

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Mr Bojan M. Jokić

**PROUČAVANJE PROCESA FORMIRANJA POROZNIH BIODOPATIBILNIH
MATERIJALA NA BAZI NEDOPIRANIH I SILICIJUMOM DOPIRANIH
 α -KALCIJUM-FOSFATA I HIDROKSIAPATITA**

Doktorska disertacija

Mentor:

Dr Đorđe Janačković, redovni profesor
TMF Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Rada Petrović, vanredni profesor
TMF Univerziteta u Beogradu

Dr Petar Uskoković, redovni profesor
TMF Univerziteta u Beogradu

Dr Kosovka Obradović-Đuričić, redovni profesor
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Ljiljana Živković, viši naučni saradnik
INN Vinča Univerziteta u Beogradu

Beograd, 2011.

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentoru, Prof. Dr Đorđu Janačkoviću se zahvaljujem na pruženoj pomoći, korisnim savetima i podršci tokom izrade rada.

Prof. Dr Radi Petrović, Prof. Dr Kosovski Obradović-Đuričić, Dr Ljiljani Živković, višem nauč. saradniku i Prof. Dr Petru Uskokoviću se zahvaljujem na korisnim sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije.

Dr Miodragu Mitriću, višem naučnom savetniku iz Laboratorije za fiziku čvrstog stanja INN "Vinča" se zahvaljujem na nesebičnom prenošenju dragocenih znanja.

Smilji Marković, naučnom saradniku iz INN "Vinča" se zahvaljujem za urađene analize raspodele veličina čestica, a Dr doc. Svetlani Grujić se zahvaljujem za analize urađene na tečnom hromatografskom i masenom spektrometru.

INVESTIGATION OF FORMATION PROCESSES OF POROUS BIOCOMPATIBLE MATERIALS BASED ON SILICON DOPED AND UNDOPED α -CALCIUM-PHOSPHATE AND HYDROXYAPATITE

ABSTRACT

During recent decades, a great attention has been focused on research and development of biomaterials that are exploited to replace missing body structures, to enhance functions of existing ones or promote the new tissue formation. The clinical success outcome of biomaterial used in tissue engineering applications depends critically upon physical and chemical properties of tested materials. The synthetic materials, capable of supporting the natural process of bone re-modeling, include the *ex vivo* generation of cell-scaffold complexes, *in vivo* resorbable bone cements, coatings that enhance the bonding between natural bone and implant, various forms of implantable prostheses, bone-repair agents etc. Synthetic bioactive ceramics such as certain forms of calcium-phosphate (hydroxyapatite: HA; α -tricalcium phosphate: α -TCP; β -tricalcium phosphate: β -TCP) and combinations of them have been widely studied due to their structural and chemical similarity with the inorganic components of natural bone. One of the most important stages of bone tissue engineering is to design and process scaffold materials aiming to, as high as possible, the in-growth of blood vessels, and to guide the growth of bone in a natural manner mimicking the structure of human compact bone. During the first decade of the twenty-first century third-generation of biomaterials has been designed to stimulate specific cellular responses at the level of molecular biology. Certain formulations of bioactive materials such as bioactive glasses release chemicals in the form of ionic dissolution products, or governing macromolecular growth factors, which at controlled rates, activate the cell functions.

The goal of the thesis was to develop three-dimensional scaffolds based on silicon doped HA/ α -TCP specifically designed for application in bone tissue engineering where, through controlled release rate of Si, Ca and P, one assure optimal influence at the biological response of material and invoke enhanced cell adhesion, differentiation and gene expression. Therefore, for scaffolds preparations silicon doped and un-doped HA particles were synthesized having different morphologies (spherical and whisker-like) using hydrothermal method. Appropriate quantities of the reactants $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA (the last one being used for synthesis of spherical-like particles) and urea were used to prepare stoichiometric hydroxyapatite (Ca/P = 1.67) and hydroxyapatite of Ca/P molar ratio that approaches 1.50. The silicon-substituted apatites were prepared using a Ca/P molar ratio approaching 1.50 by adding two different quantities of tetraethyl orthosilicate (TEOS) as the source of silicon ions. Lower Ca/P ratio and doping with silicon were used in order to enhance formation of silicon-stabilized α -TCP and improve the bioactivity when compared to pure hydroxyapatite.

The influence of silicon substitution level in spherical-and whisker-like particles on the morphology, phase transformations and bioactivity of the obtained powders and scaffolds based on these particles was investigated by x-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM),

transmission electron microscopy (TEM), high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), energy dispersive x-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and in *in vitro* test performed on SaOs2, L929 and MRC-5 cells.

The investigations showed different degree of silicon substitution under the same synthesis conditions on spherical- and whisker-like particles revealed by XRD and EDXRF analyses, where higher content of added silicon enhanced phase transformation from HA to α -TCP at lower temperatures. These transformations are more pronounced on spherical particles. Although, there is no significant difference in phase composition between un-doped and material doped with silicon at low concentration after heating at high temperature, it was observed that samples doped with less amount of silicon (0.55 wt% for spherical and 0.58 wt% for whisker-like powder particles) exhibit higher *in vitro* bioactivity on SaOs2 cells than silicon-free hydroxyapatite. Annealing of the spherical and whiskers-like particles at 1200 °C reduced cytotoxicity of the extracts on both SaOs2 and L929 cells. The SEM and XRD analysis confirmed that spherical particles doped with controlled amount of silicon transformed from HA into α -TCP by annealing at 1150 °C retaining thereby the spherical morphology of the particles. Due to this synthesis procedure, spherical α -TCP particles with a uniform size distribution could be obtained without milling that is the irrefutable process for α -TCP particles preparation obtained by other methods.

In this work three different techniques were used for scaffolds preparation. Scaffolds were prepared using silicon doped spherical- and whisker-like α -TCP particles pretreated at 1200 °C that were milled and mixed with 30 % H₂O₂ solution and polymethyl-metacrilate (PMMA) fibers, where PMMA have a function to form the interconnected porosity. After a setting time scaffolds with adequate micro- and macro-porous structure were obtained, where further annealing at higher temperatures were required to eliminate captivated PMMA fibers. When scaffolds have been obtained by mixing with H₂O₂ solutions, further annealing after the setting time was avoided. The scaffolds obtained by replica foam method using silicon doped spherical particles preheated at 1150 °C had a uniform and interconnected porous structure and compressive strength up to 5.7 MPa after sintering at 1450 °C. *In vitro* test, high proliferation activity of human fibroblast cells MRC-5 seeded on the scaffolds was confirmed.

The results achieved in this thesis contribute to a better understanding of technological aspects of synthesis of common used scaffold materials based on calcium-phosphates. Furthermore, a number of different materials synthesized in forms of HA/ α -TCP powders or scaffolds, properly characterized and thoroughly discussed, might be considered as attractive alternatives to gain appropriate knowledge for productions, within short to medium-term time span, creating innovative HA/ α -TCP biomaterials of highest potential for bone defects healing.

PROUČAVANJE PROCESA FORMIRANJA POROZNIH BIOKOMPATIBILNIH MATERIJALA NA BAZI NEDOPIRANIH I SILICIJUMOM DOPIRANIH α -KALCIJUM-FOSFATA I HIDROKSIAPATITA

IZVOD

Poslednjih nekoliko decenija, velika pažnja usmerena je na razvoj biomaterijala koji bi imali potencijal da reparišu ili zamene oštećenih delova koštanog tkiva, pospeše funkcionisanje postojećeg ili ubrzaju stvaranje novog tkiva. Klinička primenana biomaterijala zavisi pre svega od fizičkih i hemijskih svojstava materijala. U savremene sintetičke biomaterijale se ubrajaju *ex vivo* ćelijama zasejani skafoldi, *in vivo* resorbilni koštani cementi, prevlake koje pospešuju stvaranje veze između prirodne kosti i implanta, različite forme implantnih proteza i dr. Bioaktivna keramika na bazi kalcijum-fosfata (hidroksiapatit: HA; α -kalcijum-fosfat: α -TCP; β -kalcijum-fosfata; β -(TCP) zauzima značajno mesto zbog strukturne i hemijske sličnosti sa neorganskom komponentom prirodne kosti. Jedno od najvažniji područja inženjerstva koštanog tkiva predstavlja dizajniranje i procesiranje skafoldnih materijala po strukturi sličim kostima koji bi omogućili vaskularizaciju i urastanje koštanog tkiva. Tokom prve dekade 21. veka velika pažnja je usmerena na razvoj treće generacije bioaktivnih materijala koji bi stimulisali specifičan ćelijski odgovor. Značajnu grupa biomaterija čine materijali na bazi bioaktivnog stakla koji otpuštanjem jona u rastvoru stimulišu faktore rasta koji na kontrolisan način aktiviraju ćelijske funkcije.

Cilj ove teze predstavlja razvoj skafolda na bazi silicijumom dopiranih α -kalcijum-fosfata i hidroksiapatita za supstituciju i reparaciju koštanog tkiva koji bi kontrolisanim otpuštanjem jona silicijuma i kalcijuma i fosfatnih jona povoljno uticali na adheziju i diferencijaciju ćelija i gensku ekspresiju. U tom cilju sa procesiranje skafolda hidrotermalnim postupkom sintetisane su nedopirane i silicijumom dopirane čestice HA različite morfologije (sferne i vlaknaste). Kao polazna jedinjenja za sintezu stehiometrijskog hidroksiapatita ($\text{Ca/P} = 1,67$) i hidroksiapatita sa odnosom $\text{Ca/P} = 1,50$ korišćeni su $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA (poslednje jedinjenje je korišćeno za sintezu sfernih čestica) i urea. Silicijumom dopirani hidroksiapatiti su sintetisani za odnos $\text{Ca/P} = 1,50$ korišćenjem tetraetil-ortosilikata (TEOS) kao izvora silicijumovih jona. Dopiranje silicijumom pri odnosu $\text{Ca/P} = 1,50$ je izvršeno u cilju favorizovanja formiranja silicijumom stabilisanog α -TCP i poboljšanja bioaktivnih svojstava u odnosu na stehiometrijski hidroksiapatit.

Uticaj stepena supstitucije silicijumom na morfologiju, faznu transformaciju i bioaktivnost sintetisanih sfernih i vlaknastih čestica, kao i skafolda dobijenih od nedopiranih i

silicijumom dopiranih čestica analiziran je rendgenskom difrakcijom (XRD), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM), visokorezolucionom transmissionom elektronskom mikroskopijom (HRTEM), energetskom disperzionom rendgenskom fluorescentnom spektroskopijom (EDXRF), infracrvenom spektroskopijom (IC) i u *in vitro* testovima u kulturi SaOs2, L929 i MRC-5 ćelija.

XRD i EDXRF analiza je pokazala različiti nivo supstitucije silicijumom pri istim uslovima sinteze na sfernim i vlaknastim česticama. Takođe, utvrđeno je da dopiranje silicijumom dovodi do snižavanja temperature fazne transformacije HA u α -TCP. Ovaj efekat je izraženiji kod silicijumom dopiranih čestica HA sferne morfologije. Iako nema značajnije razlike u faznom sastavu između nedopiranih i silicijumom dopiranih u malom procentu prahova HA nakon termičkog tretmana na višim temperaturama, primećeno je da su prahovi dopirani silicijumom u manjem procentu (0,55 mas. % za sferne i 0,58 mas. % za vlaknaste čestice) bioaktivniji u kulturi SaOs2 ćelija u poređenju sa nedopiranim prahovima. Ekstrakti termički tretiranih sfernih i vlaknastih čestice na 1200 °C pokazuju manju citotoksičnost u kulturi SaOs2 i L929 ćelija. SEM i XRD analizom je utvrđeno da termičkim tretmanom na 1150 °C sferne čestice HA kontrolisano dopirane silicijumom transformišu u α -TCP uz očuvanje sferne morfologije. Zahvaljujuću pomenutom postupku sinteze moguće je dobiti silicijumom stabilizovane α -TCP čestice bez mlevenja koje je neizostavan proces u slučaju kada se α -TCP čestice dobijaju reakcijama u čvrstoj fazi.

U ovom radu korišćene su tri različite tehnike sa pripremu skafolda. Skafoldi su dobijeni korišćenjem silicijumom dopiranih sfernih i trakastih α -TCP čestica termički tretiranih na 1200 °C koje su nakon mlevenja umešavane sa 30 % rastvorom vodonik-peroksida i polimetilmetakrilatnih vlakana (PMMA) čija je osnovna uloga formiranje povezane poroznosti. Nakon očvršćavanja i naknadnog termičkog tretmana, u cilju sagorevanja PMMA, vlakana dobijeni su skafoldi odgovarajuće mikro- i makro-porozne strukture. Termički tretman je nepotreban u slučaju kada je sa pripremu skafolda korišćen samo vodonik-peroksid. Skafoldi pripremljeni tehnikom replike sunđerom korišćenjem silicijumom dopiranih sfernih čestica, termički tretiranih na 1150 °C, imaju uniformnu, međupovezanu poroznu strukturu i vrednost pritiska čvrstoće od 5,7 MPa nakon sinterovanja na 1450 °C tokom 2h, pri čemu se α -TCP/HA kontroliše. *In vitro* test je pokazao dobru ćelijsku proliferaciju na ispitivanim skafoldima.

Prikazani rezultati u ovom radu doprinose boljem razumevanju postupaka sinteze silicijumom dopiranih HA i skafolda na bazi bazi kalcijum-fosfatnih jedinjenja. Pored toga, sintetisani materijali u formi HA/ α -TCP praha ili skafolda, karakterisani odgovarajućim metodama, pokazuju veliki potencijal za primenu u lečenju koštanih defekata.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Kosti i struktura kostiju	3
2.1.	Makroskopska struktura kosti	3
2.2.	Mikroskopska struktura kosti	5
2.3.	Ultrastruktura kosti.....	7
2.4.	Histogeneza kosti	7
2.4.1.	Intermembranska osifikacija	7
2.4.2.	Enhondralna osifikacija.....	8
2.5.	Modelovanje i remodelovanje koštanog tkiva	9
3.	Hidroksiapatit.....	12
3.1.	Silicijum u fiziologiji kosti i hrskavice.....	12
3.2.	Supstitucija silicijumom u kalcijum-fosfatnim jedinjenjima	14
3.3.	Teorijska studija supstitucije silicijumom u kalcijum-fosfatima	16
3.4.	Poređenje biološke aktivnosti silicijumom supstituisane kalcijum-fosfatne biokeramike	17
3.5.	Uticao silicijuma na biološki odgovor organizma na implant	18
4.	Skafoldi	21
4.1.	Metode merenja poroznosti i veličine pora.....	24
4.2.	Uticao poroznosti i veličine pora na osteogenezu.....	25
4.2.1.	Uticao poroznosti i veličine pora u in vitro uslovima	25
4.2.2.	Uticao poroznosti u in vivo uslovima	25
4.2.3.	Uticao veličine pora u in vivo uslovima.....	26
4.3.	Uticao poroznosti na mehanička svojstva.....	28
5.	Materijali za dobijanje skafolda.....	29
5.1.	Biorazgradive polimerne matrice.....	29
5.2.	Keramika	30
5.3.	Biostaklo.....	31
5.4.	Kompozitni skafoldi.....	31

6.	<i>Tehnike dobijanja skafolda</i>	33
6.1.	<i>Termički inicirano fazno razdvajanje (TIPS)</i>	33
6.2.	<i>Tehnika izluživanja čestica (particulate-leaching)</i>	33
6.3.	<i>Tehnika faznog razdvajanja</i>	34
6.3.1.	<i>Tehnika faznog razdvajanja čvrsto-tečno</i>	34
6.3.2.	<i>Tehnika faznog razdvajanja tečno-tečno</i>	34
6.5.	<i>Tehnika replike sunđera</i>	35
	<i>Eksperimentalni deo</i>	40
7.	<i>Sinteza vlakana hidroksiapatita</i>	40
7.1.	<i>Eksperimentalna procedura</i>	40
7.2.	<i>Metode karakterizacije</i>	41
7.3.	<i>Rezultati i diskusija</i>	42
8.	<i>Sinteza nedopiranih i silicijumom dopiranih prahova HA</i>	49
8.1.	<i>Eksperimentalna procedura</i>	49
8.2.	<i>Metode karakterizacije nedopiranih i silicijumom dopiranih prahova HA</i>	50
8.3.	<i>Rezultati i diskusija</i>	52
9.	<i>Sinteza skafolda na bazi α-TCP cementa i PMMA vlakana</i>	69
9.1.	<i>Eksperimentalna procedura</i>	69
9.2.	<i>Metode karakterizacije</i>	70
9.3.	<i>Rezultati i diskusija</i>	71
10.	<i>Silicijumom dopirani bifazni α-kalcijum-fosfat/hidroksiapatit skafoldi dobijeni tehnikom replike poliuretanskog sunđera</i>	80
10.1.	<i>Eksperimentalna procedura</i>	80
10.2.	<i>Metode karakterizacije</i>	81
10.3.	<i>Rezultati i diskusija</i>	83
11.	<i>Sinteza skafolda modifikovanom tehnikom replike poliuretanskog sunđera</i>	112
11.1.	<i>Eksperimentalna procedura</i>	112
11.2.	<i>Metode karakterizacije</i>	112
11.3.	<i>Rezultati i diskusija</i>	112

<i>12. Zaključak</i>	115
<i>Literatura</i>	119

Spisak slika

<i>Sl. 2.1. Presek proksimalnog kraja femura.....</i>	<i>4</i>
<i>Sl. 2.2. Shematski prikaz uzdužnog preseka kosti.....</i>	<i>4</i>
<i>Sl.2.3. Poprečni presek kortikalnog osteona sa koncentričnim lamelama koje okružuju vaskularne kanale (snimljeno u polarizovanoj svetlosti).....</i>	<i>5</i>
<i>Sl. 2.4. Srpasti kancelozni osteon sa lamelama koje se pružaju paralelno duž granice koštane srži.....</i>	<i>6</i>
<i>Sl. 2.5. Sekvenca remodelovanja kortikalne kosti.....</i>	<i>11</i>
<i>Sl. 2.6. Sekvenca remodelovanja kancelozne kosti.....</i>	<i>11</i>
<i>Sl. 3.1. SEM mikrofografije materijala na bazi Si-α-TCP, HA i Si-HA nakon inkubacije u različitim uslovima: a i d) potpuna transformacija Si-α-TCP u pločaste kristale HA koja se dešava u prisustvu ćelija osteoblasta u in vitro kulturi b) Si-α-TCP transformacija u karbonatnu-HA fazu nakon inkubacije u SBF koji sadrži proteine seruma c) Si-α-TCP u SBF bez seruma i ćelija, e) HA i Si-HA proučavani u identičnim uslovima pokazuju veoma ograničenu reaktivnost.....</i>	<i>20</i>
<i>Sl. 7.1. Rendgenogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka A1, A2, A3 i A4.....</i>	<i>40</i>
<i>Sl.7.2. Podaci dobijeni rendgenskom difrakcijom (\bullet), izračunati (-) i razlika (na dnu) između izračunatih podataka i podataka dobijenih rendgenskom difrakcijom uzorka A4. Vertikalni markeri ispod rendgenograma ukazuju na moguće Bragove refleksije.....</i>	<i>43</i>
<i>Sl. 7.3. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka.....</i>	<i>45</i>
<i>Sl. 7.4. SEM mikrofografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka sa umetnutim mikrofografijama istih uzoraka snimljenim pri većem uvećanju: (a) A1, (b) A2, (c) A3) i (d) A4.....</i>	<i>46</i>
<i>Sl. 7.5 SEM mikrofografije hidrotermalno sintetisanog uzorka A4 pri (a) manjem i (b) većem uvećanju.....</i>	<i>47</i>
<i>Sl. 7.6. TEM mikrofografije uzorka A4 snimljene pri manjem uvećanju (a); TEM mikrofografije HA traka (b); HRTEM slika HA trake sa vidljivim kristalnim ravnima (c) i odgovarajući elektronski difraktogram HA trake (d).....</i>	<i>48</i>
<i>Sl. 8.1. Difraktogrami hidrotermalno sintetisanih prahova osušenih na 105 °C.....</i>	<i>53</i>
<i>Sl. 8.2. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka osušenih na 105 °C.....</i>	<i>55</i>
<i>Sl. 8.3. Difraktogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka nakon termičkog tretiranja na 1200 °C tokom 2 h.....</i>	<i>56</i>
<i>Sl. 8.4. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka HA nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2 h.....</i>	<i>57</i>

Sl. 8.5. TEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka sa elektronskom difrakcijom: (a) S1.50SiL, (b) W1.50SiL, (c) S1.50SiH i (d) W1.50SiH.....	59
Sl. 8.6. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka: (a) S1.50, (b) W1.50, (c) S1.50SiL, (d) W1.50SiL, (e) S1.50SiH, (f) W1.5SiH.....	60
Sl. 8.7. MTS analiza na ekstraktima praha sfernih i trakastih uzoraka na SaOs2 ćelijama osteosarkoma nakon 72 h.....	61
Sl. 8.8. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka: (a) S1.50SiH i (b) W1.50SiH termički tretiranih na 1200 °C	62
Sl. 8.9. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka nakon držanja u SBF tokom 72 h (a) S1.50, (b) W1.50, (c) S1.50SiL, (d) W1.50SiL, (e) S1.50SiH i (f) W1.50SiH.....	64
Sl. 8.10. Uticaj termičkog tretmana i morfologije čestica hidroksiapatita na metaboličku aktivnost L929 ćelija * = $p < 0,05$ upoređen sa kontrolnim uzorkom ($100,0 \pm 5,6$ %); osenčena oblast.....	65
Sl. 8.11. Morfološka analiza L929 ćelija kultivisanih na česticama hidroksiapatita: a i f) kontrolne kulture, b i g) S1.50SiL osušen, c i h) S1.50SiL termički tretiran na 1200 °C, d i i) W1.50SiL osušen, e i j) W1.50SiL termički tretiran na 1200 °C (uvećanje a-e 100x, f-j 200x)	66
Sl. 8.12. Uticaj medijuma za kondicioniranje pripremljenog sa osušenim ili termički tretiranim na 1200 °C česticama hidroksiapatita na metaboličku aktivnost L929 ćelija. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$ upoređen sa kontrolnim uzorkom ($100,0 \pm 3,4$ %); osenčena oblast.....	67
Sl. 8.13. Morfološka analiza L929 ćelija kultivisanih na ekstraktima čestica hidroksiapatita: a) kontrolne kulture, b) S1.50SiL osušen, c) S1.50SiL termički tretiran na 1200 °C, d) W1.50SiL osušen, e) W1.50SiL termički tretiran na 1200 °C (uvećanje a-e 100x).....	67
Sl. 9.1. SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H ₂ O ₂ nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h.....	71
Sl. 9.2. SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H ₂ O ₂ -PMMA nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h.....	72
Sl. 9.3. SEM mikrografije skafolda W1.50SiH-H ₂ O ₂ nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h.....	72
Sl. 9.4. Mikrografije skafolda W1.50SiH-H ₂ O ₂ -PMMA snimljene na istom mestu pre a i c) i posle b i d) držanja u simuliranom telesnom fluidu tokom 7 dana	74
Sl. 9.5. Mikrografije skafolda S1.50SiH-H ₂ O ₂ -PMMA snimljene na istom mestu pre a i c) i posle b i d) držanja u simuliranom telesnom fluidu tokom 7 dana	74

<i>Sl. 9.6. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 zasejanih na kontrolnom staklu nakon perioda kultivacije od 72 h snimljene pri različitom uvećanju</i>	<i>75</i>
<i>Sl. 9.7. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda: a, b) W-osušen, c, d)SW-osušen i e, f) S-osušen nakon perioda kultivacije od 72 h</i>	<i>76</i>
<i>Sl. 9.8. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda: a, b) W-1200 °C, c, d) SW-1200 °C i e, f) S-1200 °C nakon perioda kultivacije od 72 h</i>	<i>77</i>
<i>Sl. 9.9. MTS analiza osušenih i termički tretiranih uzoraka na ćelijama osteosarkoma nakon 72 h inkubacije</i>	<i>78</i>
<i>Sl. 9.10. Aktivnost alkalne fosfataze ćelija osteosarkoma SaOs2 na osušanim i termički tretiranim skafoldima nakon 72 h inkubacije</i>	<i>79</i>
<i>Sl. 10.1. Rendgenski difraktogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h</i>	<i>83</i>
<i>Sl. 10.2. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka S.167, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2</i>	<i>84</i>
<i>Sl. 10.3. Linearno skupljanje uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH na temperaturama do 1400 °C i odgovarajuće fotografije istih uzoraka na 25, 1150, 1300 i 1400 °C, snimljene na termičkom mikroskopu</i>	<i>86</i>
<i>Sl. 10.4. Raspodela veličine čestica dobijenih prahova S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH nakon sušenja na 105 °C a) i žarenja na 1150 °C b)</i>	<i>87</i>
<i>Sl. 10.5. SEM mikrografije uzoraka a)S1.50, b)S1.50SiL i c) S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h</i>	<i>87</i>
<i>Sl. 10.6. Mikrografije poliuretanskih sunđera nakon potapanja u suspenziju PVA i praha a,b) SK-S1.50, c,d)SK-S1.50SiL i e,f) SK-S1.50SiH</i>	<i>90</i>
<i>Sl. 10.7. a) Shema molekule surfaktanta, b) Ilustracija adsorpcije surfaktanta na površini čestice koordinatnim vezivanjem, c) sterna stabilizacija čestica, d) stabilizacija micela</i>	<i>92</i>
<i>Sl. 10.8. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1200 °C tokom 3h</i>	<i>94</i>
<i>Sl. 10.9. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1300 °C tokom 3h</i>	<i>96</i>
<i>Sl. 10.10. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h</i>	<i>96</i>
<i>Sl. 10.11. Makroskopski prikaz skafolda: a) SK-S1.50, b) SK-S1.50SiL, c) SK-S1.50SiH i d, e, f) SK-S1.50OS termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h</i>	<i>99</i>

<i>Sl. 10.12. Rendgenski difraktogrami skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h.....</i>	<i>100</i>
<i>Sl. 10.13. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h.....</i>	<i>101</i>
<i>Sl. 10.14. Makroskopski prikaz skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL, e, f) SK-S1.50SiH različite makroporoznosti termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h.....</i>	<i>102</i>
<i>Sl. 10.16. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h nakon 7 dana držanja u SBF-u.....</i>	<i>105</i>
<i>Sl. 10.17. SEM mikrografije površine uzoraka skafolda SK-S1.50SiH termički tretiranog 1450°C pri različitim uvećanjima, nakon držanja u SBF-u tokom 7 dana.....</i>	<i>106</i>
<i>Sl. 10.18. MTT analiza ćelija MRC-5 na skafoldima sinterovanim na 1400 °C i skafoldima koji su nakon sinterovanja držani u SBF-u tokom 3 dana</i>	<i>108</i>
<i>Sl. 10.19. DET analiza ćelija MRC-5 na skafoldima sinterovanim na 1400 °C i skafoldima koji su nakon sinterovanja držani u SBF-u tokom 3 dana</i>	<i>108</i>
<i>Sl. 10.20. SEM mikrografije ćelija humanih fibroblasta pluća MRC-5 nakon perioda kultivacije od 72 h na površini skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH sinterovanih na 1400 °C tokom 3h a, c, e) i nakon 3 dana u SBF-u b, d, f).....</i>	<i>110</i>
<i>Sl. 10.21. Prikaz: nosača i silomera od 500N a,) oblika i dimenzija b) skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH korišćenih za određivanje pritisne čvrstoće</i>	<i>111</i>
<i>Sl. 11.1. SEM mikrografije skafolda dobijenih modifikovanom tehnikom replike suđera nakon termičkog tretmana na 1450 °C tokom 3h: a, b) S1.50, c, d) S1.50SiL i e, f) S1.50SiH.....</i>	<i>114</i>

Spisak tabela

<i>Tabela 5.1. Fizička svojstva sintetičkih, biokompatibilnih i biodegradabilnih polimera korišćenih za dobijanje skafolda</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 6.1. Najčešće korišćene tehnike za dobijanje skafolda</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 6.2. Mehaničke karakteristike skafolda u zavisnosti od vrste korišćenog materijala.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 7.1. Parametri sinteze i osobine sintetizovanog hidroksiapatita i monetita.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 7.2. Rezultati strukturnog utičnjavanja vlakana hidroksiapatita (uzorak A4)</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 8.1. Količine reaktanata korišćene za dobijanje silicijumom dopiranih i nedopiranih prahova HA različite morfologije</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 8.2. Sadržaj Jedinični parametri kristalne rešetke sfernih i trakastih, silicijumom dopiranih i nedopiranih uzoraka</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 8.3. Sadržaj Si u uzorcima HA određen EDXRF spektroskopijom.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 9.1. Količine jedinjenja korišćenih za pripremu skafolda na bazi α-TCP i PMMA.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 9.2. Sastav diskova korišćenih u ALP testu</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 10.1. Sastavi suspenzija korišćenih za pripremu skafolda metodom replike sunđera</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 10.2. Fizičke karakteristike nekih organskih tečnosti na 20 °C</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 10.3. Viskoznost nekih od najzastupljenijih, u vodi rastvornih vezivnih sredstava</i>	<i>92</i>

Spisak skraćenica

BMD	gustina koštanih minerala
BMU	koštane multicelularne jedinice
CP	kalcijum-fosfat
DFT	teorija funkcionalne gustine
ECM	ekstracelularna matrica
ED	elektronska difrakcija
EDS	energetska disperziona spektroskopija
EDXRF	energetska disperziona rendgenska fluorescentna spektroskopija
FTIR	infracrvena spektroskopija
HA	hidroksiapatit; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
HRTEM	visoko rezolucijona transmisiona elektronska mikroskopija
NCP	nekolagenski protein
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
PDLA	D-PLA
PDLLA	poli(L-laktid-co-D,L-laktida)
PEG	polietilen-glikol
PEO	polietilen-oksid
PGA	poliglikolna kiselina
PLA	polilaktidna kiselina
PLGA	polilaktid-koglikolid
PLLA	L-PLA
PPF	polipropilen fumarat
PS	polistiren
PVA	polivinil alkohol
PVP	polivinil-pirolidin

SBF	simulirani telesni fluid
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
Si-HA	silicijumom supstituisani hidroksiapatit; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_{3-x}(\text{SiO}_4)_x\text{OH}_{1-x}$
Si- α -TCP	silicijumom supstituisani α -kalcium-fosfat
SPF	simulirani fluid koji sadrži serumske proteine
TEM	transmisiona elektronska difrakcija
TEOS	tetraetilortosilikat
TIPS	termički inicirano fazno razdvajanje
TPOS	tetrapropilortosilikat
α -TCP	α -kalcijum-fosfat; $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
β -TCP	β -kalcijum-fosfat; $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

1. Uvod

Milioni ljudi širom sveta pate od degenerativnih i inflamatornih bolesti koštanog i hrskavičavog tkiva koje čine polovinu od ukupnog broja oboljenja koja zahvataju populaciju stariju od 50 godina. Pored toga, frakture, osteoporoza, skolioza i drugi muskuloskeletni problemi često zahtevaju hiruršku intervenciju koja podrazumeva uvođenje stalnih, privremenih ili biodegradabilnih implanata na bazi savremenih biomaterijala koji bi zamenili do skora, u regenerativnoj hirurgiji koštanog i hrskavičavog tkiva, najzastupljenije autologne i alograftne supstiuente koji se odlikuju brojnim nedostacima kao što su: potreba za drugom hirurškom intervencijom, ograničen količina prikupljenog tkiva, mogućnost odbijanja od strane imunog sistema, rizik od infekcije i dr.

