrenja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) i HAp/PLLA(50) od vremena tretmana. Stepenn bubrenja definisan je sledećom jednačinom: $\% = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$, gde je W_0 početna masa uzorka, a W_t masa uzorka u određenom vremenu.¹²⁷ Masa uzorka W_t , određena je sušenjem datog uzorka do konstantne mase.

Sa slike 3.34a uočava se da ova vrsta kompozitnog biomaterijala ne menja kompresionu čvrstoću tretmanom na 310K u fiziološkom rastvoru ni posle 80 dana. Kompozitni biomaterijal sa PLLA molske mase 50000 g/mol tokom ispitivanog vremena takođe nije značajno menjao kompresionu čvrstoću. Stepenni bubrenja kod obe vrste kompozitnog biomaterijala tokom 80 dana istraživanja zadržavaju svoju početnu vrednost, što takođe upućuje na njegovu konstantnost. Uslovi izvođenja eksperimenta su statički, pa tako i treba posmatrati njihov uticaj na dobijene vrednosti kompresione čvrstoće i stepena bubrenja.

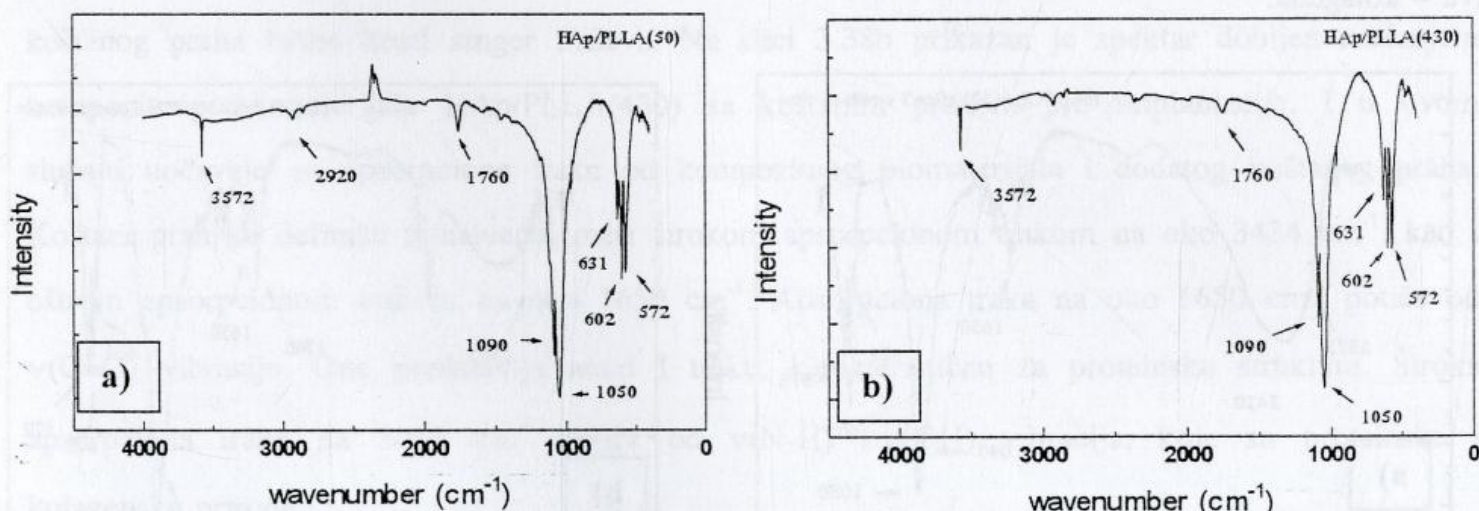


Slika 3.34. Kompresiona čvrstoća i stepen bubrenja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA: a) HAp/PLLA(430), b) HAp/PLLA(50)

3.4.2 In vivo istraživanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

FT-IR spektroskopija do sada je imala dosta široku primenu u analizi različitih procesa.¹⁶³ H. Mantsch sa saradnicima ukazao je na mogućnosti uspešne primene FT-IR spektroskopije za analizu bioloških sistema, sa posebnom mogućnošću njene primene u medicini.^{164, 165}

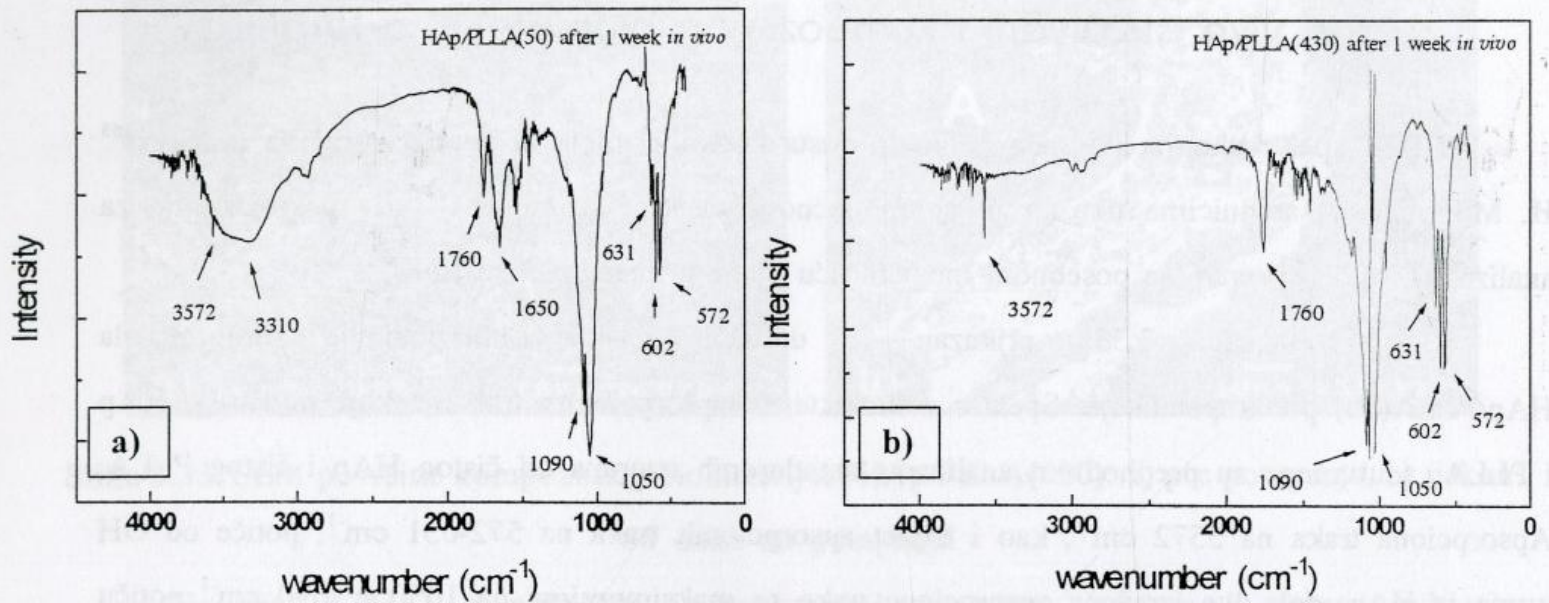
Na slici 3.35a prikazan je dobijeni spektar kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) pre implantacije. Spektar se karakteriše apsorpcionim trakama koje potiču od HAp i PLLA, a utvrđene su predhodnim analizama standardnih uzoraka od čistog HAp i čistog PLLA. Apsorpciona traka na 3572 cm^{-1} , kao i triplet apsorpcionih traka na $572\text{--}631\text{ cm}^{-1}$, potiče od OH grupa iz HAp, dok dve izražene apsorpcione trake sa maksimumima na 1050 i 1090 cm^{-1} potiču od fosfatne grupe iz HAp. Karakteristične apsorpcione trake koje potiču od PLLA su: valenciona vibracija C=O grupe na 1760 cm^{-1} i valenciona vibracija C-H grupe na oko 2920 cm^{-1} . Spektar kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) pre implantacije prikazan je na slici 3.35b gde se uočava prisustvo skoro istih apsorpcionih traka HAp i PLLA kao i na slici 3.35a.



Slika 3.35. FT-IR kompozitnog biomaterijala: a) HAp/PLLA(50), b) HAp/PLLA(430)

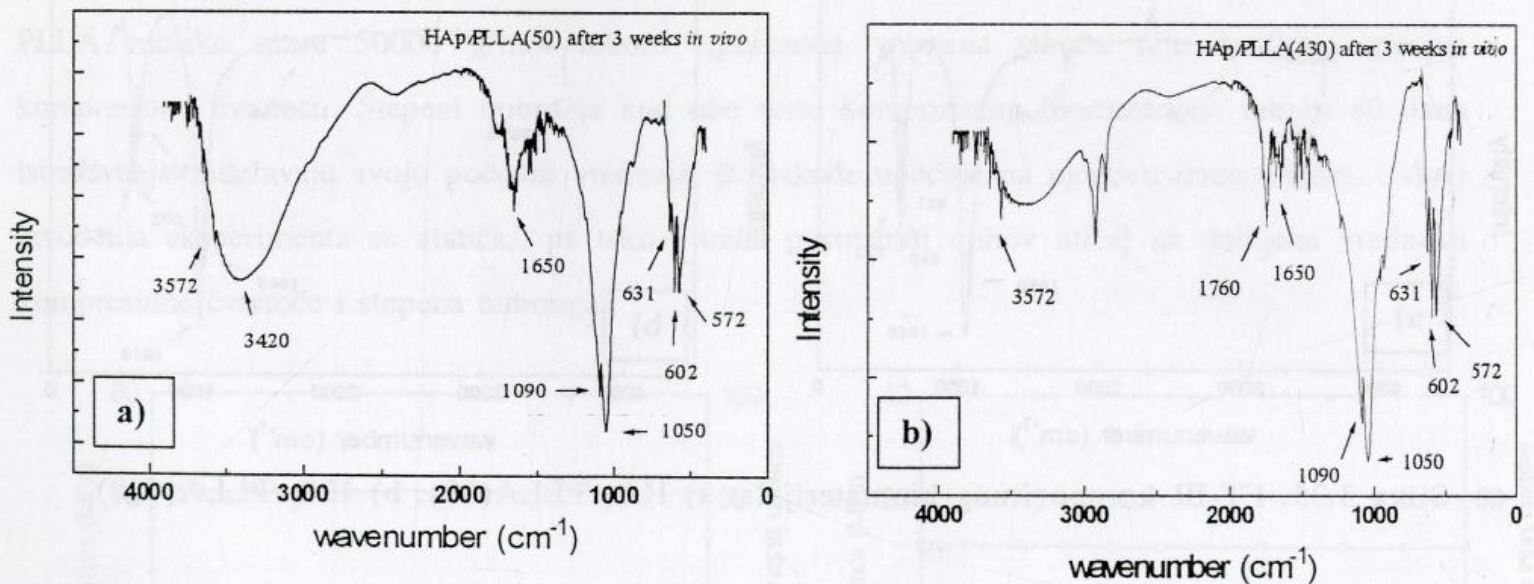
Kompozitni biomaterijali HAp/PLLA sa PLLA obe molske mase su implantirani intraperitonealno miševima. Intraperitonealna aplikacija se najčešće koristi za ispitivanje biokompatibilnosti, a peritonealna duplja je pogodna za ektopičnu osteogenezu.¹⁶⁶

Na slici 3.36 prikazan je FT-IR kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430) nakon 7 dana od implantiranja.



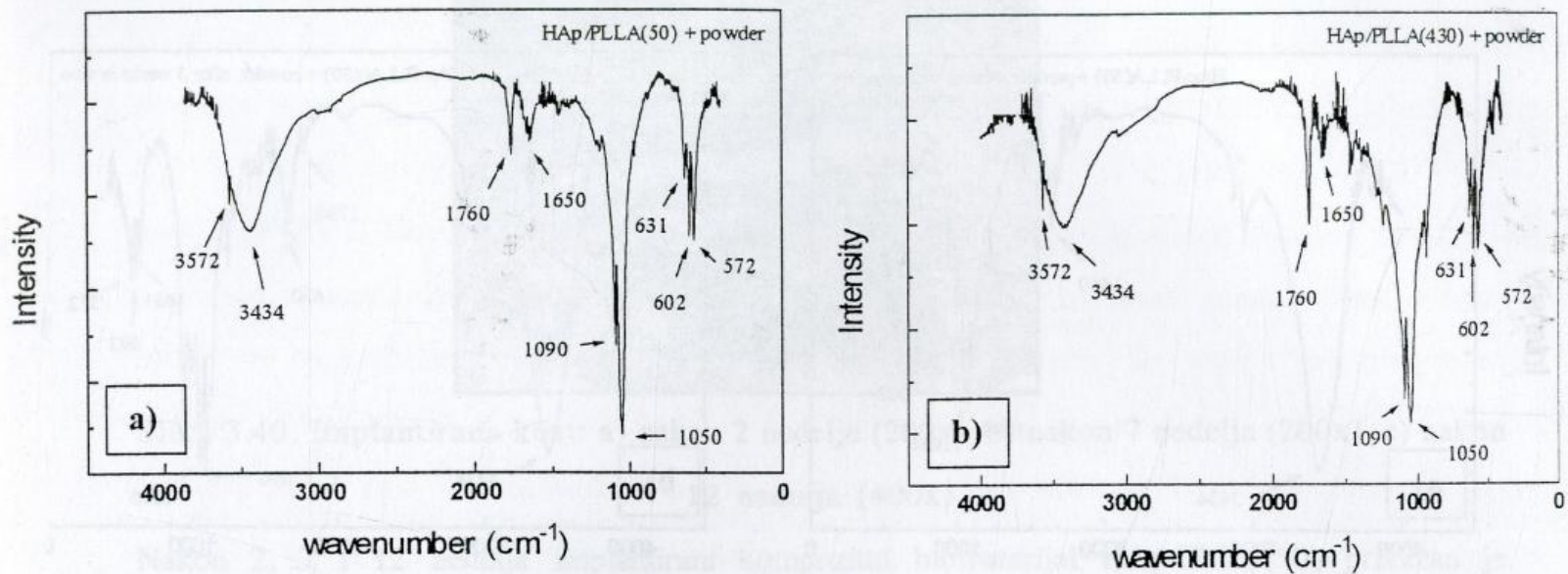
Slika 3.36. FT-IR kompozitnog biomaterijala nakon 7 dana od implantiranja: a) HAp/PLLA(50), b) HAp/PLLA(430)

FT-IR spektri blokova kompozitnog biomaterijala nakon 21 dana od implantiranja prikazani su na slici 3.37. Pojava apsorpcione trake na 3420 cm^{-1} pripisana je pojavi vezivnog koštanog tkiva – kolagena.



Slika 3.37. FT-IR kompozitnog biomaterijala nakon 21 dana od implantiranja: a) HAp/PLLA(50), b) HAp/PLLA(430)

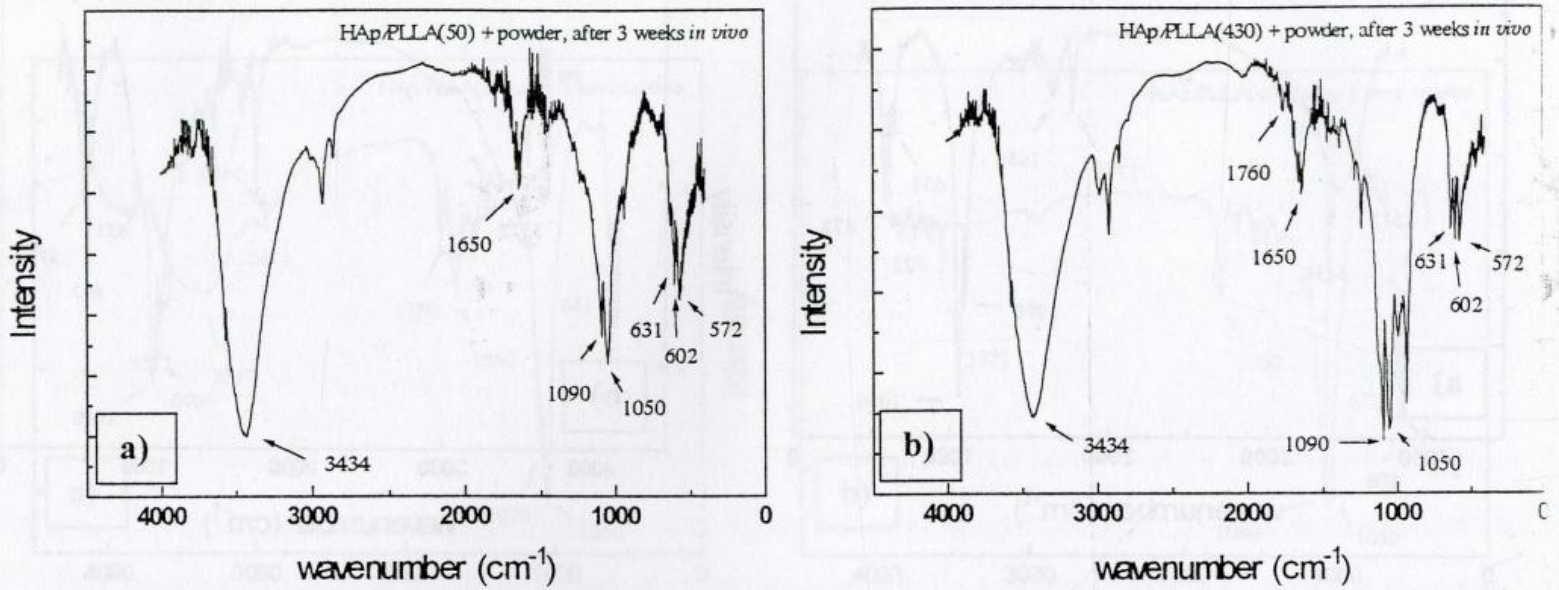
U cilju ispitivanja zamene praha autologne kosti sa kompozitnim biomaterijalom prah autologne kosti je mešan sa kompozitnim biomaterijalom HAp/PLLA u masenom odnosu 50 : 50. Na ovakav način dobijene su dve vrste kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50)/autologna kost i HAp/PLLA(430)/autologna kost. FT-IR spektari ovih kompozitnih biomaterijala prikazani su na slici 3.38.



Slika 3.38. FT-IR kompozitnog biomaterijala: a) HAp/PLLA(50)/autologna kost, b) HAp/PLLA(430)/autologna kost

Spektar dobijen korišćenjem smeše kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) sa koštanim prahom pre implantacije prikazan je na slici 3.38a. Analizom spektara kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) pre implantacije uočavaju se dve grupe apsorpcionih traka. Jedna grupa potiče od čistog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) a druga vrsta od funkcionalnih grupa dodatog koštanog praha butne kosti singer miševa. Na slici 3.38b prikazan je spektar dobijen mešanjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) sa koštanim prahom pre implantacije. I u ovom slučaju uočavaju se apsorpcione trake od kompozitnog biomaterijala i dodatog koštanog praha. Koštani prah se definiše u najvećoj meri širokom apsorpcionom trakom na oko 3434 cm⁻¹, kao i oštrom apsorpcionom trakom na oko 1650 cm⁻¹. Apsorpciona traka na oko 1650 cm⁻¹ potiče od $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibracije. Ona predstavlja amid I traku, karakterističnu za proteinske strukture. Široka apsorpciona traka na 3434 cm⁻¹ potiče od $\nu(\text{N-H})$ i $\nu(\text{OH})$ vibracija, koje su proteinske i kolagenske prirode.

Sa kompozitnim biomaterijalima HAp/PLLA/autologna kost izvršena je intraperitonealna implantacija miševima. Nakon 21 dana od implantiranja kompozitni biomaterijali su ekstrahovani i osušeni. Na slici 3.39 prikazani su FT-IR spektri dobijeni od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA /autologna kost sa PLLA obe molekulske mase nakon 21 dana od implantacije.