U cilju prevazilaženja problema vezanih za nepredvidivo ponašanje pomenutih materijala, velika pažnja je usmerena na razvoj sintetički koštani supstituenti. Uprkos velikom napretku koji je postignut na polju regenerativne medicine proteklih nekoliko godina, još uvek nije razvijen materijal koji bi dao zadovoljavajuće rezultate u zalečenju velikih koštanih defekata. Da bi bili odobreni za kliničku primenu sintetički koštani supstituenti treba da zadovolje niz kriterijuma. Tako se od sintetičkih materijal zahteva da imaju kontrolisan kvalitet i optimizovane biološke i mehaničke karakteristike za specifičnu primenu. Takođe, oni treba da pokažu sposobnost da se prilagode obliku koštanih defekata uz korišćenje minimalnih invazivnih tehnika, pokazujući stabilnost nakon implantacije. Korišćenje minimalnih invazivnih tehnika dovelo je do smanjenja operativnog vremena i komplikacija kao što su infekcija i bol, koje se javljaju nakon hirurške intervencije.

Sa unapređenjem razvoja regenerativne medicine a naročito inženjerstva tkiva, u skorije vreme se može očekivati potpuno nova strategija tretmana pacijenata. Inženjerstvo tkiva ima za cilj da regeneriše oštećene ili izgubljene delove tkiva ili organe, fokusirajući se na upotrebu, ćelijama sasejanih nosača, koji bi postepeno zamenili danas komercionalno dostupne, mehanički stabilne, biokompatibilne materijale. Novi pristup podrazumeva kombinovanje bioloških svojstava živih ćelija i fizičkih svojstava specijalno dizajniranih materijala u cilju formiranja veštačkih organa. Jednu od najvažnijih strategija inženjerstva tkiva predstavlja dizajniranje i procesiranje poroznih, biodegradabilnih trodimenzionalnih struktura tzv. skafolda, koji se odlikuju visokoporoznom strukturom sa međupovezansom i uniformnom raspodelom pora. Ovako dizajnirani skafoldi treba da služe kao strukturna podrška za razvoj ćelija i ekstracelularne matrice koji bi ubrzali proces stvaranja novog koštanog tkiva. Za što brže postizanje pune funkcije izgubljenog/uklonjenog organa, veštačko tkivo se formira *ex vivo* a nakon toga implantira na mesto oštećenja. Iako postoji značajan napredak na ovom polju koje obuhvata širu oblast bioloških nauka i nauka o materijalima, kliničko inženjerstvo tkiva se još uvek u početnoj fazi razvoja.

Inženjerstvo tkiva se bazira na razumevanju procesa formiranja i regeneracije tkiva a ne samo na implantaciji novih materijala zbog čega je u teorijskom delu ovog rada dat kratak opis procesa formiranja i strukture koštanog tkiva. Takođe, predstavljene su najzastupljeniji neorganski i organski materijali, kao i najsavremenije tehnike koje se koriste za dobijanje skafolda sa fokusom na razvoj sintetičkih skafolda na bazi biokeramike. Posebna pažnja posvećena je tehnici replike sunđera kao jednoj od najčešće, u poslednje vreme, korišćenih tehnika za proizvodnju visokoporoznih, biodegradabilnih skafolda zadovoljavajućih mehaničkih karakteristika.

2. Kost i struktura kostiju

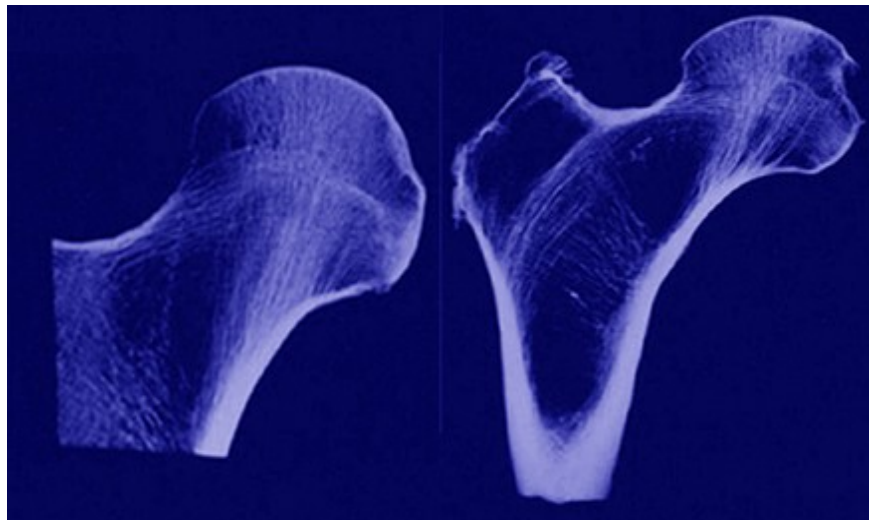
Kosti predstavljaju 206 zasebnih organa koje izgrađuju skeletni sistem. Kao i druga vezivna tkiva, kosti se sastoje od ćelija, vlakana i osnovnih jedinjenja, ali za razliku od drugih tkiva, ekstracelularna komponenta je kalcifikovana, dajući im čvrstoću i postojanost, što ih čini pogodnim za obavljanje potporne i zaštitne uloge skeletnog sistema. Kost je visokospecijalizovano tkivo koje obavlja različite funkcije: zaštita vitalnih organa kranijalnog i torakalnog dela, kao i koštane srži, smeštene unutar same kosti u kojoj se stvaraju krvni elementi, mehanička potpora i mesto za koje se vežu mišići i tetive, potpomaže metaboličku aktivnost zahvaljujući sposobnosti da skladišti različite jone, naročito kalcijumove i fosfatne, koje u slučaju potrebe kontrolisano otpuštaju, čineći tako glavni organ koji je odgovoran za održavanje serumske homeostaze.¹

2.1. Makroskopska struktura kosti

Skelet čoveka je podeljen u dva regiona: osnovni skelet, koji uključuje lobanju, kičmene pršljenove, rebra, grudnu i hloidnu kost, i periferni skelet, koji uključuje ekstremitete i karlicu.¹ Na osnovu dužine, kosti se mogu klasifikovati na duge, kratke, ravne i kosti nepravilnog oblika. Ipak, ova tradicionalna klasifikacija nije od velikog značaja, jer kosti moraju biti proučavane nezavisno i razmatrane u odnosu na funkcionalne zahteve koji se postavljaju pred njih.

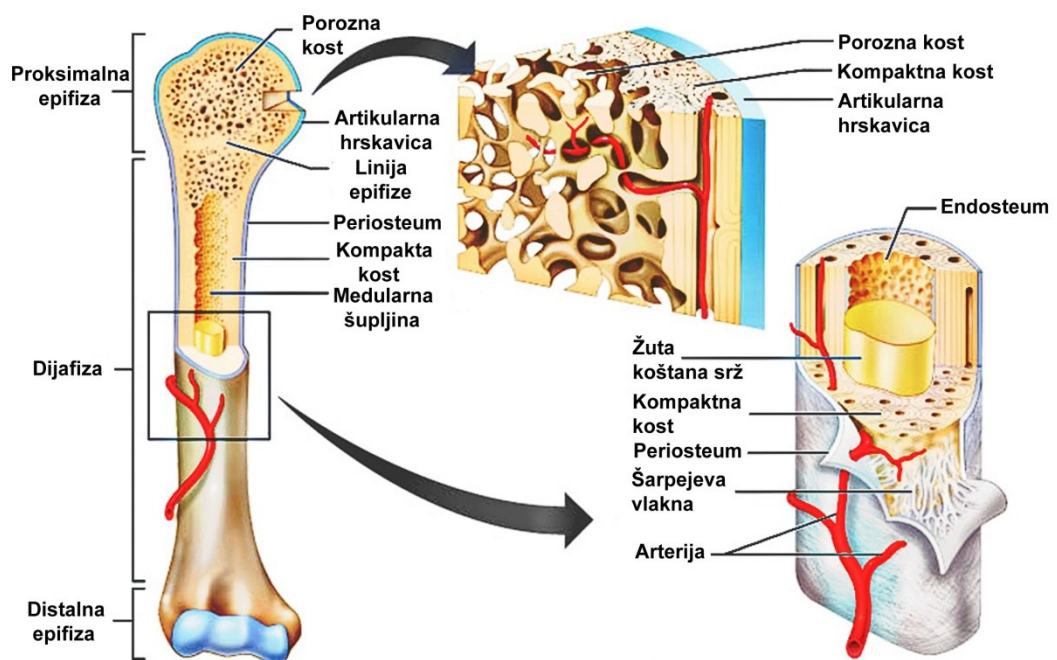
Kod svake pojedinačne kosti razlikuju se dve vrste koštanog tkiva-kompaktna kost, koja se odnosi na kortiks potpuno razvijene kosti (kortikalna kost), i sundefasta kost (kancelozna kost), koja čini centralni region kosti. Kortikalna kost se javlja kao čvrsta kontinualna forma u kojoj su šupljine vidljive jedino uz pomoć mikroskopa. Kancelozna kost se sastoji od tankih trebekula (koštanih šiljaka) organizovanih u trodimenzionalu strukturu. Veličina i debljina korteksa i arhitektura kancelozne kosti je dizajnirana tako da se suprotstavi vrsti i smeru sila kojim je svaka pojedinačna kost izložena (Sl. 2.1). Zbog toga se kost ne sme posmatrati kao izotropno tkivo. U cilju što preciznijeg merenja izrazito anizotropnog tkiva, kao što je kancelozna kost, potrebno je primeniti specijane postupke pripreme uzoraka.

Diafiza (cevasti stub) dugih kostiju, kao što su tibija i femur, se sastoji od tankozidnog cilindra kortikalne kosti sa centralnom šupljinom unutar koje je smeštena koštana srž (Sl. 2.2). Cevasta forma predstavlja idealnu formu koja treba da izdrži opterećenje na savijanje i uvrtnje, jer je šuplji cilindar jači od ispunjenog cilindra. Prema metafizi i diafizi kompaktna kost postaje progresivno tanja, a unutrašnji prostor je ispunjen kanceloznom kosti. Ovakva struktura kosti omogućava da kost na najbolji način izdrži i preraspodeli silu



Sl. 2.1. Presek proksimalnog kraja femura

pritiska koja nastaje tokom kretanja. Kortikalna kost čini oko 80 % mase skeleta, a kancelozna oko 20 %. Relativni odnos kancelozne i kortikalne kosti se razlikuje u različitim delovima skeleta. Verterbralna i iliačna kost, na kojima se najčešće vrše ispitivanja na ljudskim i životinjskim modelima, se uglavnom sastoje od kancelozne kosti sa prilično tankim omotačem kortikalne kosti. Kortikalni omotač ima značajan uticaj na čvrstoću same kosti. Prečnik kortikalne kosti se povećava tokom života, ali istovremeno dolazi do povećanja šupljine u kojoj se nalazi koštana srž, što dovodi do tanjenja kortikalnog dela.

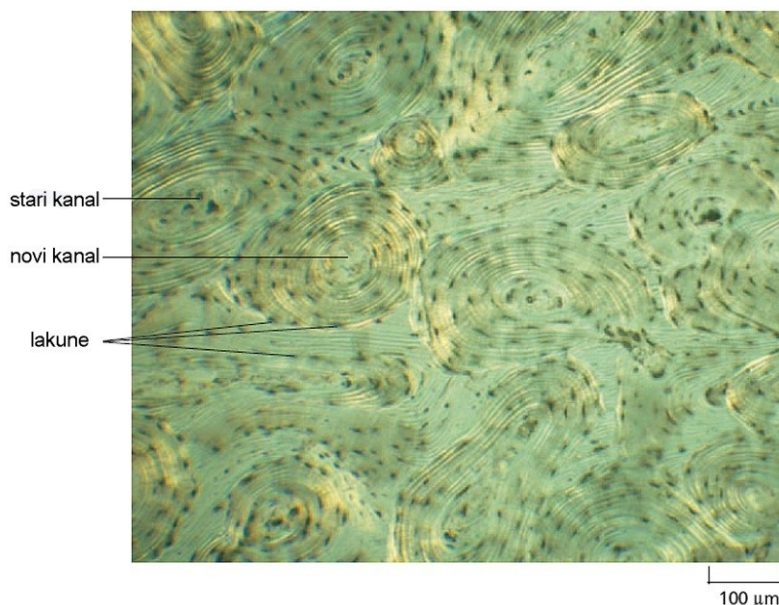


Sl. 2.2. Shematski prikaz uzdužnog preseka kosti

2.2. Mikroskopska struktura kosti

Na mikroskopskom nivou, kost se može podeliti na dva strukturno različita tipa: upredena i lamelarna kost. U upredenoj i nezreloj kosti, kolagena vlakna su slučajno raspoređena unutar same strukture, dok su u lamelarnoj kosti kolagena vlakna orijentisana u paralelne listove i snopove, a orijentacija vlakana se menja između sukcesivnih lamela. Ovo objašnjava pomeranje svetlih i tamnih traka vidljivih u polarizovanoj svetlosti (Sl. 2.3. i 2.4). Broj osteocita u jedinici zapremine u upredenoj kosti je veći nego u lamelarnoj kosti i oni su neravnomerno raspoređeni. Upredena kost nastaje tokom brzog formiranja kosti, u procesu razvoja, zalečenja nakon frakture ili kod razvoja tumora ili nekog drugog oboljenja. Dezorijentacija kolagenih vlakana daje upredenoj kosti izotropne mehaničke karakteristike. Nakon četvrte godine većina koštanog tkiva ima lamelarnu strukturu, bez obzira da li je poredana u osteone ili kao intersticijalno koštano tkivo.

Osnovu kortikalne i kancelozne kosti čini osteon (Sl. 2.3. i 2.4). Tačniji naziv bi bio sekundarni osteon, kako bi se napravila razlika u odnosu na primarni osteon, formiran tokom inicijalnog stvaranja kosti. Približno dve trećine zapremine kortikalne kosti nastaje od sekundarnih osteona. Trodimenzionalna struktura sekundarnih kortikalnih osteona je sačinjena od razgranatih cilindričnih kolona sa prosečnim razmakom između mesta grananja od 2,5 mm. Ovo rastojanje se uzima kao prosečna dužina sekundarnog kortikalnog osteona. Prečnik sekundarnog osteona kod iliačne kreste iznosi približno 150 μm , sa centralnim vaskularnim kanalom prečnika 40 μm (Haversov kanal). Haversov kanal je povezan sa drugim kanalom i komunicira sa periosteumom i sa šupljinom u kojoj se nalazi koštana srž preko poprečnih uvijenih kanala poznatih kao Volkmanovi kanali. Krvni sudovi Volkmanovih



Sl. 2.3. Poprečni presek kortikalnog osteona sa koncentričnim lamelama koje okružuju vaskularne kanale (snimljeno u polarizovanoj svetlosti)

kanala su često veći od krvnih sudova Haversovih kanala. Sekundarni kortikalni osteoni su obično orijentisani duž uzdužne ose tubularne kosti. U centru sekundarnog kortikalnog osteona nalazi se Haversov kanal, sa jednom ili dve kapilare prekrivene fenestrijalnim endotelom. Obično postoje i nemijelizovana i mestimicna mijelinizovana nervna vlakna. Koncentrične lamele kosti su centrirane oko ovog kanala. Na periferiji, sekundarni osteon je jasno razgraničen od okolne kosti cementnom linijom, koja predstavlja oblast smanjene mineralizacije, a koja sadrži sulfatisane mukosupstance i verovatno malo ili nimalo kolagena. Cementna linija se može posmatrati i kao reverzna linija koja označava nastavak procesa resorpcije kojem prethodi formiranje kosti. Osteociti su obično raspoređeni unutar osteona, tako da duža osa ćelija bude paralelna lamelama. Osteociti se nalaze u lakunama koje su povezane kanalikulima i smatraju se najstarijim ili terminalno diferenciranim ćelijama osteoblastne linije. Posmatrano na citoplazmatičnom nivou, unutar kanalikula ćelije dobijaju hranu i održavaju kontakt tokom ćelijskih procesa u osteocitima, ili iz procesa u ćelijama koje se nalaze na površini kosti.

Sekundarni kancelozni osteon ima istu osnovnu strukturu kao i kortikalni osteon, ali drugačiji oblik (Sl. 2.4). Osteon liči na široke trake koje su izgrađene od paralelnih lamela, vezanih na jednoj strani sa koštanom srži, a na drugoj sa nepravilnom cementnom linijom. Srednja debljina je mnogo manja u odnosu na srednju vrednost širine (odnos je manji od 0,2). Zbog toga pojedinačni trodimenzionalni osteon može stvarati različiti broj profila u pojedinačnom slučajnom dvodimenzionalnom poretku. Kao u kortikalnoj kosti, intersticijalna kost se vidi između sekundarnih osteona, predstavljajući zaostalu generaciju sekundarnih kanceloznih osteona.



Sl. 2.4. Srpasti kancelozni osteon sa lamelama koje se pružaju paralelno duž granice koštane srži

2.3. Ultrastruktura kosti

Osnovne komponente kosti čine ćelije i mineralizovana ekstracelularna matrica (ECM). Samo 10-20 % mase koštanog matriksa čini voda. 67 % suve mase kosti čini neorganska faza (uglavnom hidroksiapatit), 30-40 % kolagen, a ostatak čine nekolagenski proteini (NCP) i ugljenihidrati. Odnos kolagena prema nekolagenskim proteinima je prilično ujednačen u kostima, pri čemu kolageni proteini čine 90 % organske matrice u poređenju sa drugim tkivima, gde se taj procenat kreće od 10-20 %. Koštane soli formiraju neorganske konstituente koštanog matriksa i pretvaraju meki organski matriks u čvrstu strukturu, dajući kostima mehaničku čvrstoću. Hidroksiapatit predstavlja osnovnu komponentu, ali koštani minerali sadrže i brojne nečistoće. Hidroksiapatit formira male, tanke igličaste kristale dužine oko 40 nm i debljine oko 1,5-3 nm. Kristali se formiraju duž kolagenih vlakana u pravilnim razmacima od 60-70 nm.²

Predominantni kolagen kosti je kolagen tipa I, koji se nalazi u koži i tetivama, a samo malu količinu čini kolagen tipa III, V i IX. Kao i u drugim vezivnim tkivima, kolagena vlakna imaju funkciju da obezbede čvrstoću i elastičnost. Čvrstoća na istezanje kosti u velikoj meri zavisi od vlakana. Kolagen tipa I predstavlja trostruki helikoidalni molekul sintetisan od strane osteoblasta kao prokolageni molekul, sa jakim kovalentnim vezama koje drže zajedno molekule kolagena.²

Nekolagenski proteini kostiju predstavljaju kompleksne skupine molekula koje potiču od oksogena (uglavnom serumski izvedenih proteina) ili lokalnih izvora (sintetisanih od strane osteoblasta). Koštani minerali imaju izrazito veliku sposobnost adsorpcije, zbog čega mogu da vezuju mnoge proteine kao što je 2-HS-glikoprotein iz krvi, ali i faktore rasta. Osteoblasti proizvode veliki broj proteina, kao što su: alkalna-fosfataza, osteonektin i osteokalcin. Tačna uloga ovih proteina nije dovoljno dobro ispitana, ali je verovatno da oni igraju ključnu ulogu u procesu mineralizacije matriksa i u kontroli metabolizma osteoblasta i osteoklasta.²

2.4. Histogeneza kosti

Zamena već postojećeg vezivnog tkiva uvek nosi sa sobom i rizik od mogućeg formiranja koštanog tkiva. Razlikuju se dva načina osteogeneze: intermembranska osifikacije, u kojoj se kost formira direktno u primitivnom visokovaskularizovanom vezivnom tkivu, i enhodralna osifikacija, u kojoj se kost formira u postojećem hrskavičavom tkivu.²

2.4.1. Intermembranska osifikacija

Određene ravne kosti lobanje-frontalna, parietalna, ocipitalna i temporalna, se formiraju intermembranskom osifikacijom. U kondenzovanom vaskularnom vezivnom tkivu, mezenhimalne ćelije prolifериšu i diferenciraju direktno u perosteoblaste, a onda u osteoblaste, koje dalje stvaraju koštani matriks. Koštani matriks se prvo javlja u formi tankih snopova, ili trebekula, ili kao eosinofilni materijal. Nakon toga koštani matriks mineralizuje, a

osteoblasti bivaju zarobljeni u rastućoj kosti kao osteociti. Na periferiji mezenhimalne ćelije nastavljaju da diferenciraju u osteoblaste, a osteoblasti nastavljaju da formiraju kost na površini trebekula, stvarajući primarne spongioze (sastoje se od upredene kosti). Ako trebekule nastave da rastu na račun vezivnog tkiva, dolazi do formiranja primitivne kortikalne kosti. Kost se deponuje u nepravilnim koncentričnim slojevima pokazujući sličnost sa Haversovim sistemom, što se sastoji od upredene kosti (primarnog osteona). U drugim oblastima, debljanje trebekularne kosti se zaustavlja, a prostor vaskularnog vezivnog tkiva se postepeno transformiše u hematopoetsko tkivo stvarajući primitivnu kanceloznu kost. Kasnije će ova primarna ili primitivna kost biti uklonjena i progresivno zamenjena zrelijom lamelarnom kosti.²

2.4.2. *Enhondralna osifikacija*

Kosti kičmenog stuba, pelvisa i ekstremiteta se prvo formiraju kao hrskavice, koje se kasnije postepeno zamenjuju kosti u procesu koji se zove enhondralna osifikacija. U porđenju sa kosti, gde se apozicija kosti može desiti jedino na površini, hrskavica može rasti intersticijalno. U hrskavici nove ćelije mogu biti dodate po zapremini, povećavajući zapreminu stvaranjem ECM. Ovo predstavlja prednost u slučaju kada se zahteva brži rast tokom prenatalnog života i detinjstva, kao i kod longitudinalnog rasta dugih kosti. U ranom fetalnom razvoju, kondenzovane mezenhimalne ćelije se zamenjuju avaskularnim hrskavičavim modelom, koji ima nedovoljno formiran oblik zrele kosti. Kod dugih kostiju, primarni centar osifikacije se uočava u središnjem delu hrskavičavog modela. Istovremeno se odvijaju tri procesa: i) oko središnjeg dela diafize, ispod perihondriuma, mezenhimalne ćelije se menjaju kao bi formirale osteoblaste koje grade kost ispod hrskavičavog jezgra, prvobitno kao sloj osteoida, bogat kolagenom tipa I, koji kasnije mineralizuje, stvarajući periostalni prsten; ii) hondrociti u centru hrskavice prolaze kroz proces hipertrofije, i, kako se povećava njihova lakuna, upleteni matriks se sabija do tanke septe, koja kalcifikuje; iii) krvni sudovi formiraju periosteum i prodiru u jezgro hrskavice udruženi sa pericitima, hematopoetičnim i osteoprogenitorskim ćelijama, kao i osteoklastim.²

U unutrašnjosti hrskavičnog modela, osteoprogenitorske ćelije diferenciraju u osteoblaste, koji počinju da deponuju kost na septi kalcifikovane hrskavice. Tako, prethodno formirane trebekule kosti imaju jezgro kalcifikovane hrskavice. Ove primarne trebekule uskoro bivaju remodelovane i zamenjene sekundarnim trebekulama lamelarne kosti, ili koštanom srži. Nakon formiranja periostealnog prstena ne dolazi do daljeg intersticijalnog rasta diafize a dalje širenje je rezultat subperiostealnog apozicionalnog rasta (intermembranozna osifikacija). Primarni centri osifikacije se razvijaju u diafizi dugih kostiju tokom trećeg meseca fetalnog života.²

Mnogo kasnije, obično nakon rođenja, sekundarni centri osifikacije se javljaju u epifizi dugih kostiju. U sekundarnim centrima osifikacije, isti procesi se dešavaju u primarnim centrima osifikacije, osim što nema udružene subperihondralne depozicije kosti. Kad enhondralna osifikacija, koja potiče od primarnih centara osifikacije, dostigne nivo povezivanja diafize i epifize, ubrzani kontinualni longitudinalni rast dugih kostiju zavisi od

endohondralnog rasta na temenu rasta epifize. U ovom delu dolazi do citomorfoze ćelija hrskavice, koja je identična procesu koji je prethodno opisan u primarnim centrima osifikacije. Razlikuju se četiri različite zone koje predstavljaju četiri različita stadijuma citomorfoze ćelija hrskavice: i) zona odmora; ii) zona proliferacije (hondrocitna proliferacija); iii) zona hipertrofije (hondrocitna hipertrofija i ravnanje u kolone, uz dodatno deponovanje matriksa); iv) degenerativna zona (kalcifikacija hrskavičavog matriksa i metafizalno vaskularno urastanje i rasparčavanje kolagenih vlakana). Tokom ovog procesa proliferacije hrskavice i mineralizacije, kost nastavlja da raste sve dok ne dostigne konačnu dužinu.²

2.5. Modelovanje i remodelovanje koštanog tkiva

Razvoj i obnavljanje kosti uključuje tri osnovna procesa: longitudinalni rast, modelovanje i remodelovanje. Longitudinalni rast se okončava sa završetkom rasta kristalnih pločica na kraju perioda rasta. Tokom faze rasta kost poprima makroskopski oblik. Neka mesta površine podležu kontinualnom procesu resorpcije dok su druga u stalnom procesu formiranja, poznatom kao proces oblikovanja. U procesu oblikovanja dolazi do razgradnje kosti na jednom i stvaranja na drugom mestu, sve dok se ne postigne konačni oblik i veličina kosti. Modelovanje igra bitnu ulogu tokom procesa rasta i postaje relativno nedelotvorno tokom i nakon perioda potpunog formiranja skeleta. Remodelovanje je proces u kome se skelet kontinualno obnavlja. Proces započinje fetalnom osteogenezom i nastavlja se tokom života. To rezultuje obnavljanjem lamelarne kosti, ne uzrokujući velike promene u kvalitetu kosti, geometriji ili veličini. Svrha remodelovanja se ogleda u prilagođavanju skeleta promenama uslovljenim mehaničkim naprezanjima, kako bi se sprečilo nagomilavanje defekata nastalih tokom zamora, reparacija mikropukotina, očuvanje viabilnosti osteocita i omogućavanje skeletnom sistemu da učestvuje u homeostazi kalcijuma. Remodelovanje kosti pokazuje znatne regionalne promene u zavisnosti od mesta u skeletnom sistemu. Koštano remodelovanje je površinski fenomen i dešava se na svim površinama. U kosti se razlikuju četiri površine ili omotača: periostealni (periost), Haversovi kanali (interkortikal), endokortikal (endostel) i trebekularna površina. Pored razlika u aktivnosti procesa remodelovanja u zavisnosti od mesta na kome se proces odvija, postoji takođe razlika i u aktivnosti remodelovanja i koštanog balansa između različitih omotača iste kosti. Uopšte, aktivnost remodelovanja kancelozne kosti je 5-10 puta veća od one kod kortikalne kosti. Proces remodelovanja izmenjuje kost preko lokalizovane resorpcije osteoklasta koja sledi nakon osteoblastnog formiranja (udružen proces remodelovanja kosti).²⁻⁴

Remodelovanje kosti, koje kod odraslih obuhvata oko 90 % kosti, se odvija kroz niz procesa rukovođenih timom ćelija koje se nazivaju koštane multicelularne jedinice (BMU). Nakon aktivacije, osteoklasti počinu da erodiraju i resorbuju kost. Nakon što kost bude resorbovana do određene dubine, osteoklasti se zamenjuju mononuklearnim ćelijama koje završavaju proces resorpcije. Nakon završetka procesa resorpcije oblast naseljavaju preosteoblasti, diferencirajući u osteoblaste koji vode formiranju koštanog matriksa. Nakon određenog vremena (vreme starenja osteoida), koštana matrica mineralizuje u lamelarnu kost. Osteoblasti nastavljaju da formiraju koštani matriks koji kasnije mineralizuje, reparašući

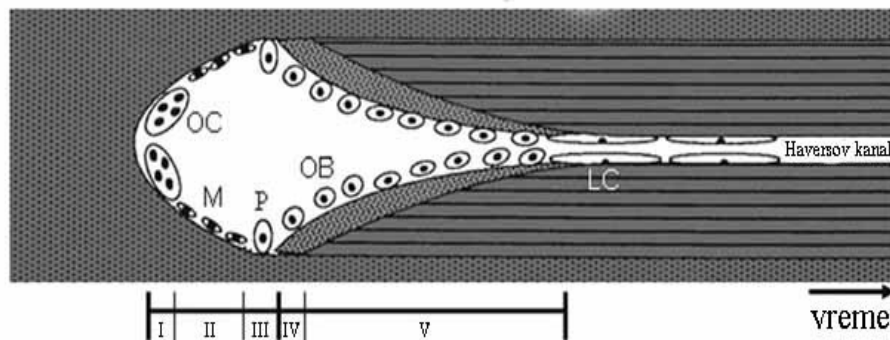
pri tome defekte (kvantni koncept remodelovanja kosti). Tokom ovog procesa jedan deo osteoblasta se inkorporira u matricu. Kao što je opisano, resorpcija i formiranje su blisko povezani procesi, kako vremenski, tako i mestom na kome se dešavaju. U normalnom procesu remodelovanja, resorpcija će uvek slediti proces formiranja, a formiranje će se uvek odvijati udruženo sa procesom resorpcije. Učestalost kojom određeno mesto na površini kosti podleže remodelovanju je poznata kao učestalost aktivacije.³⁻⁴

U kortikalnoj kosti, osnovna multićelijska jedinica formira kompleksnu i jedinstvenu strukturu, bušeći rupe u čvrstoj i kompaktnoj kortikalnoj kost, stvarajući longitudinalne kanale, koji se na poprečnom preseku javljaju kao zagrađene šupljine. Na prednjem delu je presečeni konus, gdje osteoklasti resorbuju kost. Nakon osteoklasta dolazi okno sa endotelnim ćelijama i perivaskularnim mezenhimalnim ćelijama, koje su osteoblastni progenitori. Oni iniciraju zatvaranje konusa, u kome se ispunjava longitudinalni tunel i formira novi kortikalni osteon (Sl. 2.5). Kod kancelozne kosti, redosled dešavanja je isti kao i kod kortikalne kosti (Sl. 2.6).³⁻⁴

Ukupno trajanje procesa remodelovanja kancelozne kosti je oko 4 meseca, sa periodom resorpcije od 1 meseca i periodom formiranja od 3 meseca. U kanceloznoj kosti ilijačnog grebena ovaj proces se obnavlja svake 2 godine (frekvencija aktivacije 0,5 po godini) kod zdravih odraslih osoba. Frekvencija aktivacije u kortikalnoj kosti (na površini haversovih kanala) je takođe oko 0,5 po godini. Tako je površinski bazirana aktivnost skoro identična u kanceloznoj i kortikalnoj kosti. Pošto je odnos površine kosti i zapremine kosti mnogo manji u kortikalnoj nego u kanceloznoj kosti, zapreminsko obnavljanje kortikalne kosti je mnogo manje u poređenju sa kanceloznom kosti.³⁻⁴

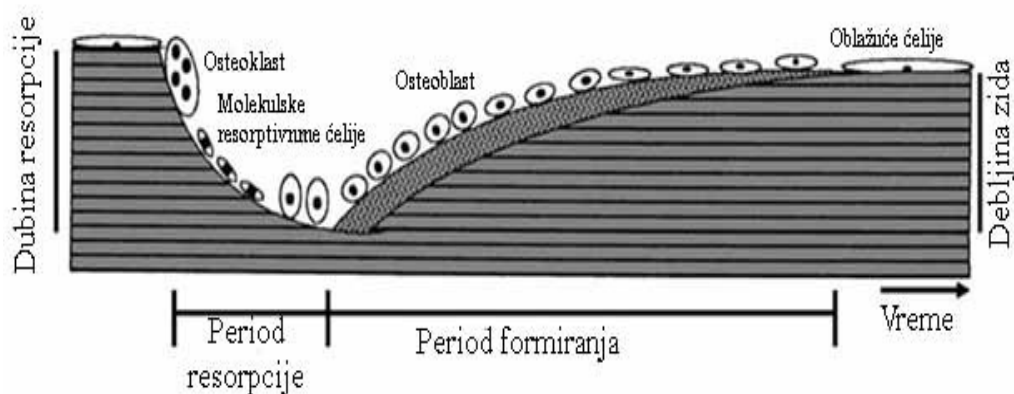
Prostor remodelovanja predstavlja količinu kosti koja je uklonjena osteoklastima i još nije reformirana osteoblastima tokom perioda remodelovanja. Ukupni prostor koji se remodeluje unutar skeleta zavisi od broja ćelija koji učestvuju tokom ciklusa remodelovanja, trajanja perioda resorpcije i perioda formiranja, kao i dubine resorpcione praznine. Kod zdravih osoba, remodelovani prostor obuhvata 6-8 % zapremine skeleta.