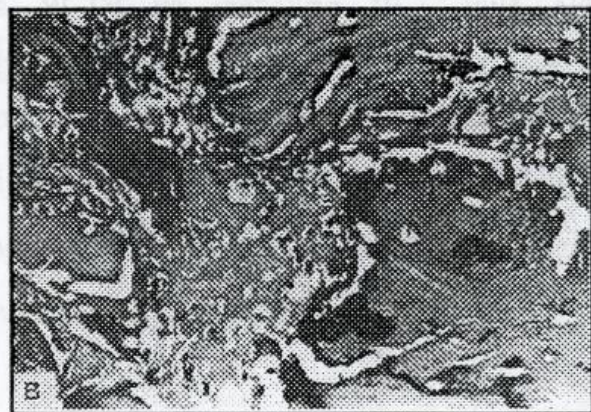
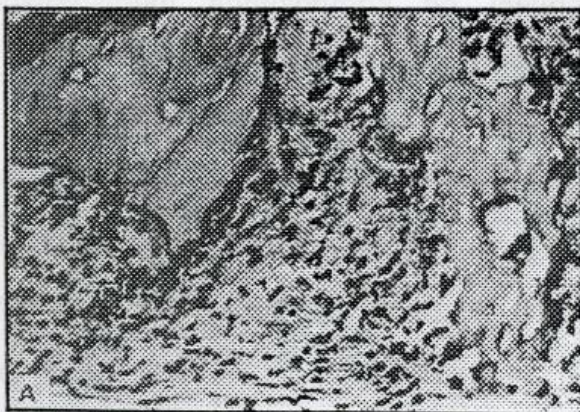


Slika 3.39. FT-IR kompozitnog biomaterijala nakon 21 dana od implantacije: a) HAp/PLLA(50)/autologna kost, b) HAp/PLLA(430)/autologna kost

3.4.2.1. Patohistološka istraživanja

U okviru ovih vrsta istraživanja uradjene su patohistoloske analize tkiva sa implantima kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430), nakon 2, 7 i 12 nedelja od intraperitonealne implantacije. Formirane su tri grupe životinja. Prvoj grupi je implantirana usitnjena kost, drugoj kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(50) i trećoj kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(430). Rezultati histopatoloških istraživanja prikazani su sa uveličanjima od 200 i 400 puta.

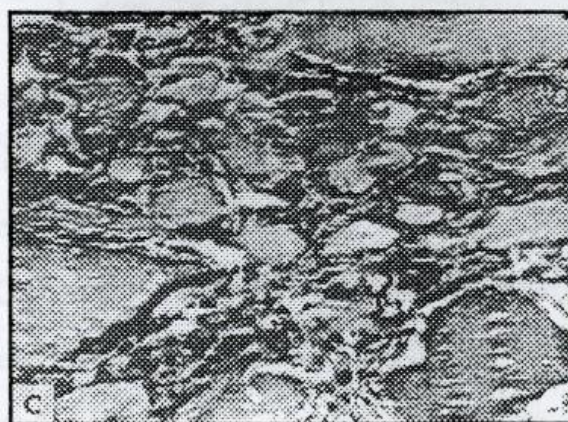
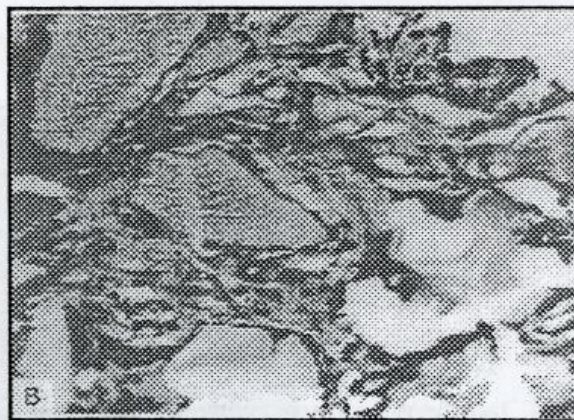
Na slici 3.40 prikazana je slika implantirane kosti nakon 2, 7 i 12 nedelja od implantiranja. Na slici 3.40a uočava se između implantiranih partikula vidljivo prisustvo inflamatornog ćelijskog infiltrata i mladih krvnih sudova. Nakon 7 nedelja pored inflamatornih ćelija i mladih krvnih sudova razvijen je i kolageni matriks što se uočava na slici 3.40b. Nakon 12 nedelja prikazani rezultati na slici 3.40c ukazuju da su implantirane partikule periferno infiltrirane kolagenim matriksom i ćelijama vezivnog tkiva.





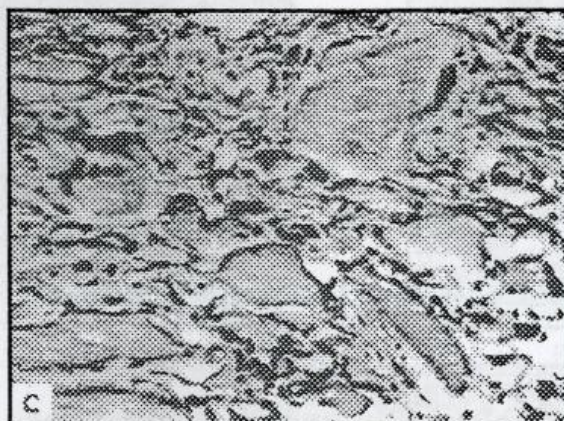
Slika 3.40. Implantirana kost: a) nakon 2 nedelje (200x), b) nakon 7 nedelja (200x), c) nakon 12 nedelja (400x)

Nakon 2, 7 i 12 nedelja implantirani kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(50) prikazan je rezultatima na slici 3.41. Nakon 2 nedelje partikule implantata su medusobno odvojene infiltratom koji se sastoji od inflamatornih ćelija i mladih krvnih sudova, što se uočava sa slike 3.41a. Na slici 3.41b vide se implantirane partikule u fazi resorpcije nakon 7 nedelja. Ćelijski infiltrat je redukovan. Džinovske ćelije u vidu klastera ulaze u partikulu. Nakon 12 nedelja, prikazani rezultati na slici 3.41c ukazuju na postojanje brojnih implantiranih partikula koje su medusobno razdvojene uzanim trakama vezivnog tkiva. Na velikom broju partikula su prisutni znaci resorpcije. Retke džinovske ćelije se vide na periferiji implantiranih partikula. Implantiran materijal je dobro prožet vezivnim tkivom.



Slika 3.41 Implantirani HAp/PLLA(50): a) nakon 2 nedelje (400x), b) nakon 7 nedelja (200x), c) nakon 12 nedelja (200x)

Na slici 3.42 prikazane su slike histopatoloških istraživanja nakon 2, 7 i 12 nedelja od implantiranja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430). Nakon 2 nedelje od implantiranja na slici 3.42a vide se implantirane partikule razdvojene infiltratom od inflamatornih ćelija. Na ivici partikula su prisutne mononuklearne ćelije koje su ponegde džinovskog izgleda. Uočljivi su znaci resorpcije implantiranog materijala. Na slici 3.42b, nakon 7 nedelja od implantiranja uočava se između partikula infiltrat od inflamatornih ćelija i fibroblasta. Vide se partikule koje su velikim delom reosrbovane. Ispod osteoklastoidnih ćelija koje su rasporedene u obliku pojasa, vide se prazni prostori. Nakon 12 nedelja od implantiranja, prikazani rezultati na slici 3.42c pokazuju brojne implantirane partikule prožete infiltratom fibroblasta i fibrocita među kojima su mali krvni sudovi. Osteoklastoidne ćelije se vide rasporedene u vidu pojasa na periferiji nekih partikula



Slika 3.42 Implantirani HAp/PLLA(430): a) nakon 2 nedelje (400x), b) nakon 7 nedelja (200x), c) nakon 12 nedelja (200x)

4. Diskusija rezultata

4.1 Diskusija rezultata sinteze i dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

4.1.1 Sinteza HAp i PLLA

Na osnovu slike 3.1, rendgenostrukturnom analizom uzorka nakon termičkog tretmana (kalcinacije) utvrđeno je prisustvo dobro iskristalisane faze kalcijum-hidroksiapatita. Prisustvo visoko kristalne forme HAp-a omogućava da prilikom *in vivo* istraživanja gotovo ne dolazi do bioresorpcije, jer se visoko kristalna forma HAp-a vrlo teško resorbuje.¹³⁴ Dobijeni rezultati rendgenostrukturne analize HAp u skladu su sa rendgenostrukturnim istraživanjima HAp drugih autora.¹⁶⁷ Fina poroznost uočena na granuli HAp prikazana na slici 3.2 omogućava potencijalnu penetraciju i čvršći kontakt druge komponente u fazi dobijanja kompozita.

Mikrostruktura površine PLLA zavisi od molske mase PLLA, što je i zapaženo na slici 3.3 a i b. Površina PLLA molske mase 50000 g/mol sa slike 3.3a je mrežaste i porozne strukture. PLLA molske mase 430000 g/mol sa slike 3.3b, poseduje glatkiju površinu, manje poroznu i kontinualniju nego PLLA molske mase 50000 g/mol.

4.1.2 Kompaktiranje visoko poroznog HAp/PLLA

U zavisnosti od masenog udela PLLA u kompozitu, nakon presovanja na sobnoj temperaturi, dobijene su različite vrednosti kompresione čvrstoće blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.^{134, 135} Sa slike 3.4 uočava se da je maksimalna vrednost kompresione čvrstoće dobijena za maseni udeo PLLA od 15%. U tabeli 3.1 prikazana je razlika zapreminskih % od masenih % PLLA. Maksimalna dobijena kompresiona čvrstoća za udeo PLLA od 15 mas% (na osnovu tab. 3.1) definisana je zapreminskim udelom PLLA od 33,2 vol%. Humano kostano tkivo poseduje viši udeo nekeramičke komponente.⁷⁰ Za sva daljnja istraživanja usvojeno je da maseni udeo PLLA bude 20 mas% iz razloga da sintetisani kompozitni biomaterijal HAp/PLLA ima zapreminski sastav blizak sastavu prosečnog koštanog tkiva. Prema tabeli 3.1 ovakav sastav poseduje teorijsku (bezporoznu) gustinu od 2,31 g/cm³. Vrednosti gustina u tabeli 3.1 dobijene su računski za teorijski gust (neporozan) blok.

Uticaoj povećanja temperature presovanja na povećavanje vrednosti gustine i kompresione čvrstoće blokova je znatan. Ove zavisnosti su prikazane na slici 3.5a i b. Relativna gustina blokova predstavlja % teorijske (neporozne) gustine i na osnovu slike 3.5a uočava se da ona sa povećanjem temperature presovanja raste. Zbog smanjenja poroznosti blokova očekivati je da se povećava kompresiona čvrstoća. Sa slike 3.5b uočava se da sa povećanjem temperature presovanja kompresiona čvrstoća raste.

Povećanjem temperature presovanja sa 293 na 353 ±3 K na pritisku od 98.10 MPa i za vreme presovanja od 15 minuta dobija se blok sa relativnom gustinom od 78,4% dok sa daljim povećanjem temperature presovanja od 353 na 457 ±3 K blok ima relativnu gustinu od 96,2%. Temperatura presovanja od 457 ±3 K predstavlja tačku topljenja PLLA pa presovanjem na ovoj temperaturi zahvaljujući rastopljenom PLLA dolazi do njegovog lakšeg tečenja i stapanja između HAp granula. Zavisnost gustine poli-l-laktida od temperature u intervalu od 341-445K prema istraživanjima Witzakea i saradnika prikazana je jednačinom: ¹⁶⁸

$$\rho(\text{gcm}^{-3})=1.145 \times [1+(0.0007391 \times (T(^{\circ}\text{C})-150))]^{-1}. \quad (4.1)$$

Sa povećanjem temperature gustina polimera se smanjuje. Smanjenjem gustine PLLA olakšano je tečenje PLLA oko granula HAp pod uticajem pritiska presovanja. Takođe je olakšano i potencijalna penetracija PLLA u poroznost granula HAp, što omogućava pojavu "zabavljanja" komponenata, koja predstavlja osnovni fenomen u mehaničkoj adheziji. Time je omogućeno povećanje mehaničkih osobina kompozita. Za temperaturu presovanja od 457K dobijeni su blokovi sa relativnom gustinom 96,2% i kompresionom čvrstoćom 70,7 MPa.

U tabeli broj 3.2 prikazani su rezultati dobijeni kompaktiranjem visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA toplim presovanjem, uz promenu pritiska i vremena toplog presovanja. U cilju ispitivanja uticaja pritiska i vremena toplog presovanja izvršena su topla presovanja na višim pritiscima od 49,0-294,3 MPa i sa vremenima od 15-60 minuta. Povećanje pritiska toplog presovanja pri konstantnoj temperaturi i vremenu utiče na povećanje relativne gustine, kompresione čvrstoće i modula elastičnosti blokova, što se uočava iz tabele 3.2. Pri pritisku toplog presovanja od 294,3 MPa dobijeni su blokovi sa relativnom gustinom od 98,7% i kompresionom čvrstoćom od 83 MPa. Uticaj povećanja pritiska toplog presovanja na isti način odražava se i na modul elastičnosti. Za pritisak toplog presovanja od 49,0 MPa dobijeni su blokovi sa modulom elastičnosti od 1,24 GPa, dok se za maksimalni pritisak toplog presovanja od 294,3 MPa dobijaju blokovi sa modulom elastičnosti od 1,68 GPa. Ispitivanje uticaja vremena toplog presovanja izvršeno je pri konstantnoj temperaturi i pritisku toplog presovanja. Sa

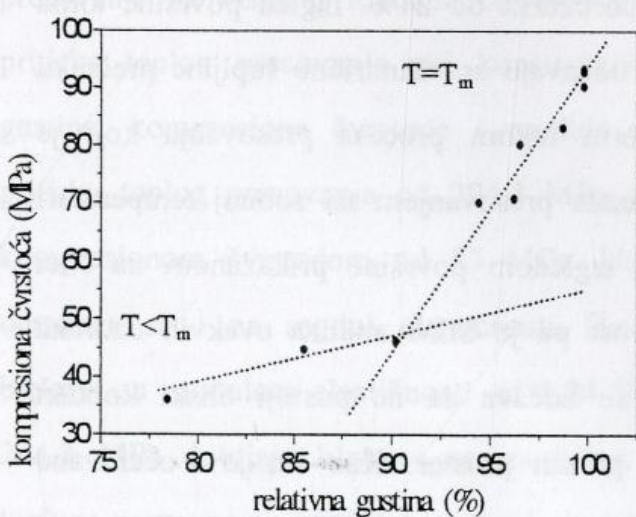
povećanjem vremena toplog presovanja relativna gustina blokova raste i dostiže maksimalnu vrednost od 99.6% za vreme od 30 minuta. Sa produžavanjem vremena toplog presovanja do 60 minuta vrednost relativne gustine se ne menja. Kompozit je za 30 minuta toplog presovanja dostigao maksimalnu gustinu u ovoj vrsti eksperimenata. Najverovatnije je da je ovo maksimalna vrednost relativne gustine koja se može postići pri primenjenim parametrima toplog presovanja i veličini granula HAp, jer dalje povećanje vremena presovanja ili pritiska ne utiče na povećanje gustine. Poroznost koja zaostaje najverovatnije potiče od unutrašnje poroznosti granula HAp i nemogućnosti penetracije PLLA u zatvorene pore HAp. Međutim mada ne dolazi do promene gustine produženjem vremena toplog presovanja utiče se na dalje povećanje kompresione čvrstoće i modula elastičnosti, što je posledica i uticaja vremena toplog presovanja na konformacione promene lanaca PLLA koje prouzrokuju promene u gipkosti (krutosti). Relaksacioni fenomeni takođe utiču na dobijene rezultate, jer su oni vremenski zavisni. Kompresiona čvrstoća blago raste i za vreme toplog presovanja od 60 minuta dostiže vrednost od 93,2 MPa. Dalje povećanje vremena toplog presovanja najverovatnije utiče i na fenomene koji se dešavaju u međufaznoj površini između HAp i PLLA. Najverovatnije je da dolazi do penetracije PLLA u porozne granule HAp koja utiče na povećanje mehaničkih osobina i stvaranja mogućnosti uspostavljanja veza između komponenti. Poređenjem rezultata iz tabele 3.2 može se zaključiti da povećanje pritiska presovanja ima manji uticaj nego povećanje vremena presovanja na gustinu i kompresionu čvrstoću.^{134-136, 142-144}

Blokovi kompozitnog biomaterijala dobijeni hladnim i toplim presovanjem analizirani su SEM-om u cilju ispitivanja odnosa komponenata od uslova presovanja i prikazane su na slici 3.6. Dodatkom hloroforma u količini od 30 mas% u kompozit i zatim njegovim presovanjem pri pritisku od 98,1 MPa na sobnoj temperaturi dobija se testast materijal. Naknadnim uparavanjem hloroforma nakon presovanja kompozit očvrstne i postiže poroznost od 24%. Izgled površine loma takvog kompozita prikazan je na slici 3.6a. U fazi PLLA uočavaju se cilindrične šupljine prečnika od 20-400 μm . U ovim šupljinama nalazio se hloroform tokom procesa presovanja koji je naknadnim uparavanjem uklonjen. Kompaktiranjem kompozita presovanjem na sobnoj temperaturi i 98.10 MPa u toku 15 minuta dobijen je kompozit sa izgledom površine prikazanom na slici 3.6.b. Velika poroznost (37%), uslovljava i veliku hrapavost pa je SEM analiza ovakvih uzoraka pri uvećanjima većim od 350x, otežana. Na slici 3.6b se uočava da ne postoji bliski kontakt komponenti HAp i PLLA, već da između njih postoji prazan prostor. Kao što je i očekivano poroznost sistema odrazila se na relativno nisku vrednost kompresione čvrstoće. Povećanje temperature presovanja sa 293 na 323 ± 3 K uticalo je na smanjenje poroznosti i povećanje

kompresione čvrstoće u manjoj meri. Na prelomnoj površini ovako dobijenih kompozita koja je prikazana na slici 3.6c poroznost je znatna a nema ni značajnijeg bliskog kontakta komponenti. Daljim povećanjem temperature presovanja sa 323 na 353 ± 3 K dobijen je kompozit čija je površina loma prikazana na slici 3.6d. Relativno sferna granula HAp-a obavijena je prevlakom PLLA debljine oko $12 \mu\text{m}$. Kontakt komponenti je relativno bliskiji ali između granule HAp i prevlake od PLLA uočava se poroznost. Kao što su i rezultati relativne gustine, kompresione čvrstoće i modula elastičnosti prikazan u tabeli 3.2, temperatura presovanja od 353 K rezultuje dobijanju kompaktnijih kompozita sa višim vrednostima kompresione čvrstoće.

Presovanjem na temperaturi topljenja PLLA od 457 ± 3 K postiže se dosta bliskiji kontakt komponenti, što se i uočava sa slike 3.6e. Između granula HAp u središnjem delu nalazi se sloj PLLA. Izgled površine nastale lomom, ali pri većem uveličanju prikazan je na slici 3.6f. U međufaznoj površini dolazi do formiranja veza najverovatnije fizičkog tipa. Uočava se uspostavljanje veza između komponenti HAp i PLLA u obliku tankih mostova PLLA ka HAp. U ovom slučaju na uvećanjima preko 3500x, usled povećanja napona preko 10 kV dolazi do povećanja energije primarnih elektrona kao i delimične apsorpcije energije primarnih elektrona od strane PLLA. Ova pojava rezultira time što pri SEM analizi ovakvog tipa kompozitnog biomaterijala pri naponima na anodi većim od 10 kV i uveličanju od 3500x faza PLLA se topi i onemogućava SEM analizu. Povećanje pritiska toplog presovanja se odrazilo na smanjenje poroznosti i intimniji kontakt komponenti što se i vidi na slici 3.6g. U sredini između dve granule HAp nalazi se sloj PLLA prosečne debljine oko $10 \mu\text{m}$. Kontakt između komponenti HAp i PLLA je veoma blizak, ali na određenim mestima ipak ima praznog prostora.

Izgled površine loma bloka dobijenog nakon 45 minuta toplog presovanja prikazan je na slici 3.6h. Uočava se vrlo intiman kontakt komponenti HAp i PLLA, i pojava penetracije PLLA u

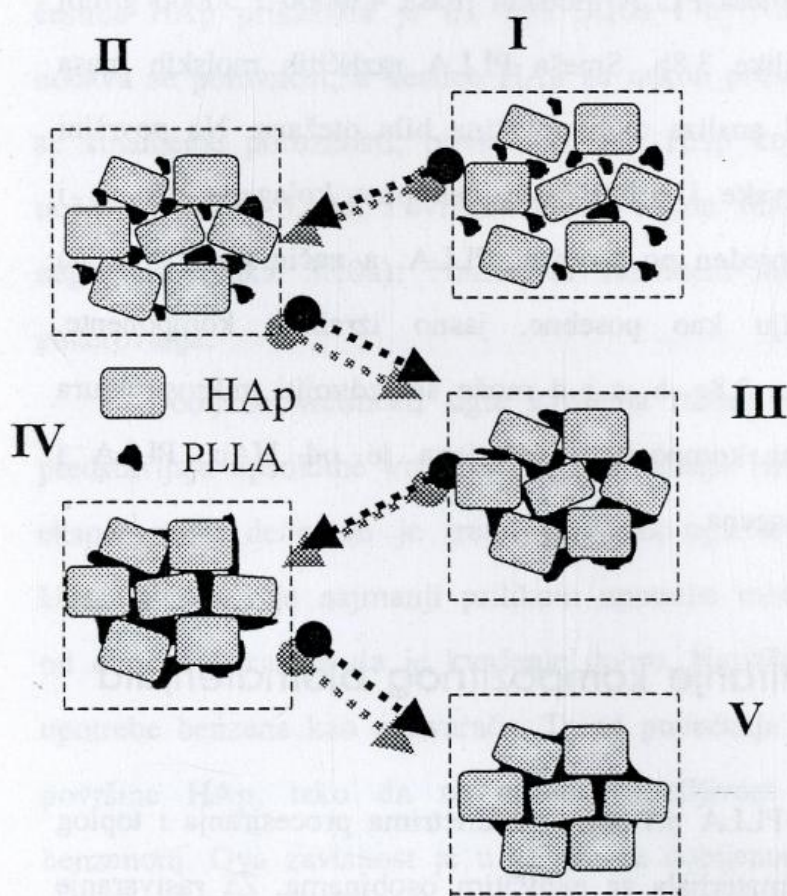


pore HAp. Dubina penetracije iznosi oko $1 \mu\text{m}$. Po mehaničkoj teoriji adhezije penetracija je od primarnog značaja za postizanje dobre adhezije. Ovako dobijeni uzorak poseduje kompresionu čvrstoću od 92.7 MPa. Očigledno je da postoji direktna povezanost između kompresione čvrstoće i poroznosti odnosno gustine. Na slici 4.1 (na osnovu rezultata iz tabele 3.2) prikazana je zavisnost kompresione čvrstoće od relativne gustine.

Slika 4.1. Kompresiona čvrstoća u zavisnosti od relativne gustine¹³⁴

Sa slike 4.1 uočava se da povećanje relativne gustine uslovljava povećanje kompresione čvrstoće blokova. Prilikom presovanja na temperaturama koje su niže od tačke topljenja PLLA ($T < T_m$) ova zavisnost sledi pravu sa manjim nagibom. Kada se toplo presovanje vrši na temperaturi topljenja PLLA ($T = T_m$) kompresiona čvrstoća izraženije raste sa povećanjem gustine i ova zavisnost sledi pravu sa većim nagibom.

U skladu sa rezultatima iz tabele 3.2 i SEM analizom blokova može se uprošćeno prikazati šema dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA iz HAp i PLLA, kompaktiranjem toplim presovanjem. Na slici 4.2 prikazana je uprošćena šema dobijanja blokova kroz V stupnjeva.¹³⁴



Slika 4.2. Uprošćena šema dobijanja blokova HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala¹³⁴

Stupanj I odgovara sistemu koji je dobijen mešanjem HAp i čvrstog PLLA. Presovanjem na hladno dobijamo kompozit koji odgovara stupnju II. Daljim presovanjem, ali na toplo preko stupnjeva III i IV dolazi se do kompozita prikazanog stupnjem V, koji je neporozan. Unošenjem granula HAp u predhodno rastvoreni PLLA u hloroformu, a zatim uparavanjem smeše HAp i rastvorenog PLLA je dobijeno stanje koje najviše odgovara stanju između stupnjeva II i III. Iz ovih razloga PLLA se pre mešanja potpuno rastvara hloroformom pa tek onda meša sa granulama HAp. Na ovakav način dobijen je kompozit kod koga stupnjevi I i II skoro ne postoje, a početni stupanj je stupanj III.

Na slici 3.7. prikazana je zavisnost kompresione čvrstoće različitih kompozitnih biomaterijala HAp/PLLA od molske mase PLLA, kao i dodatka kolagena.

Kao što se i uočava sa slike 3.7 svaki kompozit poseduje sebi svojevrsnu kompresionu čvrstoću. Najviša vrednost kompresione čvrstoće od 70,7 MPa zabeležena je kod kompozita (B1) u kome je polimerna komponenta PLLA molske mase 430000 g/mol, a najniža od 9 MPa sa

smešom (B6) PLLA molske mase 50000 g/mol i kolagena. Biomaterijal sa PLLA (B5) molske mase 50 000 g/mol ima nižu kompresionu čvrstoću nego sa PLLA molske mase 430000 g/mol. Očigledno je da molska masa a time i dužina lanaca ima presudnu ulogu u vrednostima kompresione čvrstoće. Sa višom molskom masom i dužim lancima dobijene su više vrednosti kompresione čvrstoće i obrnuto.¹³⁶ U slučaju kombinacija polimera različitih molskih masa (B2, B3 i B4) dobijene vrednosti kompresionih čvrstoća nalaze se u opsegu naznačenih (od 9-70,7 MPa).

Mikrostruktura površine razmatranih kompozita (B1-B6) analizirana je SEM-om, a izgled površina prikazan je na slici 3.8. Prelomne površine kompozitnih biomaterijala sa PLLA molskih masa 50000 i 430000 g/mol (3.8a i c) su vrlo slične. Na obe slike može se u centralnom delu uočiti granula HAp oko koje se nalazi PLLA. Smeša PLLA molskih masa 430000 i 50000 g/mol obavija granulu HAp, što se može uočiti sa slike 3.8b. Smeša PLLA različitih molskih masa poseduje relativno visoku hrapavost, pa je SEM analiza ovih površina bila otežana. Na površini kompozitnog biomaterijala B6 uočavaju se ostrvske i pahuljičaste nakupine kolagena, što se i uočava sa slike 3.8d. Kolagen je nasumice raspoređen po površini PLLA, a način kompaktiranja omogućio je njegovo izdvajanje i egzistenciju kao posebne, jasno izražene komponente. Poređenjem mikrostruktura prikazanim na slikama 3.8a, b, c i d može se izdvojiti mikrostruktura kompozita B6, koja predstavlja trokomponentni kompozit a sačinjena je od HAp, PLLA i pahuljičastih nakupina prirodnog biomaterijala kolagena.

4.1.3 Uticaj rastvarača na dizajniranje kompozitnog biomaterijala

U zavisnosti od upotrebljenog rastvarača PLLA pri istim parametrima procesiranja i toplog presovanja dobijeni su blokovi kompozitnog biomaterijala sa različitim osobinama. Za rastvaranje PLLA upotrebljeni su 1-metilen hlorid, 2-hloroform i 3-benzen. Najmnja poroznost (slika 3.9a) registrovana je prilikom upotrebe metilen hlorida kao rastvarača, a time i najviša vrednost kompresione čvrstoće (slika 3.9b). Najviša vrednost poroznosti zabeležena je kod upotrebe benzena, a pri upotrebi hloroforma kao rastvarača dobijena poroznost i kompresiona čvrstoća nalaze se između vrednosti za metilen hlorid i benzen. Kao što je i očekivano sa manjom poroznošću kod svih sistema dobijaju se blokovi sa višim vrednostima kompresione čvrstoće.

Razlog za uticaj vrste rastvarača na poroznost a kasnije i kompresionu čvrstoću može biti različit. Mnogi faktori utiču na rastvaranje PLLA, adsorpciju na površini HAp tokom vakuum

uparavanja, kvašenje površine HAp itd. Sigurno je da primenjeni različiti rastvarači različito interaguju sa PLLA (interakcioni parametar χ). Tokom rastvaranja PLLA u zavisnosti od načina interakcija sa rastvaračem lanci polimera mogu se vrlo različito ponašati.¹⁶⁹ Poroznost i hrapavost površine HAp-a ima bitnu ulogu za način i vrstu adsorpcije polimera na njenoj površini.¹⁷⁰ Svi ovi fenomeni rezultiraju različitom poroznošću i kompresionom čvrstoćom koja je registrovana.

Iz ovih razloga ispitan je jedan od niza faktora koji bi mogli da uslovljavaju dobijene rezultate a to je ugao kvašenja HAp. Ugao kvašenja HAp umnogome zavisi od hrapavosti njegove površine. Sa povećanjem hrapavosti povećava se greška merenja ugla kvašenja, pa je neophodno da ispitivana površina bude što više glatkija.^{171, 172} U cilju dobijanja glatke površine, čestice HAp su nakon presovanja sinterovane i naknadno sukcesivno polirane. Mikrostruktura presovanih čestica HAp prikazana je na slici 3.10a i b. Na površini tablete kao i u njenoj unutrašnjosti uočava se poroznost, a čestice HAp su nakon presovanja aglomerisane. Nakon sinterovanja uočava se smanjenje poroznosti, povećanje zrna HAp koje se tokom sinterovanja sjedinjavaju što se i uočava na slici 3.10d. Površina tablete nakon sinterovanja i poliranja je glatkija i manje porozna nego pre (slika 3.10a). Naznačeni fenomeni su očekivani i predstavljaju klasične fenomene sinterovanja.

Dobijene vrednosti ugla kvašenja (tabela 3.3) zbog korišćenja ne standardne metode ne predstavljaju apsolutne vrednosti ugla kvašenja HAp sa različitim rastvorima PLLA. U ovoj vrsti eksperimenta definisan je trend promena ugla kvašenja u zavisnosti od korišćenog rastvarača. Ugao kvašenja je najmanji prilikom upotrebe metilen hlorida, a njegova relativno mala vrednost od oko 15° ukazuje da je kvašenje dobro. Najviša vrednost ugla kvašenja zabeležena je prilikom upotrebe benzena kao rastvarača. Trend povećanja ugla kvašenja ukazuje na smanjenje kvašljivosti površine HAp, tako da se najveća kvašljivost postiže sa metilen hloridom, a najmanja sa benzenom. Ova zavisnost je u skladu sa dobijenom zavisnošću poroznosti i kompresione čvrstoće od vrste upotrebljenog rastvarača. Mada se najbolje vrednosti poroznosti i kompresione čvrstoće postižu uz upotrebu metilen hlorida kao rastvarača, sva dalja istraživanja sprovedena su uz korišćenje hloroforma kao relativno prihvatljivog rastvarača.

4.1.4 Uticaj toplog presovanja na strukturu HAp, PLLA i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Na slici 3.11a prikazan je DTA dijagram čistog HAp koji ukazuje da u ispitivanom temperaturskom intervalu ne dolazi do pojave fizičko-hemijskih procesa praćenih promenom entalpije. HAp je stabilan što se i moglo očekivati jer je dobijen kalcinacijom na 1100°C. Na DTA dijagramu PLLA (3.11b) uočavaju se dva endotermna procesa praćena promenama entalpije. Maksimum otklona DTA krive prvog procesa nalazi se na 176°C, a drugog na 375°C. Prva promena sa maksimumom otklona na 176°C odgovara faznom prelazu topljenja i u skladu je sa poznatim DSC istraživanjima drugih autora.¹⁷³ Na istoj slici uočava se na temperaturi od 280°C početak degradacionog procesa. Maksimum DTA krive uočava se na 375°C. TGA istraživanja P. Cornellsa i saradnika utvrdila su da PLLA počinje termičku degradaciju već na temperaturama od 190°C, dok se izražena degradacija sa maksimalnom brzinom degradacije odvija u temperaturskom opsegu od 300-370°C (pri brzini grejanja od 10°C/min).¹⁷³ Otklon DTA krive (slika 3.11b) sa izraženim pikom na 375°C definiše termičku degradaciju, korišćenog PLLA.

Mikrostruktura površine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre toplog presovanja koja je prikazana na slici 3.13a ukazuje na postojanje visoke poroznosti sistema. Povećanjem temperature, gustina polimera PLLA se smanjuje.¹⁶⁸ Na temperaturi od 185°C (458K), PLLA se nalazi u rastopljenom stanju sa smanjenom gustinom u odnosu na stanje koje poseduje na sobnoj temperaturi. Pod uticajem povišenog pritiska od 98,1 MPa PLLA fino oblaže čestice HAp i relativno uniformno se raspoređuje oko čestica HAp. Ostvarena relativno uniformna raspodela HAp u matrici od PLLA uočava se i na SEM snimku prikazanom na slici 3.13b, odakle se može zaključiti da su čestice HAp fino raspoređene u matrici od PLLA.

Na slici 3.15 prikazan je DTA dijagram kompozita C3-0, C3-15 i C3-45. DTA kriva kompozita C3-0 sa slike 3.15 potiče od visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) koji nije kompaktiran toplim presovanjem. Uočava se endotermni pik na oko 176°C koji odgovara topljenju, nakon čega sledi drugi endotermni pik na oko 375°C uslovljen degradacijom polimera. Pojava gasovitih komponenata uočava se u intervalu od 460-500°C. DTA kriva kompozita C3-15 koji je dobijen kompaktiranjem toplim presovanjem tokom vremena od 15 minuta prikazana je na istoj slici. Toplo presovanje je izvršeno na temperaturi od 185°C koja je nešto viša od temperature topljenja PLLA (T_m). Na krivoj se uočava endotermni pik koji potiče od topljenja na oko 176°C kao i drugi endotermni pik na oko 375°C. Za razliku od krive

kompozita C3-0 na ovoj krivoj uočava se više oštih i dužih otklona koji se registruju u intervalu od 280-335°C, a potiču od nastalih gasovitih komponenti. Toplim presovanjem pri $T > T_m$ tokom 15 minuta došlo je do delimične rezgradnje PLLA. Kompaktiranje toplim presovanjem dovelo je do delimične razgradnje u osnovnom lancu PLLA, što rezultira u stvaranju gasovitih proizvoda već na 280°C. Kriva kompozita C3-45, na slici 3.15. potiče od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) dobijenog kompaktiranjem toplim presovanjem tokom 45 minuta. Uočava se da je DTA kriva sastavljena od niza otklona sa postojanjem već razmatranih na 176°C i 375°C. U poređenju sa drugim krivama, pojava više pikova potiče od prisustva niza proizvoda razgradnje PLLA.

PLLA je termički vrlo osetljiv polimer. Njegovu termičku stabilnost neophodno je definisati radi određivanja optimalnih parametara njegove prerade u odnosu na željena krajnja fizičko-hemijska svojstva. Tokom termičke degradacije polimera u najvećoj meri dolazi do raskidanja veza u osnovnom lancu što rezultira u stvaranju oligomernih fragmenata koji dalje podležu degradaciji.^{174, 175} Posledica ovog procesa je smanjenje molske mase polimera, a u kasnijim fazama degradacije nastaju monomeri i gasoviti produkti. Uz pomoć planarne konformacije PLLA i njegove osnovne strukture koja je definisana kao $(-O-CH(CH_3)-CO-)_n$ može se pretpostaviti gde dolazi do raskidanja veza u osnovnom lancu.²⁴ Termička degradacija PLLA je jednostepeni proces sa kinetikom reakcije prvog reda.¹⁷³ Prema predloženom modelu I. McNeil-a i H. Lepier-a termičke degradacije PLLA, kao krajnji produkti dobijaju se ciklični oligomeri, laktid, acetaldehid i ugljen monoksid.^{176, 177} Proces termičke degradacije diktiran je krajnjim OH grupama koje "napadaju" osnovni lanac, koji se pod uticajem termičke energije uvija. Na temperaturama koje su veće od 230°C može započeti ovakva vrsta reakcije.¹⁷⁸ U svakoj od ovih reakcija OH grupa se regeneriše i proces se nastavlja. U zavisnosti od mesta gde dolazi do "napada" OH grupe u osnovnom lancu dobijaju se različiti proizvodi. Proces konsolidacije toplim presovanjem pored povišene temperature karakteriše se povećanim pritiskom sistema u funkciji vremena. Saopštavanjem mehaničke energije sistemu dolazi do degradacije polimera po mehanizmima koji dovode do smanjenja dužine lanaca i molske mase polimera.¹⁷⁹ Polimer (statističko klupko) PLLA se tokom toplog presovanja deformiše i pod uticajem pritiska dovodi u blizak kontakt sa komponentom od HAp-a. Usled toga dolazi do smanjenja poroznosti sistema, što za posledicu ima direktno povećanje kompresione čvrstoće. Nakon što se sistem dovede do stanja maksimalne gustine (minimalne poroznosti), dalje produžavanje vremena delovanja povišene temperature i pritiska dovodi do promena u okviru PLLA na granici sa HAp-om. Povećani pritisak dovodi do deformacija u stističkom klupku PLLA. Dolazi do razaranja hemijskih veza na statističkim

određenim mestima i formiranja linearnijih formi. Linearnije forme mogu se rekombinovati i tako može doći do poboljšavanja određenih mehaničkih osobina.¹⁷⁹ Vreme delovanja se pored ostalih faktora pokazuje kao bitan faktor od koga zavisi stepen termičke i mehaničke degradacije a u ovom slučaju može se definisati kao vreme za koje polimer pod uticajem temperature i pritiska menja svoju strukturu i osobine. Na slici 3.16 prikazani su TGA rezultati koji su u skladu sa DTA ispitivanjima. Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dobijen nakon 45 minuta toplog presovanja pokazao je najmanju termičku stabilnost u poređenju sa drugim. Kao što je i naznačeno sa povećanjem vremena toplog presovanja utiče se na smanjenje toplotne stabilnosti PLLA u okviru HAp/PLLA. Najveću toplotnu stabilnost pokazao je čist PLLA koji nije toplo presovan, što je i prikazano na slici 3.16.

Vremenska zavisnost delovanja povišene temperature i pritiska koja dovodi u prvom redu do raskidanja veza u osnovnom lancu PLLA ogleda se u smanjenju molske mase. Određivanjem molske mase PLLA uzoraka A, B i C dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Molska masa PLLA uzoraka A, B i C¹⁴⁵

Uzorak	A	B	C
Molska masa PLLA (g/mol)	100000	41000 – 42000	12000 – 13000

Toplim presovanjem nakon 15 minuta dobijen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa PLLA molske mase 41000-42000 g/mol. Produženjem vremena toplog presovanja dolazi do daljeg smanjenja molske mase PLLA, pa se nakon 45 minuta dobija kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa PLLA molske mase 12000-13000 g/mol.

Tokom konsolidacije toplim presovanjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dolazi do termo-mehaničke destrukcije koja se manifestuje na promene u strukturi i osobinama PLLA.

Difrakcioni spektri PLLA, dobijenih potpunim rastvaranjem u hloroformu i hladno presovanih (sl. 3.17a), pokazuju njegov karakterističan izgled na kome pored širokog pika svojstvenog za odziv amorfne faze dominira difrakciona linija na $16,89^{\circ}$, kao i tri manje izražene na $15,41^{\circ}$; $19,11^{\circ}$ i $22,43^{\circ}$. Istovetni rezultati su u skladu sa rendgenostrukturnim ispitivanjima PLLA i drugih autora.²⁹

U skladu sa fitovanim rendgenostrukturnim rezultatima koji su prikazani na slici 3.19 kompjuterskom analizom došlo se do podataka o naznačenim pikovima koji potiču od HAp i PLLA.

Pik broj 1 koji se nalazi na uglu od $16,7^\circ$ pripada PLLA, dok pikovi 2 i 3 potiču od HAp. U tabeli broj 4.2, a u skladu sa sl. 3.19 prikazane su vrednosti pikova 1, 2 i 3 koji potiču od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre i nakon 60 minuta toplog presovanja.

Tabela 4.2. Osnovne numeričke vrednosti pikova

oznaka materijala	broj pika	položaj centra	širina na poluvisini	% površine
HAp/PLLA pre toplog presovanja	1	16,66	0,400	64,80
	2	16,87	0,118	14,33
	3	16,91	0,135	20,85
HAp/PLLA nakon 60 min top. presovanja	1	16,66	0,325	37,73
	2	16,87	0,141	28,11
	3	16,91	0,148	34,15

Poređenjem slika 3.19a i b i vrednosti iz tebele 4.2 uočava se smanjenje intenziteta kao i promena oblika pika broj 1, koji potiče od PLLA. Analizom rezultata prikazanih u tabeli 4.2, uočava se da pik broj 1 učestvuje u ukupnoj površini tripleta sa 64,8 %. Nakon toplog presovanja od 60 minuta površina mu se smanjuje za 1,6 puta i to na 37,7 %. Takođe oblik pika se menja, tako da njegova širina na poluvisini pre toplog presovanja iznosi 0,400 nm, a nakon 60 minuta toplog presovanja ona je 0,325 nm. Navedeni rezultati ukazuju da tokom toplog presovanja dolazi do značajne promena kristaliničnosti PLLA. Nakon 60 minuta toplog presovanja dolazi do smanjenja kristaliničnosti PLLA, a samim tim potencijalno se povećava njegova bioresorbilnost u *in vivo* uslovima.

Da bi se dobila potpunija analiza uočene kvantitativne promene stepena kristaliničnosti, sa vremenom toplog presovanja, urađena su DSC ispitivanja koja su prikazana na slikama 3.20 i 3.21. Sumarnim posmatranjem DSC krivih (slika 3.21), i pored izvesnih sličnosti, uočavaju se značajne promene u obliku, mestu nastajanja i površini pikova topljenja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA zavisno od uslova procesiranja.