Na slici 2.5. prikazana je sekvenca remodelovanja kortikalne kosti. Tokom remodelovanja kortikalne kosti dolazi do formiranja cilindra sa konusnim vrhom u kojem napreduje osteoblastna resorpcija. Resorpcija je dalje praćena formiranjem nove kosti u oblasti zatvorenog konusa što dovodi do popunjavanja šupljine. Oblast remodelovanja može biti podeljena u pet faza: I-osteoblastna faza; II-mononuklearna faza; III-preosteoblastna faza; IV-odložena inicijalna mineralizacija; V-period mineralizacije. Faze od I-III predstavljaju period resorpcije; faze od IV-V period formiranja. OC-osteoklasti; M-mononuklearna resorpciona ćelija; P-preosteoblast; OB-osteoblast, LC-oblazujuće ćelije.



Sl. 2.5. Sekvenca remodelovanja kortikalne kosti

Tokom života, lamelarna kost se obnavlja kroz proces unutrašnje reorganizacije (proces remodelovanja). Nakon aktivacije, osteoklasti počinju da razlažu kost formirajući šupljinu (Sl. 2.6). Nakon dostizanja određene dubine osteoklaste zamenjuju mononuklearne ćelije koje završavaju proces resorpcije, nakon čega dolazi do diferencijacije osteoblastnih ćelija i formiranja nove kosti na istom mestu, pri čemu novoformirana kosti nije visokomineralizovana kao stara.³⁻⁴



Sl. 2.6. Sekvenca remodelovanja kancelozne kosti

Povećanje frekvence aktivacije dovodi do povećanja broja ćelija koje učestvuju tokom ciklusa remodelovanja kosti. Ovo dovodi do povećanja remodelovanog prostora i proporcionalnog smanjenja količine kosti. Proces je ireverzibilan jer se prostor remodelovanja, a samim tim i zapremina, vraćaju u normalu kada se uklone metaboličke promene i vrati frekvencija aktivacije u normalno stanje.³⁻⁴

3. Hidroksiapatit

Čvrsto tkivo skeleta predstavlja složeni materijal koji se sastoji od ćelija smeštenih unutar minaralizovane organske matrice. Neorgansku fazu kosti čini kalcijum-fosfat (CP), koji je strukturno najbliži hidroksiapatitu (HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).⁵ Zbog pomenute sličnosti, sintetisani stehiometrijski hidroksiapatit ima rasprostranjenu primenu kao materijal za reparaciju oštećenog skeletnog sistema. Ipak, stehiometrijski HA ima ograničenu sposobnost da formira međuspoj sa okolnim koštanim materijalom i stimuliše stvaranje novog koštanog tkiva. Takođe, stehiometrijski HA se značajnije ne degradira, nego se uglavnom zadržava u svom prvobitnom obliku tokom dužeg vremenskog perioda.⁶ Za razliku od sintetisanog HA, mineral prisutan u kostima nije stehiometrijski, pokazujući različitu deficitarnost u Ca, P i OH.⁵ Stepem supstitucije u koštanom mineralu u velikoj meri zavisi od vrste supstitucije, naročito kada se radi o supstituciji karbonatnim jonima, koja kod nekih apatita iznosi do 8 mas.%, kao i elemenata kao što su Na, Mg, K, Sr, Zn, Ba, Cu, Al, Fe, F, Cl i Si, čije je prisustvo registrovano u tragovima i iznosi manje od 1 mas%.⁵⁻⁷ Navedene supstitucije igraju veoma važnu ulogu u biološkoj aktivnosti, kako minerala kosti tako i implantnih materijala na bazi kalcijum-fosfata koji uključuju supstituciju drugim elementima, čime se utiče na rastvorljivost, hemiju površine i morfologiju materijala. Utvrđeno je da silicijum predstavlja esencijalan element za normalan rast i razvoj koštanog i hrskavičavog tkiva. Sintetički materijali na bazi kalcijum-fosfata, sa silicijumom prisutnim u tragovima unutar kristalne strukture, ispoljavaju značajno povećanje biološke aktivnosti u poređenju sa stehiometrijskim analozima.⁸ Ovo povećanje biološke aktivnosti se može pripisati promenama svojstava materijala indukovanih prisustvom silicijuma, kao i direktnim efektom koje silicijum ima u fiziološkim procesima u sistemu koštanog i vezivnog tkiva.

3.1. Silicijum u fiziologiji kosti i hrskavice

Pored kiseonika silicijum je nazastupljeniji element u Zemljinoj kori. U organizmu sisara, silicijum je zastupljen u različitim količinama. Tako koncentracija silicijuma u serumu iznosi približno 1 ppm, 2-10 ppm u jetri, bubrezima, plućima i mišićima. Oko 100 ppm silicijuma se nalazi u kostima i ligamentima, a oko 200-600 ppm u hrskavici i drugom vezivnom tkivu.⁹ Visoka koncentracija silicijuma primećena je u sastavnim delovima ekstracelularne matrice, ukazujući na ulogu koju ima silicijum u biološkom povezivanju faktora koji doprinose arhitekturi i elastičnosti vezivnog tkiva.⁹

Silicijum je element koji je prvi obuhvaćen u ranom procesu biomineralizacije, a analize sprovedene na uzorku kosti su pokazale lokalizovano prisustvo silicijuma na mestima kativne kalcifikacije kod mladih miševa i zečeva.¹⁰ Primećeno je da najveća koncentracija silicijuma u ranom stadijumu kalcifikacije iznosi do 0,5 mas.% pri malom odnosu kalcijum-fosfor (Ca/P=0,7), dok koncentracija silicijuma opada s vremenom ispod nivoa detekcije kod poodmakle (napredne) kalcifikacije, kod koje Ca/P dostiže vrednost onog u HA (Ca/P=1,67).¹⁰ Dokazano je da prisustvo silicijuma ima direktan uticaj na proces mineralizacije, pri čemu

silicijum u formi ortosilikatne kiseline ($\text{Si}(\text{OH})_4$) ima sposobnost da indukuje precipitaciju HA iz rastvora elektrolita u prisustvu proteina koji uobičajeno inhibiraju njegovu precipitaciju.^{11,12}

Uloga silicijuma kao esencijalnog elementa u visoko diferenciranim biološkim organizmima (drugačijim od onih kod primitivnih diatomeja, sunđera i biljaka kao što je bambusova trska) je otkrivena 70-tih godina prošlog veka kroz oskudnu studiju Carlislea,^{12,14} Schwarz¹⁵ i Seaborna.¹⁶ Carlisle je izveo inicijalnu studiju deficitarnosti Si, koja je pokazala značajnu zavisnost razvoja zdravog skeletnog sistema od prisustva silicijuma. Chicks je sproveo dijetu koja se sastojala od kazeina i kukuruza sa veoma niskim sadržajem Si (oko 2 $\mu\text{g/g}$) uz dodatak od oko 100 mg/g Si u obliku natrijum-metasilikata u ishrani pilića. Nakon 26 dana prosečna masa pilića koji nisu imali uključen silicijumom u ishrani je iznosila 76 g, dok je kod pilića koji su imali ishranu obogaćenu silicijumom prosečna masa iznosila 116 g. Takođe, uočene su i nepravilnosti na grebenu, koži i kostima kod pilića sa niskim nivoom silicijuma, a koncentracija silicijuma u serumu je bila i do petnaest puta manja, što je povezano sa deformacijama koje su primećene na krajevima tibije, femura i metatarzusa.¹⁴ Manja količina kolagena primećena je i u hrskavici kod silicijumom deficitarnih životinja, bez značajne razlike u količini nekolagenskih proteina.¹⁴ U sličnoj studiji koju su sprovedi Schwarz i Milne, pacovi koji su uzgajani na dijeti i okolini osiromašenoj Si upoređivani su sa pacovima koji su bili na ishrani obogaćenoj natrijum-metasilikatom rastvorenom u svežem vodenom rastvoru u koncentraciji od 50 mg Si/100 g. Životinje koje su bile na ishrani obogaćenoj silicijumom su pokazale za 33,8 % brži rast u poređenju sa životinjama koje su bile na silicijumom osiromašenoj dijeti.¹⁵ Na osnovu ovih istraživanja, Carlisle je odlučio da se Si kategorizuje kao esencijalni element u metaboličkim procesima koji se odvijaju tokom razvoja kosti i vezivnog tkiva.¹⁷⁻¹⁹

Poslednja istraživanja uticaja dijetne bazi silicijuma na mineralnu gustinu kosti (BMD) kod ljudi su potvrdila da je BMD bila povećana i značajno povezana sa dijetom.²⁰ Podaci o BMD su dobijeni na uzorcima iz lumbalnog dela kičme i nekoliko mesta u kuku, usklađivanjem sa faktorima za koje je poznato da utiču na adsorpciju hranljivih materija ili BMD. Pokazalo se da je povećanje BMD od 10 % u korelaciji sa povećanjem sadržaja silicijuma u ishrani sa ispod 14 mg Si/danu na više od 40 mg Si/danu.²⁰

Dijeta obogaćena silicijumom pokazuje i stimulatívni efekat na stvaranje hrskavice, a može i inhibitoriski delovati na proces resorpcije. Kod teladi koja su bila na ishrani u kojoj je silicijum unosen u obliku stabilisane ortosilikijumove kiseline tokom 23 nedelje, primećeno je povećanje nivoa silicijuma u serumu od oko 70%, a uočeno je i povećanje koncentracije kolagena u hrskavičavom tkivu.²¹ Ispitivanja koja su uključivala uticaj ishrane obogaćene silicijumom su ukazala na značaj uloge Si u procesu remodelovanja kosti.^{22,23}

Utvrđeno je da silicijum u vodenom rastvoru poboljšava proliferaciju osteoblasta, diferencijaciju i stvaranje kolagena, kao i da ima uticaj na ćelije osteoblasta u *in vitro* uslovima zavisno od koncentracije. Obogaćivanjem ćelijskih kultura humanih osteoblasta ortosilikijumovom kiselinom u količini od 0-50 μM (0-1,4 ppm Si) primećeno je povećanje

kolagena tipa I od oko 1,8 puta, ali i povećanje aktivnosti od 1,5 i 1,2 puta alkalne fosfataze i osteokalcina, ukazujući na udruženo povećanje osteogeneze.²⁴ Ujednačeno doziranje homogene kulture humanih osteoblasta vodenim rastvorom silicijuma u koncentraciji od 0,1-100 ppm tokom 48 sati dovodi do povećanja proliferacije osteoblasta i ćelijske diferencijacije kroz regeneraciju beta transformišućeg faktora rast (TGF- β), u zavisnosti od primenjene doze.²⁵ Takođe, pokazalo se da produkti rastvorljivosti Biostakla[®], koji sadrže visoku koncentraciju silicijuma u vodenom rastvoru, stimulišu osteogenezu i sintezu kolagena.²⁶ Tretiranje kultura jonskim produktima nastalim rastvaranjem Biostakla dovodi do povećanja ćelijske proliferacije, diferencijacije, lučenja kolagena i razvoja osteoblasta dobijenih iz kalvarije pacova u *in vitro* kulturi.²⁷

3.2. Supstitucija silicijumom u kalcijum-fosfatnim jedinjenjima

Sinteza i karakterizacija silicijumom supstituisanog HA (Si-HA) i silicijumom supstituisanog α -kalcijum-fosfata (Si- α -TCP) je poslednje decenije predmet istraživanja mnogih naučnih grupa širom sveta.²⁸⁻⁴⁰ Istraživanja su pokazala da i Si-HA, i Si- α -TCP pokazuju pozitivan uticaj na apoziciju kosti, koštano urastanje, kao i degradaciju kosti uz posredovanje ćelija u poređenju sa stehiometrijskim HA. Osim toga, α -TCP, zahvaljujući svojim karakteristikama u rastvoru, predstavlja jednu od glavnih komponenata nekoliko bioaktivnih kalcijum-fosfatnih cemenata. α -TCP je rastvorljiviji od hidroksiapatita, i njegova hidroliza u vodenim rastvorima se odvija kroz mehanizam koji uključuje rastvaranje i sukcesivnu precipitaciju stabilnije faze.⁴¹

Postoje četiri polimorfna oblika anhidrovanog trikalcijum-fosfata: α -Ca₃(PO₄)₂ (α -TCP), stabilna faza između 1120 °C i 1470 °C, ali metastabilna ispod 1120 °C; α' -TCP, faza stabilna iznad 1470 °C; β -Ca₃(PO₄)₂ (β -TCP) faza, stabilna ispod 1120 °C i β' -TCP faza, stabilna na visokim pritiscima. Njihova uloga u procesu biomineralizacije je veoma važna, obzirom na činjenicu da α -TCP lako hidrolizuje u oktakalcijum-fosfat, a zatim u mineral vitoklit, koji se javlja tokom procesa biomineralizacije i čija je struktura veoma slična strukturi β -TCP.³⁶ Iako u literaturi postoje navodi o postojanju hidratiranih trikalcijum-fosfata, oni još uvek nisu jasno identifikovani kao izolovana kristalna jedinjenja.⁴²

Sinteza Si- α -TCP i Si-HA je bazirana na metodama dobijanja iz vodenih rastvora, gde se silicijum unosi korišćenjem prekursora, kao što su tetraetilortosilikat (TEOS) ili tetrapropilortosilikat (TPOS), Si(IV)acetat,²⁹⁻³⁴ ili u formi nanočestičnog silicijuma koji se uvodi tokom precipitacije ili žarenja amornog kalcijum-fosfata ili nanokristalnog HA.⁴³⁻⁴⁴ Takođe, ispitivano je i dobijanje Si-HA i Si- α -TCP reakcijama u čvrstom stanju i hidrotermalnim postupkom.³⁷ Materijali se uobičajeno sinteruju na temperaturama između 800 i 1200 °C. Za razliku od HA, α -TCP se ne dobija taloženjem iz vodenih rastvora nego reakcijama dekompozicije na temperaturama koje prelaze 700 °C.⁷ Kalcijum deficitarni HA ili amorfni kalcijum-fosfatni materijali sa odnosom kalcijuma i fosfora između 1,50 i 167 se razlažu na β -TCP ili ostaju u formi bifaznog sistema β -TCP i HA sinterovanjem na temperaturama između 700 i 1250 °C.⁷ Takođe, utvrđeno je da prisustvo silicijuma stabilizuje

α -TCP fazu, koja se formira na nižim temperaturama od 700 °C.^{43,44} Fazni sastav je u mnogome zavistan i od Ca/(P+Si) i Ca/P odnosa u sistemu, količine dodatog silicijuma, načina na koji se silicijum uvodi u sistem i uslova sinterovanja, naročito temperature. Na osnovu promena parametara kristalne rešetke nakon inkluzije silicijuma, razmatranjem atomskih radijusa, najjednostavniji model predlaže da inkorporacija podrazumeva zamenu PO_4^{3-} grupa SiO_4^{4-} grupama. U cilju postizanja elektroneutralnosti, ovakva supstucija PO_4^{3-} grupa je praćena stvaranjem drugih defekata kako bi se kompenzovala promena naelektrisanja. Postoje mnogi mogući mehanizmi kompenzacije naelektrisanja koji zavise od termodinamičkih uslova tokom procesa sinteze. Razmatrani mehanizmi uključuju stvaranje vakancija O i višak Ca, od kojih svaka kompenzuje promenu izazvanu uvođenjem dva jona silicijuma. Takođe, i višak H u Si- α -TCP i Si-HA može kompenzovati promenu naelektrisanja, a u slučaju Si-HA kompenzacija može biti postignuta stvaranjem OH vakancija.^{30,31,33,44} Si-HA predstavlja interesantan slučaj, jer kompenzacija promene naelektrisanja uvođenjem silicijuma može biti postignuta viškom Ca i H ili stvaranjem O ili OH vakancijama. Koji će od predloženih mehanizama biti dominantan zavisi od količine vode prisutne tokom procesa sinteze, što može rezultovati dobijanjem različitih materijala.⁴⁵⁻⁴⁸ Pored napred pomenutog, hemijske formule koje su predložene za Si- α -TCP i Si-HA polaze od pretpostavke da se kompenzacija naelektrisanja odvija stvaranjem OH i H vakancija. Predložene formule su $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_{3-x}(\text{SiO}_4)_x\text{OH}_{1-x}$ i $\text{Ca}_3(\text{P}_{1-x}\text{Si}_x\text{O}_{4-x/2})_2$, za Si- α -TCP i Si-HA, redom.^{30,34,47,49}

U slučaju da je koncentracijom silicijuma ispod granične vrednost, jednofazni supstituisani oblici HA i α -TCP imaju iste kristalografske prostorne grupe kao njihovi stehiometrijski analozi, uz izmenjene karakterističnih parametara kristalne rešetke koje se dešavaju uvođenjem silicijuma.^{30,44,47,49}

Različite mešavine faza Si-HA, α - i β -TCP, Si- α -TCP, kao i druge faze, poput silikokarnotita i amorfni jedinjenja, nastaju u zavisnosti od temperature sinterovanja, Ca/P i Ca/(P+Si) odnosa u sistemu, kao i od količine dodatog silicijuma. Jednofazni Si-HA, različitog stepena dopiranosti, može biti dobijen održavanjem konstantnog Ca/(P+Si) odnosa između 1,67-1,75 ako se silicijum dodaje u koncentraciji do 1,97 mas.%.⁴³ Shodno tome, moguće je dobiti Si- α -TCP fazu fiksiranjem Ca/(P+Si) odnosa na vrednost 1,50 ako se silicijum dodaje u koncentraciji od 0,6-0,9 mas.%.³⁴ Ako se fiksira Ca/P odnos, a menja količina dodatog silicijuma, moguće je dobiti mešavinu faza.⁴⁴ Npr., za Ca/P odnos fiksiran na vrednost 1,67 uz dodatak silicijuma od 8 mas.%, dobija se višefazni sistem koji se sastoji od Si-TCP, Si-HA, β -TCP i amorfne faze promenljivog Si-Ca-P sastava.⁴⁴ Razvoj ovih faza takođe zavisi i od načina na koji se silicijum uvodi u HA. Kada se silicijum u sistem uvodi korišćenjem organometalnih prekursora TEOS-a ili silicijum-acetata, a ne nanofaznim SiO_2 , dobija se manje α -TCP ili Si-TCP faze, dok pri većim koncentracijama dolazi do formiranja silikonkarnotita.²⁸ Ovo ukazuje na ulogu SiO_2 -HA međuspoja na stabilizaciju Si- α -TCP faze koja potiče od reakcije HA sa Si.^{33,45} Alternativno objašnjenje može biti i inhibirajući efekat CO_3^{2-} supstitucije u fosfatnim ravnima na inkorporaciju Si.⁴⁵

3.3. Teorijska studija supstitucije silicijumom u kalcijum-fosfatima

Priroda strukture kalcijum-fosfata, u kojima su PO_4^{3-} grupe smeštene u kolonama vezane sa jonima Ca^{2+} , može se teorijski izračunati korišćenjem teorije funkcionalne gustine (DFT).⁵⁰⁻⁵³ Ovo su značajna istraživanja koja koriste prvi princip ili tzv. *ab initio* metode bazirane na funkcionalnoj teoriji gustine i pseudopotencijalima.⁵⁴ Ova istraživanja su korišćenja za simulacija svojstava materijala u masi i na površini, kao i uticaja nakon dopiranja HA-a i TCP-a silicijumom. Postavljanjem pravih uslova DFT metoda ima predvidivu mogućnost, a istraživanja bazirana na ovoj metodi su otkrila detalje vezane za energiju i strukturu na atomskom nivou.⁵¹⁻⁵³

Simulacija ukazuje na to koji od mehanizama kompenzacije naelektrisanja je moguć dopiranjem HA silicijumom: OH vakancije, formiranje SiO_3OH ili nastanak Si_2O_7 uzrokovan O vakancijom. Zaključeno je da ne postoji jedinstven Si-HA materijal nego različiti tipovi, zavisno od uslova tokom dobijanja. Ovo se može smatrati tačnim i u slučaju HA, kod koga voda prisutna tokom sinteze može usloviti prisustvo vode u strukturi materijala nakon sinteze uz zauzimanje dela OH mesta.^{55,56}

Raspodela atoma na površini pomenutih biomaterijala je od velike važnosti jer se veza između čvrstog materijala (implanta) i biološkog medijuma formira tamo gde dolazi do delovanja ćelija i proteina, što dovodi do resorpcije i depozicije koštanog tkiva. Takođe, *ab initio* metod može biti korišćen kako bi se stimulisala granična površina izmedju materijala i vakuma. Jedno od takvih istraživanja izvršeno je i na površini HA-a i α -TCP-a.^{53,57} U slučaju kada u masi kristala dolazi do razdvajanja i stvaranja pukotina, atomi koji se nalaze blizu površine reaguju menjajući položaj. Rekonstrukcija površine proučavanih kalcijum-fosfata nastoji da neutrališe površinsko naelektrisanje, ali su fosfatne grupe na površini manje koordinisane kiseonikom, što uslovljava stvaranje prilično reaktivne površine. Površina HA je opsežno proučavana a utvrđeno je da postoji nekoliko izraženih, visokoindeksiranih površina zavisno od vrste sečenja.⁵⁷ Površinska energija može biti procenjena a moguće je predvideti i njenu relativnu stabilnost. Ipak, simulacija uslova na površini čvrste faze i vakuma nije od velikog interesa za proučavanje u biološkom medijumu. Simulacija tako složenih sistema je izvan mogućnosti predložene metode, ali prvi korak predstavlja proučavanje interakcija jednog ili dva molekula vode s površinom.⁵⁷ Utvrđeno je da postoje jake interakcije molekula vode sa svim razmatranim površinama HA zbog postojanja izloženih, nezasićenih atoma kiseonika i disocijacije koja postoji u većini slučajeva. Površine (010) tipa predstavljaju najreaktivnije, a (001) najmanje reaktivne površine u HA, što može biti uslovljeno morfologijom kristalita HA u vodenom rastvoru, a naročito prirodom pločastih kristalita HA pronađenih u prirodnim kostima. Gubitak Ca u izmeni sa dva vodonika iz okolne sredine predstavlja energetski veoma favorizovanu reakciju, što može imati značajan uticaj na bioaktivnost materijala.⁵⁷

Metoda *ab initio* simulacije je novija metoda i njena primena na biomaterijalima je u početnoj fazi razvoja. Ipak, nedavno objavljena istraživanja ukazuju da predložena metoda

daje veoma korisne informacije kada se koristi udruženo s eksperimentom i u slučaju kada se raspolaže informacijama o strukturi materijala na atomskom nivou.

3.4. Poređenje biološke aktivnosti silicijumom supstituisane kalcijum-fosfatne biokeramike

Govoreći o značaju uloge koju ima silicijum na ubrzanje procesa zalečenja koštanog tkiva, ne iznenađuje činjenica da i biokeramika u koju je inkorporisan silicijum pokazuje povećanu bioaktivnost. Ovo uključuje i materijale sa veoma velikim sadržajem silicijuma kao što su Biostaklo (Na-Ca-P-Si stakla promenljivog sastava) i pseudovolastonit (CaSiO_3),⁵⁸⁻⁵⁹ kao i materijale na bazi kalcijum-fosfata dopirane silicijumom u malom procentu, kao što je Si-HA i Si-TCP.^{60,61}

Superiorne biološke karakteristike Si-HA i Si-TCP materijala za implantaciju su odavno potvrđene.^{6,59-64} *In vivo* istraživanja koja su vršena poređenjem biološke aktivnosti Si-HA i HA granula ukazuju na povećanje rasta koštanog tkiva od 14,5 % procenata kod Si-HA u poređenju sa kontrolnim HA.^{61,63} Ovo istraživanje pokazuje da se morfologija istaloženog apatita i redosled procesa koji se dešavaju razlikuju na površini Si-HA i HA implanta.^{61,63} Formiranje fibrila organizovanog kolagena se primećuje na spoju kost/Si-HA nakon 6 nedelja, dok se kod nedopiranog HA ovakve strukture primećuju nakon 12 nedelja, ukazujući na značaj koji ima silicijum u procesu remodelovanja koštanog tkiva.⁶³ Dvanaestonedeljna studija na malim životinjama, izvedena od strane Hing-a i saradnika je pokazala da su stepen apozicije kosti, urastanje i adaptivno remodelovanje značajno uslovljeni sadržajem silicijuma u Si-HA, pokazujući da prisustvo silicijuma od 0,8 mas.% daje optimalan odgovor na ćelije koje učestvuju u procesu formiranja i resorpcije kosti. Mastrogiacoma i saradnici^{58,61} su istraživali uticaj svojstava poroznih implanata na bazi Si-TCP tokom dužeg perioda u *in vivo* uslovima na krupnijim životinjama. Oni su utvrdili da samo 10-20 % polaznog Si-TCP materijala ostaje nakon 1 godine, i da se porozni materijal u potpunosti resorbuje nakon 2 godine, zamenjujući se potpuno novoformiranim, visoko mineralizovanim laminarnim koštanim tkivom. Stehiometrijski HA materijali slične poroznosti ostaju skoro nepromenjeni i nakon 5 godina.^{58,61}

In vitro proučavanja doprinose razumevanju specifičnih interakcija između ćelija i materijala Si-HA i HA. Potvrđeno je da i Si-HA, i HA materijali potpomažu razvoj osteoklasta iz mononuklearnih prekursora, pokazujući resorpciju u prisustvu ćelija osteoklasta.^{59,62,64} Materijali na bazi Si-TCP i Si-HA pokazuju i povećanu osteogenezu ćelija sličnih osteoblastima što je praćeno povećanjem novoformirane matrice *in vitro*.^{62,64} Lai i saradnici su pokazali da prisustvo silicijuma u biomaterijalima implantiranim u koštano tkivo nema neželjeno dejstvo na organizam, što je potvrđeno merenjem tragova silicijuma u krvi i urinu nakon implantiranja resorbilnog stakla.^{63,65} Takođe, nije primećeno ni povećanje nivoa silicijuma u kostima, bubrezima, jetri, plućima, limfnim čvorovima i slezini, kao ni povećanje koncentracije silicijuma sa strane kosti koja okružuje implant, ukazujući da se silicijum iz resorbilnog implanta bez štetnog dejstva izlučuje iz organizma.^{63,65}

3.5. Uticaj silicijuma na biološki odgovor organizma na implant

Kada se biomaterijal implantira u biološki sistem dolazi do dinamičke reakcije na spoju materijal-tkivo koja određuje stepen i sastav specifičnih proteina koji utiču na oporavljanje i aktivaciju ćelija, stimulišući razvoj novog tkiva.^{66,67} Biomimetičko taloženje (taloženje biološki sličnog, karbonatnog HA; *eng.* biomimetic precipitation) na površini implanta je usko povezano sa bioaktivnošću različitih tipova implantnih materijala^(66, 68). Povećana bioaktivnost materijala na kome se dešava biomimetička precipitacija je u vezi sa adsorpcijom i inkorporacijom bioloških moita za koje se veruje da predstavljaju mesta za koja se vežu ćelije.^{64,67} Utvrđeno je da materijali koji pospešuju biomimetičko izdvajanje preferentno adsorbuju fibronektin RGD protein, i dodatno povećavaju funkciju vezivanja fibronektina na pripremljenu površinu, što vodi vezivanju, proliferaciji i diferencijaciji osteoblasta. Napred navedeno predstavlja polaznu reakciju materijala u tečnom medijumu koja se dešava tokom prvih 48 sati inkubacije kada dolazi do adsorpcije proteina koji privlače ćelije, koje dalje pripremaju površinu.^{66,67} Primer koji ukazuje na vezu između biomimetičkog taloženja i biološke aktivnosti, predstavlja hemijsko tretiranje površine silicijumom kako bi se stvorile Si-OH veze ili primena negativnog potencijala na sloj silicijuma, koja će uzrokovati taloženje faze slične apatitu u fiziološkom rastvoru, stvaranjem materijala koji će mineralizovati osteoblasti.^{68,69} Ograničena bioaktivnost keramike na bazi stehiometrijskog HA leži u velikoj stabilnosti HA u medijumu, što ne pospešuje proces biomimetičkog taloženja uslovljen površinom materijala.⁶⁷

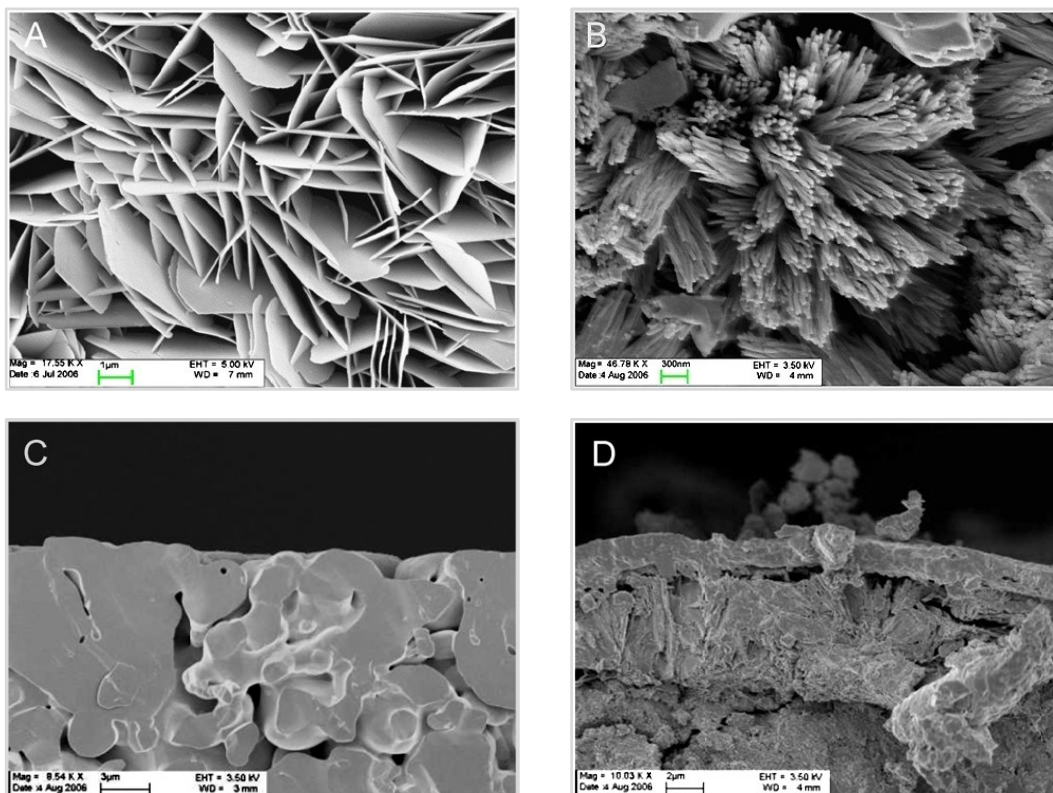
Sposobnost kalcijum-fosfatnih materijala da indukuju biomimetičko taloženje je u uzajamnoj vezi sa rastvorljivošću β -TCP faze prisutne u materijalu koji se implantira.⁷⁰ Međutim, hemijski sastav površine takođe uslovljava biomimetičko taloženje koje nije nužno uslovljeno prisustvom prekursorske kalcijum-fosfatne faze. Činjenica je da se biomimetičko taloženje dešava na različitim materijalima kao što su Bioglass[®], silicijum i titan dobijenim sol-gel metodom, kao i polimerima poput polietilen-oksida.⁷¹ Biomimetičko taloženje se pospešuje postojanjem rastvorljivijih kalcijum-fosfatnih materijala, razvijanjem negativno naelektrisane površine usled disocijacije hemijskih grupa kao što su Ti-OH ili Si-OH, specifičnom hemijom površine, kao i nanokristalnom strukturom.^{68,72}