Registrovan je uticaj vremena toplog presovanja na temperaturu topljenja, entalpiju topljenja i stepen kristaliničnosti PLLA. Stepem kristaliničnost polimera (χ_c) je izračunat kao količnik entalpije topljenja ΔH_{TM} i entalpije topljenja 100% kristaliničnog PLLA koja iznosi 93,7 J/g.¹²⁸

U tabeli broj 4.3 prikazani su dobijeni rezultati za temperature topljenja T_m , entalpije topljenja ΔH_{TM} i stepene kristaliničnosti χ_c čistog PLLA kao i PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala pre i nakon 30 i 60 minuta toplog presovanja, a na osnovu slike 3.20.

Tabela 4.3. Osobine PLLA dobijene analizom DSC ispitivanja za brzinu grejanja 20 K/min

Uzorak	T_m (K)	ΔH (J/g)	χ_c (%)
PLLA	451,7	50,2	53,5
HAp/PLLA pre toplog presovanja	450,9	44,1	46,9
HAp/PLLA 30 min toplog presovanja	447,8	45,3	48,3
HAp/PLLA 60 min toplog presovanja	445,2	32,4	34,5

Na osnovu slike 3.21 i tabele 4.3 uticaj toplog presovanja na naznačene osobine PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA takođe se uočavaju. Nakon 30 minuta toplog presovanja visoko poroznog HAp/PLLA dobijen je kompaktniji kompozitni biomaterijal (sa PLLA čija je $T_m=447,8$ K, $\Delta H_{TM}=45,3$ J/g i $\chi=48,3$ %). Tokom toplog presovanja usled smanjene gustine i lakšeg tečenja PLLA oko čestica HAp, a pod dejstvom povišenog pritiska dolazi do smanjenja poroznosti i poboljšanja mehaničkih osobina. Usled delovanja termo-mehaničkih faktora tokom toplog presovanja dolazi do kidanja lanaca a time i smanjenja molske mase PLLA. Ovo će se odraziti na promenu stepena kristaliničnosti (koji je nešto veći u slučaju kristalizacije HAp/PLLA dobijenog toplim presovanjem od 30 minuta) i temperature topljenja datog kompozita.

Toplo presovanje od 60 minuta ima najizraženiji uticaj na osobine analiziranog PLLA u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Nakon 60 minuta toplog presovanja dobijen je HAp/PLLA sa PLLA kod koga je $T_m=445,2$ K, $\Delta H_{TM}=32,4$ J/g i $\chi=34,5$ %. Dobijena entalpija topljenja i stepen kristaliničnosti su značajno manji nego u slučaju nepresovanog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA, kao i onog koji je dobijen nakon 30 minuta toplog presovanja. Ovi rezultati su u skladu sa ranije prikazanim WAXS ispitivanjima. Nakon 30 minuta toplog presovanja dobijeni su blokovi sa poroznošću od $1,4 \pm 0,2\%$. Toplim presovanjem nakon 60 minuta dobijeni blokovi poseduju gustinu koja je bliska potpuno gustom stanju sa poroznošću od $0,4 \pm 0,2\%$. Pored ranije navedenih faktora, najverovatnije je da i postojanje poroznosti utiče na mehanizam kristalizacije i registrovane promene entalpije topljenja i stepena kristaliničnosti. Osobine PLLA kao što je molska masa, toplotni kapacitet, gustina, veličina kristalita i njegova perfekcija imaju uticaja na promene T_m , a njihov uticaj nije bio predmet ovih istraživanja.¹⁶²

Mogućnost smanjenja kristaliničnosti PLLA komponente pod uticajem visokog pritiska u prisustvu čestica HAp naznačen je i od strane drugih autora. Utvrđeno je da dolazi do smanjenja kristaliničnosti PLLA u odnosu na čist, i formiranja većih amorfnih regiona tako što čestice HAp pod uticajem pritiska utiču na razdvajanje i smanjenje kristalnih regiona PLLA.¹²⁸

U poređenju sa čistim PLLA, PLLA iz kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA na temperaturama do 200°C pokazuje veću stabilnost, što se i uočava na slici 3.22. Razlog ovome se u najvećoj meri objašnjava time da čestice HAp koje se nalaze u kompozitu sa PLLA predstavljaju barijeru u prenosu toplote kao i šupljine koje uslovljavaju poroznost sistema zbog razlike u koeficijentima prolaza toplote.¹⁸⁰ Zbog nestacionarnosti provođenja toplote u posmatranom temperaturskom intervalu čestice HAp i poroznost uslovljavaju postojanje prividno veće vrednosti termičke stabilnosti PLLA. Nakon 200°C pri brzini grejanja od 20°C/min najverovatnije dolazi do stacionarnijeg prenosa toplote kroz uzorak i termičke degradacije PLLA do potpunog gubitka mase. Termička stabilnost analiziranih PLLA iz kompozita je različita i ona se smanjuje sa povećanjem vremena toplog presovanja. Najmanju stabilnost pokazuje PLLA iz kompozitnog biomaterijala koji je dobijen nakon 60 minuta toplog presovanja. 100 % gubitak mase ovog PLLA je registrovan na temperaturi od 360°C. Najvišu stabilnost poseduje čisti PLLA čiji 100 % gubitak mase se registruje na 435°C (slika 3.22).

Spektar kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pre toplog presovanja sačinjen je od spektralnih linija koje potiču od konstitutivnih komponenti HAp i PLLA. PLLA se karakteriše apsorpcionom trakom na 1760 cm^{-1} koja potiče od valentnih vibracija (C=O) grupe, deformacionim vibracijama na 1386 i 1453 cm^{-1} od (CH₃) grupe i valentnim vibracijama na 2986 i 2933 cm^{-1} od (C-H) grupe. HAp karakteriše triplet apsorpcionih traka na 626, 600 i 566 cm^{-1} koje potiču od (OH) grupa, dublet na 1093 i 1040 cm^{-1} od (PO₄) grupa i apsorpciona traka na 3573 cm^{-1} koja potiče od (OH) grupe.^{140, 181} Nakon toplog presovanja na 459K tokom 30 i 60 minuta, na osnovu IR spektara prikazanih na slici 3.24 može se uočiti da nije došlo do formiranja novih komponenti i nestanka PLLA. Promene koje su se dešavale u PLLA tokom 30 i 60 minuta toplog presovanja uglavnom su vezane za ranije definisano smanjenje molske mase i promena tačke i entalpije topljenja kao i stepena kristaliničnosti. Na osnovu IR analize, kao i predhodnih WAXS i DSC merenjima utvrđeno je da nije došlo do kvalitativnih promena tokom toplog presovanja i da kompozitni biomaterijal HAp/PLLA nakon 60 minuta toplog presovanja u sebi sadrži konstitutivne komponente HAp i PLLA sa kontrolisanim promenama.

4.1.5 Uticaj toplog presovanja na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA

Varijacijom osnovnih parametara toplog presovanja dobijen je čitav spektar blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa različitim osobinama.^{136, 146}

Gustina tj. poroznost blokova uslovljava mehaničke osobine, kao što su kompresiona čvrstoća i modul elastičnosti. Nesumljivo je da postoji uzajamna zavisnost ove tri veličine. Uticaj poroznosti na mehaničke osobine je poznat i definisan, tako što sa smanjenjem poroznosti rastu mehaničke karakteristike. Na slici 3.25. prikazana je relativna gustina blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dobijenih za različita vremena, toplim presovanjem. Kod svih vrsta kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA uočava se da sa povećanjem vremena toplog presovanja raste relativna gustina. Dve grupe krivih na sl. 3.25 se uočavaju. Prvu grupu, predstavlja kompozitni biomaterijali HAp/PLLA sa veličinom HAp granula od 0,5-0,7mm (C5-C8), a drugu sa HAp česticama veličine oko 100 nm (C1-C4). U slučaju kompaktiranja kompozita sa prahom HAp (C5-C8) već posle 30 minuta dobijaju se blokovi sa maksimalnom gustinom od 99,6%, koja se ne menja i nakon 60 minuta toplog presovanja. U slučaju kompaktiranja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa HAp granulama (C5-C8) maksimalna gustina iznosi 98,4% nakon 60 minuta toplog presovanja. Uočena razlika između maksimalnih gustina kompaktiranih blokova posledica je postojanja određene poroznosti prisutne u granulama HAp.

Zavisnost kompresione čvrstoće od vremena toplog presovanja prikazana je na slici 3.26. Kod svih vrsta kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa povećanjem vremena toplog presovanja, povećava se kompresiona čvrstoća. Sistem sa manjim česticama HAp od oko 100nm i PLLA molske mase 430000 g/mol (C1), u odnosu na druge sisteme, pokazuje najviše vrednosti kompresione čvrstoće, koja za 60 minuta toplog presovanja dostiže vrednost od 140,0 MPa. Poređenjem rezultata kompresione čvrstoće kompozitnih biomaterijala C1-C8 uočava se uticaj veličina čestica HAp, molske mase PLLA, pritiska i temperature toplog presovanja na mehaničke osobine. Sa manjim česticama jednog te istog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA (C2 i C6), a pri istim uslovima pritiska i temperature kompaktiranja dobijaju se više vrednosti kompresione čvrstoće.

Za iste uslove kompaktiranja i istu veličinu čestica, uočava se postojanje uticaja molske mase na kompresionu čvrstoću materijala. Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa PLLA više molske mase (C2 i C4) pokazuje više vrednosti kompresione čvrstoće od sistema kod koga je

PLLA niže molske mase. Promena pritiska toplog presovanja takođe ima uticaj na dobijenu kompresionu čvrstoću blokova. Kompresiona čvrstoća iste vrste kompozitnog biomaterijala (C5 i C6) kompaktnog pri istim uslovima toplog presovanja, ali na različitim pritiscima je različita. Kod kompaktnog vršenog na višem pritisku (C5) dobijene su i više vrednosti kompresione čvrstoće (od C6). U navedenim slučajevima kompaktno je vršeno na temperaturi topljenja polimera PLLA. Kompoziti C1 i C3 su kompaktni na temperaturi koja je za 10K viša od temperature topljenja datog polimera. Blokovi kompozitnog biomaterijala kompaktni na ovim temperaturama poseduju više vrednosti kompresione čvrstoće (C1 i C3), nego isti dobijeni pri nižoj temperaturi (C2 i C4).

Na slici 3.27 prikazani su moduli elastičnosti blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Najviši moduli su zabeleženi kod blokova koji imaju najviše vrednosti kompresione čvrstoće i relativne gustine (C1) i nakon 60 minuta kompaktnog on iznosi 10,0 GPa. Najniže vrednosti modula su zabeležene nakon kompaktnog blokova sa najnižim vrednostima kompresione čvrstoće i relativne gustine. Na primer, nakon 60 minuta toplog presovanja kompozita C8 dobijeni su blokovi sa modulom elastičnosti od 5,7 GPa. Povećanje modula elastičnosti posledica je i konformacione promenljivosti lanaca PLLA, odnosno gipkosti (krutosti). Fenomeni relaksacije lanaca PLLA koji su vremenski zavisni, takođe utiču na ove promene.

Na slici 3.28 a prikazana je mikrostruktura prelomne površine kompozita C1 pre toplog presovanja. Uočava se matriks od PLLA u kome su smeštene međusobno odvojene čestice HAp. Jedna čestica HAp radi uočavanja je zaokružena krugom. Polimerni PLLA matriks ima porozan i mrežast oblik, sa sfernim porama, koje biomaterijalu daju visoku poroznost. Kod kompozita C7 pre toplog presovanja granule HAp su takođe smeštene u kontinualnu matricu od PLLA, prikazanu na slici 3.28b. Za razliku od slike 3.28a, ovde je HAp komponenta sa znatno većom veličinom čestica i sačinjena je od granula veličina 0,5-0,7 mm. Granule su smeštene u matricu od polimera PLLA i međusobno su odvojene. Tokom kompaktnog toplim presovanjem dolazi do smanjenja poroznosti sistema i intimnijeg kontakta komponentata HAp i PLLA. Pošto se toplo presovanje odigrava na temperaturama koje predstavljaju temperaturu topljenja PLLA, kompaktno je olakšano s obzirom da je PLLA rastopljen, a komponente se tokom vremena približavaju jedna drugoj. Na slici 3.28c prikazana je mikrostruktura prelomne površine kompozita C7, dobijenog tokom 15 minuta toplog presovanja. Uočava se deo granule HAp (u desnom delu slike) i polimer PLLA koji u gornjem delu granule je prekriva. PLLA nije u bliskom kontaktu sa HAp, što se i uočava kao delimično prazan prostor označen strelicom na međufaznoj površini HAp-PLLA. Nakon toplog presovanja kompozita C7 tokom 15 minuta nije došlo do potpuno

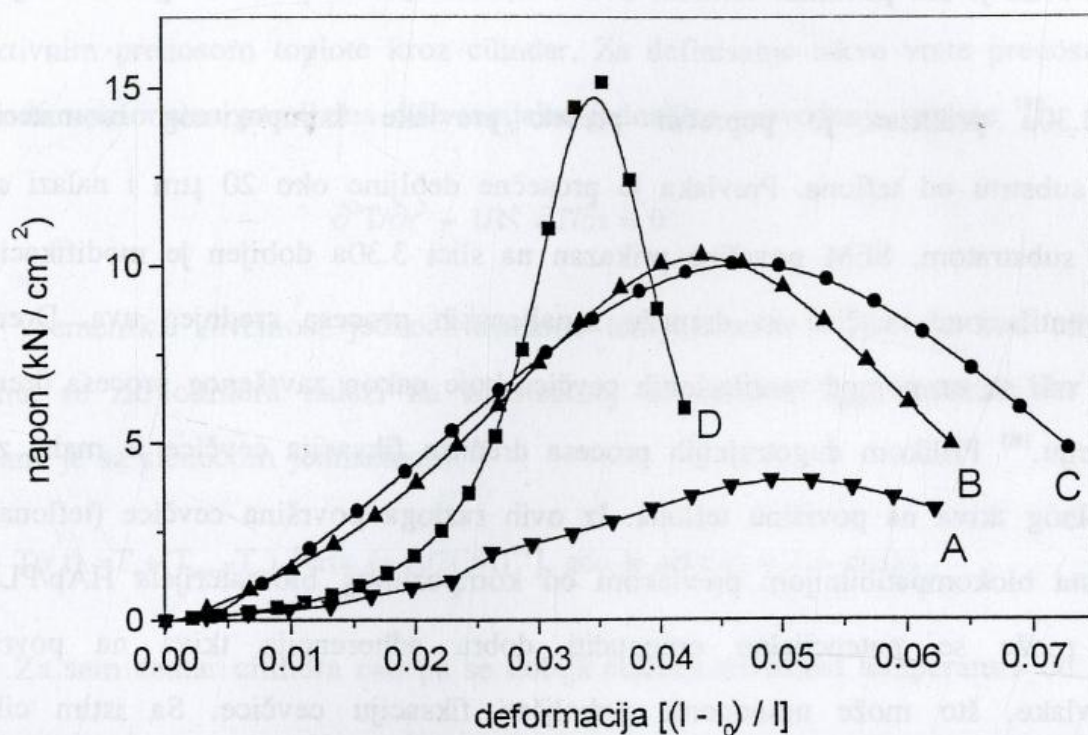
intimnog kontakta konstitutivnih komponenti što se je i odrazilo na ranije pomenutu gustinu i kompresionu čvrstoću od 95% i 54,8 MPa (slika 3.25 i 3.26). Na slici 3.28d prikazana je mikrostruktura kompozita C3 nakon 15 minuta toplog presovanja. Sa slike se uočavaju pore prosečnog prečnika oko 400 μm koje su nasumice raspoređene u unutrašnjosti. Slika 3.28e prikazuje deo PLLA koji je nakon 30 minuta toplog presovanja kompozita C7, očvrsnuo na granuli HAp. Na slici 3.28f prikazana je mikrostruktura kompozita C1, nakon 60 min toplog presovanja. Gotovo bezporozan sistem gustine 99,6%, sa kompresionom čvrstoćom od 140 MPa daje mikrostrukturu prelomne površine sa dosta bliskim kontaktom HAp čestica i PLLA. Sferne čestice HAp su smeštene u matricu od PLLA, a jedna čestica radi uočavanja HAp je zaokružena krugom. Čestice HAp su u poređenju sa slikom 3.28a dosta bliskije, što se i odrazilo na smanjenje poroznosti i povećanje kompresione čvrstoće. Prilikom kvalitativne analize svih mikrostruktura dobijenih SEM-om korišćen je EDX sistem, koji je potvrdio raspored komponentata HAp i PLLA.

Kao što je i naznačeno u ovim istraživanjima dobijene su maksimalne vrednosti kompresione čvrstoće koja je bliska kompresionoj čvrstoći prirodnih kostiju. Odredene grupe autora su na istim ili sličnim sistemima ostvarile sintezu blokova sa dosta različitim vrednostima maksimalne kompresione čvrstoće, što se može uočiti iz tabele 4.4.

Tabela 4.4. Kompresiona čvrstoća maksimalno ostvarena do sada HAp/polimer kompozitnih biomaterijala

kompozit	kompresiona čvrstoća (MPa)	autor, referenca
HAp/polilaktidglikol	3,0	L. Lu i sr. [28]
HAp/poli-l-laktid	137,0	C. Verheyen i sr. [182]
HAp/poli-l-laktid	140,0	N. Ignjatović i sr. [137, 146]
HAp/poli-l-laktid	143,0	Y. Shikinami i sr. [128]
humerus (arm bone)	132,0	J. Park, [6]
radius (arm bone)	149,0	J. Park, [6]

Prilikom određivanja kompresione čvrstoće, dobijene su grafičke zavisnosti napon – deformacija, za svaki kompozit ponaosob. Na slici 4.3. prikazana je dobijena zavisnost za kompozit sa najnižim (C8) i najvišim (C1) mehaničkim karakteristikama.



Slika 4.3. Dijagram napon – deformacija, za kompozitne biomaterijale HAp/PLLA: A- kompozit C8, toplo presovan 5 minuta, B- kompozit C1, toplo presovan 5 minuta, C- kompozit C8, toplo presovan 60 minuta, D-kompozit C1, toplo presovan 60 minuta

Nakon 5 minuta toplog presovanja kompozita C8 dobijena je kriva A sa lomom koji je izrazito plastičan. Kriva C potiče od istog kompozita, dobijenog nakon 60 minuta toplog presovanja a lom ima osobine plastično – krto g loma. Kriva B potiče od kompozita C1 toplo presovanog 5 minuta i takođe poseduje plastično – krto g lom. Nakon 60 minuta toplog presovanja kompozita C1 dobijena je zavisnost napon – deformacija definisana krivom D koja ima sva obeležja krto g loma. Očigledan je uticaj vremena toplog presovanja, tj poroznosti i mehaničkih osobina, na vrstu loma blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Na taj način se može uspostaviti niz (A-B-C-D) po vrsti deformacije i loma, koji počinje izrazito plastičnim, a završava se krto m lomom.

4.1.6 Diskusija rezultata deponovanih prevlaka

Na substratu od Ti nanešena je prevlaka kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) čija je mikrostruktura prikazana na slici 3.29a. Polimerna komponenta prevlake PLLA raspoređena je u obliku mreže, a čestice HAp nalaze se u okviru PLLA. Ovako dobijena relativno hrapava i mrežasta mikrostruktura površine potencijalno može poslužiti za naseljavanje ćelija osteoblasta tokom aplikacije prevlake.¹³⁶ U cilju funkcionalne modifikacije površine kompozitna prevlaka

HAp/PLLA(430) nanešena je na površinu teflona, a ova mikrostruktura površine prikazana je na slici 3.29b.

Na slici 3.30a prikazan je poprečni presek prevlake kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100) na substratu od teflona. Prevlaka je prosečne debljine oko 20 μm i nalazi se u bliskom kontaktu sa substratom. SEM površine prikazan na slici 3.30a dobijen je modifikacijom površine teflonske ventilacione cevčice za drenažu zapaljenskih procesa srednjeg uva. Drenaža zapaljenskih procesa vrši se uz pomoć ventilacionih cevčica koje nakon završenog procesa drenaže omogućavaju ventilaciju.¹⁸³ Prilikom dugotrajnijih procesa drenaže fiksacija cevčice je mala, zbog loše adhezije okolnog tkiva na površinu teflona. Iz ovih razloga površina cevčice (teflona) je modifikovana sa dosta biokompatibilnijom prevlakom od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Na ovakav način može se potencijalno omogućiti dobra adhezija tkiva na površinu biokompatibilne prevlake, što može umnogome poboljšati fiksaciju cevčice. Sa istim ciljem deponovana je prevlaka trokomponentnog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(100)/kolagen na supstrat od titana čija mikrostruktura je prikazana na slici 3.30b. Sa slike se uočavaju čestice HAp veličine oko 100 nm koje se aglomerišu u veće. Čestice se nalaze po površini PLLA a kvalitativan sastav analiziranih faza potvrđen je EDS ispitivanjem. Na osnovu slika 3.29 i 3.30 može se uočiti da molska masa PLLA utiče na mikrostrukturu površine. Kompozitna prevlaka HAp/PLLA sa PLLA više molske mase (430000 g/mol) formira kontinualnu mrežu sa uglavnom petugaonim i šestougaonim perforacijama. Ovih perforacija nema u slučaju kompozitne prevlake sa PLLA niže molske mase (100000 g/mol), već PLLA formira tanak sloj koji je kontinualan.

4.1.7. Modelovanje fenomena prenosa toplote tokom toplog presovanja

Vreme toplog presovanja, pored pritiska ima vrlo značajnu ulogu u dizajniranju osobina i svojstava kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Dobijeni eksperimentalni podaci potvrdili su i definisali način delovanja vremena toplog presovanja na strukturu i osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Pored dobijenih rezultata u ovim istraživanjima ispitana je mogućnost primene *teorije efektivnog medijuma* za definisanje procesa toplog presovanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u cilju dizajniranja njegovih osobina. Teorija efektivnog medijuma do sada je primenjena na niz različitih kompozita sa komponentama koje se međusobno dosta razlikuju, a u cilju modelovanja njihovih osobina.¹⁸⁴ Uzorak kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA dobijen toplim presovanjem u cilindričnom kalupu definisan je cilindričnim oblikom. Iz tih razloga prenos

toplote kroz kompozitni biomaterijal HAp/PLLA tokom dizajniranja toplim presovanjem, opisan je konduktivnim prenosom toplote kroz cilindar. Za definisanje takve vrste prenosa toplote korišćena je jednodimenzionalna parcijalna diferencijalna jednačina provođenja toplote¹⁸⁵

$$\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} - \frac{1}{\aleph} \frac{\partial T}{\partial t} = 0 \quad (4.2)$$

Vremenska zavisnost jednodimenzione temperaturske raspodele kod cilindra prečnika $2a$, pri čemu se zid cilindra nalazi na konstantnoj temperaturi T_{\max} , unutrašnjost na temperaturi T_0 definisana je sa sledećom jednačinom.¹⁸⁵

$$T(r,t) = T_0 + (T_{\max} - T_0) [\operatorname{erfc} (a-r)/2(\aleph t)^{1/2}], \text{ gde je } \operatorname{erfc}(x) = 1 - \operatorname{erf}(x) \quad (4.3)$$

Za sam centar cilindra $r=0$ pa se dobija sledeća zavisnost temperature od vremena:

$$T(r=0, t) = T_0 + (T_{\max} - T_0) [\operatorname{erfc} a/2(\aleph t)^{1/2}] \quad (4.4)$$

Oznake u jednačinama definisane su sledećim promenljivim: t vreme presovanja, k koeficijent toplotne provodnosti, a poluprecnik cilindra, T_{\max} temperatura presovanja, T_0 početna temperatura; \aleph koeficijent toplotne difuzivnosti ($\aleph = k/\rho C_p$), C_p toplotni kapacitet, ρ gustina.

Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sastoji se od komponenti HAp i polimera PLLA kao i pora, koje imaju različite vrednosti toplotnih kapaciteta i koeficijenata prenosa toplote.^{180, 186, 187} Teorija efektivnog medijuma omogućava da se sistem sa više komponenti različitih osobina prikaže kao jednokomponentni koji ima efektivne vrednosti toplotnih parametara. Efektivna vrednost toplotne difuzivnosti definisana je teorijom efektivnog medijuma kao:¹⁸⁴

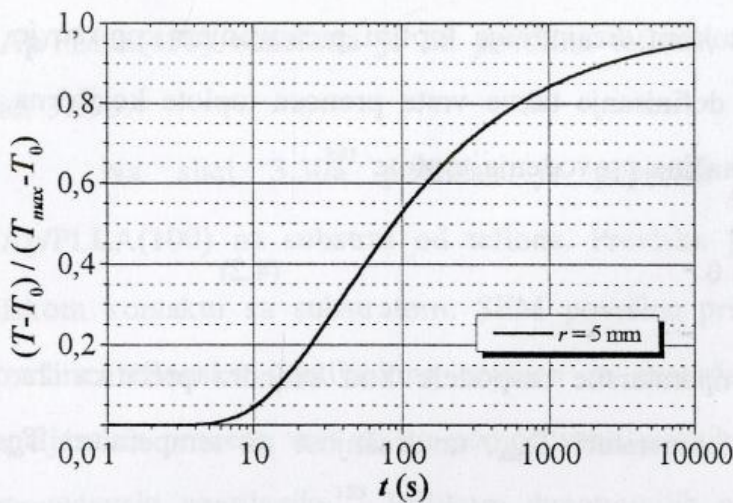
$$\aleph_{\text{eff}} = (\sum l_i)^2 / \sum (l_i / \aleph_i) [1 + k_i (\sum l_j / k_j + \sum R_j)] \quad (4.5)$$

Član $\sum R_j$ predstavlja sumu otpora koji se javljaju tokom prenosa toplote kroz međufaznu površinu i on se u daljim proračunima zanemaruje. U našem slučaju sa sistemom koji se sastoji od komponente 1 HAp i komponente 2 PLLA dobija se:

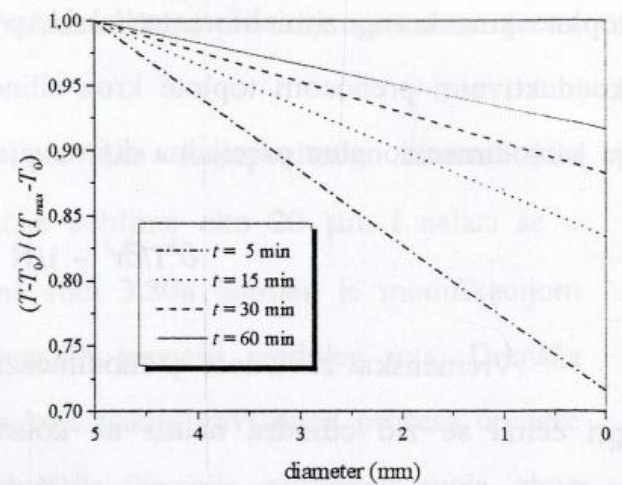
$$\aleph_{\text{eff}} = 1 / [(u^2 / \aleph_1) + (1-u)^2 / \aleph_2 + u(1-u)(k_1/k_2 \aleph_1 + k_2/k_1 \aleph_2)] \quad (4.6)$$

u predstavlja zapreminski udeo komponente 1, $u=V_1/V$ i $(1-u)=V_2/V$

Na slici 4.4 prikazana je dobijena zavisnost temperature sa vremenom toplog presovanja u centru cilindra (kalupa). Promene temperature duž cilindra (kalupa) u zavisnosti od mesta u cilindru prikazana je na slici 4.5 za vremena toplog presovanja od 5, 15, 30 i 60 minuta.



Slika 4.4. Promena temperature tokom vremena u sredini cilindra toplog presovanja



Slika 4.5. Promena temperature duž cilindra tokom toplog presovanja

Zavisnost je dobijena za poluprečnik kalupa od 5 mm. Uočava se da je na početku toplog presovanja središnji deo na temperaturi T_0 , dok tokom vremena temperatura raste (slika 4.4). Nakon vremena toplog presovanja od 2000 s temperatura središnjeg dela se asimptotski približava temperaturi zida kalupa. Za kalupe šireg prečnika ($r > 5 \text{ mm}$) kriva se pomera u desno i obrnuto. Tokom toplog presovanja dolazi do prolaza toplote od zida kalupa ka njegovoj unutrašnjosti. Ako se posmatra poprečni presek, normalan na osu cilindra, dobija se zavisnost temperature duž prečnika, od mesta na zidu cilindra ($r=a$) do ose ($r=0$) koja je prikazana na slici 4.5. Zid kalupa ($r=5$) se nalazi na temperaturi presovanja (T_{\max}) i ona je stalna. Tokom toplog presovanja sa povećanjem vremena toplog presovanja od 5 minuta na 15, 30 i 60 krive temperaturne zavisnosti, smanjuju nagib. Očekivano je da sa produžetkom vremena toplog presovanja temperatura unutar cilindra približava se temperaturi zida kalupa.

Primenjena *teorija efektivnog medijuma* podrazumeva da su otpori koji se javljaju u međufaznoj površini zanemarljivo mali. SEM analizom prelomnih površina (sl. 3.28) kompozitnog biomaterijala HAP/PLLA može se uočiti da u međufaznoj površini ima poroznosti koja može biti predstavljena otporom. Tokom toplog presovanja na povišenim pritiscima osobine faza (koeficijent prolaza toplote, gustina, toplotni kapacitet) nisu konstantne. Da bi se proces toplog presovanja mogao realno matematički modelovati uz primenu teorije efektivnog medijuma, neophodno bi bilo uzeti u obzir naznačene potencijalne promene.

4.2 Diskusija in vitro i in vivo istraživanja

4.2.1 In vitro istraživanja

In vitro istraživanja u prvom redu odnosila su se na promene pH fiziološkog rastvora u kome se nalazio kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430) i koje su prikazane na sl. 3.31. Naglo smanjenje pH fiziološkog rastvora u toku početnog perioda testiranja za oba sistema je posledica oslobađanja kiselih produkata iz PLLA.¹²⁷ Međutim razlog za ovakve promene pH nalazi se i u činjenici da se produkti razgradnje ne odvođe iz sistema, već ostaju u njemu.³³
¹⁴¹ U *in vivo* uslovima produkti razgradnje se odvođe iz okoline kompozita, a proces degradacije se vrši i uz pomoć enzima, što procesu degradacije daje složeniji smisao.

Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije kalcijuma u fiziološkom rastvoru atomskom apsorpcijom, tokom tretmana kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430), prikazani su na slici 3.32. Uočava se da koncentracija kalcijuma u rastvoru, sa vremenom izlaganja HAp/PLLA(430) fiziološkom rastvoru, raste. Povećanje koncentracije kalcijuma u rastvoru potvrđuje njegov prelaz iz čvrste komponente HAp u rastvor. Količina kalcijuma se sa vremenom tretmana povećava, a rezultati SEM analize ukazuju da je njegovo poreklo sa granula HAp. Najverovatnije je da dolazi do jonske izmene između Ca^{2+} iz HAp i Na^+ iz fiziološkog rastvora.

Razmatranjem SEM rezultata prikazanih na slici 3.33 koji ukazuju da je do degradacije i promena došlo samo na površini uzorka, ali ne i u njegovoj unutrašnjosti, tako da se može pretpostaviti potencijalni scenario primene kompozitnog biomaterijala, HAp/PLLA. Najpre u prvoj fazi, živi organizam isključivo dolazi u interakciju sa površinom biomaterijala što u ovom slučaju predstavlja PLLA. Svi fenomeni koji se tada dešavaju direktno su vezani za fizičko-hemijske osobine PLLA. Tek nakon površinskog rastvaranja PLLA dolazi do druge faze u kojoj preovladava interakcija živog organizma sa HAp. Ova dva fenomena se u kasnijim fazama međusobno preklapaju.

Sa slike 3.34 uočava se da obe vrste kompozitnog biomaterijala ne menjaju kompresionu čvrstoću tretmanom na 310K u fiziološkom rastvoru ni posle 80 dana. Step en bubrenja takođe potvrđuje stabilnost oba kompozitna biomaterijala u toku 80 dana. Uočava se da je kompresiona čvrstoća kompozitnog biomaterijala sa PLLA molske mase 50000 g/mol niža nego sa PLLA molske mase 430000 g/mol, što je i očekivano. Potrebno je naglasiti da je tretman vršen u statičkim uslovima i da tokom tretmana uzorci nisu bili izloženi nikakvim naprezanjima i opterećenjima. Ukupna poroznost oba kompozitna biomaterijala HAp/PLLA dobijena toplim

presovanjem ne prelazi 4%. Ovako mala poroznost onemogućila je bržu difuziju fiziološkog rastvora tokom 80 dana tretmana u unutrašnjost kompozitnog biomaterijala. Spora difuzija fiziološkog rastvora onemogućila je potencijalnu hidrolizu PLLA, a time i prouzrokovala mehaničku stabilnost kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA obe molske mase.

4.2.2 In vivo istraživanja

Analiza različitih i složenih proteinskih sistema uspešno je obavljena primenom FT-IR spektroskopije.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Primenjenom FT-IR spektroskopijom analizirani su kompozitni biomaterijali HAp/PLLA(50) i HAp/PLLA(430).^{140, 141} FT-IR spektar dobijen analizom uzoraka kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) nakon 1 nedelje in vivo ispitivanja prikazan je na slici 3.36a. Na spektru se uočavaju ranije prisutne apsorpcione trake koje potiču od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50), a definisane su na slici 3.35 a. Pored ranije prisutnih apsorpcionih traka prisutne su i novonastale. Uočava se pojava novih traka koje se javljaju kao široka apsorpciona traka u oblasti $3000-3630\text{ cm}^{-1}$, i takođe oštre apsorpcione trake u području $1470-1870\text{ cm}^{-1}$.

Proces zarastanja kostiju obuhvata u osnovi period inflamacije, reparacije i remodeliranja.⁹⁵ Obavljena istraživanja su usmerena na fazu reparacije u toku koje dolazi do promena bitnih za sintezu i primenu kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Početak faze stvaranja kolagena označen je porastom koncentracije glukozoaminglukana, sekundarnog amina koji u svojoj strukturi poseduje NH grupu.⁸⁹ Sinteza kolagena odvija se enzimskim putem a počinje formiranjem polipeptidnih kraćih lanaca. Formiraju se dve vrste polipeptida pro- α 1 i pro- α 2, koji se enzimski sintetišu u najvećoj meri od α -amino kiseline serina, prolina i hidroksprolina.⁹⁶ Ove amino kiseline su međusobno povezane peptidnom vezom (NH-CO). Iz ovih razloga najčešće je u kolagenu prisutna sekvenca aminokiselina -glicin-prolin-hidroksprolin-. Tri polipeptidna lanca formiraju prokolagen koji se peptidazama pretvara u tropokolagen. Kolagenska vlakna se formiraju iz tropokolagena.⁹⁶ Sintezi kolagena je moguće kvantifikovati praćenjem pojave prolina, njegovog obeležavanja i prepoznavanja u fazama sinteze kolagena.¹⁸⁸ Prema predloženoj metodologiji analize FT-IR spektara proteinskih struktura, prvo je neophodno uočiti apsorpcione trake koje potiču od valencionih $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibracija tzv. amid I traka, koje se javljaju na oko 1650 cm^{-1} .¹⁶⁴ Amid I trake uglavnom potiču od valencionih $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibracija koje se kupluju sa deformacionim $\delta(\text{N-H})$ vibracijama. Amid II trake uglavnom potiču od deformacionih $\delta(\text{N-H})$ vibracija koje se kupluju sa valencionim $\nu(\text{C-N})$ vibracijama.¹⁶⁴ Poznato je naime da proteinski molekuli u prvom redu kolagen

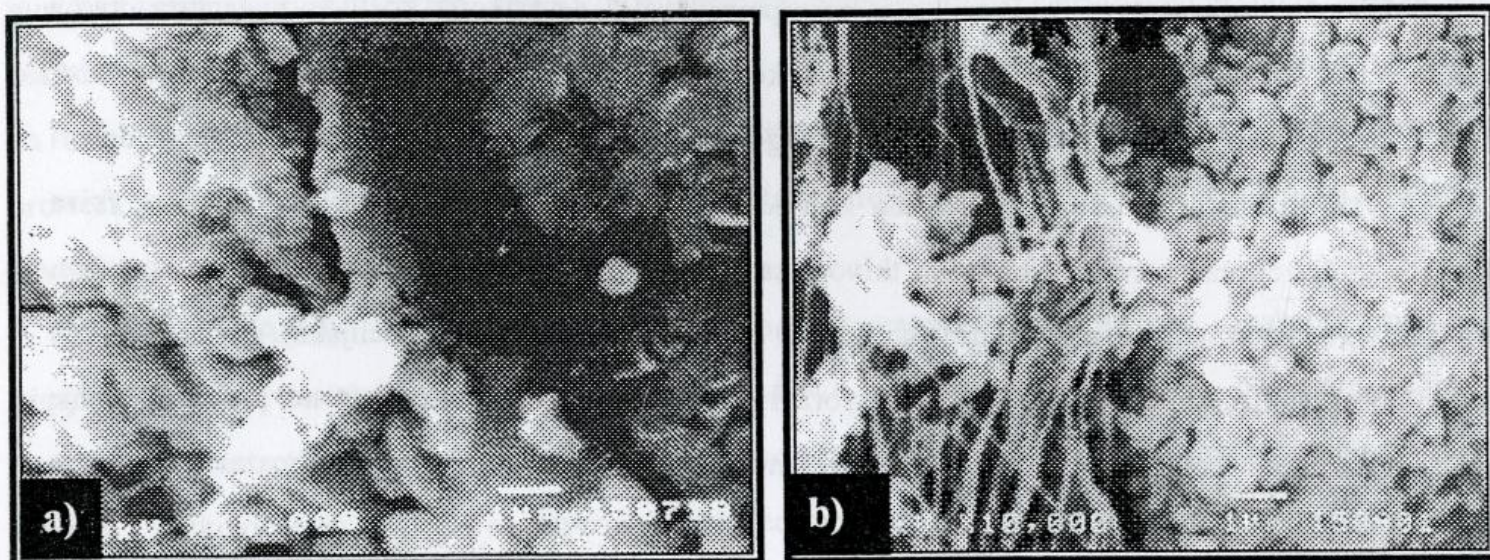
u spektralnom području od 1500-1700 cm^{-1} poseduju amid I i II traku. Sekundarni amini poseduju jednu valencionu apsorpcionu traku od NH grupe srednjeg do slabog intenziteta na 3350-3300 cm^{-1} ili 3450 cm^{-1} .¹⁹¹ Na slici 3.36a uočava se amid I traka na oko 1650 cm^{-1} . Na istoj slici ne uočavaju se apsorpcione trake u oblasti od 1800-2800 cm^{-1} , što je karakteristično za biološke materijale.¹⁶⁵ Period reparacije započinje pojavom sekundarnih amina, što je ranije razmatrano. Pojava apsorpcionih traka na oko 3310 cm^{-1} najverovatnije se može pripisati valencionoj vibraciji NH grupe koja potiče iz sekundarnih amina. α -amino kiseline imaju karakteristične spektre koji su definisani sledećim apsorpcionim trakama : 3100-2600 cm^{-1} od valencione vibracije grupe NH_3^+ tzv "amonijumska traka" koja je široka i srednje jačine, 1660-4590 cm^{-1} od deformacione asimetrične vibracije grupe NH_3^+ kao slaba traka i 1550-1480 cm^{-1} od deformacione simetrične vibracije grupe NH_3^+ kao slaba traka.¹⁹² Apsorpcione trake na slici 3.36a u području 1470-1870 cm^{-1} najverovatnije potiču od novostvorenih α -amino kiselina koje učestvuju u sintezi kolagena. Pojava apsorpcionih traka između 1250-1500 cm^{-1} na slici 3.36a mogla bi se pripisati i moguće nastalim CH_2 i CH_3 grupama lipidne prirode, koje su karakteristične za biološke materijale.¹⁶⁵ Slika 3.36b predstavlja spektar dobijen korišćenjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) nakon jedne nedelje implantacije. Analizom spektra sa slike 3.36b uočava se da na njemu ne postoji bitna promena u odnosu na isti materijal pre implantacije čiji je spektar prikazan na slici 3.35b. Ne uočavaju se promene koje su prisutne kao kod korišćenja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) prikazane na slici 3.36a. Međutim uočava se prisustvo slabih apsorpcionih traka u oblasti 1500-1700 cm^{-1} , koja najverovatnije potiče od α -amino kiselina nastalih nakon 1 nedelje *in vivo*. Poređenjem spektara prikazanih na slikama 3.36 a i b može se uočiti da se biološki procesi brže odvijaju u sistemima sa kompozitnim biomaterijalom HAp/PLLA(50) nego HAp/PLLA(430) tokom 1 nedelje *in vivo*. Spektar dobijen *in vivo* testiranjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) nakon tri nedelje implantacije prikazan je na slici 3.37a. Spektar se karakteriše prisustvom već ranije razmatranih apsorpcionih traka od kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50). Uočava se i prisustvo široke apsorpcione trake na 3420 cm^{-1} , koja u tom delu spektra dominira i odgovara IR spektru kolagena koji ima široku apsorpcionu traku sa maksimumom na 3420 cm^{-1} .^{165, 191, 192} Apsorpciona traka na 3420 cm^{-1} može se, pripisati postojanju $\nu(\text{N-H})$ vibracija kolagenske prirode a prisutna širina trake postojanjem $\nu(\text{OH})$ vibracija takođe kolagenske prirode.¹⁶³ Sve to ukazuje da je nakon 3 nedelje implantiranja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA došlo do stvaranja vezivnog kolagenskog tkiva, i da reparacija ulazi u završnu fazu. Na slici 3.37a takođe se uočava pojava da u oblasti 1800-2800 cm^{-1} nema apsorpcionih traka, što potvrđuje biološku prirodu uzorka.¹⁶⁵ Nakon 3 nedelje *in vivo* korišćenjem

kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) dobijen je spektar prikazan na slici 3.37b. Apsorpciona traka na oko 1760 cm^{-1} prisutna na slici 3.37b (potiče od valencione vibracije C=O grupe iz PLLA), ukazuje da nije došlo do bioresorpcije PLLA. Apsorpciona traka na oko 1650 cm^{-1} je prisutna ali je slabog intenziteta u odnosu na ostale apsorpcione trake. Takođe uočava se formiranje široke apsorpcione trake bez uočljivog maksimuma u oblasti oko 3420 cm^{-1} . Ovi rezultati ukazuju da u toku 3 nedelje *in vivo*, korišćenjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) nije došlo do stvaranja kolagena, već jedinjenja koja predhode njegovom stvaranju. Stanje prikazano na slici 3.37b dobijeno korišćenjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(430) nakon 3 nedelje *in vivo* vrlo je slično stanju dobijenom korišćenjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) tokom 1 nedelje *in vivo*, prikazano na slici 3.36a.