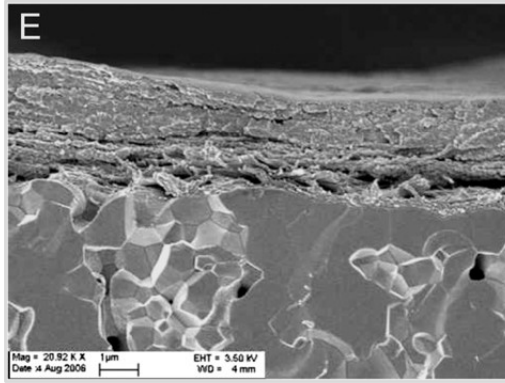
Biomimetička precipitacija je primećena na površini Si-HA i Si- α -TCP.⁷³ Potpuna transformacija u HA sličan biološkom apatitu uočena kod nekih Si- α -TCP materijala koji su držani u SBF-u.⁷³ Utvrđeno je da površina Si- α -TCP filmova pokazuje povećani afinitet prema OPN proteinima na mestima na kojima je uočeno taloženje HA.⁷⁴

Mikroskopijom atomskih sila Si-HA i HA utvrđeno je da korišćenjem vrha koji se završava COO⁻ grupom Si-HA pokazuje prisustvo komponenata sa jačim van der Waalsovima silama, elektronegativnije površine i povećanu površinsku adheziju.⁷⁵ Istraživanja obavljena mikroskopijom atomskih sila (AFM) uz korišćenje RGD proteinom funkcionalizovanih vrhova (tip) su pokazala veću adheziju Si-TCP površina na kojima dolazi do bržeg biomimetičkog izdvajanja koje je praćeno većom biološkom aktivnošću. Ovo istraživanje je pokazalo i porast elektronegativnosti površine sa povećanjem količine silicijuma u sistemu, što nužno ne

ukazuje na bolji biološki odgovor. Veruje se da supstitucija PO_4^{3-} grupa SiO_4^{4-} grupama olakšava stvaranje negativnije naelektrisane površine kod materijala koji sadrže silicijum.⁷⁵

Dobro je poznato da brojna bio jedinjenja poput proteina, glikoproteina i polisaharida imaju značajan uticaj na ubrzanje ili usporavanje nukleacije i rasta, kao i na morfologiju istaloženih kalcijum-fosfatnih jedinjenja u *in vitro* i *in vivo* uslovima.⁷⁶ Poređenje HA i Si-HA u *in vitro* i *in vivo* uslovima ukazuje da se stepen rastvorljivosti u pomenuta dva okruženja ne razlikuje, dok se mehanizam rastvaranja i morfologija kristalita koji se formiraju na HA i Si-HA znatno razlikuju.⁷⁷ U *in vitro* uslovima dolazi do formiranja nodularnih naslaga apatita, dok u *in vivo* uslovima nastaju pločasti kristali apatita, ukazujući na uticaj proteina na morfologiju apatita koji se izdvaja na površini u *in vivo* okruženju.⁷⁷ Takođe, Si- α -TCP pokazuje značajnu osetljivost u različitom vodenom okruženju, kao što je elektrolit simuliranog telesnog fluida (SBF), simulirani fluid koji sadrži serumske proteine (SPF), i potpuno *in vitro* ćelijsko okruženje koje sadrži SBF elektrolit, serumske proteine i ćelije koje stvaraju specifične proteine. Na slici 3.1 prikazani su materijali na bazi Si- α -TCP, HA i Si-HA nakon inkubacije u različitim medijumima. Na mikrografijama (Sl. 3.1c) se uočava da Si- α -TCP pokazuje malu reaktivnost u SBF okruženju koje ne sadrži ćelije i serum, dok se progresivnija transformacija u karbonatnu-HA fazu dešava nakon inkubacije u SBF koji sadrži proteine seruma (Sl. 3.1b). I konačno, potpuna transformacija Si- α -TCP u pločaste kristale HA se dešava u prisustvu ćelija osteoblasta u *in vitro* kulturi (Sl. 3.1a i d). U poređenju sa Si- α -TCP, HA, pa čak i Si-HA, proučavani u identičnim uslovima, pokazuju veoma ograničenu reaktivnost (Sl. 3.1e).⁷⁸





Sl. 3.1. SEM mikrografije materijala na bazi Si- α -TCP, HA i Si-HA nakon inkubacije u različitim uslovima: a i d) potpuna transformacija Si- α -TCP u pločaste kristale HA koja se dešava u prisustvu ćelija osteoblasta u in vitro kulturi b) Si- α -TCP transformacija u karbonatnu-HA fazu nakon inkubacije u SBF koji sadrži proteine seruma c) Si- α -TCP u SBF bez seruma i ćelija, e) HA i Si-HA proučavani u identičnim uslovima pokazuju veoma ograničenu reaktivnost

4. Skafoldi

Ključnu ulogu u procesu regeneracije koštanog tkiva zauzimaju skafoldi, materijali koji služe kao podloga za ćelijske interakcije i formiranje koštane ekstracelularne matrice u cilju obezbeđivanja strukturne podrške novoformiranom tkivu. Jedna od najčešćih metoda korišćenih u inženjerstvu tkiva podrazumeva izolaciju specifičnih ćelija biopsijom iz pacijenta i njihovo uzgajanje na trodimenzionalnom skafoldu u kontrolisanim uslovima. Nakon toga, formirani skafold se ugrađuje na željeno mesto u telo pacijenta u cilju formiranja novog tkiva unutar skafolda koji se degradira tokom određenog vremena.⁷⁹⁻⁸¹ Drugi, alternativni pristup podrazumeva direktnu ugradnju skafolda *in vivo* kako bi se stimulisalo direktno formiranje tkiva *in situ*.⁸⁰⁻⁸² Prednost poslednjeg pristupa se ogleda u smanjenju broja potrebnih operacija, što skraćuje vreme potrebno za oporavak pacijenta.

Skafoldni materijali za koštanu regeneraciju treba da zadovolje određene zahteve za obavljanje ove funkcije, uključujući mehanička svojstva, slična onim koju ima kost na mestu reparacije, kao i biokompatibilnost i biorazgradivost koja odgovara brzini remodelovanja. Skafold služi pre svega kao osteokonduktivni moiti dok se nova kost formira u procesu spustitucije iz susednog živog koštanog tkiva.⁸³

Pored obezbeđivanja osteokonduktivnosti, skafoldi mogu da služe i kao nosači citokina, kao što su koštani morfogenetski proteini (BMPs), insulinu slični faktori rasta (IGFs) i transformišući faktori rasta (TGFs), koji menjaju obnovljene prekursorske ćelije iz tkiva domaćina u ćelije koje stvaraju koštanu matricu, obezbeđujući tako osteoinduktivnost. Konačno, proces osteogeneze se inicira tako što se skafoldi pre implantacije zasade ćelijama koje će formirati nove centre za formiranje kosti, kao što su osteoblastne i mezenhimalne ćelije koje imaju potencijal da memorišu poreklo.⁸³ Genetski transformisane ćelije koje pokazuju osteokontuktivna svojstva takođe mogu biti korišćene u ovu svrhu. Kombinacija skafolda, citokina i ćelija u cilju stvaranja *ex vivo* tkivne konstrukcije predstavlja hipotezu koja bi trebala da obezbedi efikasniju koštanu regeneraciju u *in vivo* uslovima u poređenju sa samom matricom biomaterijala. Dodatno, poboljšani rast tkiva, sličan koštanom u *in vitro* uslovima, nudi novu mogućnost praćenja progresije bolesti.

Skafoldi, čija je uloga da pospeše proces osteogeneze, treba da imaju morfologiju koja je slična morfologiji kosti kako bi se optimizovala integracija sa okolnim tkivom. Trebekularnu kost čija je poroznost od 50-90 % (tipična gustina femoralne kortikalne kosti je $1.85 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$) a prečnik pora oko 1mm obavija korikalna kost.^{84,85} Kortikalna kost ima čvrstu strukturu sa nizom šupljina, kao što su Haversovi kanali, sa površinom poprečnog preseka od $2500-12000 \mu\text{m}^2$, što rezultuje poroznošću od 3-12 % (tipična gustina proksimalne trebekularne kosti je $0,30 \pm 0,10 \text{ g/cm}^3$).⁸⁴ Stepem mineralizacije zavisi i od vrste koštanog tkiva. Tako npr., trebekularna kost iz kalkaneuma ima gustinu od $1,135 \pm 0,147 \text{ g/cm}^3$, dok je kod trebekularne kosti iz ilijačnog grebena izmerena gustina iznosi $1,098 \pm 0,077 \text{ g/cm}^3$.⁸⁶

Mehanička svojstva kosti u zavisno od starosti, 3, 5 i 35 godina, imaju vrednosti modula elastičnosti od 7,0; 12,8; 16,7 GPa, redom, mereno za femoralnu kost.⁸⁷ Tvrdi se da sa starenjem čvrstoća na istezanje i modul elastičnosti femoralne kortikalne kosti opada za oko 2 % svake decenije.⁸⁴ Složenost građe i različitost svojstava koštanog tkiva (npr. poroznost, veličina pora i ćelijski tip), kao i razlike koje su vezane za proces starenja, način ishrane, aktivnost (mehaničko opterećenje) i zdravstveno stanje svakog pojedinca, predstavljaju veliki izazov u proizvodnji skafolda i inženjerstvu koštanog tkiva.

Karakteristike skafolda zavise primarno od prirode biomaterijala i načina dobijanja. Prednosti i nedostaci materijala koji se koristi za dobijanje skafolda kao što su: metali i njihove legure, keramika, staklo, hemijski sintetisani polimeri, prirodni polimeri, kao i kombinacija pomenutih materijala u formi kompozita su predmet istraživanja mnogih naučnih grupa. Karakteristike i zahtevi koji se postavljaju pred skafoldne materijale u inženjerstvu koštanog tkiva su kritički ispitani, a skorija istraživanja uključuju i razmatranje razgradnje,⁸⁹⁻⁹¹ mehaničke karakteristike,⁸⁸⁻⁹⁶ isporuku citokina,⁹⁷⁻¹⁰⁴ kao i zasejavanje skafolda različitim ćelijskim kulturama.¹⁰²⁻¹⁰⁷

Poroznost, kao jedan od bitnijih zahteva koji se postavlja pred skafolde, se definiše kao procenat praznog prostora u čvrstom materijalu i predstavlja morfološko svojstvo koje je nezavisno od materijala.¹⁰⁸ Prisustvo pora predstavlja neophodan uslov za formiranje koštanog tkiva omogućavajući migraciju i proliferaciju osteoblasta i mezenhimalnih ćelija, kao i vaskularizaciju.¹⁰⁹ Dodatno, porozna površina pospešuje mehaničko vezivanje između implantiranog biomaterijala i okolne, prirodne kosti, obezbeđujući veću mehaničku stabilnost na kritičnim mestima.¹¹⁰ Najčešće korišćene tehnike za izazivanje poroznosti unutar biomaterijala su: izluživanje soli, formiranje gasa, razdvajanje faza, sušenje zamrzavanjem (eng. freeze-drying) i sinterovanje, zavisno od materijala koji se koristi za dobijanje skafolda. Smatra se da minimalna veličina pora potrebna za regeneraciju mineralizovane kosti treba da iznosi oko 100 μm na osnovu istraživanja koje je sproveo Hulbert i saradnici nakon implantacije cilindričnih uzoraka kalcijum-aluminata, poroznosti 46 % u femoralnu kost psa.¹¹¹ Veće pore (100-150 i 150-200 μm) pokazuju znatno urastanje kosti, dok manje pore (75-100 μm) rezultuju urastanjem nemineralizovanog osteoidnog tkiva. Manje pore (10-44 i 44-75 μm) omogućavaju jedino prodiranje fibroznog tkiva.¹¹¹ Ovi rezultati su u skladu sa normalnim Haversovim sistemima koji dostižu prečnik od približno 100-200 μm .¹¹¹ Ipak, korišćenje tehnike laserske perforacije za dobijanje pora (50, 75, 100 i 125 μm) na pločicama titana, ugrađenim u defekte femoralne kosti zeca, je pokazalo, na osnovu sličnog urastanja kosti, da veličina od 100 μm ne predstavlja kritičnu veličinu pora u uslovima kada kost nije izložena velikom mehaničkom naprezanju.¹¹²

Neophodnost prisustva pora u procesu regeneracije koštanog tkiva potvrdio je Kokubo sa saradnicima na aktopičnom modelu pacova korišćenjem kompaktnih i neporoznih čestica hidroksiapatita za isporuku BMP-2. Primećeno je da na kompaktnim česticama ne dolazi do formiranja nove kosti, dok na poroznim skafoldima dolazi do direktne osteogeneze.¹⁰⁹ Potvrda ovom zaključku dolazi i na osnovu poređenja metalnih implanta sa i

bez porozne prevlake. Tretiranje površine implanta na bazi legura titana sinterovanim perlama titana (Porocoat®) dovodi do stvaranja porozne prevlake koja pospešuje kortikalnu jačinu smicanja implanta nakon uspešnog zarastanja u tibiji ovce, dok prevlake sa perlama hidroksiapatita nisu rezultovale nekim značajnijim poboljšanjem.¹¹³ Titanijumske vlaknaste prevlake (poroznost 45 % i prosečna veličina pora 350 μm) pospešuju urastanje kosti i povećavaju potencijal resorpcije u uslovima povećanog stresa kod femoralne kosti psa na modelu totalne proteze kuka.¹¹⁴ Slični rezultati su dobijeni ispitivanjem implantata titana sa prevlakama dobijenim plazma sprej metodom poroznosti od 56-60 %, iako je najintezivnije koštano urastanje uočeno na mrežici titana otvorene poroznosti (poroznost 60 % i prosečna veličina pora 170 μm) prevučenoj hidrogelom na bazi polivinil alkohola.¹¹⁵

D’Lima i saradnici su pokazali da je hrapavost površine veoma značajna za osteointegraciju implantata titana u femoru zečeva, dok su prevlake dobijene nagrizanjem kiselinom (najveća površinska hrapavost) pokazale najbolju ukupnu osteointegraciju u poređenju sa prevlakama dobijenim peskiranjem i prevlakama u obliku mreže vlakana (prosečna veličina pora 400 μm).¹¹⁶ Prisustvo debljeg (600-1000 nm) poroznog (13-24% poroznost, pore manje od 8 μm) oksidnog filma na zavrtnjima od titana dovelo je do boljeg formiranja koštanog tkiva nakon implantacije u tibiju zečeva, u poređenju sa kontrolnim nanoporoznim oksidnim slojem debljine 17-200 nm.^{117,118} Smanjena poroznost oksidnog sloja (19 % naspram 24 %) rezultuje smanjenom površinskom hrapavošću (0,97 naspram 1,02 μm) merenom konfokalnom laserskom skenirajućom profilometrijom.¹¹⁹ Implanti na bazi legura titanijuma sa prevlakom hidroksiapatita debljine od 50 μm nisu povećale procenat osteointegrirane površine u mandibularnoj kosti pasa, iako je primećeno proširivanje koštanog tkiva unutar mikropora hidroksiapatita, što je rezultovalo koštanim vezivanjem na mikronivou.¹²⁰

Iako makroporoznost (veličina pora veća od 50 μm) ima veliki uticaj na krajnji ishod osteogeneze, isto tako značajan uticaj ima i mikroporoznost (veličina pora manja od 10 μm) i hrapavost zidova pora. Tako štapići hidroksiapatita s prosečnom veličinom pora od 200 μm i glatkim i gustim zidovima pora ne uspevaju da indukuju formiranje ektopične kosti kod pasa, u poređenju sa štapićima istog materijala čija je prosečna veličina pora oko 400 μm, ali čiji su zidovi porozni i hrapavi.¹²¹ Površinska hrapavost povećava vezivanje, proliferaciju i diferencijaciju ćelija koje formiraju koštano tkivo uz neophodno prethodno vezivanje za površinu materijala.¹²¹

Tehnika dobijanja skafolda slobodnom formom u čvrstom stanju (Solid free-form tehnika) omogućava dobijanje poli(dezaminotirozil-tirozin etil ester karbonata) (pseudo poliamnino kiseline izvedene iz tirozina) skafolda sa četiri aksijalna i četiri radijalna kanala i definisanom veličinom pora od 500 μm, odvojenim 500 μm čvrstim zidovima, ili 80% poroznim zidovima.¹²² Kao kontrolni materijal korišćeni su skafoldi sa slučajnom raspodelom pora. Iako nema statističke razlike u formiranju kosti u kranijalnim defektima zečeva, urastanje kosti diktira građa skafolda, tako da je kod uzoraka sa slučajnom raspodelom pora primećeno kontinualno urastanje sa periferije, dok je kod skafolda sa istom veličinom pora i

poroznošću zidova pospešen proces diskontinualnog urastanja kosti uz stvaranjem koštanih ostrva kroz celu zapreminu skafolda. Kod skafolda sa istom veličinom pora i poroznim zidovima primećeno je urastanje kosti po oba gore pomenuta tipa.¹²² Postoji hipoteza da diskontinualno urastanje kosti pospešuje ubrzano zalečenje, pošto se formiranje kosti odvija ne samo sa margina nego kroz celi prostor defekta.¹²² Pomenuta studija pokazuje povećanu osteogenezu kod poroznih materijala u poređenju sa kompaktnim implantima, kako na makroskopskom tako i na mikroskopskom nivou.

4.1. Metode merenja poroznosti i veličine pora

Za određivanje poroznosti i veličine pora skafolda danas se koriste različite metode. Ukupna poroznost (Π) se određuje gravimetrijski korišćenjem formule¹²³⁻¹²⁵

$$\Pi = 1 - \rho_{\text{skafold}}/\rho_{\text{materijal}} \quad (4.1)$$

gde je $\rho_{\text{materijal}}$ gustina materijala od koga je dobijen skafold, a ρ_{skafold} je prividna gustina skafolda određena deljenjem mase skafolda zapreminom koju skafold zauzima.

Živina porozimetrija je metoda koja se koristi za merenje i poroznosti i veličine pora.^{123,124,126-131} Skafold se stavlja u penetrometar i natapa živom pod povišenim pritiskom. Što više pritisak (P) raste, to više opada radijus pora (r) koje se popunjavaju prema Washburn-ovoj jednačini¹²⁴

$$P = 2\sigma \cos \theta / r \quad (4.2)$$

gde je σ površinski napon žive, a θ ugao kvašenja. Otvorena poroznost (π) (poroznost dostupna za živinu intruziju) data je kao:¹²⁴

$$\pi = V_{\text{intruzije}}/V_{\text{skafolda}} \quad (4.3)$$

gde je $V_{\text{intruzije}}$ ukupna intruziona zapremija žive, a V_{skafold} zapremina skafolda. Konačno, zatvorena poroznost (ω), poroznost koja nije dostupna živi, može biti određena kao:¹²⁴

$$\omega = \Pi - \pi \quad (4.4)$$

Otvorena poroznost može biti jednako dobro određena metodom merenja istisnute tečnosti.¹³²⁻¹³⁴ Skafold se potopi u poznatu zapreminu tečnosti (V_1) u kojoj se ne rastvara skafold i kroz seriju izvlačenja i utiskivanja, pod povišenim pritiskom, tečnost se utiskuje u pore skafolda. Nakon serije ciklusa zapremina tečnosti u i izvan skafolda je V_2 . Kada se ukloni tečnošću prevučeni skafold, preostala tečnost ima zapreminu V_3 , a otvorena poroznost se izračunava iz izraza:^{132,133}

$$\pi = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3) \quad (4.5)$$

Primenjeni pritisak kod merenja porozimetrije intruzijom žive treba da bude u opsegu od 30 do 400 kPa.¹⁰⁸ Biomaterijali koji su stišljivi ili koji pucaju pod visokim pritiskom treba da

budu analizirani na relativno nižim pritiscima ili u interpretaciju eksperimentalnih merenja treba da budu uključene korekcije za kompresibilnost.¹⁰⁸

4.2. Uticaj poroznosti i veličine pora na osteogenezu

4.2.1. Uticaj poroznosti i veličine pora u in vitro uslovima

Uticaj poroznosti i veličine pora na proces osteogeneze u *in vitro* uslovima ispitivan je na osteoplastnim i nediferenciranim ćelijama. Zasađivanjem osteoplastnih ćelija na skafoldima različite raspodele veličine pora dobijenim postupkom fazne emulzije polimerizacije stirena, gde porast temperature tokom sinteze dovodi do povećanja veličine pora skafolda, primećeno je da se većina ćelija nalazi u malim porama (40 μm).¹³⁵ Takođe, utvrđeno je da su ćelije brže migrirale unutar većih pora (100 μm) skafolda, ali nije utvrđeno da veličina pora utiče na dubinu proliferacije ili stepen mineralizacije.¹³⁵ Slično, manje pore (0.4 i 13 μm) u TiO_2 filmu na površini titana uslovljavaju povećanu proliferaciju humanih ćelija tripsinizovanih iz kostiju u poređenju sa većim porama (49 μm).⁷³ U kompozitnim skafoldima na bazi apatita i kolagena sa porama veličine od 50 do 300 μm , povećani sadržaj apatita (0, 70 i 90 mas.%) utiče na smanjenje poroznosti (79, 73 i 49 mas.%, redom) ali se ne primećuju značajnije razlike u proliferaciji MC3T3-E1 osteoblasta.¹³⁶ Istraživanja koja su vršena sa mezenhimalnim matičnim ćelijama pacova na neizatkanim vlaknima polietilen tereftalata različitog prečnika (2-42 μm) i poroznosti (93-97 %) su pokazala da je na vlaknima manjeg prečnika primećeno slabije vezivanje ćelija i sferni oblik ćelija, zbog toga što je veličina ćelija porediva ili čak veća od prečnika vlakna.¹³⁷ Slično ponašanje je primećeno i praćenjem ćelijske proliferacije koja je izraženija kod manjih pora u skafoldima izrađenim od tanjih vlakana.¹³⁷ Utvrđeno je da vlakna prečnika od 9 do 12 μm stimulišu aktivnost alkalne fosfataze i stvaranje osteokalcina više nego vlakna drugog prečnika.¹³⁷ Veća poroznost nije dovela do većeg ćelijskog vezivanja, ali je dovela do povećanja ćelijske proliferacije, jer povećana poroznost omogućava lakši dotok kiseonika i hranljivih materija.¹³⁷ Autori objašnjavaju ovu pojavu suzbijenom proliferacijom i ćelijskom agregacijom koja je primećena na materijalu napravljenom od debljih vlakana.¹³⁷ Može se zaključiti da osteogeneza *in vitro* nije uslovljena veličinom pora, ali se povećava sa smanjenjem poroznosti. Ipak, treba primetiti da su dimenzije proučavanih pora za jedan red veličine manje od minimalnih zahteva za odvijanje procesa osteogeneze *in vivo*, i da u okruženju, gde osteogeneza zavisi od drugih procesa, kao što je vaskularizacija, efekt poroznosti bi bio suprotan, što će biti prikazano u nastavku.

4.2.2. Uticaj poroznosti u in vivo uslovima

Koštana regeneracija unutar skafolda uključuje obnavljanje i penetraciju ćelija iz okolnog koštanog tkiva, kao i vaskularizaciju. Očekuje se da veća poroznost pospeši proces osteogeneze što je potvrđeno u mnogobrojnim istraživanjima. Korišćenjem solid free-form tehnike dobijena je poroznost od 80 do 88 % u skafoldima na bazi poli(L-laktid-ko-D,L-glikolida) (PDLLA) koji sadrže 20 mas.% β -kalcijum-fosfata (veličine pora 125-150 μm).⁸⁹ Implantacijom u kranumu zečeva utvrđeno je da se najviše urastanja i

formiranja novog koštanog tkiva dešava u područjima sa velikom poroznošću.⁸⁹ Skafoldi sa četiri aksijalna i četiri radijalna makroskopska kanala pospešuju dalju osteogenezu.⁸⁹ U cilju stvaranja poroznosti tokom procesa zalečenja poli(propilen fumarat) je kombinovan sa rastvornim solima kalcijuma kao puniocem. Nakon implantacije u tibiju pacova, skafoldi sa većim procentom soli, koja dovodi do stvaranja veće poroznosti *in vivo* pokazuju veće i dublje urastanje.¹³⁸ Dentalni implanti prevučeni titanom, koji je imao strukturu kancelozne kosti i poroznost od 44 i 48 %, nakon implantacije u mandibularnu i femoralnu kost psa su pokazali značajnije urastanje nove kosti kod više poroznih prevlaka u svim merenjima vršenim tokom 14 nedelja u femoralnoj kosti, i na dva merenja u mandibularnoj kosti nakon 2 i 4 nedelje.¹¹⁰ *In vivo* ispitivanja skafolda na bazi hidroksiapatita različite geometrije, ortogonalne i radijalne (veličina kanala 444 i 366 μm i poroznost 44 % i 38 %, respektivno) u defektima mandibularne kosti su pokazala da nema značajnije razlike u stepenu urastanja novoformirane kosti, ali je oblik tako formirane kosti uslovljen arhitekturom kanala. Tako, ortogonalna arhitektura dovodi do formiranja međusobno isprepletane matrice hidroksiapatita i novoformirane kosti, dok radijalna arhitektura uzrokuje stvaranje čvrstih koštanih delova u centralnom delu implanta.¹³⁹ Kruyt i saradnici su poredili hidroksiapatitne skafolde različite poroznosti (70 % poroznosti i prosečne veličine pora 800 μm (70/800) naspram 60 % poroznosti i prosečne veličine pora 400 μm (60/400)). Primećeno je da koštane stromalne ćelije koza (gMSC) više proliferišu tokom šest nedelja u *ex vivo* kulturi na 60/400 skafoldima.¹⁴⁰ Međutim, skafoldi zasejani gMSC nakon implantacije u bilateralne paraspinalne mišiće koza pokazuju bolje formiranje koštanog tkiva na 70/800 skafoldima.¹⁴⁰ Ovaj rezultat je najverovatnije uzrokovan većom površinom koja dovodi do bolje jonske izmene i koštane adsorpcije.¹⁴⁰

U literaturi postoji veoma ograničen broj istraživanja u kojima se ne navodi značajniji uticaj poroznosti na stepen apozicije kosti. Tako npr., implanti na bazi niki-titanijum legure (nitinol) poroznosti 66 % pokazuju veći, mada statistički ne i značajniji, kontakt na spoju implant-kost, nego implanti sa 47 % poroznosti u defektima femoralne kosti pacova.¹⁴¹ Slično, ni u skafoldima na bazi poli(propilen fumarata) različite poroznosti (57-75 %), koji su implantirani subkutano u zečeve, u kranijalne defekte, nije primećena statistička razlika u formiranju koštanog tkiva.¹⁴² Odsustvo bilo kakvih izveštaja koji ukazuju na povoljan uticaj skafolda sa smanjenom poroznošću utvrđuje već postojeće stanovište o potrebi korišćenja visokoporoznih implanata za regeneraciju koštanog tkiva.

4.2.3. Uticaj veličine pora u *in vivo* uslovima

Nezavisno od polaznih istraživanja koja su sproveli Hubert i saradnici, u kojima se definiše veličina pora od 100 μm , mnogi istraživači su proširili ispitivanja na veličine pora iznad 100 μm u cilju pronalaženja optimuma za regeneraciju koštanog tkiva.¹¹¹ Porozni blokovi hidroksiapatita različite veličine pora (106-212, 212-300, 300-400, 400-500, 500-600 μm) su upoređivani nakon subkutane implantacije u zečeve.¹⁴³⁻¹⁴⁴ Aktivnost alkalne fosfataze, sadržaj osteokalcina i stepen novoformirane kosti su bili najveći na uzorcima čija je veličina pora bila od 300-400 μm .¹⁴³⁻¹⁴⁴ Primećeno je da je početak remodelovanja kosti

znatno usporen kod laserom teksturisanih površina legura titana (Ti6Al4V) sa veličinom pora od 100 μm , u poređenju sa implantima sa veličinom pora od 200 do 300 μm , implantiranih u distalni femoralni korteks zečeva.¹⁴⁵ Iako su implantati čija je veličina pora iznosila 300 μm imali veći stepen lamelarne kosti, njihova osteointegracija je bila manja u poređenju sa implantima čija veličina pora je iznosila 200 μm , zbog manjeg stepena ukupnog (unutar pora i površinski kost-implant) kontakta.¹⁴⁵ Čak i u slučaju kada su poređeni uzorci sa veličinom pora ispod prihvaćenog minimuma, rastući od 35,4 do 45,7 μm , sa smanjenjem polaznog sadržaja polimera hialuronata (10 % naspram 66 %) u kolagen/hialuronat skafoldima, primećeno je povećano formiranje nove kosti u defektima kalvarije pacova.¹⁴⁶

Ayers i saradnici su sprovedli istraživanje koje je pokazalo da veličine pora (353, 218 i 179 μm) i odgovarajuće poroznosti (43, 54 i 51 %) nitinol implanata nakon implantacije u kranijalnim defektima zečeva ne utiču značajnije na proces osteogeneze.¹⁴⁷ Ipak, pošto je debljina implanta istog reda veličine kao i veličina pora, autori su pretpostavili da treba da postoji minimalan odnos debljina-veličina pora da bi se primetio različit uticaj veličine pora na formiranje kosti.¹⁴⁷ Implantacijom skafolda na bazi polipropilen fumarata, različite poroznosti (57-75 %) i veličine pora (300-500 i 600-800 μm) subkutano ili u kranijalne defekte zečeva, nije primećena statistička razlika u formiranju koštanog tkiva ili u inflamatornom odgovoru.¹⁴² Takođe, nisu primećene ni razlike na kontaktu kost-implant kod nitinol implanata prosečne veličine pora od 505 μm i 209 μm nakon implantacije u femoralnim defektima pacova, ali je primećena pojava fibroze.¹⁴¹

Veoma je interesantan značaj uticaja veličine pora kod regeneracije kosti na progresiju u odnosu na osteogenezu. Hidroksiapatitni skafoldi u formi saća sa malim (90-120 μm) i velikim kanalima prečnika 350 μm korišćeni su za isporuku BMP-2 subkutanom implantacijom u pacove.^{143,148,149} U kanalima malog prečnika hondrogeneza se dešava pre osteogeneze. Nasuprot tome, u kanalim većeg prečnika proces formiranja novog koštanog tkiva se odvija direktno.^{143,148,149} Poboljšana vaskularizacija koja je primećena u kanalima većeg prečnika rezultat je većeg prisustva kiseonika i lakšeg dotoka hranljivih materija, što pospešuje direktnu osteogenezu.^{143,148,149} Utvrđeno je da sličan efekat koji uslovljava stvaranje različitog tipa novoformirane kosti zavisi i od vrste BMP-2 kojima se puni skafold. Kod skafolda implantiranih subkutano u pacove koji imaju istu veličinu pora (100-200 μm), u oba slučaja, i u formi blokova, i u formi čestica, odvija se proces direktnog nastanka kosti. Ipak, kod hidroksiapatita u formi saća dešava se osteohondralna osifikacija.¹⁴⁸ Geometrija skafolda pospešuje vaskularizaciju kod formi u obliku blokova i čestica, favorizujući direktno formiranje kosti za razliku od hidroksiapata u formi saća, gde smanjeno prisustvo kiseonika uslovljava pojavu polazne faze hondrogeneze.¹⁴⁸ Proces direktnog formiranja kosti je takođe uslovljen geometrijom pora. Tako, duže i zakrivljene pore u blokovima usporavaju prodiranje mezenhimalnih ćelija i kapilara, rezultujući formiranjem kosti jedino na spoljašnjim površinama materijala, suprotno sistemima sa česticama, gde se formiranje kosti primećuje u dubljim slojevima materijala.¹⁴⁸

4.3. Uticaj poroznosti na mehanička svojstva

Iako povećana poroznost i veličina pora pospešuju proces formiranja-urastanja kosti, oni ujedno pogoršavaju mehanička svojstva, dovodeći u pitanje strukturnu celovitost skafolda.