Spektar dobijen korišćenjem smeše kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa koštanim prahom pre implantacije prikazan je na slici 3.38. Analizom spektara kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA obe molske mase uočavaju se dve grupe apsorpcionih traka. Jedna grupa potiče od čistog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA a druga potiče od funkcionalnih grupa dodatog koštanog praha butne kosti singer miševa. Nakon 3 nedelje *in vivo* testa kompozitni biomaterijal dobijen iz smeše autologne kosti i HAp/PLLA(50) pokazao je spektar prikazan na slici 3.39a gde se primećuje novonastala široka apsorpciona traka na oko 3434 cm^{-1} , koja se iz ranijih razmatranja pripisuje funkcionalnim grupama kolagena. Korišćenjem ove vrste materijala nakon 3 nedelje *in vivo* dolazi do stvaranja novih vezivno-tkivnih vlakana, među njima i kolagenih. Smanjivanje apsorpcione trake na 1760 cm^{-1} na slici 3.39a, ukazuje na nestajanje PLLA iz biomaterijala odnosno ono definiše njegovu bioresorpciju. Nakon 3 nedelje *in vivo* smeša praha autologne kosti i HAp/PLLA(430) dala je spektar prikazan na slici 3.39b gde se uočava oštra apsorpciona traka na 1650 cm^{-1} kao i na 3434 cm^{-1} što ukazuje na stvaranje novih vezivno-tkivnih vlakana. Postojanje apsorpcione trake na 1760 cm^{-1} može se pripisati postojanju PLLA koji se nije bioresorbovao. Poređenjem slika 3.39a i b može se primetiti da je intenzitet apsorpcione trake na 3434 cm^{-1} veći kod HAp/PLLA(50) materijala nego kod HAp/PLLA(430). Ovi rezultati ukazuju da je stvaranje kolagena prilikom upotrebe HAp/PLA(50) brže nego kod HAp/PLLA(430) mada stvaranje novog vezivnog tkiva kolagena pored molske mase zavisi i od odnosa i raspodele kristalinično/amorfno unutar PLLA.^{6, 128} Rezultati istraživanja pokazuju da korišćenjem blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) nakon 3 nedelje *in vivo* dolazi do stvaranja kolagena.

FTIR spektroskopijom međutim nije bilo moguće odrediti gde i kako dolazi do stvaranja kolagena u okviru kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Iz tih razloga implantiranim blokovima

kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA analizirana je promena mikrostrukture pre i posle implantacije. Na slici 4.6 prikazan je poprečni presek bloka kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50) pre i nakon 21-og dana od implantiranja.



Slika 4.6. SEM prelomne površine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA(50): a) pre implantacije, b) nakon 21 dana od implantacije

Na slici 4.6a uočava se mikrostruktura granule HAp obložene kontinualnom polimernom komponentom PLLA koja je u bliskom kontaktu sa HAp. Nakon 3 nedelje in vivo testa dobijena je mikrostruktura prikazana na slici 4.6b pri čemu se uočava da su značajnije promene vezane za polimernu komponentu. Primećuje se nestanak polimerne PLLA komponente i ujedno nastanak na njeno mesto novih vlaknastih struktura koje dobro adheriraju po površini HAp. Vlakna povezuju granule HAp i prema predhodnim rezultatima FT-IR spektroskopije su kolagenske prirode. Na mestima gde se nalazio bioresorbilni PLLA, unutar kompozitnog biomaterijala, došlo je do stvaranja kolagenskih vlakana.

4.2.2.1 Diskusija patohistoloških istraživanja

U grupama implantiranih, životinjama je unet samo jedan od tri biomaterijala. Ove grupe su označene prema oznaci implantata, tj. HAp/PLLA(50), HAp/PLLA(430) i B za usitnjenu kost.

Tokom perioda istraživanja od 2-12 nedelja dobijeni rezultati su razmatrani u vremenskim intervalima nakon 2, 7 i 12 nedelja od implantacije.

Nakon 2 nedelje.

Obdukcijski nalaz: Koštani prah je dobro prožet vezivnim tkivom i dobro inkapsuliran. Granule kompozitnog biomaterijala, bez obzira na vrstu, prožete su vezivnim tkivom i inkapsulirane, pri čemu je vrlo uočljiva vaskularizacija.

Histopatološki nalaz: B. Prisutna je resorpcija kosti i destrukcija kostnog materijala, kao i proliferacija vezivnog tkiva između fragmenata kostnog implantata. Na nekim fragmentima kosti vidi se testerasta površina kao znak resorpcije fagocitnim ćelijama. Mogu se videti razoreni delovi kosti u vidu grubo granuliranog materijala koji je jasno demarkiran od još uvek postojećeg tkiva kosti, a spolja okružen zrelim fibroznim tkivom sa snopovima vlakana čineći tzv. vezivnu kapsulu. Na delu preparata vidi se prazan prostor gde je resorpcija završena. Od ćelijskih elemenata vide se polimorfonuklearne ćelije (PMN) i makrofagi što ukazuje na proinflamatorne procese. Manje koštane partikule bolje su obložene makrofagima i oko njih je izraženija fibroza. Takođe je uočljiva angiogeneza (sl. 3.40a).

HAp/PLLA(50). Ovaj tip implantiranog kompozitnog biomaterijala vidi se u obliku jako eozinofilnih gredica koje na mnogim mestima okružuju polja vezivnog tkiva sa kolagenim matriksom. Neposredno uz implantat mogu se mestimično videti palisadno rasporedene mononuklearne ćelije hiperhromnog jedra. Površina implantiranih partikula ispod adheriranih ćelija je eozinofilnija od untrasnjosti partikule. Zapaža se bolja adherencija ćelija na HAp/PLLA(50) nego na kost. Na više mesta se vidi prodor ćelija kroz kompozit. U celularnom sastavu tkiva oko kompozita je dosta makrofaga i krupnih ćelija epiteloidnog izgleda. Prazni prostori koji se vide između kompozita i okružujućih ćelija su verovatno posledica resorpcije kompozita. Takođe je prisutna vaskularizacija, ali u manjoj meri, kao i slabiji ćelijski odgovor nego u slučaju koštanih implanata (sl. 3.41a).

HAp/PLLA(430). Na histološkim preparatima partikule HAp/PLLA(430) su sitnogradularnog izgleda i blede eozinofilne boje. Prisutna je ćelijska infiltracija od mononuklearnih elemenata na periferiji implanata sa više makrofaga, ali sa manjom gustinom ćelija nego u prethodne dve grupe. Može se videti kako grupe ćelija u vidu klastera poniru u implantiran kompozitni biomaterijal. Klasteri su sastavljeni od ćelija krupnih jedara i obilne citoplazme ili multinuklearnih ćelija, a oko njih se vidi prisustvo praznog prostora što je verovatno uslovljeno resorbtivnom aktivnošću ovih ćelija. Ponegde se zapaža klinasto uranjanje ćelija u implantirane partikule (sl 3.42a). U odnosu na prethodna dva analizirana tipa implanata ovde je najizraženija vaskularizacija. Neke partikule su okružene vezivno tkivnom kapsulom u kojoj dominira matriks.

Nakon 7 nedelja.

Obdukcijski nalaz: Implanti su u vezivnim kesama i vaskularizovani.

Histopatološki nalaz: B. U ovom terminu je smanjen broj PMN u odnosu na prethodni period kao i manja makrofagna infiltracija. Vide se fragmenti kosti koji su okruženi infiltratom gusto zbijenih mononuklearnih ćelija, uglavnom sa hiperhromnim jedrom nepravilnog oblika i oskudnom citoplazmom, koje mestimično prodiru u dubinu koštanog fragmenta. Ponegde se nailazi na krupnije mononuklearne ili multinuklearne ćelije osteoklastnog izgleda u okruženju praznih prostora nastalih najverovatnije njihovom aktivnošću. Preparatima dominiraju epiteloidne ćelije, fibroblasti i ekstracelularni matriks (sl. 3.40b).

HAp/PLLA(50). Prisutna je oskudna proinflamatorna reakcija sa makrofagima i gigantocitima, sa dosta fibroblasta i vrlo malo PMN i limfocita, ali i manjom gustinom ćelija, nego pri implantaciji kosti. Mononuklearne ćelije koje su u neposrednom susedstvu kompozita su krupne i potkovičastog izgleda sa hiperhromnim jedrom, što bi odgovaralo opisu osteoklasta. Na ovim preparatima su posebno karakteristične mnogobrojne džinovske multinuklearne *osteoclast-like* ćelije pored kojih se vide brojne šupljine koje su nastale usled resorpcije implanta (sl. 3.41 b). Ispod ćelija je često vidljiv zrnast pojas, verovatno nastao ekstracelularnom razgradnjom implanta, ali se vidi i fagocitovan zrnast materijal u citoplazmi osteoklasta. Duboko u kompozitnom biomaterijalu vide se ćelije čijom aktivnošću je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA(50) fragmentisan. Vidljivo je da centralni delovi kompozita imaju karakterističan eozinofilan materijal koji na periferiji dobija metahromatska svojstva tako da menja boju u plavo što je verovatno nastalo usled izmenjene pH po periferiji. Kompozitni biomaterijal je bolje urastao u tkivo nego fragmenti kosti, a i vidljiva je i bolja adherencija ćelija.

HAp/PLLA(430). U odnosu na implant sa niskomolskim PLLA vidljiva je snažnija proinflamatorna reakcija u vidu fokalno raspoređenih infiltrata sa makrofagima, više PMN i više krvnih sudova nego u slučaju implantacije HAp/PLLA(50). Prisutna je i snažnija osteoklastna aktivnost i više džinovskih multinuklearnih *osteoclast-like* ćelije sa dobrom adherencijom, ali se mnogo rede sreću ćelijski klasteri. Vide se ogromni prazni prostori u kojima je samo na pojedinim mestima prisutan fino granuliran eozinofilni materijal. Između ovih prostora je tkivo koje ima karakteristike zrelog vezivnog tkiva izgrađenog od fibrocita i kolagenih vlakana (sl. 3.42b).

Nakon 12 nedelja.

Obdukcijski nalaz: Svi implantati su urasli i vidljivi su kroz kožu. Koštani implantati su vrlo čvrsti. HAp/PLLA(430) implantati su čvrsti i dobro vaskularizovani i sa hipertrofiranim

vezivom. HAp/PLLA(50) implanti su gusti, uglavnom nevascularizovani, mekši i sa razraslim vezivom.

Histopatološki nalaz: B. Na preparatima se mogu videti polja sa završenom resorpcijom. Preostali implantiran materijal je dobro inkapsuliran. Na malim ostacima koštanih fragmenta vidi se nazubljena površina, a ponegde je vidljivo prisustvo osteoklastnih ćelija (sl. 3.40c).

HAp/PLLA(50). Čestice kompozitnog biomaterijala su u obliku blede eozinofilnog homogenog materijala. Između partikula i vezivnog tkiva mogu se videti široke pukotine bez nekog strukturnog sadržaja. Vezivno tkivo između partikula najvećim delom je sačinjeno od malih mononuklearnih ćelija koje su nešto krupnije neposredno uz ivicu kompozita. Mogu se videti čestice kompozita koje su u centru dobrim delom resorbovane, dok se periferno još uvek zadržava struktura implanta u vidu sitnozrnog blede eozinofilnog materijala. Neposredno uz samu ivicu kompozita sreće se dosta ćelija sa krupnim hiperhromnim jedrom dok su u dubini vezivnog tkiva rasporedene ćelije tipa fibrocita kao i male hiperhromne ćelije okruglog jedra sa siromašnom citoplazmom. Na preparatima dominira vezivno tkivo sa predominacijom fibroblasta u celularnom sastavu, što odgovara slici fibroze (sl. 3.41c).

HAp/PLLA(430). Oko implantiranog kompozitnog biomaterijala su šire i uže trake vezivnog tkiva koje razdvajaju kompozit (sl. 3.42c). Vezivno tkivo koje je uz ivicu kompozita sadrži velike multinuklearne ćelije ispod kojih su pukotine verovatno nastale kao posledica resorpcije kompozita. Mogu se naći na više mesta nakupine krupnih mononuklearnih i multinuklearnih ćelija čija se citoplazma u vidu prstastih nastavaka zavlači u dubinu kompozita. Ovde je karakteristično da je resorpcija najviše izražena na periferiji kompozita, dok se u središnjem delu implanta još uvek može videti sitnogradulозна blede eozinofilna struktura.

Postoji više objavljenih nalaza da HAp može da se javi kao inflamatorni agens.¹⁹³ Takođe, za PLLA u različitim istraživanjima postoji dosta podataka o izazivanju inflamatornog odgovora.¹⁹⁴ Prisustvo inflamacije je moralo biti očekivano pri implantacijama zato što je to strano telo u peritoneumu. Multinuklearne ćelije koje se vide na preparatima su znak inflamatornog procesa. Prisustvo intenzivne fagocitoze i posle 12 nedelja na implantiranim partikulama HAp/PLLA(430), ali slabo i na HAp/PLLA(50) verovatno je posledica razlika u strukturi polimera PLLA. Dugo održanje fagocitoze može biti karakteristično za dugotrajnu razgradnju PLLA. Intraperitonealna reakcija na unošenje PLLA je i prisustvo PMN leukocita na analiziranim preparatima. Ranije je objavljeno da se inflamatorni odgovor karakteriše najvećim porastom neutrofila posle 48 sati od intraperitonealnog unošenja različitih PLA partikula.¹⁹⁵ Svakako da osim hemijskog sastava

implantata treba uvažiti i podatke da se neke karakteristike inflamatornog odgovora ne pokazuju u nekim drugim modelima implantacije PLA.^{196, 197}

Pošto se ispitivani sintetski materijali ponašaju kao prirodna kost, dakle fagocituju se i resorbuju, može se govoriti o njihovoj biokompatibilnosti. Resorpcija je inače prvi korak u sukcesivnim procesima remodeliranja kosti čije je fiziološko finale proces osteogeneze.¹⁴⁷

5. Zaključak

U ovom radu izvršena je sinteza i dizajniranje strukture i osobina kompozitnog biomaterijala hidroksiapatit/poli-l-laktid (HAp/PLLA) sa komponentama bioresorbilnog polimera poli-l-laktida (PLLA) i bioneresorbilne keramike kalcijum-hidroksiapatita (HAp). Kompozitni biomaterijal HAp/PLLA je ispitan u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Na osnovu rezultata dobijenih sintezom i proučavanjem dizajniranja strukture i osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA može se zaključiti:

§ Precipitacionim postupkom između kalcijum nitrata i amonijaka u prisustvu fosforne kiseline može se dobiti visoko čista komponenta HAp-a različitih veličina čestica pogodnih za dobijanje kompozitnih biomaterijala na bazi HAp-a. Na ovakav način dobija se amorfna komponenta kalcijum fosfata koja nakon kalcinacije na 1373K prelazi u visoko kristalnu formu HAp-a.

§ Rastvaranjem PLLA sa rastvaračem (hloroform ili metilenhlorid) na sobnoj temperaturi dobijen je rastvor PLLA pogodan za mešanje sa HAp komponentom. Mešanjem rastvora PLLA sa granulama ili česticama kalcinisanog HAp u željenom odnosu dobija se tečna suspenzija koja se podvrgava vakuum uparavanju na temperaturi od 293-313K i pritisku 10-50 Pa. Nakon vakuum uparavanja dobija se visoko porozni kompozitni biomaterijal HAp/PLLA u različitim oblicima, zavisno od dimenzija i oblika kalupa u kome se suspenzija nalazi tokom uparavanja.

§ Dizajniranje strukture i osobina visoko poroznog kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA ostvareno je kompaktiranjem toplim presovanjem na temperaturama bliskim temperaturi topljenja PLLA. Smanjenjem gustine olakšano je tečenje PLLA oko granula HAp pod uticajem pritiska presovanja. Takođe je olakšana i potencijalna penetracija PLLA u poroznost granula HAp, što omogućava pojavu "zabavljivanja" faza, koja predstavlja osnovni fenomen u mehaničkoj adheziji. Time je omogućeno povećanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Varijacijom parametara toplog presovanja: temperature, pritiska i vremena omogućava se kontrolisano dobijanje poroznosti, kompresione čvrstoće i modula elastičnosti blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Pored navedenih osobina krajnje osobine blokova zavise i od upotrebljenih

veličina čestica HAp komponente i od molske mase PLLA. Sa manjim česticama HAp i višom molskom masom PLLA, kompaktiranjem toplim presovanjem dobija se blok sa višom kompresionom čvrstoćom, gustinom i modulom elastičnosti, i obrnuto. Nakon 60 minuta toplog presovanja na temperaturi 467K(194°C), sa česticama HAp od 100 nm i PLLA molske mase 430000 g/mol dobijen je blok kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa relativnom gustinom od 99,6%, kompresionom čvrstoćom 140,0 MPa i modulom elastičnosti 10,0 GPa, što su vrednosti bliske vrednostima humanog koštanog tkiva. Varijacijom parametara toplog presovanja moguće je dobiti čitav niz blokova različitih struktura i osobina koji prilikom opterećenja i loma imaju osobine od plastičnih, preko plastično-krtih do krtih kompozitnih biomaterijala.

§ Toplim presovanjem dobijaju se blokovi sa relativno uniformnom raspodelom komponenti. Tokom toplog presovanja dolazi do promena u strukturi polimera PLLA, dok keramika HAp ostaje nepromenjena. Osnovni fenomen tokom toplog presovanja koji uslovljava osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA je degradacija pod uticajem termičke i mehaničke energije. Tokom toplog presovanja na temperaturi topljenja PLLA u prvom redu dolazi do topljenja polimera PLLA, što pod uticajem povišenog pritiska rezultira u intimnijem kontaktu između HAp i PLLA komponenata. Toplim presovanjem dolazi do naprezanja u statističkom klupku PLLA što rezultira u raskidanju veza u lancu polimera i stvaranju oligomernih i ostalih produkata razgradnje, što dovodi do smanjenja molske mase PLLA i njegove termonestabilnosti. Analizirane promene rezultiraju u promenama koje se odražavaju na tačku topljenja, entalpiju topljenja i stepen kristaliničnosti polimera PLLA. Varijacijom vremena toplog presovanja može se uticati na intenzitet navedenih promena. U analiziranom vremenskom intervalu toplog presovanja, sa maksimalnim vremenom od 60 minuta, dobijen je blok kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA u čijoj se polimernoj komponenti kristaliničnost smanjila za 1,6 puta. Sa povećanjem vremena toplog presovanja stabilnost PLLA se smanjuje i obrnuto.

§ Na osnovu FT-IR istraživanja u analiziranom vremenskom intervalu toplog presovanja od 0-60 minuta ne dolazi do značajnijih kvalitativnih promena komponenti HAp i PLLA, kao ni do totalne destrukcije PLLA koju prati pojava novih komponenti.

Na osnovu rezultata nanošenja tankih slojeva i prevlaka na supstratima može se zaključiti:

§ Nanošenjem HAp/PLLA kompozitnog biomaterijala premazivanjem metalnih ili polimernih substrata dobija se prevlaka prosečne debljine oko 20 μm . Mikrostruktura prevlake uslovljena je molskom masom upotrebljenog PLLA. Sa PLLA molske mase 430000 g/mol dobijene prevlake su mrežaste i perforirane sa oblikom šestougaoih i petougaoih pora, dok je prevlaka sa PLLA 100000 g/mol kontinualna.

Na osnovu *in vitro* i *in vivo* istraživanja obavljenih na kompozitnom biomaterijalu može se zaključiti:

§ U statičkim uslovima tokom *in vitro* ispitivanja blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA zadržavaju početne mehaničke osobine tokom 80 dana. Promene pH fiziološkog rastvora kojim je tretiran HAp/PLLA ukazuju na bržu degradaciju kompozitnog biomaterijal sa PLLA niže molske mase. Pored degradacije polimera PLLA postoje i procesi rastvaranja HAp na površinama granula, koji takođe uslovljavaju potencijalnu primenu kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

§ Pojava novih funkcionalnih grupa i jedinjenja u procesu *in vivo* ispitivanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA molskih masa 50000 i 430000 g/mol rezultira u stvaranju karakterističnih apsorpcionih traka koje su definisane FT-IR spektroskopijom. Pojava apsorpcionih traka na oko 1650 cm^{-1} i 3420 cm^{-1} tokom vremena implantiranja definiše pojavu kolagena, vezivnog tkiva, koga nema na početku ispitivanja. Stvaranje kolagenskog tkiva je brže kod upotrebe kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA molske mase 50000 g/mol, nego kod 430000 g/mol. Tokom aplikacije kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA molske mase 50000 g/mol, dolazi do bioresorpcije i nestanka PLLA. Proces bioresorpcije PLLA je definisan smanjenjem apsorpcionih traka na 1760 cm^{-1} , koje potiču od C=O grupa PLLA. Korišćenjem kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA molske mase 430000 g/mol tokom posmatranog vremena implantacije bioresorpcija PLLA je značajno usporena. Nastali isti krajnji produkti pri upotrebi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA niske i visoke molske mase kao i smeše praha autologne kosti sa kompozitnim biomaterijalom HAp/PLLA sa PLLA obe molske mase, ukazuju na mogućnost supstitucije praha autologne kosti sa kompozitnim biomaterijalom HAp/PLLA. Stvaranje kolagena je

brže prilikom korišćenja praha autologne kosti i kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA sa PLLA 50000 g/mol molske mase.

§ Histopatološka istraživanja utvrdila su da ispitivani implantati ne daju znake većeg inflamatornog odgovora. Dobro urastanje u vezivno tkivo govori o dobroj biokompatibilnosti. Postoji razlika u ponašanju dva ispitivana kompozitna biomaterijala u odnosu na brzinu resorpcije i izazvan tkivni odgovor. Opšta karakteristika svih implantiranih preparata HAp/PLLA sa PLLA molske mase 50000 g/mol je mnogo jača eozinofilnost od komparativnog preparata. S druge strane, HAp/PLLA sa PLLA molske mase 430000 g/mol, implantati imaju uočljivo slabiju eozinofilnost. Uočljivo je da je resorpcija najintenzivnija na koštanim implantima, zatim na HAp/PLLA sa PLLA 50000 g/mol, a najsporije je na HAp/PLLA sa PLLA 430000 g/mol. Nakon 7 nedelja ispitivanja bioresorpcija je intenzivna na HAp/PLLA sa PLLA molske mase 50000 g/mol. Nakon 12 nedelja istraživanja znaci resorpcije na kompozitnom biomaterijalu sa PLLA molske mase 50000 g/mol su minorni, ali još uvek uočljivi na preparatima sa PLLA molske mase 430000 g/mol, što ukazuje da do njegove bioresorpcije još nije došlo.

6. Literatura

- [1] J. B. Park, *Biomaterials an introduction*, Plenum Press, New York and London, 1979; 110-125
- [2] M. Agrawal, "Reconstructing the human body using biomaterials", *JOM*, january (1998) 31-35
- [3] L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic", *J. Am. Cer. Soc.*, 74 (1991) 1487-1510
- [4] N. Akamatsu, "Artificial bone and joints", *Asian. Med. J.*, 36 (1993) 621-627
- [5] L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Cer. Soc.*, 81 (1998) 1705-1728
- [6] J. B. Park, R. S. Lakes, "Biomaterials, an introduction", Second Edition, Plenum Press, New York and London, 1992, 7-316
- [7] Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito, "Corrosion resistance of implant alloys in pseudo physiological solution and role of alloying elements in passive films", *Mater. Trans. JIM*, 38 (1997) 78-84
- [8] Y. Okazaki, S. Rao, S. Asao, T. Tateishi, S. Katsuda, Y. Furuki, "Effects of Ti, Al and V concentrations on cell viability", *Mater. Trans. JIM*, 39 (1998) 1053-1062
- [9] Y. Okazaki, S. Rao, S. Asao, T. Tateishi, "Effects of metallic concentrations other than Ti, Al and V on cell viability", *Mater. Trans. JIM*, 39 (1998) 1070-1079
- [10] Lj. Vujošević, D. Stamenković, K. Obradović, G. Pavlović, G. Popović, "Stomatološki materijali", Stomatološki fakultet, 1997, 253-258
- [11] W. Kraft, G. Petzow, "New copper rich dental amalgams" in *Biomaterials*, Edit by G. Winter, D. Gibbons, H. Plenk, John Wiley and Sons, 1980, 327-333
- [12] N. Ignjatović, D. Milojević, D. Uskoković, "Uticaj polaznih karakteristika dentalnih amalgamskih legura na formiranje faza i mikrostrukture amalgama", *Stomatološki glasnik Srbije*, 45 (1998) 41-44
- [13] P. G. Boswell, "The suppression of γ_2 precipitation and the kinetics of the gettering of Sn in a dispersed phase dental amalgam", *J. Mater. Sc.-Lett.*, 15 (1980) 1311-1314
- [14] P. V. Hatton, I. M. Brook, "The role of electron microscopy in the evaluation of biomaterials:", *E. Micros. Analys.*, January (1998) 39-41
- [15] D. Basmadjian, M. Sefton, S. Baldwin, "Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical consideration", *Biomaterials*, 18 (1997) 1511-1522
- [16] J. Biedlingmaier, R. Samaranayake, P. Whelan, "Resistance to biofilm formation on otologic implant materials", *Otolaryng.-Head Neck Surg.*, 118 (1998) 444-451
- [17] E. C. Combe, "Notes on dental materials", Churchill Livingstone, Edinburg, 1977, 159-195
- [18] Z. Kresa, J. Rems, O. Wichterle, "Hydron gel implants in vocal cords", *A. Otolaryng.*, 76 (1973) 360-365

- [19] P. Vondrac, B. Dobtel, "Biostability of medical elastomers: a review", *Biomaterials*, 5 (1984) 209-215
- [20] W. Noll, "Chemie und technologie der silicone", Verlag Chemie GmbH, Weinheim Bergstr, 1968, 336-352
- [21] J. Jovanović, M. Govedarica, P. Dvornić, "An investigation of the relationships between some synthetic conditions and the properties of polysiloxane elastomers prepared by hydrosilylation crosslinking", *Bull. Chem. Techn. Macedonia*, 17 (1998) 25-31
- [22] Y. Ikada, "Polymeric biomaterials research", *Adv. Eng. Mater.*, 1 (1999) 67-68
- [23] Encyclopedia of Materials Science and Engineering, "Biodegradation of biomedical polymers:", Ed. M. Bever, Pergamon Press, Oxford, 1, 1986, 323-326
- [24] W. S. Pietrzak, D. R. Sarver, M. L. Verstynen, "Bioabsorbable fixation devices: status for the craniomaxillofacial surgeon", *J. Craniofac. I Surg.*, 8 (1997) 87
- [25] P. Flory, "Statistical mechanics of chain molecules", Interscience-Wiley, New York, 1969, 249-268
- [26] M. Plavšić, S. Tomić, L. Sajc, B. Bugarski, G. Jovanović, "Structure optimization of polylactide microcapsules for controlled drug release", *Mat. Sci. Forum*, 282-283 (1998) 271-280
- [27] W. Michaeli, O. Pfannschmidt, "Microporous, resorbable implants produced by the CESP process", *Adv. Eng. Mater.*, 1 (1999) 206-208
- [28] L. Lu, A. Mikos, "The importance of new processing technique in tissue engineering", *MRS Bull.*, 21 (1996) 28-31
- [29] P. van der Witte, "Polylactide membranes", Ph. D. Thesis, University of Twente, Neterlands, (1994)
- [30] Č. Ristić, M. Plavšić, M. Goosen, L. Sajc, D. Antonović, B. Bugarski, "An investigation of the synthesis of poly(l-lactide) as a biodegradable polymer for orthopaedic applications", *J. Serb. Chem. Soc.*, 61 (1996) 311-318
- [31] S. Iannace, L. Nicolais, "Isothermal crystallization and chain mobility of poly(l-lactide)", *J. Appl. Polym. Sci.*, 64 (1997) 911-919
- [32] H. Tsuji, Y. Ikada, "Properties and morphology of poly(l-lactide). II. Hydrolysis in alkaline solution", *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 36 (1998) 59-66
- [33] P. Mainil-Varlet, R. Curtis, S. Gogolewski, "Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides", *J. Biomed. Mater. Res.*, 36 (1997) 360-380
- [34] P. Mainil-Varlet, S. Gogolewski, P. Nieuwenhuis, "Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their in vivo degradation", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 7 (1996) 713-721

- [35] Y. Kinoshita, M. Kobayashi, T. Hidaka, Y. Ikada, "Reconstruction of mandibular continuity defects in dogs using poly(l-lactide) mesh and autogenic particulate cancellous bone and marrow: preliminary report", *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 55 (1997) 718-723
- [36] Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada, "Enhancement of bone formation by drawn poly(l-lactide)", *J. Biomed. Mater. Res.*, 30 (1996) 553-558
- [37] L. Pineda, M. Busing, R. Meing, S. Gogolewski, "Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(l-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects", *J. Biomed. Mater. Res.*, 31 (1996) 385-394
- [38] S. Ishaug-Riley, L. Okun, G. Prado, M. Applegate, A. Ratcliffe, "Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films", *Biomaterials*, 20 (1999) 2245-2256
- [39] A. Mikos, "Bone regeneration templates", PCT patent, (1995) WO 95/03011
- [40] B. Hayes, "Implanable bioabsorbable article", PCT patent, (1992) WO 92/10218
- [41] B. Boyan, C. Agrawal, J. Heckman, "Biodegradable implant for fracture nonunions", PCT patent, (1996) WO 96/28117
- [42] L. Freed, G. Vunjak-Novaković, R. Biron, D. Eagles, D. Lesnoy, S. Barlow, R. Langer, "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering", *Bio/Technology*, 12 (1994) 689-691
- [43] S. Gogolewski, J. Mainil-Varlet, J. Dillan, "Sterility mechanical properties and molecular stability with low-temperature plasmas", *J. Biomed. Mater. Res.*, 32 (1996) 227-235
- [44] P. Tormala, S. Vainionpaa, P. Rokkanen, P. Helevirta, M. Pellinen, "Surgical biocomposite material and method for producing the material", European Patent, (1993) EP 0289562B1
- [45] S. Miyamoto, K. Takaoka, T. Okada, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, S. Suzuki, K. Ono, "Polylactid acid - polyethylene glycol bloc copolimer", *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 294 (1993) 333-343
- [46] Y. Jin-San, O. Sung-Hwan, K. Mal-Nam, S. In-Joo, K. Young-Ha, "Thermal and mechanical properties of poly(l-lactid acid)-poly(ethylene-co vinyl-acetate) blends", *Polymer*, 40 (1999) 2303-2312
- [47] J. Tjia, B. Aneskievich, P. Moghe, "Substrate-adsorbed collagen and cell secreted fibronectin concertedly induce cell migration on poly(lactide-glucolide) substrates", *Biomaterials*, 20 (1999) 2223-2233
- [48] J. Babenese, L. Mc Intire, A. Mikos, "Growth factor delivery for tissue engineering", *Pharm. Res.*, 17 (2000) 497-504
- [49] S. Hrkach, J. Ou, N. Lotan, R. Langer, "Poly(l-lactic acid-co-amino-acid) graft-copolymers", *ACS Symposium Series*, 627 (1996) 93-102

- [50] J. de Groot, A. Nijenhuis, P. Bruin, A. Pennings, R. Veth, J. Klompmaker, H. Jansen, "Use of porous biodegradable polymer implants in meniscus reconstruction. I. Preparation of porous biodegradable polyurethanes for the reconstruction of meniscus lesions", *Polymer Science*, 268 (1990) 1073-1081
- [51] C. Piconi, G. Maccauro, "Zirconia as a ceramic biomaterial", *Biomaterials*, 20 (1999) 1-25
- [52] T. Webster, R. Siegel, R. Bizios, "Osteoblast function on nanophase alumina", Fourth International Conference on Nanostructured Materials, NANO 98, Book of abstracts, (1998) 153
- [53] J. Bossert, E. Fidancevska, M. Bucker, M. Milosevski, "Sintering and properties of dense and porous $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ", *Sci. Sinter.*, 30 (1998) 19-27
- [54] W. LaCourse, "Transparency, inertness, sterilizability suit glass to medical use", *Glass Researcher*, 5 (1995) 3
- [55] P. Ducheyne, "Stimulation of biological function with bioactive glass", *MPS Bull.*, 23 (1998) 43-49
- [56] W. Suchanek, M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite – based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", *J. Mater. Res.*, 13 (1998) 94-117
- [57] M. Jarcho, "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 157 (1981) 259-263
- [58] J. Ranzani, S. Rahal, S. Schellini, M. Marques, E. Taga, "Repair of the anophthalmic cavity of rats with synthetic hydroxyapatite", *Braz. J. Med. Biolog. Res.*, 30 (1997) 1181-1186
- [59] T. Koshino, W. Kubota, T. Morii, "Bone formation as a reaction to hydraulic hydroxyapatite thermal decomposition product used as bone cement in rabbits", *Biomaterials*, 16 (1995) 125-126
- [60] M. W. Yung, "The use of hydroxyapatite granules in mastoid obliteration", *Clin. Otolaryngol.*, 21 (1996) 480-484
- [61] G. Zambonin, M. Grano, "Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts", *Biomaterials*, 16 (1995) 397-402
- [62] K. Kurashina, H. Kurita, H. Takeuchi, M. Hirano, C. Klin, K. de Groot, "Osteogenesis in muscle with composite graft of hydroxyapatite and autogenous calvarial peristeum: a preliminary report", *Biomaterials*, 16 (1995) 119-123
- [63] A. Piatelli, P. Trisi, "Microscopic and chemical analysis of bone-hydroxyapatite interface in a human retrieved implant. A case report", *J. Periodontol.*, 64 (1993) 906-909
- [64] B. Boyan, T. Hummert, D. Dean, Z. Schwartz, "Role of materials surfaces in regular bone and cartilage cell response", *Biomaterials*, 17 (1996) 137-146

- [65] E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, Y. Wakisaka, Y. Kuboki, "Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis", *J. Biochem.*, 121 (1997) 317-324
- [66] M. Fabbri, G. Celotti, A. Ravaglioli, "Hydroxyapatite-based aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture", *Biomaterials*, 16 (1995) 225-228
- [67] S. Lazić, "Formiranje hidroksiapatita iz visoko presićenih rastvora i sorpcione karakteristike", Doktorska disertacija, TMF, Beograd (1991) 3-28
- [68] L. A. Boskey, A. S. Posner, *J. Phys. Chem.*, 77 (1973) 2313
- [69] J. D. Termine, A. S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.*, 140 (1970) 307
- [70] J. L. Katz, R. A. Harper, "Calcium Phosphates and Apatites", in *Encyclopedia of Materials Science and Engineering*, Editor-in-Chief M. B. Bever, Pergamon Press, Oxford, 1986, 475-476
- [71] P. W. Brown, M. Fulmer, "Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature", *J. Am. Ceram. Soc.*, 74 (1991) 934-940
- [72] P. Brown, N. Hocker, S. Hoyle, "Variations in solution chemistry during the low temperature formation of hydroxyapatite", *J. Am. Ceram. Soc.*, 74 (1991) 1848-1854
- [73] M. Tanahashi, T. Kokubo, T. Matsuda, "Quantitative assessment of apatite formation via a biomimetic method using quartz crystal microbalance", *J. Biomed. Mat. Res.*, 31 (1996) 243-249
- [74] S. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, "Apatite formation on silica gel in simulated body fluids: its dependance on structures of silica gels prepared in different media", *J. Biomed. Mater. Res.*, 33 (1996) 145-151
- [75] J. Le Huec, T. Schaefferbeke, D. Clement, J. Fiber, A. Le Rebeller, "Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress", *Biomaterials*, 16 (1995) 113-118
- [76] A. Ruys, M. Wei, C. Sorrell, M. Dickson, A. Brandwood and B. Mitthope, "Sintering effects on the strength of hydroxyapatite", *Biomaterials*, 16 (1995) 409-415
- [77] I. H. Arita, D. S. Wilkinson, M. A. Mondragon, V. H. Castano, "Chemistry and sintering behavior of thin hydroxyapatite ceramics with controlled porosity", *Biomaterials*, 16 (1995) 403-408
- [78] G. Daculsi, J. Legeros, "Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest", *J. Biomater. Res.*, 31 (1996) 495-501
- [79] P. Li, I. Kangasniemi, K. de Groot, T. Kokubo, "Bonelike hydroxyapatite induction by a gel derived titania on a titanium substrate", *J. Am. Ceram. Soc.*, 77 (1994) 1307-1312
- [80] G. Willmann, "Coatings of implants with hydroxyapatite materials connections between bone and metal", *Adv. Eng. Mater.*, 1 (1999) 95-105

- [81] K. Hayashi, T. Inadome, H. Tsumura, Y. Naka-Shima, Y. Sugioka, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite-coated titanium on the bone-implant interface shear strength", *Biomaterials*, 15 (1994) 1187-1191
- [82] J. Breme, Y. Zhou, L. Groh, "Development of a titanium alloy suitable for an optimized coating with hydroxyapatite", *Biomaterials*, 16 (1995) 239-244
- [83] P. Li, K. de Groot, T. Kokubo, "Bioactive hydroxyapatite composite coating prepared by sol-gel process", *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 7 (1996) 27-34
- [84] S. W. Russell, K. A. Luptak, C. T. Suchicital, T. L. Alford, V. B. Pizziconi, "Chemical and structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite thin films under rapid thermal processing", *J. Am. Ceram. Soc.*, 79 (1996) 837-842
- [85] N. Ignjatović, J. Grubić, Z. Šaponjić, S. Zec, M. Miljković, V. Jokanović, D. Uskoković, "Nanošenje tankih slojeva TiO_2 i HAp metodom cikličnog natapanja i naknadnog termičkog tretmana", *Tehnika-Novi materijali* 8 (1999) 1-7
- [86] S. H. Rhee, J. Tanaka, "Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method", *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 (1998) 3029-3031
- [87] R. E. Holmes, R. W. Mooney, R. W. Bucholz, A. F. Tancer, "A coralline hydroxyapatite bone graft substitute", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 188 (1984) 282-292
- [88] J. Hollinger, J. Brekke, E. Gruskin, D. Lee, "Role of bone substitutes", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 324 (1996) 55-65
- [89] J. Linder, "Bone healing", *Clin. Plast. Surg.*, 4 (1977) 425-437
- [90] H. Pohunkova, J. Stehlik, J. Vachal, O. Cech, M. Adam, "Morphological features of bone healing under the effect of collagen-graft-glycosaminoglycan copolymer supplemented with the tripeptide gly-his-lys", *Biomaterials*, 17 (1996) 1567-1574
- [91] J. Todhunter, R. Minor, A. Wootton, L. Krook, N. Burton-Wurster, G. Lust, "Effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on repair of articular cartilage defects in the equine carpus", *J. Orthop. Res.*, 11 (1993) 782-795
- [92] N. Bertolami, G. Ellis, B. Donoff, "Healing of cutaneous and mucosal wounds grafted with collagen-glycosaminoglycan/silastic bilayer membranes: a preliminary report", *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 46 (1988) 971-978
- [93] L. Niklason, "Replacement arteries made to order", *Science*, 286 (1999) 1493-1494
- [94] K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*, 21 (2000) 667-681
- [95] Z. Golubović, Lečenje zatvorenih preloma potkolenice, Zadužbina Andrejević, Beograd, 1997, 45-47