Porozni penasti materijali dobijeni sinterovanjem poli(laktid-ko-glikolid) mikrosfera, korišćenjem mikrosfera različitog prečnika (212-250 i 600-710 μm), dovode do formiranja većih pora (od 72 do 164 μm dvočasovnim zagrevanjem i od 101 do 210 μm četveročasovnim zagrevanjem) i šire raspodelu pora (38-110 μm razlika u veličini, redom), ali bez uticaja na ukupnu poroznost (> 30 %).¹⁵⁰ Modul pod pritiskom opada sa 297 na 232 MPa.¹⁵⁰ Slično, veća poroznost (80 % naspram 58 %) slabi mehanička svojstva poroznih poli(L-laktid-ko-D,L-glikolid) skafolda (pritisna čvrstoća opada sa 11,0 na 2,7 MPa, a modul sa 168,3 na 43,5 MPa).⁶⁹ Povećanje veličine pora sa 45-150 na 300-600 μm povećava modul elastičnosti (3,1-7,8 MPa) ali ne utiče na krajnju čvrstoću skafolda dobijenih fotopolimerizacijom multifunkcionalnih kiselobaznih oligomera mlečne kiseline, nastalih vezivanjem 10 jedinica mlečne kiseline na svakoj strani jezgra dietilenglikola.¹⁵¹ Poroznost ovih skafolda iznosi ~80 %, mada manja poroznost dovodi do stvaranja manje povezanih pora,¹⁵² a veća poroznost do slabljenja mehaničkih svojstava skafolda.¹⁵¹ Poroznost od 80 % predstavlja kritičnu tačku između međupovezanosti i mehaničkih svojstava skafolda dobijenih foto-umrežavanjem polipropilenfumarata, tako da najčvršći skafoldi sa potpuno povezanim porama dobijeni ovom tehnikom imaju modul elastičnosti od 2,3 kPa i pritisnu čvrstoću od 0,11 MPa.¹⁵³

5. Materijali za dobijanje skafolda

Danas se za dobijanje skafoldnih materijala najčešće koriste prirodni ili veštački polimeri kao što su: polisaharidi, poli(a-hidroksi estri), hidrogelovi ili termoplastični elastomeri.^{80,81,154,155} Drugu važnu grupu čine bioaktivni keramički materijali, kao što su kalcijum-fosfati i biokativna stakla ili staklo-keramika.^{125,156} Trenutno, najviše pažnje se posvećuje razvoju kompozita na bazi polimera i keramike u cilju poboljšanja mehaničkih karakteristika skafolda i interakcije sa okolnim tkivom.^{125,157-161} Pored pomenutih, veliki napori se ulažu u razvoj skafolda koji imaju sposobnost kontrolisanog otpuštanja lekova. Ovi skafoldi mogu lokalno otpuštati faktore rasta ili antibiotike i tako pospešiti zarastanje kosti na mestu defekta, kao i brže zalečenje same rane.^{125,162}

Brojni su zahtevi koji se postavljaju pred skafoldne materijale. U cilju ispunjenja što većeg broja ovih zahteva, kompozitni materijali koji kombinuju prednosti polimernih i keramičkih materijala predstavljaju dobar izbor, pre svega u inženjerstvu koštanog tkiva, što potvrđuje i značajan broj istraživanja koja se vrše u ovom pravcu u poslednje vreme. U nastavku ovog poglavlja biće prikazani relevantni biodegradabilni polimeri i bioaktivna keramika, kao i strategija vezana za dobijanje kompozitnih skafolda sa povezanom poroznošću. Takođe, biće prikazana mikrostrukturna i keramička svojstva i dato poređenje između materijala koji se već koriste za biomedicinske primene.

5.1. Biorazgradive polimerne matrice

Postoje dve vrste biorazgradivih polimera, prirodni i sintetički. U prirodne materijale ove grupe spadaju polisaharidi (skrob, alginat, hitin/citozan, derivati hialuronske kiseline) ili proteini (soja, kolagen, fibrin gel, svila), a kao ojačavajući materijali koriste se različite vrste biovlakana kao što su prirodna vlakna lignoceluloze, opisana detaljnije u studijama i preglednim radovima.^{163,164}

U ovom pregledu pažnja će biti usmerena na drugu kategoriju, sintetičke, biorazgradive polimere. Sintetički polimeri se mogu dobiti u kontrolisanim uslovima što omogućava dobijanje materijala predvidljivih i reproduktibilnih mehaničkih i fizičkih svojstava, kao što su čvrstoća, modul elastičnosti i brzina razgradnje. Drugu prednost predstavlja kontrola nečistoća u samom materijalu. Takođe, mogući rizik od toksičnosti, imunoodgovora i infekcije se znatno smanjuje kod čistih polimera koji su izgrađeni od monomernih jedinica prostije strukture. U tabeli 5.1 je dat pregled fizičkih karakteristika pomenutih polimera.¹⁶⁵⁻¹⁷³

Tabela 5.1. Fizička svojstva sintetičkih, biokompatibilnih i biodegradabilnih polimera korišćenih za dobijanje skafolda

Polimer	Tačka topljenja (°C)	Tačka staklastog prelaza (°C)	Vreme biodegradacije (meseći)	Pritisna čvrstoća i čvrstoća na istezanje (MPa)	Moduli (GPa)
1. Polimeri degradabilni po zapremini					
PDLLA	Amorfan	55-60	12-16	Pilule: 35-150, Film ili disk: 29-35	Film ili disk: 1,9-2,4
PLLA	173-178	60-65	>24	Pilule: 40-120, Film ili disk: 28-50, Vlakno: 870-2300	Film ili disk: 1,2-3,0 Vlakno: 10-16
PGA	225-230	35-40	6-12	Vlakno: 340-920	Vlakno: 7-14
PLGA	Amorfan	45-55	Podesivo:1-12	41,4-55,2	1,4-2,8
PPF	-	-	Masa	2-30	
PCL	58	-72	>24		
PHA i smeše	120-177	-2-4	Masa	20-43	
2. Površinski razgradivi polimeri					
Polianhidridi	150-200	-	Površina	25-27	0,14-1,4
Poliorto-estri	30-100	-	Površina	4-16	2,5-4,4
Polifosfazen	-66-50	242	površina	-	-

5.2. Keramika

Keramički implantati koji se koriste u svrhu poboljšanja procesa osteogeneze se uglavnom baziraju na hidroksiapatitu, koji čini osnovnu gradivnu komponentu koštanog tkiva. Najčešće korišćena tehnika za dobijanje keramičkih implantata zasniva se na visokotemperaturnom sinterovanju keramičkih kompakata. Tako se npr., prah hidroksiapatita sinteruje u formi blokova sa potpuno povezanim porama (500 μm), 77 % poroznosti, čvrstoće na pritisak i čvrstoće na savijanje od 17,4 i 7,2 MPa, respektivno, sa modulom elastičnosti od 0,12 GPa.¹²⁶ Ovakvi skafoldi uzrokuju ektopično formiranje kosti nakon subkutane implantacije u miševu.¹²⁶ Cilindrični sintetički porozni hidroksiapatitni implantati sa veličinom pora od 400 - 600 μm i poroznošću od 80 % korišćeni su za zalečenje

femoralnih defekata pacova.¹⁷⁴ Porozne čestice hidroksiapatita (prosečna veličina pora 150 μm , poroznost 70 %) i porozne koralne replike hidroksiapatita (egzoskeletne mikrostrukture kalcijum karbonatnih koralna se prevode u hidroksiapatit hidrotermalnom hemijskom izmenom) u formi blokova (prosečna veličina pora 320 μm , poroznost 66%) su korišćeni kao nosači BMP-2 u ektopičnom modelu kod pacova, indukujući direktnu osteogenezu bez prethodnog formiranja hrskavice.¹⁰⁹ Drugi tipovi keramike koji se koriste za reparaciju oštećenog tkiva uključuju porozne kalciju-metafosfatne ($[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$) blokove (veličina pora 200 μm) koji su korišćeni za uzgajanje stromalnih ćelija koštane srži pacova u *ex vivo* uslovima i za ektopičko formiranje kosti miševa.¹⁷⁵ Skafoldi dobijeni oblikovanjem prirodnih koralna u formu ljudske mandibularne kondile sa veličinom pora od 150-220 μm i poroznošću od 36 %, prethodno zasejane mezenhimalnim ćelijama koštane srži zečeva, doveli su do stvaranja ektopične kosti u miševima.¹⁷⁶ Takođe, ispitan je uticaj višekomponentne keramike. Tako je npr. utvrđeno da porozna bifazna keramika (hidroksiapatit/kalcijum-fosfat) poroznosti 50 % i veličinom pora od 150 μm uspešno zalečuje femoralne defekte kod pasa.¹⁷⁷ Uopšteno, keramički biomaterijali pokazuju sposobnost formiranja karbonatnog hidroksiapatita na površini, sličnog onom koji je prisutan u kostima, pospešujući na taj način osteointegraciju. Takođe, utvrđeno je da ovi materijali pokazuju sposobnost vezivanja koncentrovanih citokina kao i prirodna kost.¹⁷⁸ Krtost i spora degradacija su ono što čini glavni nedostatak ovih materijala tokom njihove upotrebe.

5.3. Biostaklo

Chen i saradnici su uspeali da dobiju veoma porozne sunderaste skafolde na bazi biodegradabilnog 45S5 stakla za reparaciju oštećenog koštanog tkiva. Utvrđeno je da je makroporozna struktura dobijenog sunderastog skafolda veoma slična strukturi spongiozne kosti sa otvorenom poroznošću, većom od 90 %. Izmerene vrednosti pritiskne čvrstoće i čvrstoće na savijanje, pri poroznosti od skoro 91 % iznose 0,3-0,4 i 0,4-0,5 MPa, redom.¹⁷⁹ Izmerene vrednosti pritiskne čvrstoće se nalaze u rasponu vrednosti koje odgovaraju pritisknoj čvrstoći spongiozne kosti.¹⁸⁰

Bioaktivna stakla dobijena sol-gel postupkom imaju nanoporoznost koja kontroliše brzinu degradacije zbog čega se koriste za dobijanje skafolda koji odgovaraju mikrostrukтури kancelozne kosti. Skafoldi na bazi bioaktivnog stakla, optimizovane nanoporoznosti, su otporni na pritisak, ali imaju malu žilavost. Zbog napred pomenutog, idealni skafoldi treba da imaju sva svojstva stakla uz povećanu žilavost. Ovakvi materijali mogu biti dobijeni jedino korišćenjem nanokompozitnih materijala.

5.4. Kompozitni skafoldi

Razvoj kompozitnih skafoldnih materijala predstavlja izazov poslednjih nekoliko godina, jer kompoziti objedinjuju prednosti jednog ili više tipova materijala, dajući bolji odgovor okolnog tkiva na mestu primene. Na taj način, moguće je iskoristiti prednosti obradivosti polimernih materijala, a uključivanjem kontrolisane količine bioaktivne

keramičke faze moguće je povećati mehaničku čvrstoću.¹⁸¹⁻¹⁸² U isto vreme, loša bioaktivnost većine polimera može biti neutralisana inkluzijom bioaktivnih jedinjenja ili nanošenjem bioaktivnih prevlaka na polimernu osnovu. Takođe, stepen bioaktivnosti može biti kontrolisan zapreminom frakcije, veličinom, oblikom i raspodelom inkluzija.^{133,181,183-194}

Pokazalo se da povećanje zapremine inkluzija i odnosa površina-zapremina dovodi do povećanja bioaktivnosti, dok se za neke primene umesto sfernih čestica favorizuje upotreba vlakana.¹⁹⁵⁻¹⁹⁶ Dodatak biokativne faze u bioresobilni polimer može uzrokovati i promenu degradacije polimera, omogućavajući bržu izmenu protona u vodi. Ovaj mehanizam se smatra odgovornim za stvaranje efekta pufera na površini polimera, menjajući kiselinsku degradaciju polimera.^{181,183} Inkluzija bioaktivnog stakla modifikuje površinska i zapreminska svojstva kompozitnih skafolda povećanjem hidrofилности i adsorpcije vode hidrofobne polimerne matrice, menjajući tako brzinu degradacije.^{183,190} Idealno, kinetika degradacije i resorpcije kompozitnih skafolda treba da bude takva da omogući ćelijama da proliferišu i luče ekstracelularnu matricu, dok skafold postepeno nestaje, ostavljajući prostor za razvoj novih ćelija i rast tkiva. Takođe, potrebno je da struktura 3D skafolda bude zadržana sve dok novoformirano tkivo ne dostigne takva mehanička svojstva da može samostalno da postoji.

6. Tehnike dobijanja skafolda

Danas se u svetu koriste brojne tehnike, uključujući i sol-gel postupak, za dobijanje visoko poroznih struktura.⁷¹ Međutim, u nastavku će biti opisane samo najbitnije tehnike dobijanja, koje dovode do formiranja 3D strukture sa povezanom poroznošću.

6.1. Termički inicirano fazno razdvajanje (TIPS)

Korišćenjem TIPS tehnike moguće je dobiti 3D resorbilne skafolde veoma velike poroznosti (oko 97 %), sa kontrolisanom makro i mikrostrukturom koja je pogodna za formiranje nervnog, muskulatornog i koštanog tkiva.¹⁸¹ Dobijeni skafoldi se odlikuju veoma poroznom, anizotropnom, cevastom morfologijom i velikom povezanom poroznošću. Mikroporoznost sundera dobijenih TIPS postupkom, morfologija pora, mehaničke karakteristike, bioaktivnost i brzina degradacije može biti kontrolisana menjanjem koncentracije polimera u rastvoru, zapreminom dodate sekundarne faze, režimom hlađenja, kao i vrstom korišćenog polimera i rastvarača.

TIPS tehnika dobijanja skafolda se zasniva na rastvaranju i dugom mešanju polimera u dimetilkarbonatu kako bi se dobio homogeni rastvor polimera. U rastvor polimera može biti dodata određena količina staklenog ili keramičkog praha. Mešavina se prenosi u posudu i ultrazvučno tretira. Nakon toga, posuda se naglo hladi u tečnom azotu i drži 2h na temperaturi od -196 °C. Smrznuta mešavina se nakon toga ostavlja u kupatilo za hlađenje na -10 °C, i povezuje na vakum. Rastvarač sublimiše na -10 °C tokom 48h, a zatim na 0 °C narednih 48h, nakon čega sledi sušenje na sobnoj temperaturi u vakumu dok se ne dostigne konstantna masa.¹⁸³

Maquet i saradnici su TIPS postupkom razvili veoma porozni PDLA/Bioglass kompozitni skafold sa bimodalnom i anizotropnom poroznom strukturom, sačinjenom od tubularnih makropora veličine 100 µm, koje su povezane mikroporama prečnika od 10-50 µm.¹⁸³

6.2. Tehnika izluživanja čestica (particulate-leaching)

Tehnika izluživanja čestica predstavlja drugu veoma rasprostranjenu tehniku koja se koristi za dobijanje skafoldnih materijala za medicinsku primenu.¹⁹⁷ Ukratko, tehnika se zasniva na finom mlevenju soli nakon čega se čestice odgovarajuće veličine nasipaju u module u koje se uleva rastvor polimera. Nakon isparavanja rastvarača, kristali soli se izlučuju potapanjem u vodu, kako bi se formirale pore unutar skafolda. Pomenuti proces dobijanja skafolda je veoma jednostavan, a veličina pora i poroznost mogu biti jednostavno kontrolisani veličinom kristala soli i masenim odnosom so-polimer. Ipak, važne karakteristike skafolda, kao što su oblik pora i povezana poroznost ne mogu biti kontrolisane. U cilju prevazilaženja ovih nedostataka razvijene su druge metode dobijanja skafoldnih materijala.

6.3. Tehnika faznog razdvajanja

Homogeni, višekomponentni sistemi, pod određenim uslovima, postaju termodinamički nestabilni, nastojeći da se podele u više faza u cilju smanjenja ukupne energije sistema. Tako se polimerni rastvor razdvaja na dve faze, polimerom bogatu fazu i fazu osiromašenu polimerom. Nakon uklanjanja rastvarača dolazi do očvršćavanja polimerom bogate faze. Tehnika faznog razdvajanja je korišćena za dobijanje poroznih membrana za filtraciju i separaciju.¹⁹⁸ Međutim, pore dobijene ovom tehnikom obično imaju prečnik od nekoliko mikrona do nekoliko desetina mikrona, i najčešće nisu uniformno raspoređene, što predstavlja glavni nedostatak u medicinskoj primeni. U poslednje vreme razvijene su nove tehnike u cilju kontrolisanja procesa faznog razdvajanja, kao što je tehnika termički iniciranog faznog razdvajanja.

6.3.1. Tehnika faznog razdvajanja čvrsto-tečno

Fazno razdvajanje može biti postignuto snižavanjem temperature kako bi se omogućila kristalizacija rastvarača iz polimernog rastvora. Nakon uklanjanja kristala rastvarača (sublimacijom ili izmenom rastvarača), prostor koji su ispunjavali kristali rastvarača predstavlja poroznost. Ova tehnika je pogodna za dobijanje skafolda korišćenjem različitih polimera i polimernih kompozitnih materijala.¹⁸¹

Menjanjem uslova u procesu fazne separacije moguće je dobiti pore različite strukture. Tako npr., tkiva poput nervnog, muskulaturnog, dentinskog, tkiva ligamenata imaju orijentisanu cevastu ili vlaknastu strukturu. U cilju olakšanja organizacije i regeneracije takvog tkiva poželjno je da skafoldi imaju veliku poroznost i orijentisani poredak otvorenih mikročestica. Za formiranje ove strukture razvijene su nove tehnike kako bi se obezbedio rast štapičastih kristala iz polimernih rastvora. Nakon uklanjanja štapiča dolazi do formiranja mikrotubula u pravilnom poretku.¹⁸¹ Skafoldi sa orijentisanom tubularnom strukturom imaju anizotropne mehaničke karakteristike slične vlaknastom i tubularnom tkivu, koje potpomažu ćelijsku organizaciju u orijentisano tkivo.¹⁸¹

6.3.2. Tehnika faznog razdvajanja tečno-tečno

Snižavanje temperature može uzrokovati tečno-tečno fazno razdvajanje polimernog rastvora. Kada takav proces vodi formiranju bikontinualne strukture (obe polimerom bogate i polimerom siromašne faze su kontinualne), dolazi do formiranja skafolda otvorene porozne strukture nakon uklanjanja rastvarača. Npr., mešavina dioksana i vode se koristi za tečno-tečno fazno razdvajanje i dobijanje PLA i GLGA skafolda.¹⁹⁹

6.4. Tehnike zasnovane na korišćenju biodegradabilnih polimernih vlakana

Ranije tehnologije za dobijanje skafolda bile su zasnovane na upotrebi biodegradabilnih polimernih vlakana (PGA, PLA) dobijenih postupcima koji su korišćeni u tekstilnoj tehnologiji. Jedan od prvih skafolda zasnovan na ovoj tehnologiji dobijen je od

neizatkanih PGA vlakana. Ovako dobijeni PGA skafoldi su korišćeni sami ili u kombinaciji sa drugim biorazgradivim polimerima u inženjerstvu hrskavice, tetiva, krvnih sudova, srčanih zalisaka i drugih tkiva.^{181,199} Ipak, skafoldi na bazi neizatkanih PGA vlakana pokazuju i određene nedostatke, kao što su: loša mehanička čvrstoća, velika brzina razgradnje, teškoća u kontrolisanju oblika pora i prečnika vlakana.

6.5. Tehnika replike sunđera

Priprema skafolda na bazi stakla korišćenjem tehnike replike poliuretanskog sunđera odvija se kroz niz postupaka koji uključuju:

- topljenje staklarske mešavine određenog hemijskog sastava u platinskim tiglovima na povišenim temperaturama iznad 1200 °C;
- grubo mlevenje dobijenog stakla u čeličnim mlinovima uz prosejavanje na ispod 150 μm;
- fino mlevenje separisanih čestica u planetarnim mlinovima sa kuglama i posudama od Y₂O₃ stabilisanog ZrO₂, u organskim rastvaračima, do veličine od oko 5-10 μm;
- ispitivanja koloidne stabilnosti čestica stakla u vodi korišćenjem različitih disperzionih sredstava u cilju određivanja uslova za dobijanje stabilne suspenzije za dobijanje skafolda tehnikom replike polimernog sunđera;
- određivanje ceta potencijala;
- homogenizovanje suspenzije čestica stakla uz korišćenje disperzionog sredstva i polivinil alkohola u kugličnim mlinovima;
- Potapanje polimernog sunđera u pripremljenu suspenziju;
- Sušenje tokom 24h;
- Žarenjem pripljmljenog skafolda do 500 °C brzinom od 1 °C min⁻¹.²⁰⁰

U tabeli 6.1 prikazane su prednosti i nedostaci najčešće korišćenih tehnika za dobijanje skafolda, a u tabeli 6.2 mehaničke karakteristike skafolda dobijenih nekim od najčešće korišćenih materijala.

Tabela 6.1. Najčešće korišćene tehnike za dobijanje skafolda


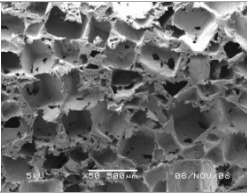
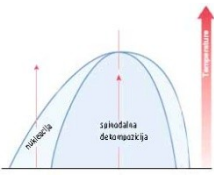
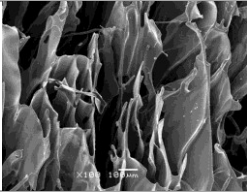
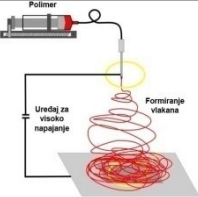
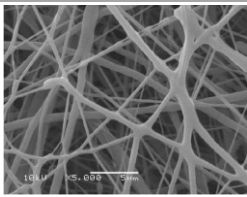
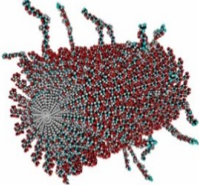
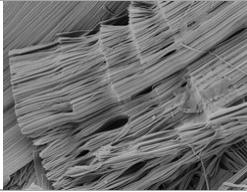
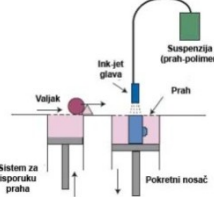
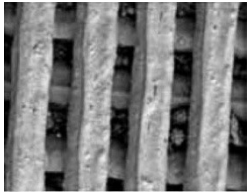
	Tehnika	Shema	Struktura skafolda	Poroznost i veličina pora
Konvencionalni skafoldi	Izluživanje čestica			Poroznost < 90 % Veličina pora 5-600 μm
	<p>Pred: - jednostavna metoda, dobijanje različitih materijala, ne zahteva skupu opremu. Nedos: - razlike u gustini uzrokuju neuniformnu raspodelu pora, teško se postiže potpuna i velike povezanost pora, potreba skidanja površinskog sloja, zahteva se najčešće korišćenje organskih rastvarača.</p>			
Konvencionalni skafoldi	Termički inicirana fazna separacija (TIPS)			Poroznost < 90 % Veličina pora 5-600 μm
	<p>Pred: - jednostavna metoda, dobijanje različitih materijala, ne zahteva skupu opremu, velike povezanost pora. Nedos: - teško se postiže potpuna i potreba skidanja površinskog sloja zahteva se najčešće korišćenje organskih rastvarača.</p>			
Nanostrukturalni skafoldi	Elektrospining			Poroznost < 90 % Veličina pora 1-10 μm
	<p>Pred: - relativno jeftina metoda dobijanja vlakana velikog broja polimera, odlična kompatibilnost sa ćelijama i tkivom, korišćenjem kristala leda kao kolektora moguće je dobiti skafolde značajne zapremine sa velikim porama. Nedos: - često je neophodno korišćenje organskih rastvarača, teško se dobijaju skafoldi većih pora, loše mehaničke karakteristike.</p>			
Nanostrukturalni skafoldi	Uređena nanovlakna			Poroznost < 95 % Veličina pora 200-800 μm
	<p>Pred: - samouređeni sistem, obično u vodi, koji može biti formiran i u prisustvu ćelija (bioaktivna funkcija). Nedos: - Relativno skupa metoda za veće količine, slabe mehaničke karakteristike ograničavaju tip skafolda za inženjerstvo mekog tkiva.</p>			
3D printing	3D printing			Poroznost < 45-60% Veličina pora 45-1600 μm
	<p>Pred: - dobra kontrola veličine pora i međupovezanosti na mikro- i nano nivou sloj po sloj proces omogućava proizvodnju kompleksnih i anatomskih oblika. Nedos: - potrebna skupa oprema, rezolucija ograničena na manje pore, zahteva biomaterijal u obliku praha kontrolisane veličine čestica.</p>			

Tabela 6.1. nastavak

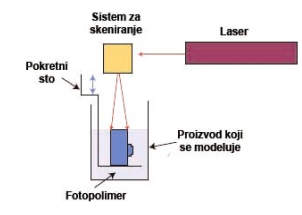
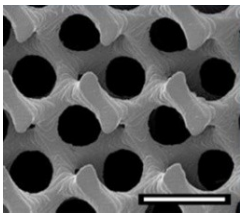
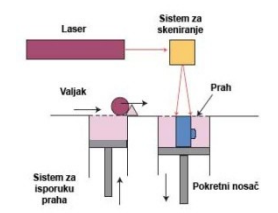
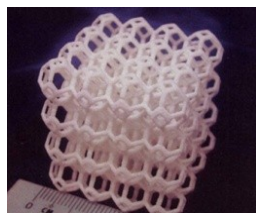
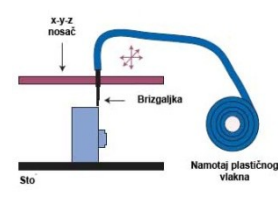
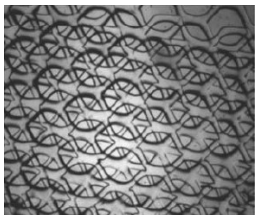
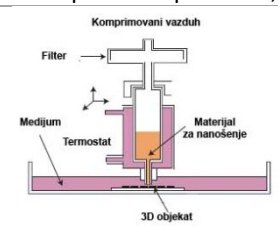
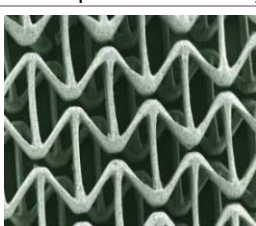
Skafoldi kao čvrste slobodne forme	Stereolitografija			Poroznost < 90% Veličina pora 20-1000 μm
		Pred: - dobra kontrola veličine pora i međupovezanosti na mikro- i nanonivou, sloj po sloj proces omogućava proizvodnju kompleksnih i anatomskih oblika. Nedos: - potrebna skupa oprema, potrebni UV osetljivi polimeri.		
	Selektivno lasersko sinterovanje			Poroznost < 40% Veličina pora 20-2500 μm
		Pred: - dobra kontrola veličine pora i međupovezanosti na mikro- i nanonivou sloj po sloj proces omogućava proizvodnju kompleksnih i anatomskih oblika. Nedos: - potrebna skupa oprema, rezolucija ograničena na manje pore, zahteva biomaterijal u obliku praha kontrolisane veličine čestica, uglavnom se primenjuje na keramičke materijale.		
	Modelovanje iz rastopa			Poroznost < 80% Veličina pora 100-2000 μm
		Pred: - dobra kontrola veličine pora i međupovezanosti na mikro- i nanonivou sloj po sloj proces omogućava proizvodnju kompleksnih i anatomskih oblika, dobra rezolucija. Nedos: - pošto se u tehnici koristi rastop polimera ograničena je na termoplastične polimere, teško se postiže formiranje malih pore.		
	Direktno pisanje (3D plotting)			Poroznost < 90% Veličina pora 5-100 μm
		Pred: - dobra kontrola veličine pora i međupovezanosti na mikro-i nanonivou sloj po sloj proces omogućava proizvodnju kompleksnih i anatomskih oblika, dobra rezolucija. Nedos: - potrebna skupa oprema, potrebno je da biomaterijal formira mastilo polielektrolita, potrebno značajno vreme za formiranje skafolda.		

Tabela 6.2. Mehaničke karakteristike skafolda u zavisnosti od vrste korišćenog materijala

Materijal	Pritisna čvrstoća (MPa)	Svojna čvrstoća (MPa)	Modul elastičnosti (GPa)	Otpornost na lom (MPa m^{-1/2})
Hidroksiapatit (HA)	4400	>40	~100	~1.0
45S5 Biostaklo	~500	42	35	0.5–1
Staklo-keramika A/W	1080	215	118	2.0
Porozno bioaktivno staklo70S30C	225	-	-	-
Porozna biostaklo-staklo keramika (>90%)	0.2-0.4	-	-	-
Porozni HA (82–86%)	0.21–0.41	-	0.83-1.6·10 ⁻³	-
Kortikalna kost	130–180	50–151	12–18	6–8
Kancelozna kost	4–12	-	0.1–0.5	-

EKSPERIMENTALNI DEO

7. Sinteza vlakana hidroksiapatita

Jedan od najviše proučavanih postupaka za poboljšanje mehaničkih karakteristika keramike na bazi hidroksiapatita i kalcijum-fosfatnih cemenata zasniva se na dodavanju vlakana u keramiku.²⁰¹ Istraživanje hidroksiapatita igličaste morfologije privuklo je veliku pažnju poslednjih nekoliko godina zbog dokazanog smanjenja biokompatibilnosti i bioaktivnosti u slučaju kada se kao vlakna za ojačavanje biokeramike koriste bioinertni materijali poput SiC, C, Si₃N₄, Al₂O₃ ili ZrO₂.^{202,203} U ojačanim polimerima, korišćenje usmerenih HA vlakana umesto praškastog HA rezultovalo je poboljšanjem žilavosti i čvrstoće, kao i anizotropijom, sličnoj onoj koju imaju kortikalne kosti ljudi.²⁰⁴ Za sintezu vlaknastog HA koriste se različiti postupci sinteze, od kojih su najzastupljeniji hidrotermalni postupak,²⁰⁵⁻²⁰⁷ zasnovan na korišćenju mokrim postupkom sintetisanog HA, male kristaliničnosti i nepravilnog oblika ili gela, kao polaznog materijala,^{208,209} postupak homogene precipitacije,²¹⁰ sinteza iz rastopa soli²¹¹ i sinteza precipitacijom iz rastvora na čvrstoj fazi.²¹² Dobijanje traka ili vlakna reakcijama u čvrstoj fazi i iz gela je u velikoj meri zavisno od strogo definisanih uslova pripreme, a vlakna dobijena ovim postupcima pokazuju manju kristaliničnost i termičku stabilnost. Homogena precipitacija pri maloj brzini reakcije predstavlja relativno jednostavnu metodu za dobijanje uniformnih čestica HA, ali vlakna HA dobijena ovim postupkom u širokom opsegu sastava i u različitim eksperimentalnim uslovima pokazuju relativno malu kristaliničnost, znatno manji odnos dužina-širina, a često dobijena vlakna ne predstavljaju čist HA.²¹³⁻²¹⁶

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje optimalnih reakcionih uslova za sintezu vlakana HA jasno definisane morfologije variranjem polazne koncentracije prekursora i pH vrednosti rastvora korišćenjem uree. Korišćeni postupak sinteze pokazuje prednosti u odnosu na već postojeće, pre svega zbog činjenice da se postepeno povećanje pH vrednosti jednostavno kontroliše koncentracijom uree u polaznom rastvoru, što omogućava dobijanje čistih kristala monetita i apatita kontrolisane morfologije.

7.1. Eksperimentalna procedura

Vlakna hidroksiapatita različitog odnosa širina-dužina sintetisana su hidrotermalnim postupkom u direktnoj reakciji kalcijum-nitrata tetrahidrata (Ca(NO₃)₂·4H₂O, 99.8 %, Carlo Erba) i natrijum-dihidrogenfosfata dihidrata (NaH₂PO₄·2H₂O, Carlo Erba) uz korišćenje uree ((NH₂)₂CO, Fluka) kao agensa za homogenu precipitaciju.

Svi uzorci (A1-A4) sintetisani su rastvaranjem stehiometrijskih količina Ca(NO₃)₂·4H₂O i NaH₂PO₄·2H₂O, (Ca/P=1.67) i različitih količina uree (Tabela 7.1) u 1500 ml destilovane vode, u staklenom sudu. U cilju obezbeđivanja uniformnog prenosa toplote, 1500 ml destilovane vode je sipano u prostor između staklenog suda i čeličnog zida autoklava.

Reakciona temperatura je merena termoparom smeštenim u unutrašnjosti autoklava. Početna pH vrednost rastvora iznosila je 4,5 za sve uslove sinteze bez podešavanja dodatkom

kiseline. Autoklav je zagrevan do 160 °C tokom 1 h i držan na ovoj temperaturi 2 h. Nakon ovog perioda, autoklav je ostavljen da se hladi do sobne temperature tokom 10 h. Dobijeni precipitat je filtriran pod vakuumom, nakon čega je ispran destilovanom vodom.

Tabela 7.1. Parametri sinteze i osobine sintetizovanog hidroksiapatita i monetita

Uz.	masa (g)			Ca/P (mol)	pH _{početno}	pH _{krajnje}	Fazni sastav	Morfologija čestica
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	urea					
A1	15.17	6.00	0.5	1.01	4.5	3.1	Monetit	Veliki pinakoidalni i igličasti kristali
A2	15.17	6.00	1	1.15	4.5	4.2	Monetit, hidroksiapatit	Igličasti kristali
A3	15.17	6.00	2	1.42	4.5	5.7	Hidroksiapatit, monetit	Pljosnati i igličasti kristali
A4	15.17	6.00	3	1.65	4.5	6.9	Hidroksiapatit	Trake

7.2. Metode karakterizacije

Difraktogrami uzoraka A1, A2 i A3 (Tabela 7.1) su dobijeni korišćenjem konvencionalnog difraktometra za analizu praha (Philips PW 1050) sa Bragg-Brentano geometrijom i CuK_{α1,2} zračenjem (Ni filter). Difraktogrami uzoraka A1-A3 su snimljeni na sobnoj temperaturi u opsegu 2θ 5 – 70° sa korakom 2θ od 0,02° i vremenom snimanja od 2 s po svakoj tački, a za uzorak A4 2θ je u osegu 8 – 120° sa korakom 2θ od 0.02° i vremenom snimanja od 14 s po tački. Pri snimanju je korišćen 1/2° slit na izvoru i prijemni slit od 0.1 mm.

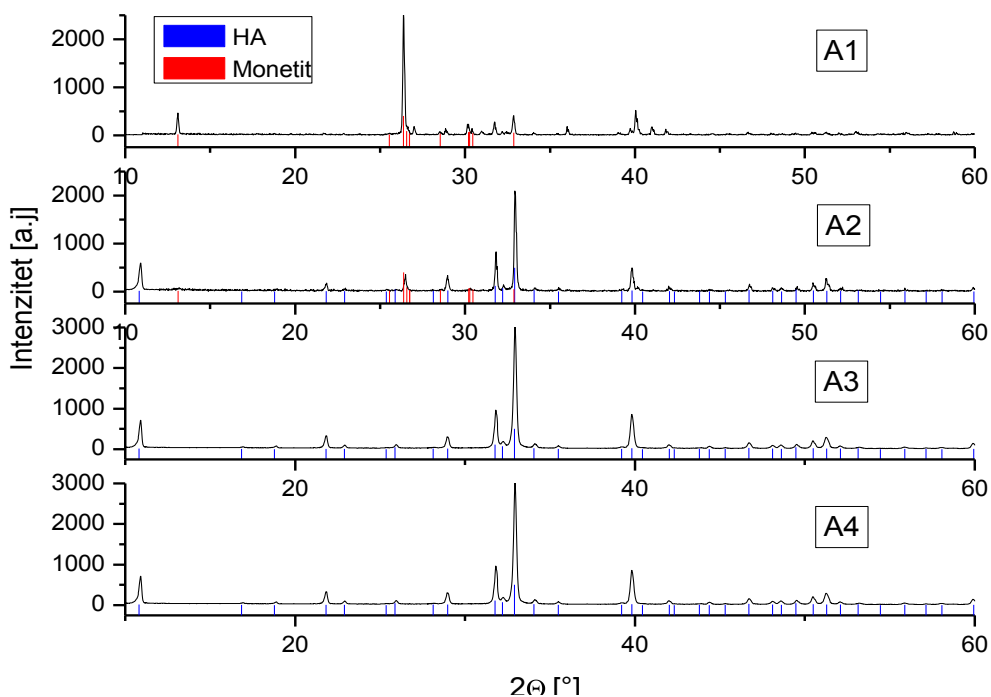
Strukturna analiza je urađena po Ritveldovoj metodi uz korišćenje Koalariet kompjuterskog programa zasnovanog na konvoluciji osnovnih parametara u cilju generisanja linijskog profila.^{217,218} Ovaj program je prihvaćen za obradu podataka dobijenih na uzorku sa dominantnim mikrostrukturnim parametrima.²¹⁸

Morfologija dobijenih čestica je analizirana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) korišćenjem uređaja JEOL JSM-5800 na 20 kV i FIB SEM na 5 kV, transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM), elektronskom difrakcijom (ED) i visokorezolucionom TEM (HRTEM) korišćenjem konvencionalnog TEM JEOL 200 CX na 200 kV i HRTEM na 80 kV. Pre analize skenirajućom elektronskom mikroskopijom, uzorci su napareni legurom Au-Pd u plazma naparivaču. Hemijski sastav uzoraka je određen energetsom disperzionom spektroskopijom (EDS), sa SiLi detektorom rendgenskih zraka (Oxford instrument, UK) koji je povezan na skenirajući elektronski mikroskop i kompjuterki kontrolisan višekanalni analizator Isis 3.2. Analiza je izvršena u cilju određivanja sadržaja Ca i P. Infracrvena spektroskopska (FTIR) analiza je izvršena na spektrometru MB Bomen 100 Hartmann and Braun u opsegu talasnog broja od 400-4000 cm⁻¹. Dobijeni prahovi (≈3 mg) su

pažljivo izmešani sa ≈ 500 mg osušenog praha kalijum-bromida (KBr za FTIR analizu, Merck) u ahatnom avanu do potpune homogenizacije smeše.

7.3. Rezultati i diskusija

Na difraktogramu (Sl. 7.1) se može uočiti da uzorak A1 čini čista monetitna faza. Položaj svih uočenih difrakcionih maksimuma se potpuno slaže sa standardnim difraktogramom monetita (JCPDS br. kartice 70-1425). Postepeno povećanje pH vrednosti uzrokovano većom početnom koncentracijom uree dovodi do nastanka manje količine hidroksiapatitne faze u uzorku A2, što je vidljivo na difraktogramu (Sl. 7.1). Dalje povećanje koncentracije uree (uzorak A3 i A4) dovodi do formiranja skoro potpuno čistog hidroksiapatita (JCPDS br. kartice 09-9432). Na difraktogramima (Sl. 7.1) se uočava jasno izražena kristalna struktura kod svih prahova. Na difraktogramu uzorka A4, sintetisanog pri najvećoj koncentraciji uree u polaznom rastvoru, uočeni su veoma intenzivni i uski difrakcioni maksimumi koji odgovaraju kristalnim ravnima (100), (200) i (300).

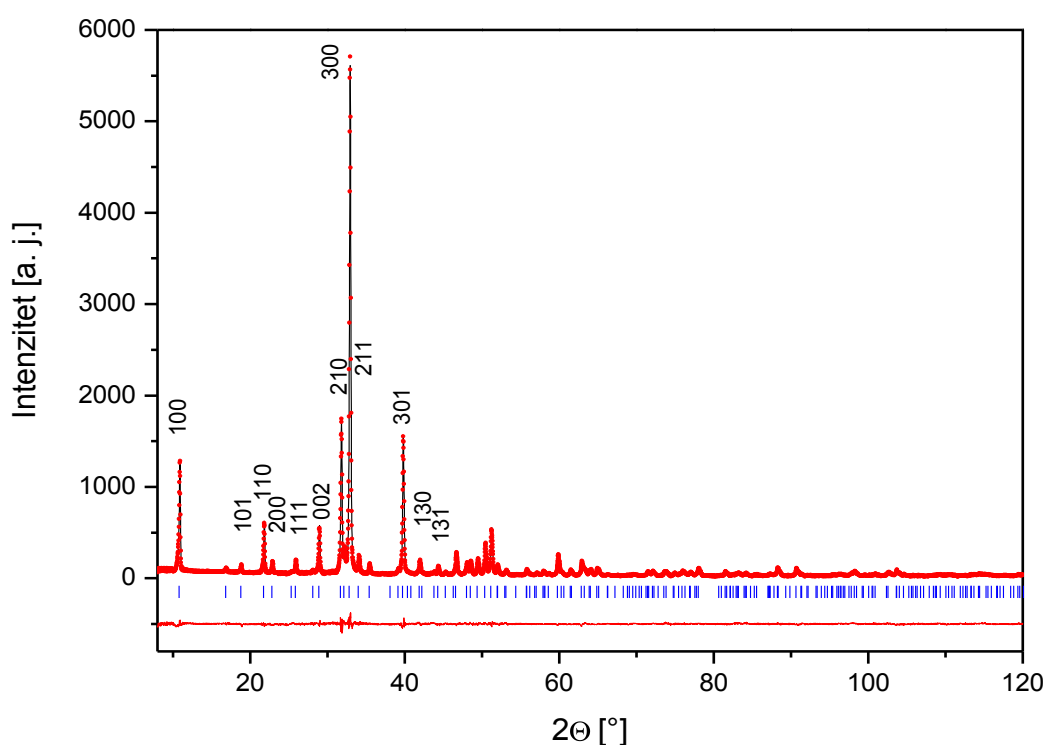


Sl. 7.1. Rendgenogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka A1, A2, A3 i A4

Mehanizam formiranja pinakoidalnih kristala monetita i traka hidroksiapatita se može objasniti na sledeći način. Naime, monetit kao najstabilnija kalcijum-fosfatna faza, koja se javlja pri pH vrednosti manjoj od 2,7, se prva formira. Sa povećanjem koncentracije uree u polaznom rastvoru dolazi do rasta pH vrednosti kao posledica razlaganja uree. Na povišenim temperaturama, iznad 80 °C, urea se kontinualno razlaže na ugljen-dioksid i amonijak. Takvo, *in situ* oslobađanje amonijaka dovodi do postepenog povećanja pH vrednosti reakcionog rastvora, do vrednosti na kojoj je hidroksiapatit termodinamički najstabilnija faza

(pH > 4,8) u odnosu na druga kalcijum-fosfatna jedinjenja koja mogu nastati u pomenutom sistemu.

Difraktogram uzorka A4 korišćen je za utučnjavanje kristalne strukture HA vlaknaste morfologije. Može se primetiti da se difraktogram uzorka A4, zahvaljujući jako izraženoj preferentnoj orijentaciji kristala (Sl. 7.2), značajno razlikuje od uobičajenih difraktograma hidroksiapatita sa slučajnom orijentacijom kristalita.²¹¹ Tkođe, na difraktogramu uzorka A4 se ne primećuje da je narušena heksagonalna simetrija. Zbog napred pomenutog, utučnjavanje kristalne strukture izvršeno je u $P6_3/m$ prostornoj grupi dobro poznatog apatitnog strukturnog tipa sa sledećim kristalografskim pozicijama jona: Ca^{2+} smeštenim na dve kristalografske pozicije – jedna na $6h [x y 1 = 4]$ sa m lokalnom simetrijom, i drugi, na poziciji $4f [1/3 2/3 z]$ sa lokalnom simetrijom $4f$; P^{5+} smeštenim na kristalografsku poziciju $6h [x y 1 = 4]$ sa lokalnom m simetrijom; O^{2-} smeštenim na dve različite $6h$ pozicije $[x y 1 = 4]$ sa lokalnom simetrijom m , i na opštoj kristalografskoj poziciji $12i [x y z]$ sa lokalnom simetrijom 1 ; OH^- smeštenom na kristalografsku poziciju $2a [0 0 1/4]$ sa lokalnom simetrijom 6 . Polazni atomski parametri za ovu strukturu su uzeti iz utučnjavanja u prostornoj grupi $P6_3/m$, dobijenim korišćenjem podataka dobijenih neutronsom difrakcijom pojedinačnih kristala.²¹⁹ Atomske pozicije, jedinična ćelija, pozadina, veličina kristalita, parametri izmeštanja mikronapreznja, termalni B faktori i preferentna orijentacija su ostavljene da variraju. Svi parametri dobijeni strukturnim utučnjavanjem prikazani su u Tabeli 7.2.



Sl.7.2. Podaci dobijeni rendgenskom difrakcijom (•), izračunati (-) i razlika (na dnu) između izračunatih podataka i podataka dobijenih rendgenskom difrakcijom uzorka A4. Vertikalni markeri ispod rendgenograma ukazuju na moguće Bragove refleksije

Utačnjavanje kristalne strukture pokazuje veoma razvijenu preferentnu orijentaciju vlakana hidroksiapatita (snimljeno u refleksionom modu na rendgenskom difraktometru - Brucker Advance D8), što je uzrokovano jasno vidljivom razlikom između difraktograma hidroksiapatita sa vlaknastom strukturom i hidroksiapatita sa slučajnom orijentacijom kristalita.²¹¹ Dodatno, da difraktogramu (Sl. 7.2) se mogu primetiti veoma intezivne refleksije koje potiču od ravni bliskih 100 pravcu, a koje prikrivaju refleksije duž 001 pravca. Svaki pokušaj pripreme uzorka koji bi vodio slučajnoj raspodeli kristalita bio je bezuspešan. Ovo najverovatnije znači da su trake hidroksiapatita koje rastu duž *c* ose prirodno orijentisane na taj način da su ravni duž 001 pravca postavljene normalno na površinu uzorka.

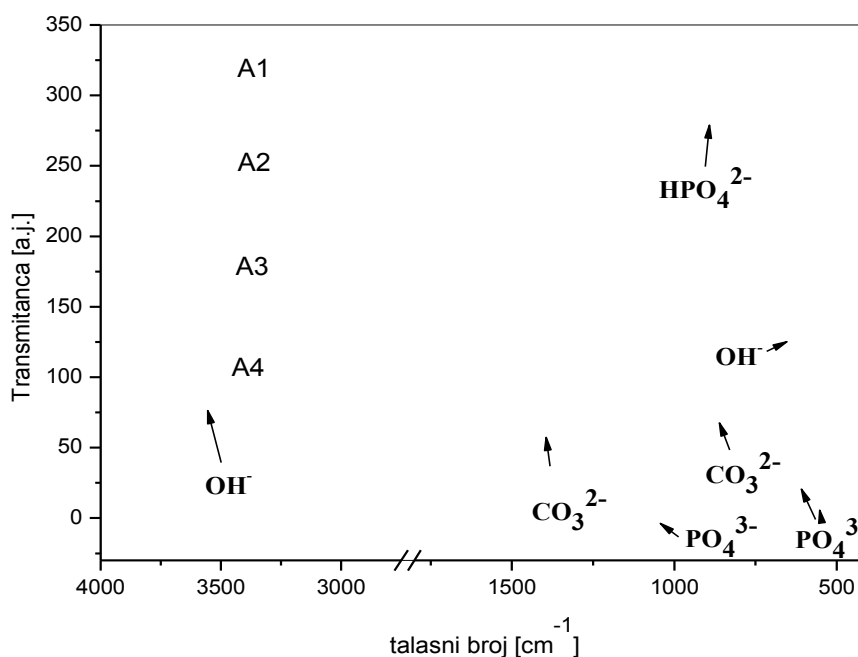
Izračunata veličina kristalita (Tabela 7.2) i TEM mikrografije (Sl. 7.6) ukazuju da debljina traka iznosi oko 300 nm. S druge strane, na difraktogramu širina pikova na polumaksimumu se ne razlikuje značajnije od difraktograma kristalnih sistema kod kojih su kristaliti razvijeni duž *c* ose, ukazujući na to da kristaliti imaju istu dimenziju u svim pravcima.

Tabela 7.2. Rezultati strukturnog utičnjavanja vlakana hidroksiapatita (uzorak A4)

	$B(\text{Å}^2)$	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>
Ca ²⁺ (6h)	0,91(4)	0,2518(2)	0,9939(3)	1/4
Ca ²⁺ (4f)	0,83(5)	1/3	2/3	0,4898(7)
P ⁵⁺ (6h)	1,00(6)	0,4033(3)	0,3746(3)	1/4
O ²⁻ (1) (6h)	0,5(1)	0,3364(4)	0,4751(5)	1/4
O ²⁻ (2) (6h)	1,7(1)	0,5961(7)	0,4398(7)	1/4
O ²⁻ (3) (12i)	4,2(1)	0,3254(3)	0,2595(4)	0,4383(7)
OH ⁻	1,9(2)	0	0	1/4
Parametri kristalne rešetke [Å]		$a = 9,44415(6)$	$c = 6,8913(26)$	
Veličina kristalita [nm]		329(18)		
Mikro naprezanje [%]		0,133(5)		
Preferentna orijentacija		0,4960		
R _{wp} [%]		8,8		

FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka A1, A2, A3 i A4 prikazani su na slici 7.3. Prikazani spektri potvrđuju prisustvo funkcionalnih grupa, koje daju informaciju o čistoći u uzorcima prisutnih faza sintetisanih pri različitim vrednostima pH. Na FTIR spektrima uzoraka A3 i A4 jasno se uočavaju trake na 3600 cm⁻¹ koje odgovaraju slobodnim vibracijama

OH grupa. Široke trake koje odgovaraju vibracijama istezanja OH grupa od 2800 do 3600 cm^{-1} vidljive su na spektrima svih uzoraka, dok su trake koje potiču od prisutne vezane vode na 1640 cm^{-1} najizraženije u spektru uzorka A1. $\nu_1 \text{PO}_4$ trake, koje se javljaju na 960 cm^{-1} , vidljive su na spektrima uzorka A2, A3 i A4. Trostruko zakrivljenje uslovljeno prisustvom $\nu_3 \text{PO}_4$ vibracija na $\approx 1070 \text{ cm}^{-1}$ nije uočljivo na spektrima uzorka A3 i A4 jer je traka suviše intenzivna. Trake na 1025, 1100 i slabe trake na 1145 cm^{-1} potiču od prisutnih PO_4^{3-} jona, a znatno izraženije su i trake na 1025 cm^{-1} na spektrima uzorka A1 i A2. Dodatno, intenzitet traka na 885 cm^{-1} , koje odgovaraju kiselim fosfatnim grupama (HPO_4^{2-}) se smanjuje. Analizom $\nu_4 \text{PO}_4$ vibracija, utvrđeno je da trake na 530 i 550 cm^{-1} na niskim frekvencijama se pripisuju HPO_4^{2-} grupama. Trake na 1545 i 1450 cm^{-1} , koje potiču od CO_3^{2-} jona, koji zamenjuju neke od OH^- jona (A-tip), vidljive su na FTIR spektrima uzorka A3 i A4. Proučavajući spektre uzoraka A3 i A4, može se izvesti zaključak na osnovu traka koje se javljaju na 1412 i 873 cm^{-1} da je najveći broj PO_4^{3-} jona zamenjen CO_3^{2-} jonima (B-tip). Dodatno, povećanje intenziteta trake na $\approx 1450 \text{ cm}^{-1}$, primećeno na spektrima uzorka A3 i A4 je veće nego povećanje intenziteta trake $\approx 1542 \text{ cm}^{-1}$.⁵⁵ Ipak, svi hidrotermalno sintetisani uzorci hidroksiapatita pripadaju AB-tipu karbonatnog hidroksiapatita. Veruje se da karbonatni joni potiču od razgradnje uree na povišenim temperaturama.



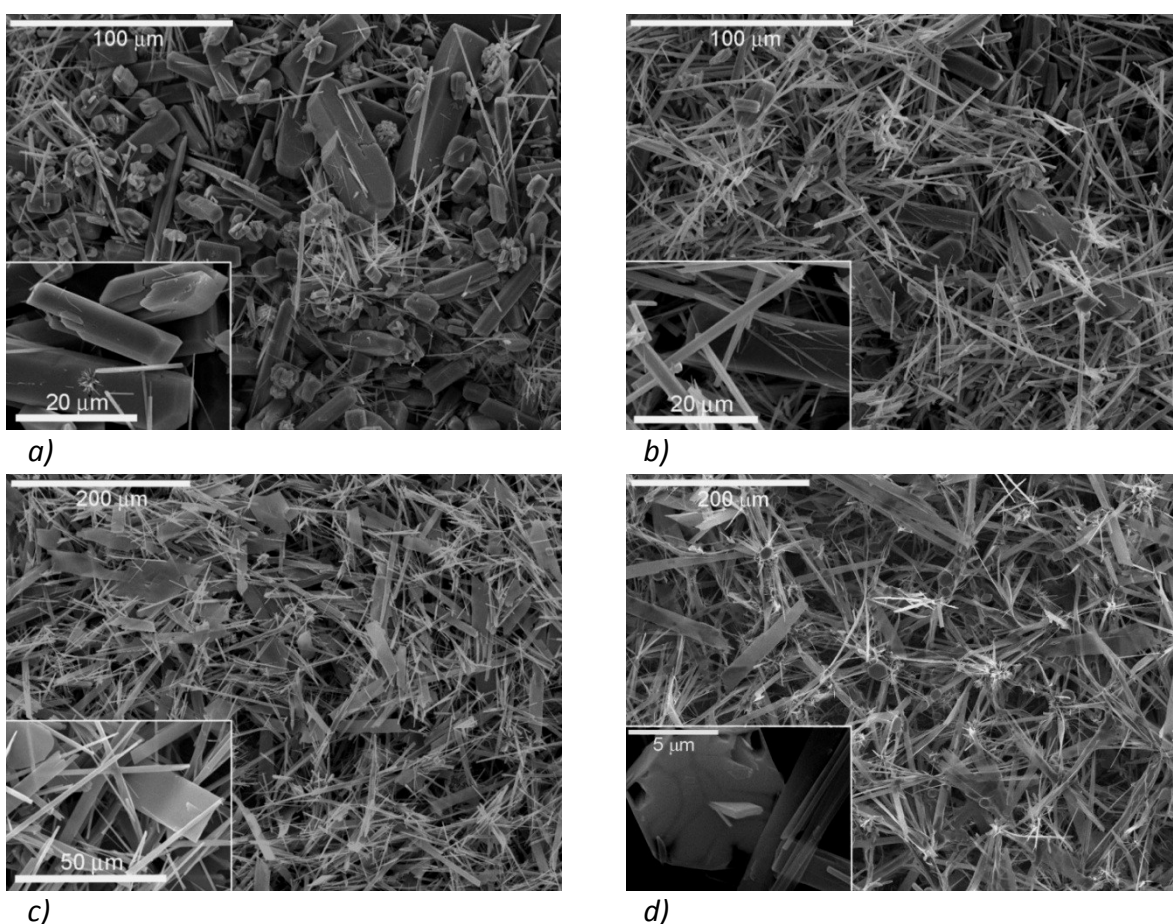
Sl. 7.3. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka

U nastavku, na SEM i TEM mikrofografijama prikazana je detaljnija mikrostruktura sintetisanih uzoraka.

SEM mikrofografije sintetisanih prahova prikazane su na slici 7.4. Na slici 7.4. a prikazani su dobro razvijeni kristali monetita dužine od $\approx 10 - 80 \mu\text{m}$ i širine $\approx 5 - 20 \mu\text{m}$. Na

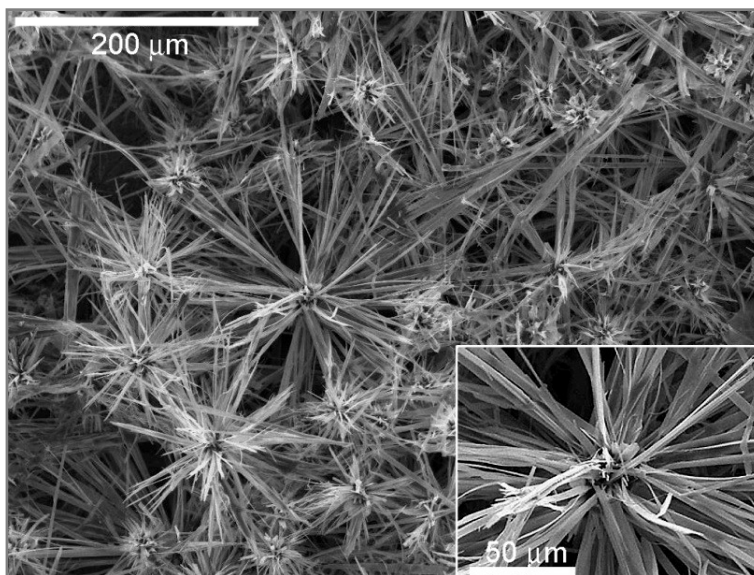
istom mikrografu uočljivo je prisustvo manjih, igličastih kristala monetita. Povećanjem koncentracije uree (Sl. 7.4. b), igličasti kristali postaju dominantna forma.

Dalje povećanje koncentracije uree u polaznom rastvoru dovodi do nastanka apatitne faze koju karakterišu kristali u obliku pločica (Sl. 7.4. c). Veliki pinakoidalni kristali monetita prisutni u uzorcima A1 i A2 (Sl. 7.4. a i b) nisu vidljivi na mikrografima uzorka A3, iako rendgenska analiza potvrđuje prisustvo male količine monetita u pomenutom uzorku. U cilju povećanja količine heksagonalnih traka u sintetisanom uzorku, postepeno povećanje pH vrednosti reakcione smeše postignuto je dodatkom veće količine uree. Nastanak pahuljastih čestica hidroksiapatita, prikupljenih iz vodenog rastvora po završetku sinteze, koje se sastoje od velikog broja traka, prikazan je na mikrografu na slici 7.4. d. Mikrografija pokazuje da dužina vlakana iznosi od 50 do 150 μm , a širina od 2 do 10 μm . Na istom mikrografu, čestice u formi šolje sa osom šestog reda vidljive su u centru same pahuljičaste čestice (Sl. 7.4. d) i kao izolovane čestice (isečak na slici 7.4. d). Njihovo formiranje može biti objašnjeno Wulfovom teorijom oblika, koja definiše ravnotežni oblik savršenog kristala materijala koji se nalazi u kontaktu sa okolnim medijumom. Ravnotežni oblik se postiže u cilju smanjivanja ukupne energije sistema, a doprinos daju, kako sama unutrašnjost tako i površina kristala.²²⁰

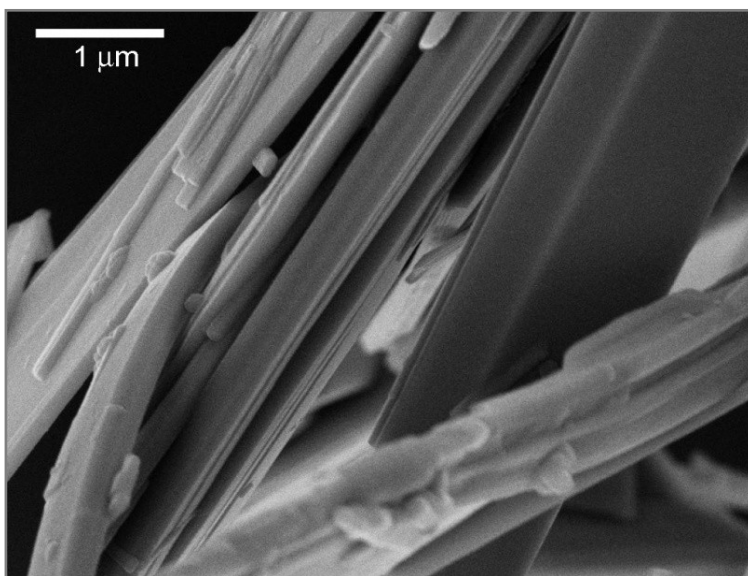


Sl. 7.4. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka sa umetnutim mikrografijama istih uzoraka snimljenim pri većem uvećanju: (a) A1, (b) A2, (c) A3) i (d) A4

Pahuljaste čestice hidroksiapatita (uzorak A4), prikupljene iz vodenog rastvora po završetku sinteze prikazane su na mikrografu na slici 6.5. a. Na mikrografu (isečak na slici 7.5. a) može se videti da se prethodno pomenuta heksagonalna forma slična šolji formira u centru pahuljaste čestice. Iz tako nastale heksagonalne forme razvijaju se trake kao posledica brzog rasta hidroksiapatita duž c ose (Sl. 7.4. d, isečak). Na mikrografu istog uzorka snimljenom pri većem uvećanju (Sl. 7.5. b) uočava se da je prosečna debljina trake oko 300 nm, što je potvrđeno i utačnjavanjem kristalne strukture Rietvaldovom metodom.



a)



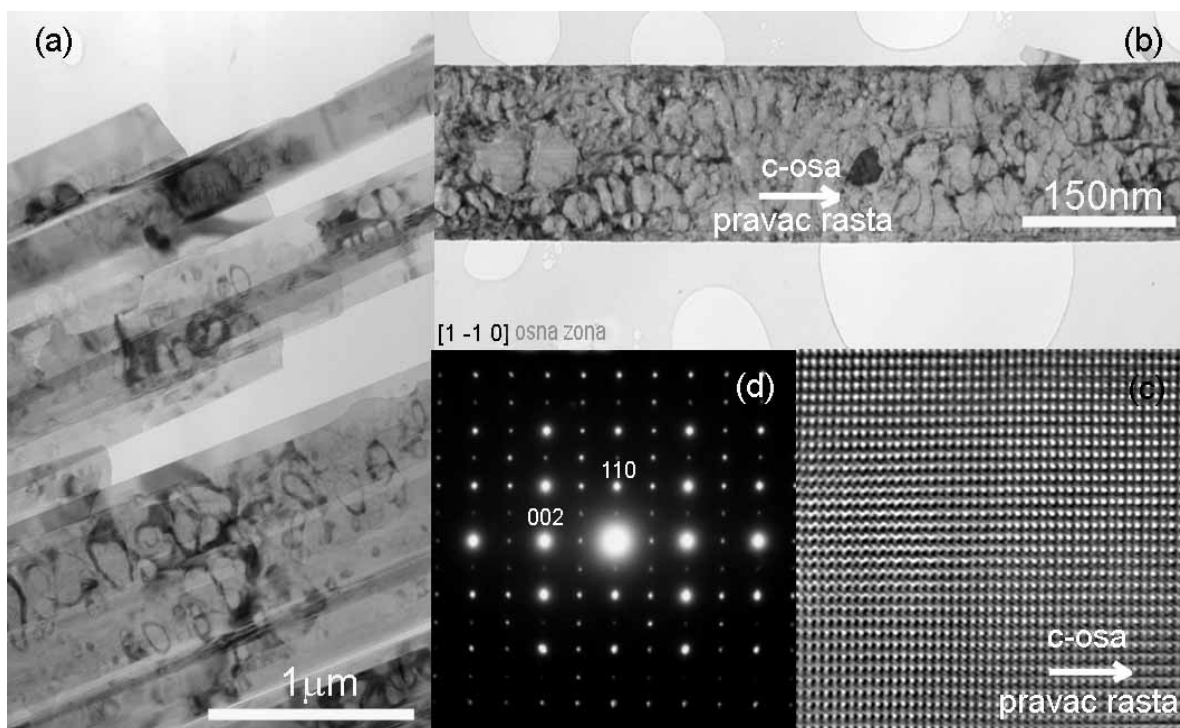
b)

Sl. 7.5. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanog uzorka A4 pri (a) manjem i (b) većem uvećanju

U slučaju kada se hidrotermalna sinteza izvodi na temperaturama iznad 90 °C, dolazi do bržeg razlaganja uree, što stvara uslove za formiranje većeg broja nukleusa, što bi trebalo da dovede do stvaranja većeg broja manjih kristala. Uprkos ovoj pretpostavci, zasnovanoj na

teoriji rasta kristala, dobijene su veoma dobro iskristalisale čestice hidroksiapatita u formi izduženih traka veličine oko 150 μm .