- [96] L. Stryer, "Biochemistry", W. H. Freeman and company, San Francisco, Second Edition, 1992, 186-204
- [97] G. K. Hunter, P. V. Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg, H. A. Goldberg, "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins", *Biochem. J.*, 317 (1996) 59-64
- [98] B. B. Kovanova, I. A. Sinčukova, "Kolagenoplastika v medicine", Moskva, Medicina, 1978, 9-187
- [99] Z. Guo, C. Ku, I. Gibson, S. Best, "Processing of hydroxyapatite/titanium bio-composite and functionally graded bio-materials (FGBM)", Materials Congress 98, Oxford, Book of abstracts, (1998) 256
- [100] J. Choi, Y. Kong, H. Kim, I. Lee, "Reinforcement of hydroxyapatite bioceramics by addition of Ni₃Al and Al₂O₃", *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 (1998) 1743-1748
- [101] E. Pissiotis, L. Spangberg, "Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite", *J. End.*, 16 (1990) 473-486
- [102] J. McIntyre, J. Shackelford, M. Chapman, R. Pool, "Characterization of a bioceramic composite for repair of large bone defects", *Ceramic Bulletin*, 70 (1991) 1499-1503
- [103] G. Bekchenko, G. Bruskina, G. Kesyan, V. Shabatin, Y. Baschenko, "Use of composition materials based of collagen, hydroxyapatite and tricalcium phosphate for the substitution of bone defects", The 3rd European East-West Conference & Exhibition on Materials and Processes, Strasbourg, France, November 3-6, Book of abstract, (1992) IV-1
- [104] A. Rovira, J. Amedee, R. Bareille, M. Rabaud, "Colonization of a calcium phosphate elastin solubilized peptide collagen composite material by human osteoblasts", *Biomaterials*, 17 (1996) 1535-1540
- [105] K. Nishihara, "Biomedical materials", US Patent, (1999) 5,990,381
- [106] S. Jefferies, "Delayed drug delivery system", US Patent, (1999) 5,904,715
- [107] J. Li, B. Fortash, L. Hermansson, "Hydroxyapatite-alumina composites and bone-bonding", *Biomaterials*, 16 (1995) 417-422
- [108] Y. Harada, J. Wang, V. Doppalapudi, A. Willis, M. Jasty, W. Harris, M. Nagase, S. Goldring, "Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalciumphosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro", *J. Biomed.l Mater. Res.*, 31 (1996) 19-26
- [109] L. Jha, J. Santos, J. Knowles, "Characterization of apatite layer formation on P₂O₅-CaO, P₂O₅-CaO-Na₂O and P₂O₅-CaO-Na₂O-Al₂O₃ glass hydroxyapatite composites", *J. Biomed.l Mater. Res.*, 31 (1996) 481-486

- [110] C. Reed, K. TenHuisen, P. Brown, H. Allcock, "Thermal stability and compressive strength of calcium deficient hydroxyapatite-poly(bis(carboxylatophenoxy)phosphazane) composites", *Chem. Mater.*, 8 (1996) 440-447
- [111] W. Bonfield, "Design of bioactive ceramic-polymer composites" in "An introduction to bioceramic", Ed. L. Hench, J. Wilson, World Scientific, Singapore, 1993, 299-304
- [112] F. Guild W. Bonfield, "Predictive modeling of the mechanical properties and failure processes in hydroxyapatite-polyethylene (Hapex™) composite", *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, 9 (1998) 497-502
- [113] M. Wang, C. Berry, M. Braden, W. Bonfield, "Yong's and shear moduli of ceramic particle filled polyethylene", *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, 9 (1998) 621-624
- [114]. Q. Liu, J. de Wijn, C. van Blitterswijk, "Nanoapatite/polymer composites: mechanical and physicochemical characteristics", *Biomaterials* 18 (1997) 1263-1270
- [115] R. Labella, M. Braden, S. Deb, "Novel hydroxyapatite-based dental composites", *Biomaterials* 15 (1994) 1197-1200
- [116] S. Deb, M. Wang, K. Tanner, W. Bonfield, "Hydroxyapatite-polyethylene composites: effect of grafting and surface treatment of hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, 7 (1996) 191-193
- [117] A. M. Dupraz, J. R. de Wijn, S. A. van der Meer, K. de Groot, "Characterization of silane-treated hydroxyapatite powders for use as filler in biodegradable composites", *J. Biomed. Mater. Res.*, 31 (1996) 231-238
- [118] A. Borzacchiello, L. Ambrosio, L. Nicolais, E. Harper, K. Tanner, W. Bonfield, "Isothermal and non-isothermal polymerization of a new bone cement", *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, 9 (1998) 317-324
- [119]. T. Otsuka, M. Fukaya, T. Hideo, S. Shigeo, S. Niwa, K. Sawai, H. Ota, "Tube net fabric composition weaved and knitted with biosoluble fiber and filled with hydroxyapatite", Japanese patent office, (1995) 07303692 A74
- [120] H. Elgendy, M. Norman, A. Keaton, C. Laurencin, "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymers composite materials", *Biomaterials*, 14 (1993) 263-269
- [121] S. Cho, M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka, "Novel calciumphosphate/polylactide composites: its in vitro evaluation", *Key Eng. Mater.*, 132-136 (1997) 802-805
- [122] C. Laurencin, M. Borden, M. Attawia, F. Ko, G. Morrill, "Polymer based tissue engineering of bone", *Polymer Preprints*, 39 (1998) 122-123
- [123] S. Jefferies, "Bone repair materijal and delayed drug delivery", (1989) PCT WO 89/04646
- [124] A. Letić-Gavrilović, R. Scandurra, K. Abe, "Genetic potential of interfacial guided osteogenesis in implant devices", *Dent. Mater. J.*, 19 (2000) 99-132

- [125] M. Plavšić, "Polimerni materijali-nauka i inženjerstvo", Naučna knjiga, Beograd (1996) 25-303
- [126] P. Tormala, S. Vainionpaa, P. Rokkanen, P. Helevirta, M. Pellinen, "Surgical biocomposite material and a method for producing the material", (1993) EP 0289562 B1
- [127] C. C. P. M. Verheyen, C. P. A. T. Klein, J. M. A. de Blicckhogervorst, J. G. C. Wolke, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot, "Evaluation of hydroxyapatite/poly(l-lactide) composites: physicochemical properties", *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, 4 (1993) 58-65
- [128] Y. Shikinami, M. Okuno, "Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-l-lactide (PLLA): part I. Basic characteristics", *Biomaterials* 20 (1999) 859-877
- [129] A. Polson, D. Swanbom, R. Dunn, C. Cox, R. Norton, B. Lowe, K. Peterson, "Method and composition for treating a bone tissue defect", United States Patent, (2000) 6,071,530
- [130] C. Laurencin, J. Devin, M. Attawia, "Polymeric-hydroxyapatite bone composite", U.S. Patent, (1998) 5,766,618
- [131] Y. Imai, Y. Kakizawa, M. Kammikura, T. Shikata, "Biodegradable material and process for the preparation thereof", U.S. Patent, (1999) 5,955,529
- [132] K. Cooper, C. Chen, A. Scopelianos, "Hard tissue bone cement and substitutes", U.S. Patent, (1998) 5,747,390
- [133] D. Lee, C. Rey, M. Aiolova, "Bioresorbable ceramic composites", U.S. Patent, (2000) 6,027,742
- [134] N. Ignjatović, S. Tomić, M. Dakić, M. Miljković, M. Plavšić, D. Uskoković, "Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials", *Biomaterials*, 20 (1999) 809-816
- [135] N. Ignjatović, M. Plavšić, M. Miljković, Lj. Živković, D. Uskoković, "Microstructural characteristic of Ca-hydroxyapatite/poly-L-lactide based composites", *J. Microsc.*, 196 (1999) 243-248
- [136] N. Ignjatović, M. Plavšić, D. Uskoković, "Composite biomaterial hydroxyapatite/poli-L-lactide (collagen) with poli-L-lactid different molar weight", *Adv. Eng. Mater.*, 2 (2000) 511-514
- [137] N. Ignjatović, K. Delijić, M. Vukčević, D. Uskoković, "Microstructure and mechanical properties of hot pressed hidroxyapatite/poli-l-lactide biomaterials", *Key Eng. Mater.*, 192-195 (2001) 737-740
- [138] N. Ignjatović, S. Tomić, J. Filipović, M. Plavšić, D. Uskoković, "The influence of hot pressing on the polymer phase properties in hydroxyapatite-poly-l-lactide composite biomaterials" 2nd International Conference of the Chemical Societies of the South East European Countries, Halkidiki, 2 (2000) 41

- [139] N. Ignjatović, S. Tomić, J. Filipović, D. Uskoković, "The influence of hot pressing on the polymer phase properties in composite biomaterial", 5th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Papers, (2000) 489-491
- [140] N. Ignjatović, V. Savić, S. Najman, M. Plavšić, D. Uskoković, "A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy", *Biomaterials*, 22 (2001) 571-575
- [141] N. Ignjatović, V. Savić, S. Najman, M. Plavšić, D. Uskoković, "Analysis of *in vivo* substitution of bone tissue by HAp/PLLA composite biomaterial with poly-l-lactide different molecular weight using FTIR spectroscopy", *Mater. Sci. Forum*, 352 (2000) 143-150
- [142] M. Plavšić, S. Tomić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Physico-chemical properties of HAp/PLLA composite for medical application", Physical Chemistry 98, 4th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Papers, (1998) 473-475
- [143] D. Uskoković, M. Plavšić, N. Ignjatović, "Nov postupak za dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA pogodnog za rekonstrukciju koštanog tkiva", Savezni zavod za intelektualnu svojinu, Yu patent, P-491/98 (1998)
- [144] N. Ignjatović, S. Tomić, Lj. Živković, D. Uskoković, "Composite biomaterials Calcium-hydroxyapatite/polymer", 1st International Conference of the Chemical Societies of the South East European Countries, Halkidiki, 2 (1998) 214
- [145] N. Ignjatović, Lj. Živković, M. Plavšić, N. Petranović, D. Uskoković, "Degradation changes in poly-l-lactide during hot pressing of hydroxyapatite/poly-l-lactide composites suitable for reconstruction of bone tissue", 9th European conference: Polymer in medicine and surgery, University of Krems, Austria, Conference Pre-Prints, (2000) 79 - 85
- [146] N. Ignjatović, K. Delijić, M. Vukčević, D. Uskoković, "The designing of properties of calcium-hydroxyapatite/poly-lactide composite biomaterials by hot pressing", *Z. Metallkunde*, 92 (2001) 145-149
- [147] S. Najman, Lj. Đorđević, V. Savić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Biological evaluation of hydroxyapatite/poly-l-lactide composite biomaterials with poly-l-lactide of different molecular weights intraperitoneally implanted into mice", *Biomaterials*, (2001), (accepted)
- [148] R. Dunn, A. Tipton, "Polymeric compositions useful as controlled release implants", US Patent, (1999) 5,945,115
- [149] L. Rodrigues-Lorenzo, A. Salinas, M. Vallet-Regi, J. San Roman, "Composite biomaterials based on Al₂O₃/PMMA/PLLA", *J. Biomed. Mater. Res.*, 30 (1996) 515-522
- [150] I. Balać, P. Uskoković, N. Ignjatović, R. Aleksić, D. Uskoković, "Stress analysis in hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials, *Comp. Mater. Sci.*, 20 (2001) 244-252

- [151] T. Furukawa, Y. Matsusue, T. Yasunaga, Y. Shikinami, M. Okuno, T. Nakamura, "Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly(l-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures", *Biomaterials*, 21 (2000) 889-898
- [152] T. Furukawa, Y. Matsusue, T. Yasunaga, Y. Nakagawa, Y. Okada, Y. Shikinami, M. Okuno, T. Nakamura, "Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(l-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures", *J. Biomed. Mater. Res.*, 50 (2000) 410-419
- [153] T. Furukawa, Y. Matsusue, T. Yasunaga, Y. Nakagawa, Y. Shikinami, M. Okuno, T. Nakamura, "Bone bonding ability of a new biodegradable composite for internal fixation of bone fractures", *Clin. Orth. Rel. Res.*, 379 (2000) 247-258
- [154] D. Dejković, Z. Božović, Z. Gačić, B. Radojević, M. Zlatić, Č. Lazović, "Biokompatibilnost materijala u ortopedskoj hirurgiji i biološke reakcije na implante", XI Konferencija za ETAN, Budva 4-7 jun, Zbornik radova, (1996) 212-215
- [155] P. Ducheyne, Q. Qiu, "Bioactive ceramic: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function", *Biomaterials*, 20 (1999) 2287-2303
- [156] D. A. Puelo, "Understanding and controlling the bone-implant interface", *Biomaterials*, 20 (1999) 2311-2321
- [157] K. H. Ceng, "Prize-winning peaks at the microscopic world", *Materials World*, 6 (1998) 756-757
- [158] B. S. Stanton, "Disinfection, sterilization and preservation", Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 29-132
- [159] A. Russell, W. Hugo, G. Ayliffe, "Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization", Blackwell Publisher, 1992, 46-112
- [160] S. Milosavljević, "Strukturne instrumentalne metode", Hemijski fakultet, Beograd (1994) 39-107
- [161] U. Mioč, S. Mentus, "Odabrane metode fizičko hemijske analize", Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1993, 41-80
- [162] S. Sandler, W. Karo, J. Bonestell, E. Pearce, "Polymer synthesis and characterization", Academic press, San Diego, 1998, 173-519
- [163] B. P. Colarusso, L. H. Kidder, I. W. Levin, J. C. Fraser, J. F. Arens, E. N. Lewis, "Infrared spectroscopic imaging: From planetary to cellular systems", *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 106-120
- [164] H. H. Mantsch, R. N. McElhaney, "Applications of infrared spectroscopy to biology and medicine", *J. Mol. Struct.*, 217 (1990) 347-362
- [165] H. Mantsch, M. Jackson, "Molecular spectroscopy in biodiagnostics", *J. Mol. Struct.*, 347 (1995) 187-206

- [166] I. Bab, L. Passi-Even, D. Gazit, E. Sekeles, A. Ashton, N. Peylan-Ramu, I. Ziv, M. Ulmanky, "Osteogenesis in vivo diffusion chamber cultures of human marrow cell", *Bone Miner.*, 4 (1988) 373-386
- [167] E. Suvorova, P. Buffat, "Electron diffraction from micro and nanoparticles of hydroxyapatite", *J. Microsc.*, 196 (1999) 46-58
- [168] D. Witzake, R. Narayan, J. Kolstad, "Reversible kinetics and thermodynamics the homopolymerization of L-lactide with 2-ethylhexanoic acid tin(II)salt", *Macromolecules*, 30 (1997) 7075-7085
- [169] C. Joziase, H. Veenstra, D. Grijpma, A. Pennings, "On the chain stiffness of poly(lactide)s", *Macromol. Chem. Phys.*, 19 (1990) 2219-2229
- [170] H. Burns, D. Carpenter, "Adsorption of polystyrene on porous and nonporous adsorbent", *Macromolecules*, 1 (1968) 384-390
- [171] Lj. Kostić, "Uticaj prirode gradivnog materijala i obradenosti površina na akumulaciju dentalnog plaka", Doktorska disertacija, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, (1996) 1-90
- [172] Lj. Kostić, S. Milonjić, N. Bibić, D. Trifunović, "Surface free energy of selected dental materials", *J. Serb. Chem. Soc.*, 62 (1997) 1129-1135
- [173] P. C. Aarnoud, "Molecular architecture of biodegradable poly(lactide) alloys and blends" Ph Thesis, Rijksuniversitet Groningen, (1993) 75-90
- [174] N. Grassie, G. Scott, *Polymer Degradation & Stabilisation*, Cambridge University Press, Cambridge, 1988, 17-67
- [175] W. Schnabel, *Polymer Degradation*, Akademic-Verlag-Berlin, 1981, 26-27
- [176] I. C. Mc Neill, H. A. Leiper, *Degradation Studies of Some Polyesters and Polycarbonates-I. Polylactide: General Features of the Degradation Under Programmed Heating Conditions*, *Poly. Degrad. Stabil.*, 11 (1985) 267-285
- [177] M. C. Gupta, V. G. Deshmukh, *Thermal Oxidative Degradation of Poly-lactid Acid. Part II: Molecular Weight and Electronic Spectra During Isothermal Heating*, *Coll. Polym. Sci.*, 260 (1982) 517-517
- [178] I. C. Mc Neill, H. A. Leiper, *Degradation Studies of Some Polyesters and Polycarbonates-II. Polylactide: Degradation Under Isothermal Conditions*, *Poly. Degrad. Stabil.*, 11 (1985) 309-321
- [179] C. Simonescu, C. Operea, "Mechanochemia compusilor makromolekulari", MIR: Moskow, 1970, 11-110 (in Russian)
- [180] H. H. Moroi, K. Okimoto, R. Moroi, Y. Terada, *Numeric approach to the biomechanical analysis of thermal effects in coated implants*, *Int. J. Prosthodont*, 6 (1993) 564-572

- [181] S. Lazić, J. Katanić-Popović, S. Zec, N. Miljević, "Properties of hydroxyapatite crystallized from high temperature alkaline solution", *J. Cryst. Growth* 165 (1996) 124-128
- [182] C. Verheyen, J. de Wijn, C. van Blitterswijk, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, 26 (1992) 1277
- [183] W. Armstrong, "A new treatment for chronic secretory otitis media", *Arch. Otolaryngol.*, 59 (1954) 653-654
- [184] M. Dramićanin, Z. Ristovski, V. Đoković, S. Galović, "Conduction of heat in inhomogeneous solids", *Appl. Phys. Lett.*, 73 (1998) 321-323
- [185] H.S. Carslaw, J.C. Jaeger, "Conduction of heat in solids", 2nd Ed. by H.S. Carslaw, J.C. Jaeger, Oxford University Press, Oxford, 1959, 8-10
- [186] J. Bicerano, Prediction of Polymer Properties, Marcel Dekker, INC, 1993, 98-315
- [187] M. Varma-Nair, B. Wunderlich, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 20 (1991) 347
- [188] W. ElHarake, M. Furman, B. Cook, K. Nair, J. Kukowski, I. Brodsky, "Measurement of dermal collagen synthesis rate in vivo humans", *Am. J. Phys. End. Metab.*, 274 (1998) 586-591
- [189] T. Fujii, Y. Miyahara, Y. Watanabe, "Highly sensitive biochemical analysis using low-temperature infrared spectroscopy measurements", *Appl. Spectrosc.*, 51 (1997) 1682-1686
- [190] K. K. Chittur, "FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces", *Biomaterials*, 19 (1998) 357-369
- [191] D. O. Hummel, Atlas of polymer and plastics analysis. Second, completely revised edition, Carl Hansen Verlag, 1984, 373
- [192] J. Bellamy, »The infra red spectra of complexmolecules«, London, Chapman & Hall, 1975, 247-258
- [193] H. R. Schumacher, "Crystals, inflammation, and osteoarthritis", *Jr. Am. J. Med.*, 83 (1987) 11-16
- [194] R. Bos, F. Rozema, G. Boering, A. Nijenhuis, A. Pennings, A. Verwey, P. Nieuwenhuis, H. Jansen, "Degradation and tissue reaction to biodegradable poly(L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats", *Biomaterials*, 12 (1991) 32-36
- [195] A. van Sliedregt, M. Knook, S. Hesselting, H. Koerten, K. de Groot K, C. van Blitterswijk, "Cellular reaction on the intraperitoneal injection of four types of polylactide particulates", *Biomaterials*, 13 (1992) 819-24
- [196] K. Hooper, T. Nickolas, E. Yurkow, J. Kohn, D. Laskin, "Characterization of the inflammatory response to biomaterials using a rodent air pouch model", *J. Biomed. Mater. Res.*, 50 (2000) 365-374

[197] J. Bergsma, F. Rozema, R. Bos, G. Boering, W. de Bruijn, A. Pennings, "In vivo degradation and biocompatibility study of in vitro pre-degraded as-polymerized polylactide particles", *Biomaterials*, 16 (1995) 267-274



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ненад Игњатовић

број индекса теза је одбрањена 2001. године

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза и дизајнирање структуре и особина хидроксиапатит-полилактид композитних биоматеријала

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12. 11. 2013.

Ненад Игњатовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза и дизајнирање структуре и особина хидроксиапатит-полилактид композитних биоматеријала

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12. 11. 2013.

Ahmad Lujatovic