TEM mikrografije osušenih trakastih čestica uzorka A4 prikazane su na slici 7.6. isečci a i b. Elektronska difrakcija, koji odgovara centralnom delu trakaste čestice, prikazana je na slici 7.6. u isečku d. Difrakcija pokazuje da trake predstavljaju pojedinačne kristale, što je potvrđeno i rendgenskom difrakcionom analizom. Difrakcije koje se vide na elektronskom difraktogramu u potpunosti mogu biti indeksirane u heksagonalnoj $P6_{3/m}$ prostornoj grupi, u kojoj kristališe hidroksiapatit, korišćenjem parametara ćelije preuzetih iz kartice JCPDS 09-432 (Sl. 7.6. isečak d). Reprezentativna slika dobijena na visokorezolucionom TEM-u snimljena duž $[110]$ pravca prikazana je na slici 7.6. u isečku d, čime je potvrđena savršeno uređena struktura dobijenih traka hidroksiapatita uzorka A4. TEM/ED/HRTEM analiza potvrđuje prethodni zaključak izveden iz utičnjavanja kristalne strukture da trake (uzorak A4) predstavljaju pojedinačne kristale orijentisane duž c ose.



Sl. 7.6. TEM mikrografije uzorka A4 snimljene pri manjem uvećanju (a); TEM mikrografije HA traka (b); HRTEM slika HA trake sa vidljivim kristalnim ravnima (c) i odgovarajući elektronski difraktogram HA trake (d)

8. Sinteza nedopiranih i silicijumom dopiranih prahova HA

Cilj sprovedenih istraživanja bio je da se sintetiše hidroksiapatit poboljšane bioaktivnosti u odnosu na čisti hidroksiapatit kroz kontrolisan proces kristalizacije u hidrotermalnim uslovima na povišenoj temperaturi. Za dobijanje materijala kontrolisane morfologije i hemijskog sastava, bitnih za medicinsku primenu HA, sprovedene su dva postupka sinteze u kojima su sintetisane nedopirane i silicijumom dopirane čestice hidroksiapatita sferne i vlaknaste morfologije. Ispitan je uticaj silicijuma na strukturu i faznu transformaciju dobijenih apatita, kao i bioaktivnost u *in vitro* uslovima.

8.1. Eksperimentalna procedura

Silicijumom-dopirani apatiti sintetisani su u formi vlakana i sfera (sferne i vlaknaste čestice su u daljem tekstu označene slovima S i W, redom) hidrotermalnom metodom korišćenjem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (korišćen u sintezi sfernih čestica HA) i uree. Odgovarajuće količine reaktanata proračunate su za odnos Ca/P 1,67 i 1,50. Količine $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i uree prikazane su u Tabeli 8.1. Silicijumom-supstituisani apatiti dobijeni su za polazni odnos Ca/P = 1,50 kako bi se pospešila fazna transformacija hidroksiapatita u α -TCP fazu na nižim temperaturama uz dodatak dve različite količine tetraetil-ortosilikata (TEOS) kao izvora jona silicijuma (Tabela 8.1). Svaka sinteza je izvedena mešanjem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (korišćen samo u slučaju sfernih čestica) i uree u 1500 ml destilovane vode u staklenom sudu. TEOS je prvo rastvoren u 40 ml apsolutnog alkohola, a onda dodat u osnovni rastvor. U cilju obezbeđivanja uniformnog prenosa toplote, 1500 ml destilovane vode je nasuto u prostor između staklenog suda u kome se nalazi pripremljeni rastvor i čeličnog zida autoklava. Autoklav je zagrejan do 160 °C tokom 1h, a onda držan na ovoj temperaturi 2h. Nakon tog perioda autoklav je hlađen 10 h do sobne temperature. Istaloženi apatit je sakupljen filtracijom na vakumu i ispran destilovanom vodom. Proizvodi sinteze su termički tretirani na 1200 °C u atmosferi vazduha pri brzini zagrevanja od 10 ° min⁻¹.

Tabela 8.1. Količine reaktanata korišćene za dobijanje silicijumom dopiranih i nedopiranih prahova HA različite morfologije

Uzorak	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mol)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mol)	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mol)	Urea (mol)	TEOS (mol)	Ca/P (mol)
S1.67	0,0642	0,0385	0,0199	0,2000	0	1,67
S1.50	0,0577	0,0385	0,0199	0,2000	0	1,50
S1.50SiL	0,0577	0,0385	0,0199	0,2000	0,0024	1,50
S1.50SiH	0,0577	0,0385	0,0199	0,2000	0,0240	1,50
W1.67	0,0642	0,0385	0	0,2000	0	1,67
W1.50	0,0577	0,0385	0	0,2000	0	1,50
W1.50SiL	0,0577	0,0385	0	0,2000	0,0024	1,50
W1.50SiH	0,0577	0,0385	0	0,2000	0,0240	1,50

8.2. Metode karakterizacije nedopiranih i silicijumom dopiranih prahova HA

Rendgenski difraktogrami sintetisanih prahova su snimljeni korišćenjem konvencionalnog difraktometra za analizu prahova (Ital Structure APD 2000) sa Bragg-Brentano geometrijom i $\text{CuK}_{\alpha 1,2}$ zračenjem. Difraktogrami su snimljeni na sobnoj temperaturi pri uglu 2θ između $5-70^\circ$ i korakom 2θ od 0.02° , i vremenom snimanja od 2 s po svakoj tački merenja. Korišćeni su $1/2^\circ$ slit na izvoru i prijemni slit od 0.1 mm. Fazna identifikacija, profilna analiza i utačnjavanje parametara kristalne rešetke su određeni korišćenjem WinPLOTR²²¹ i PowderCell²²² programa. Kao polazni parametri za utačnjavanje kristalne strukture uzeti su parametri Kaya i Smitha.^{223,224}

Morfologija sintetisanih prahova je proučavana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju JEOL JSM-5800 i TESCAN Mira3 XMU na 20 kV, i transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM) T-100 CX. Pre SEM analize, praškasti uzorci su napareni legurom Au-Pd, dok su za TEM analizu uzorci dispergovani u etanolu i naneseni na bakarnu mrežicu.

Hemijski sastav uzoraka određen je energetskom disperzionom spektroskopijom (EDS) sa SiLi detektorom karakterističnih rendgenskih zraka i Isis 3.2 softverskim paketom (Oxford Instruments, UK) koji je povezan na SEM i više-kanalni analizator, i energetskom disperzionom rendgenskom fluorescentnom spektroskopijom (EDXRF) na uređaju Oxford ED 2000 spectrometer (Oxford Instrument, UK).

Infracrvena spektroskopska analiza (FTIR) je izvršena na uređaju MB Bomen 100 Hartmann and Braun pri vrednosti talasnog broja između 400 to 4000 cm^{-1} . Praškasti uzorci (≈ 3 mg) su pažljivo izmešani sa kalijum-bromidom (≈ 500 mg) u ahatnom avanu.

Koncentracija EDTA određena je tačnom hromatografskom i masenom spektrometrijskom (LC-MS/MS) metodom. Ekstrakti praškastih uzoraka su analizirani sistemom Surveyor LC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) opremljenim sa Zorbax Eclipse® XDB-C18 kolonom $4.6\text{ mm} \times 75\text{ mm}$, i veličinom čestica punjenja od $3.5\text{ }\mu\text{m}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pokretna faza se sastojala od 40 % vode i 60 % metanola, a brzina protoka je iznosila $0,5\text{ ml min}^{-1}$. Maseni spektar je dobijen na LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) četvoropolnom jonsko-masenom spektrometru uz korišćenje elektrosprej jonizujuće tehnike. Pripremljeni rastvor je analiziran u negativnom jonizujućem modu sa optimizovanim radnim parametrima izvora: napon izvora (5 kV), noseći gas (23 a.j.) i temperaturom kapilare ($290\text{ }^\circ\text{C}$).

Priprema ćelijske kulture i zasejavanje ćelija

Eksperiment je obavljen sa SaOs2 ćelijama osteosarkoma, koje su kultivisane u McCoy mediumu (Sigma) prihranjenim sa 10 % serumom fetusa govečeta FCS (Biochrom AG), Glutamax i Pen/Strep (Gibco) i držani na temperature od $37\text{ }^\circ\text{C}$ u vlažnoj atmosferi sa 5 %

CO₂ u Heraeus inkubatoru. Svi ispitivani uzorci su sterilisani 30 min u vodenoj pari na 121 °C u Falcon 30 autoklavu (LTE Scientific) pre ispitivanja u ćelijskoj kulturi.

Metabolička aktivnost

Isti postupci za kvantifikovanje potencijalne citotoksičnosti primenjeni su kod sintetisanih osušenih i termički tretiranih prahova sfernih i vlaknaste morfologije. Osušeni (na 100 °C tokom 2h) i termički tretirani (na 1200 °C tokom 2 h) praškasti uzorci su ekstrahovani u pripremljeni medium (0,2 g mL⁻¹) tokom 24 h pre dodavanja (3 dodavanja za svaki uzorak) na kultivisani sloj koštanih ćelija u mikrotitar ploče sa 96 otvora sa kulturama (TPP). Nakon inkubacije tokom 72 h, broj preživelih ćelija odresđen je na uređaju CellTiter 96[®]. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit je pripremljen po specifikaciji proizvođača (Promega). Optička gustina (450 nm) je očitavana na Mithras spektrofluorometru (Berthold) za obe vrste ispitivanih i kontrolnih uzoraka. Za sve uzorke izvršena su dvostruka merenja.

Biokompatibilnost osušenih i termički tretiranih na 1200 °C uzoraka S1.50SiL i W1.50SiL određena je dodatno ispitivanjem metaboličke aktivnosti na L929 ćelijama i morfološkom analizom L929 ćelija u kulturi. Takođe, ispitan je i uticaj ekstrakta sintetizovanih prahova u direktnom kontaktu sa ćelijama. Ekstrakt je pripremljen inkubacijom osušenih i termički tretiranih na 1200 °C uzoraka hidroksiapatita S1.50SiL i W1.50SiL u kompletu RPMI medijuma tokom 24 h na 37 °C (67 mg/ml). Komplet RPMI medijuma se sastoji od RPMI 164 medijuma (Sigma) prihranjenim sa 10 % seruma fetusa govečeta (FCS) (AA Laboratories), 2 mM L-glutamina i antibiotika. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 min na 15000 o min⁻¹. Nakon centrifugiranja ekstrakti su odvojeni, a pH vrednost ekstrakta je podešena na pH vrednost medijuma kulture (7,4). Za ispitivanje je korišćeno pet različitih koncentracija ekstrakta (100, 50, 25, 12,5, 6,25 %), a za ispitivanje direktnog uticaja čestica apatita na L929 ćelije korišćene su sledeće koncentracije uzoraka: 250, 100, 50, 10, 2,5 µg/ml.

Ćelijska kultura L929 ćelija

L929 ćelije (ATCC klonovi) su raspoređene u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Costar) (1,5·10⁴ ćelija/ćeliskom sudu/200 µl kompleta RPMI medijuma) i kultivisani u inkubatoru u kontrolisanoj atmosferi sa CO₂ gasom tokom 6 h na 37 °C. Nakon toga, medijum je pažljivo uklonjen i zamenjen istom zapreminom suspenzije praha hidroksiapatita ili ekstrakta hidroksiapatita, u koncentracijama koje su ranije navedene. Kontrolne ćelije su inkubirane u sam komplet medijuma. Proces inkubacije je trajao 2 dana na temperaturi od 37 °C. Nakon toga, ćelijske kulture su analizirane pod invertnim mikroskopom (Olympus) i snimljene digitalnom kamerom, nakon čega je urađena MTT analiza.

MTT analiza

Metabolička aktivnost L929 ćelija, kultivisanih na uzorcima sfernih i trakastih čestica, ili u ekstraktima na prethodno opisani način, određena je korišćenjem MTT metode. Posle

morfološke analize, supernatati su uklonjeni iz ćelijske kulture L929 i zamenjeni sa 100 µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid)) rastvora (krajnja koncentracija je 100 µg/ml kompleta RPMI medijuma). Ćelije su inkubirane MTT rastvorom u inkubatoru tokom 4h. Nakon toga, 100 µl 0.1 N HCl i 10% natrijum-dodecilsulfata (SDS) je dodato u svaku ćeliju. Uzorci su ostavljeni preko noći u inkubator, a naredni dan konverzija MTT u živim ćelijama u formazan hromofor je određena merenjem absorbance na 570/650 nm na čitaču (N.T. Laboratory). Ćelije suda sa MTT rastvorom bez ćelijske kulture korišćene su kao kontrolni uzorak. Pošto nije bilo značajnije razlike u absorbanci izmerenoj u ćelijama sa ispitivanim prahovima i onima u kojima je bio prisutan samo medijum, slepa proba je integrisana. Svi prikazani podaci predstavljaju srednju vrednos ± SD dobijenu na osnovu šest merenja.

Metabolička aktivnost L929 ćelija kultivisanih na ispitivanim prahovima HA je određena relativno u odnosu na metaboličku aktivnost kontrolnih ćelija na sledeći način:

$$\frac{\text{OD (ispitivanih uzoraka)} - \text{OD (slepe probe)}}{\text{OD (kontrolne ćelije)} - \text{OD (slepa proba)}} \cdot 100 \% \quad (8.1)$$

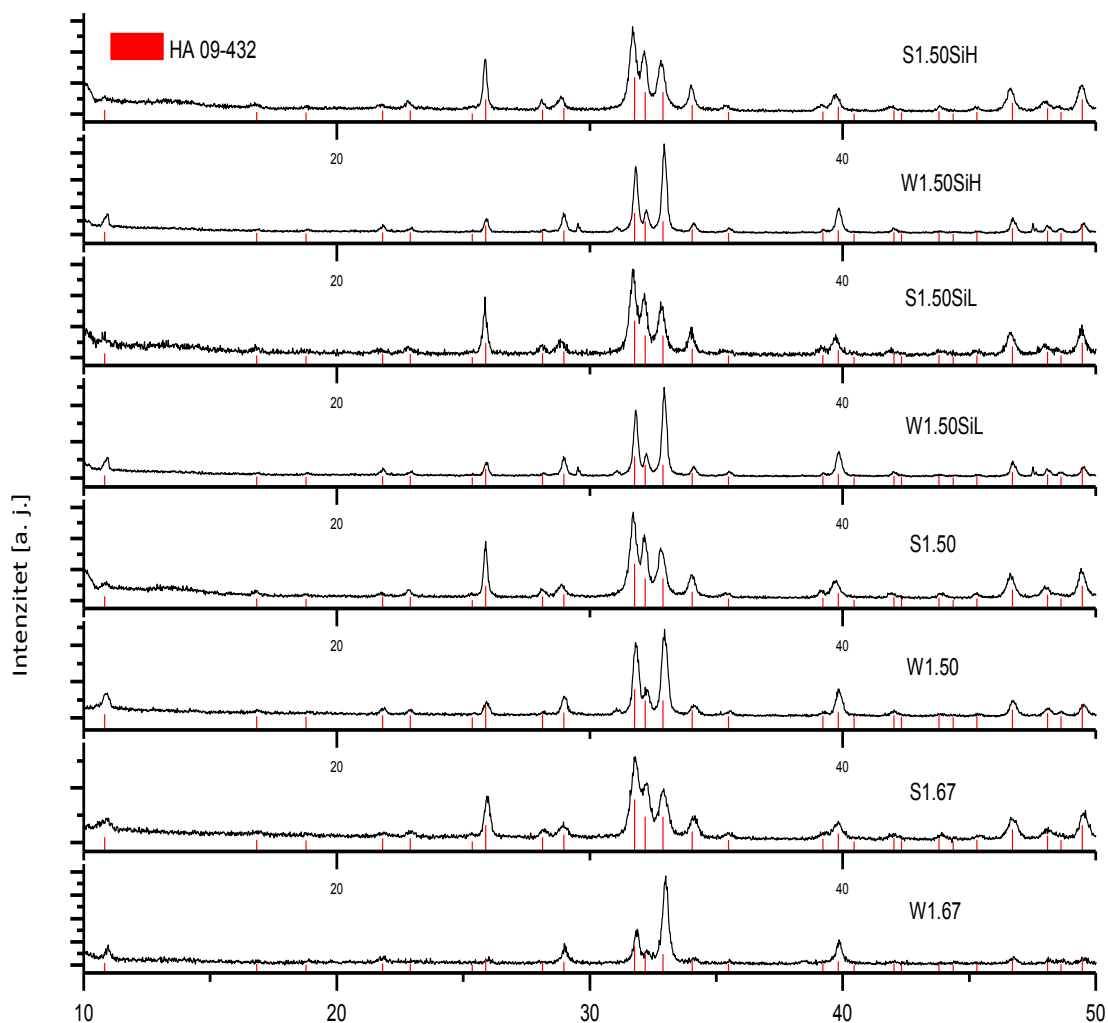
In vitro stabilnost u simuliranom telesnom fluidu (SBF)

Sintetisani dopirani i nedopirani prahovi, termički tretirani na 1200 °C (0,5 g) su potopljeni u 30 ml SBF-a, jonske koncentracije i pH vrednosti približno jednakim onima u humanoj plazmi, na 37 °C tokom 72 h. Nakon vađenja iz rastvora SBF-a, uzorci su osušeni i naparavanjem Au-Pd legurom pripremljeni za dalju SEM analizu.

8.3. Rezultati i diskusija

Difraktogrami dobijenih dopiranih i nedopiranih prahova HA prikazani su na slici 8.1 Uočava se da položaj pikova na rendgenskom difraktogramu sfernih i trakastih čestica HA odgovara karakterističnim pikovima kristalnog apatita prema ICDD standardu za HA (PDF 9-432). Uzorci S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH osušeni na 105 °C daju prilično nerazdvojene pikove koji su slični onima koji se javljaju kod bioloških apatita. Međutim, difraktogrami uzoraka W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH, zahvaljujući veoma izraženoj preferentnoj orijentaciji, se značajno razlikuju od difraktograma koji se obično dobijaju kod apatita sa proizvoljnom orijentacijom kristalita.

Dodatno, na difraktogramima uzoraka W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH (Sl. 8.1) uočavaju se veoma intenzivne refleksije koje potiču od ravni bliskih 100 pravcu, koji prikivaju refleksije duž 001 pravca. Naznačena promena širine pikova na polumaksimumu intenziteta u odnosu na kristalne sisteme kod kojih su kristaliti razvijeni duž c ose, ukazuje da kristaliti imaju iste dimenzije u svim pravcima.



Sl. 8.1. Difraktogrami hidrotermalno sintetisanih prahova osušenih na 105 °C

Utačnjeni parametri jedinične ćelije dobijenih iskristalinskih prahova prikazani su u tabeli 8.2. Sa povećanjem očekivanog sadržaja silicijuma u uzorcima HA uočava se povećanje parametra a i c i kod sfernih čestica i kod trakastih čestica HA sa Ca/P odnosom 1,50, što se može uzeti kao dokaz inkorporacije SiO_4^{4-} anjona unutar kristalne rešetke koji zamenjuju PO_4^{3-} anjone. Neslaganje između vrednosti parametara kristalne rešetke kod silicijumom supstituisanih apatita navedeno od strane Sayera i saradnika²²⁵ i vrednosti parametara kristalne rešetke koji su dobijeni u ovom radu nije iznenađujuće, pre svega zbog činjenice da su u postupku sinteze korišćeni drugi uslovi, kao i količine silicijuma, što ukazuje na razlike u hemijskom sastavu u odnosu na silicijumom-supstituisane apatite dobijene precipitacionim postupcima i reakcijama u čvrstom stanju.

Treba znati da rendgenska difrakciona analiza prahova apatita, sintetisanih različitim postupcima, može dati iste difraktograme, koji u potpunosti odgovaraju HA, iako se Ca/P odnos znatno razlikuje od stehiometrijskog odnosa, koji za HA iznosi 1,67. Zbog napred navedenog, rendgenska difrakciona analiza se obično izvodi na uzorcima koji su termički

tretirani na temperaturama višim od 800 °C u cilju određivanja uticaja hemijskog sastava na fazni sastav i strukturu hidroksiapatita.²²⁶

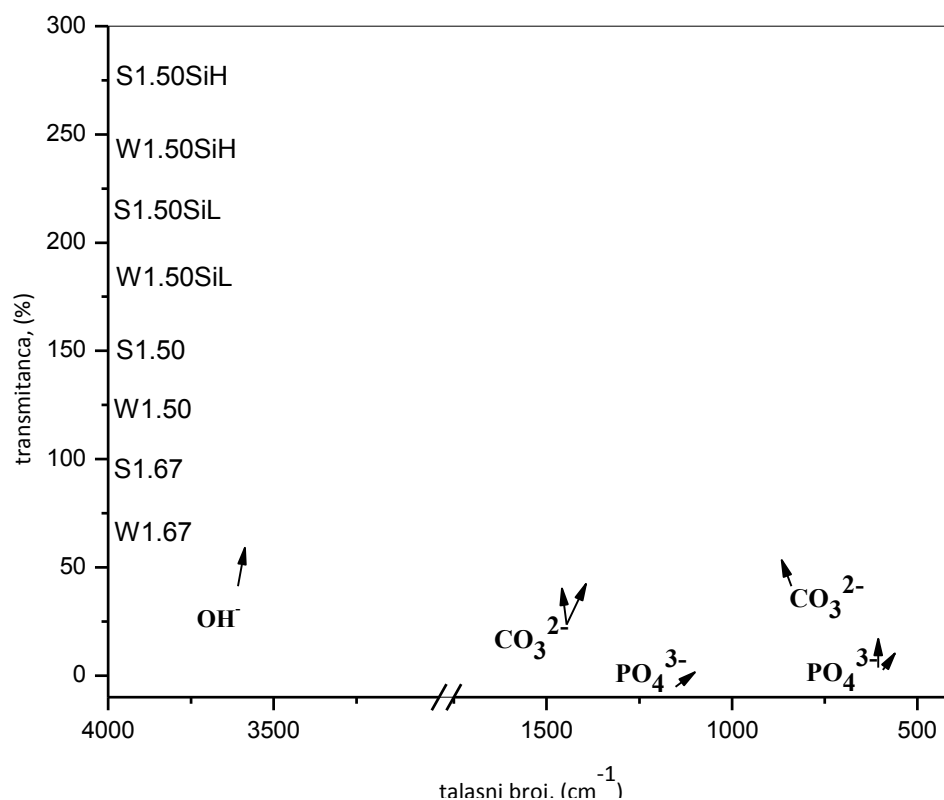
Tabela 8.2. Jedinični parametri kristalne rešetke sfernih i trakastih, silicijumom dopiranih i nedopiranih uzoraka.

Uzorak. Jed. param.	S1.67	S1.50	S1.50SiL	S1.50SiH	W1.67	W1.50	W1.50SiL	W1.50SiH
a (Å)	9,4498(3)	9,4669(3)	9,4683(3)	9,4693(3)	9,4442(3)	9,4377(3)	9,4412(3)	9,4522(3)
c (Å)	6,8881(2)	6,8997(2)	6,9026(2)	6,9027(2)	6,8913(2)	6,8921(2)	6,8939(2)	6,9022(2)

Infracrvena spektroskopija korišćena je za analizu osušenih i termički tretiranih prahova HA u cilju kvantifikovanja uticaja supstitucije silicijumom na različite funkcionalne grupe hidroksiapatita, kao što su hidroksilne i fosfatne grupe. FTIR spektr sintetisanih i osušenih prahova S1.67, S1.50, S1.50SiL, S1.50SiH, W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH prikazan je na slici 8.2.

Na FTIR spektru (Sl. 8.2) uzoraka S1.67, S1.50, S1.50SiL, S1.50SiH uočava se porast intenziteta traka koje potiču od slobodnih OH veza, pri čemu su spektri svih uzoraka veoma slični. Slabe OH veze na 3569 cm⁻¹ su delimično prekrivene širokim pikovima koji se javljaju na 2600-3700 cm⁻¹, koji su karakteristični za vlagu prisutnu u uzorcima. Tri pika na 1100, 1040 i 960 cm⁻¹ koji potiču od v3 i v1 veza i dva pika na 605 and 567 cm⁻¹ koja potiču od v4 veza su primećena na svim spektrima.

Karbonatne v3 trake na 1635, 1460 and 1416 cm⁻¹, i karbonatne v2 trake, kao pojedinačni pikovi na 875 cm⁻¹, su uočene kod svih tek pripremljenih uzoraka. Primećeno je da su pikovi koji potiču od karbonatnih v3 traka na 1635 i 1415 cm⁻¹ kod uzoraka W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH blago pomereni na 1622 i 1409 cm⁻¹ kod tek pripremljenih S1.67, S1.50, S1.50SiL, S1.50SiH uzoraka. Blago pomeranje je primećeno i kod karbonatnih v2 traka sa 875 cm⁻¹ za uzorke W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH na 880 cm⁻¹ za uzorke S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH. Jasno razdvojeni pikovi na 1140 cm⁻¹, karakteristični za Si-O veze, se ne uočavaju na prikazanim FTIR spektrima.

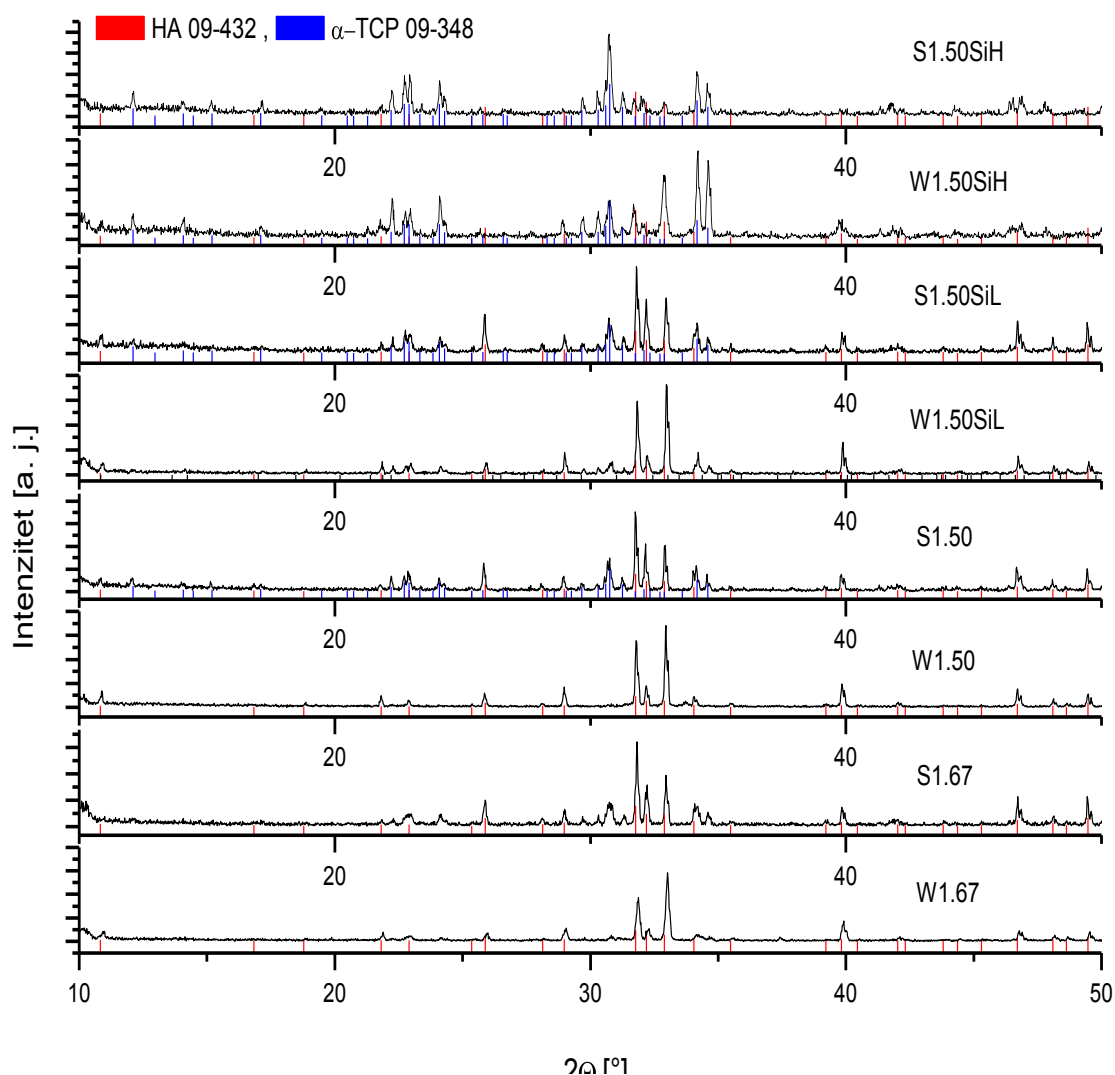


Sl. 8.2. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka osušenih na 105 °C

Rendgenski difraktogrami uzoraka, termički tretiranih na 1200 °C tokom 2 h, prikazani su na slici 8.3. Na difraktogramima uzoraka sferne i trakaste morfologije uočava se različito ponašanje tokom zagrevanja, koje se ispoljava u nastajanju različitih količina α -TCP faze. Svi difrakcioni pikovi odgovaraju ICDD (JCPDS) standardima za HA (PDF kartica br. 09-432) i α -TCP (PDF kartica br. 9-348) fazu, pri čemu Si- α -TCP faza kristalografki odgovara α -TCP fazi.

Poredeći difraktograme sfernih i trakastih prahova apatita dobijenih iz rastvora različitog polaznog Ca/P odnosa, 1,67 (uzorci S1.67 i W1.67) i 1,50 (uzorci S1.50 i W1.50), uočava se da Ca/P odnos u polaznom rastvoru ima direktan uticaj na fazni sastav. Fazna transformacija iz HA u α -TCP može se videti na difraktogramu uzoraka S1.50 i S1.67. Analizom rendgenograma uzoraka W1.50 i W1.67, vidi se da su uzorci apatita koji kristališu u formi traka mnogo stabilniji tokom zagrevanja do temperature od 1200 °C u odnosu na uzorke S1.50 i S1.67. Na difraktogramu uzorka W1.67 primećuje se prisustvo CaO faze u maloj količini (PDF kartica br. 82-1690). Analizom difraktograma uzorka S1.50SiH, sintetisanog pri deset puta većoj koncentraciji silicijuma u polaznom rastvoru, kao dominantna faza javlja se α -TCP faza, dok je HA faza prisutna u vrlo maloj količini. Na difraktogramu uzorka W1.50SiH uočava se prisustvo u približno istoj količini i α -TCP i HA faze. Značajno je da na difraktogramima uzoraka nisu uočeni pikovi koji odgovaraju kalcijum-silikatnoj fazi, ukazujući na to da silicijum supstituiše ili formira dispergovanu fazu unutar HA faze.

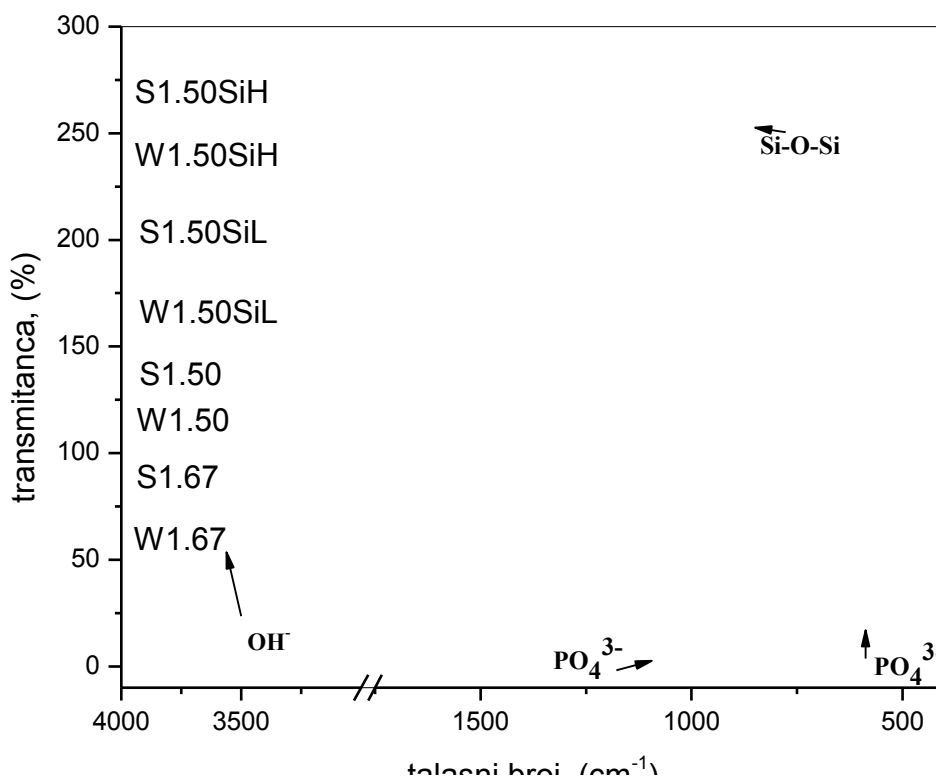
Na osnovu prikazanih rezultata, formiranje Si- α -TCP faze može biti objašnjeno kristalografijom fosfatnih sistema i nepravilnostima unutar kristalne rešetke koje je povezano sa supstitucijom silicijumom unutar kristalne rešetke kalcijum-fosfata. Promene u načinu sinteze mogu dovesti do supstitucije silicijumom na različitim mestima i različitog kompenzacionog mehanizmima za otklanjanje promene naelektrisanja izazvanog pomenutom supstitucijom.



Sl. 8.3. Difraktogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka nakon termičkog tretiranja na 1200 °C tokom 2 h

FTIR spektri termički tretiranih na 1200 °C tokom 2h uzoraka S1.67, S1.50, S1.50SiL, S1.50SiH, W1.67, W1.50, W1.50SiL i W1.50SiH prikazani su na slici 8.4. Na FTIR spektrima se uočava skoro potpuni nestanak širokih traka koje potiče od prisutne vlage u uzorcima dok se OH traka javlja kao veoma oštar pik, osim kod uzoraka S1.50SiH i W1.50SiH kod kojih su trake, koje odgovarajuju istežućim OH vibracijama na 3575 cm^{-1} potpuno nestale. Nestanak OH pikova ukazuje na to da su se najverovatnije OH šupljine formirale unutar rešetke HA kako bi kompenzovale efekat promene naelektrisanja uzrokovan supstitucijom Si^{4+} na mestu P^{5+} .

Uočeno je da jasni pikovi koji odgovaraju karbonatnim jonima na 1635, 1460, 1416 i 875 cm^{-1} na FTIR spektru osušenih uzoraka (Sl. 8.2) potpuno nestaju žarenjem na 1200 °C, osim na FTIR spektrima uzoraka W1.67 i W1.50, na kojim se još uvek primećuju pikovi slabog intenziteta na 1635 cm^{-1} . Mnogo značajniji efekat supstitucije silicijumom primećen je poređenjem FTIR spektara osušenih i termički tretiranih uzoraka u područjima između 800 i 1000 cm^{-1} i 450 i 700 cm^{-1} koji potiču od PO_4 veza. Spektri termički tretiranih uzoraka imaju karakteristične ν_3 i ν_1 trake na 1088, 1030 i 962 cm^{-1} i ν_4 trake na 631, 604 560 cm^{-1} .²²⁷ Takođe, primećeno je malo pomeranje pika na 630 cm^{-1} na spektru uzoraka S1.67, S1.50 i S1.50SiL, kao i pika na 633 cm^{-1} na spektru uzoraka W1.67, W1.50 i W1.50SiL. Navedeni pikovi nisu vidljivi na spektru uzoraka S1.50SiL i W1.50SiL. Može se uočiti da ν_4 trake termički tretiranih uzoraka W1.67, W1.50 i W1.50SiL pokazuju razdvojene pikove na 563 i 573 cm^{-1} . Razdvajanje pikova na 565 cm^{-1} nije primećeno na spektru uzorka W1.50SiH. Značajno je primetiti prisustvo novih pikova na 945 cm^{-1} koji se javljaju kod termički tretiranih uzoraka, pikova na 890 cm^{-1} kod uzoraka S1.67, S1.50 i S1.50SiL, i pikova na 860, 800, 730 i 493 cm^{-1} na spektru uzoraka S1.50SiH i W1.50SiH. Trake koje se javljaju na 730 cm^{-1} su karakteristične za TCP fazu, dok trake na 800 cm^{-1} ukazuju na postojanje O–Si–O veza.²²⁸



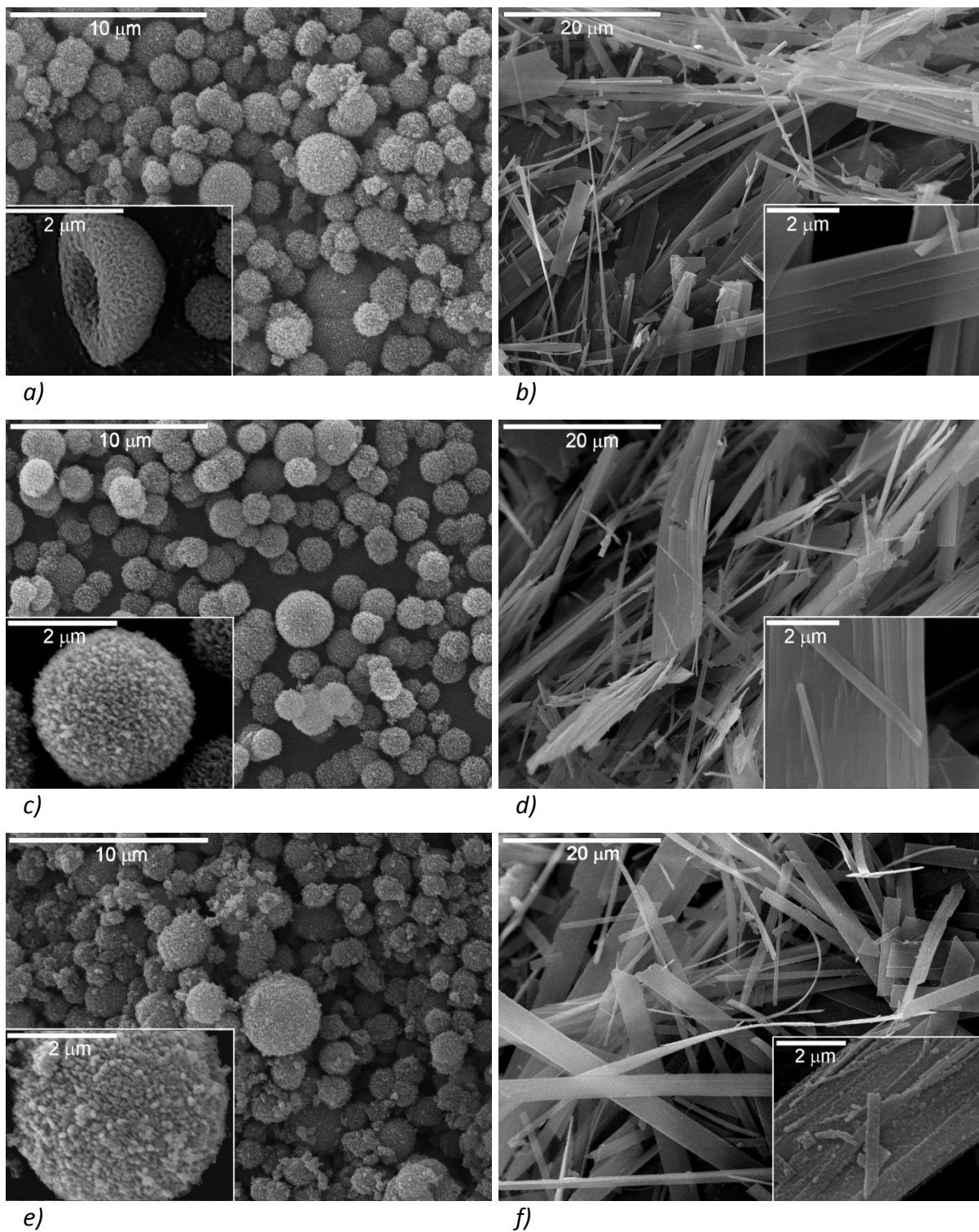
Sl. 8.4. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka HA nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2 h

Mikrografije neaglomerisanih sfernih i vlaknastih čestica dobijenih hidrotermalnom metodom (Tabela 8.1) prikazane su na slici 8.5. Na slici se uočava da se veličina sfernih čestica kreće od 1 do 3 μm , dok trakaste čestice nemaju usku raspodelu veličine što je posledica preferentnog kristalnog rasta duž jednog pravca. Sferne čestice, prikazane na slici 8.5a, c i e, izgrađene su od velikog broja agregisanih primarnih igličastih nanočestica veličine

od 200 do 500 nm (umetnuta slika na sl. 8.5a) u zavisnosti od prečnika sferne čestice. Primićuje se da površina čestica postaje manje neravna sa povećanjem količine silicijuma (dodatog u formi TEOS-a) u polaznom rastvoru (umetnute slike na slici 8.5c i 8.5e), što je uzrokovano nanočesticama SiO₂ koje se formiraju na vrhovima primarnih igličastih kristalita (umetnuta slika 8.5e) koji izgrađuju sferne čestice. Formiranje nanočestica SiO₂ na površini je uočljivije posmatranjem vlaknastih čestica apatita sintetisanih pri istim hidrotermalnim uslovima, ali bez prisustva Na₂EDTA u polaznom rastvoru (Sl. 8.5f). Na mikrografu trakastih čestica sintetisanih pri manjim koncentracijama silicijuma, ne primećuje se formiranje nanočestica SiO₂ na ravnoj površini vlakana (slika 8.5b).

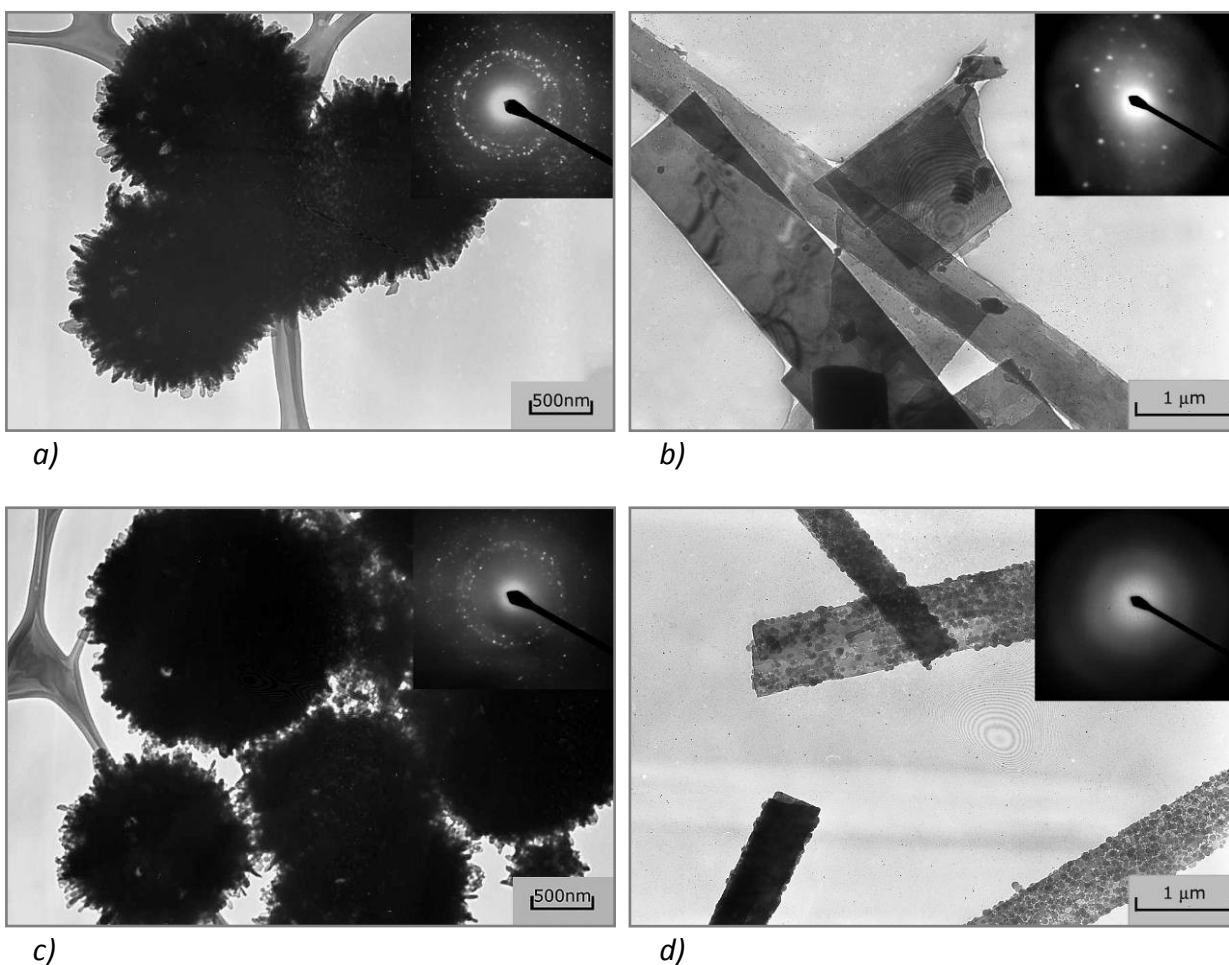
Nanometarske čestice SiO₂ se formiraju hidrolizom monomera TEOS-a, kao prekursora, u prisustvu baze (NH₃) kao katalizatora, čija koncentracija se povećava sa razgradnjom uree. Pošto su TEOS i voda nemešljivi, kao sredstvo za homogenizaciju u polaznom rastvoru korišćen je etanol. Prema Ileru, kondenzacija monomera se dešava na taj način što se povećava broj Si-O-Si veza i smanjuje broj terminalnih hidroksilnih grupa unutrašnjom kondenzacijom, što vodi stvaranju trodimenzionalne mreže. Ove čestice dalje kondenzuju u mnogo kompaktnije strukture sa OH grupama koje su zaostale sa spoljne strane i koje služe kao nukleusi.²²⁹ Pri pH ≥ 7, povećava se brzina rastvaranja koloidnog SiO₂, a zbog znatne jonizacije čestica SiO₂ iznad ove pH vrednosti, dalji rast čestica se odvija agregacijom ili geliranjem.²²⁹ Formiranje nanočestica SiO₂ na površini hidroksiapatitnih čestica može biti objašnjeno napred pomenutim mehanizmom, zbog skoro istih uslova prisutnih tokom hidrotermalnog postupka sinteze. Dalji rast se odvija kroz proces starenja (Ostwald-ov mehanizam), gde veće čestice rastu na račun rastvorljivijih manjih čestica, što je dodatno pospešeno na povišenim temperaturama koje vladaju u hidrotermalnim uslovima. Na slikama 8.5e i f se primećuje da je veličina sfernih nanočestica SiO₂, formiranih na površini sfernih i trakastih čestica HA, oko 50 nm.

Postoje dva mehanizma formiranja slojeva koja se mogu javiti tokom sinteze a koji se zasnivaju na fenomenu heterogene nukleacije (površinska nukleacija) i procesu heterogene koagulacije. Površinska nukleacija se odvija kroz proces parcijalne adsorpcije hidrolizovanih molekula TEOS-a na površini hidroksiapatita, gde u baznim uslovima, silanolne grupe u međusobnoj reakciji obrazuju siloksanske veze. Proces koji se odvija mehanizmom heterokoagulacije zasniva se na adsorpciji SiO₂ čestica, prethodno nukleisanih u rastvoru. Može se pretpostaviti da je površinski mehanizam dominantni mehanizam koji se javlja tokom sinteze uzoraka S1.50SiH i W1.50SiH, zbog baznih uslova nastalih razgradnjom uree i niske koncentracije TEOS-a.



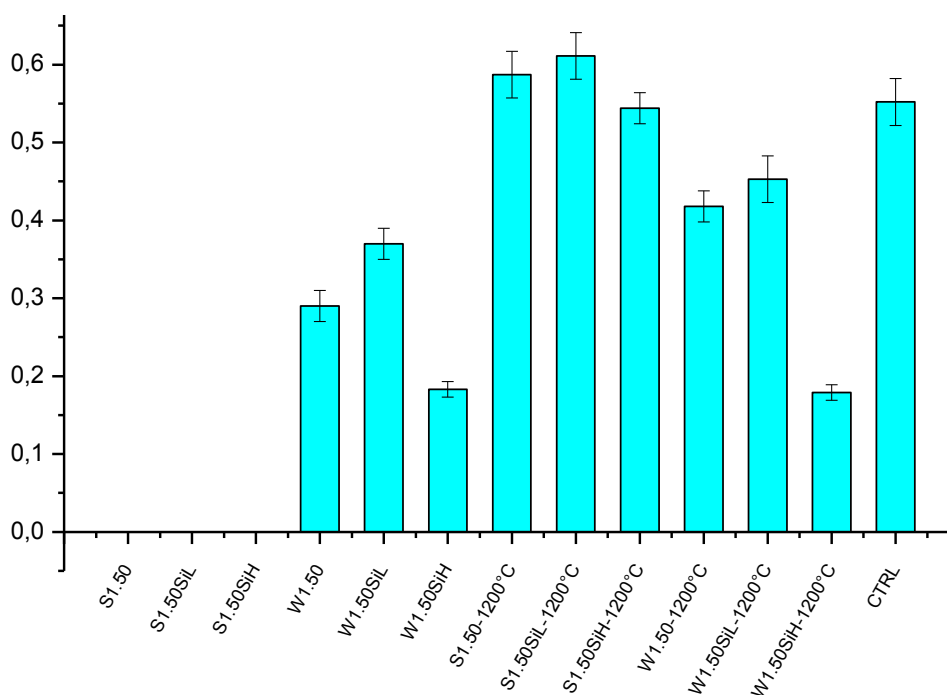
SI. 8.5. SEM mikrofografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka: (a) S1.50, (b) W1.50, (c) S1.50SiL, (d) W1.50SiL, (e) S1.50SiH, (f) W1.50SiH

Transmisiona elektronska mikroskopska analiza je primenjena kako bi se ispitala mikrostruktura sfernih i trakastih čestica HA (Sl. 8.6). TEM mikrografija uzorka S1.50SiL snimljena pri malom uvećanju (Sl. 8.6a) pokazuje da su sferne čestice formirane iz primarnih igličastih kristalita HA. Polikristalna struktura sfernih čestica dopiranih malom količinom silicijuma potvrđena je elektronskom difrakcionom analizom prikazanom na umetnutoj slici 8.6a. Na slici 8.6c (uzorak S1.50SiH), uočava se prisustvo sfernih nanočestica silicijuma koje se formiraju na površini osnovnih čestica. Elektronska difrakcija (Sl. 8.6c) pokazuje veoma slabu kristaliničnost, uslovljenu najverovatnije prisustvom nanočestica silicijuma. Na mikrografu uzorka W1.50SiL (Sl. 8.6b) nije uočljivo prisustvo čestica silicijuma na površini vlakana a mikrodifrakciona slika (umetnuta slika 8.6b) ukazuje na jasno izraženu kristalnu strukturu uzorka. Kod uzorka W1.50SiH, dopiranog deset puta većom koncentracijom silicijuma (Sl. 8.6d), se jasno vide formirane nanočestice silicijuma koje ravnomerno prekrivaju površinu vlakana. Difuziona difrakciona slika koja odgovara centralnom delu vlakna (prikazana na slici 8.6d) ukazuje na amorfnu strukturu uslovljenu prisustvom nanočestica silicijuma.

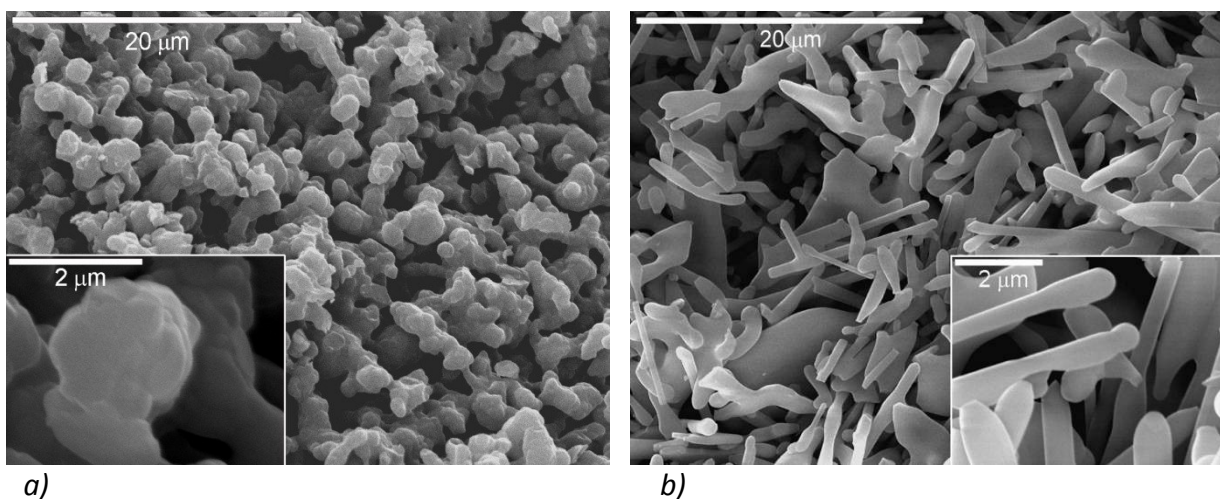


Sl. 8.6. TEM mikrografije hidrottermalno sintetisanih uzoraka sa elektronskom difrakcijom:
 (a) S1.50SiL, (b) W1.50SiL, (c) S1.50SiH i (d) W1.50SiH

U cilju ispitivanja potencijalne citotoksičnosti sintetisanih sfernih i vlaknastih čestica hidroksiapatita, urađen je test proliferacije SaOs2 ćelija na ekstraktu praha. MTS analiza (Sl. 8.7) prikazuje broj ćelija uzgajanih 3 dana u ekstraktima praškastih uzoraka dopiranih i nedopiranih sfernih i trakastih čestica hidroksiapatita. Dobijeni rezultati pokazuju da su ekstrakti osušenih sfernih čestica, dopiranih ili nedopiranih silicijumom, toksični za ćelije, dok ekstrakti silicijumom dopiranih i nedopiranih vlaknastih čestica hidroksiapatita nisu pokazali takav efekat pri istim uslovima. Termičkim tretiranjem prahova hidroksiapatita na 1200 °C tokom 2h (Sl. 8.8a i b) dobijeni su prahovi koji su pokazali manju citotoksičnost (Sl. 8.7). Pored toga, ekstrakti svih termički tretiranih uzoraka hidroksiapatita na 1200 °C su pokazali povećanu biokompatibilnost, osim na uzorku W1.50SiH, što je najverovatnije uzrokovano prisustvom Si u medijumu u koncentraciji većoj od fiziološke i optimalne, koja je neophodna da bi se izazvao bolji biološki odgovor materijala za supstituciju koštanog tkiva na bazi kalcijum-fosfata.²³⁰⁻²³¹ Uočava se da sferne i vlaknaste čestice dopirane manjom količinom silicijuma pokazuju najmanju toksičnost u poređenju sa nedopiranim česticama HA i česticama HA dopiranim deset puta većom količinom silicijuma.



Sl. 8.7. MTS analiza na ekstraktima praha sfernih i trakastih uzoraka na SaOs2 ćelijama osteosarkoma nakon 72 h



Sl. 8.8. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka: (a) S1.50SiH i (b) W1.50SiH termički tretiranih na 1200 °C

Iako nema značajnije fazne razlike između čestica nedopiranih i dopiranih u manjoj koncentraciji silicijumom koje su termički tretirane na 1200 °C, bolja proliferacija SaOs2 ćelija dobijena na ekstraktu praha S1.50SiL i W1.50SiL je evidentna. EDS analiza nije potvrdila prisustvo Si u osušenim uzorcima S1.50SiL i W1.50SiL zbog malog procenta silicijuma unutar kristalne strukture HA. Hemijska analiza dobijena EDXRF spektroskopijom je pokazala prisustvo silicijuma u maloj koncentraciji kod uzoraka S1.50SiL i W1.50SiL (Tabela 8.3). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prahovi dopirani silicijumom u manjem procentu pokazuju bolju bioaktivnost u *in vitro* uslovima u poređenju sa nedopiranim prahovima apatita (uzorci S1.50 i W1.50). Pomenuti rezultati ukazuju na to da supstitucija silicijuma u maloj količini u kristalnoj rešetki HA nema značajan uticaj na faznu transformaciju HA u α -TCP, ali ima značajan uticaj na proliferaciju ćelija. Znatno veća koncentracija Si, izmerena u uzorcima S1.50SiH i W1.50SiH (Tabela 8.3), pokazala je negativan uticaj na proliferaciju ćelija, u poređenju sa uzorcima S1.50SiL i W1.50SiL.

Tabela 8.3. Sadržaj Si u uzorcima HA određen EDXRF spektroskopijom

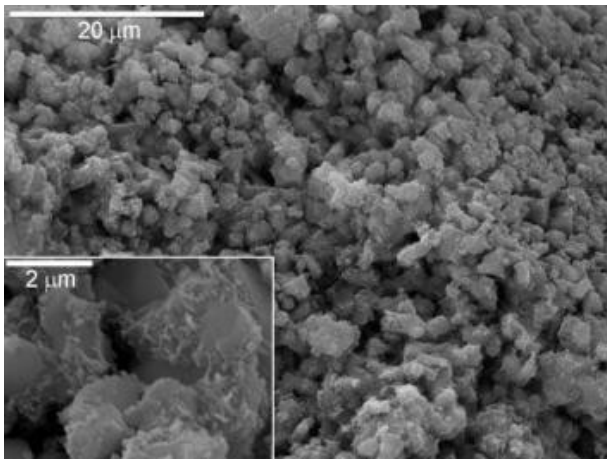
Uzorak	S1.50SiL	S1.50SiH	W1.50SiL	W1.50SiH
Si, mas.%	0.55(3)	2.10(3)	0.58(3)	2.73(3)

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima u kojima se koncentracija Si od 0,8 mas.% navodi kao optimalna koncentracija za adheziju ćelija.²³² Poređenjem rezultata dobijenih MTS analizom (Sl. 8.7), silicijumom dopirane čestice S1.50SiL, termički tretirane na 1200 °C su se pokazale optimalnim za ćelijsku proliferaciju. Različita bioaktivnost, ispitivanih uzoraka je najverovatnije posledica razlike u faznom sastavu

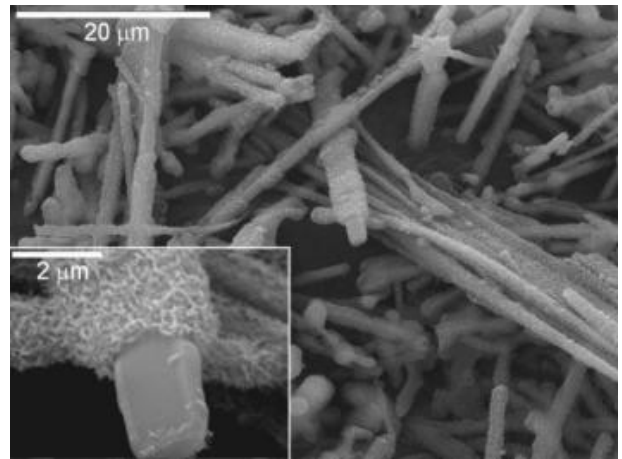
nakon termičkog tretmana na 1200 °C, kao i veće rastvorljivosti α -TCP faze koja u većoj meri inicira ćelijsku aktivnost.²³³

Različita bioaktivnost koja je uočena na ekstraktima prahova sferne i vlaknaste morfologije leži i u činjenici da se substitucija silicijumom ne dešava u istom stepenu unutar strukture sfernih i vlaknastih čestica. Utvrđeno je da ekstrakt praha osušenih sfernih čestica pokazuje efekat povećane citotoksičnosti na proliferaciju SaOs2 ćelija. Nakon hemijske analize ekstrakta prahova izvršene na tečnom hromatografskom-višestepenom masenom spektrometrijom utvrđeno je prisustvo EDTA samo u osušenim uzorcima sfernih čestica u koncentraciji od 65, 68 i 72 ppm za uzorake S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH, redom. U skladu sa prethodnim istraživanjima koja je sproveo Ballal i saradnici, u kojima je utvrđeno da soli EDTA deluju toksično u *in vitro* uslovima, detektovano prisustvo zaostalog EDTA u ekstraktu osušenih sfernih čestica je najverovatnije uzrok povećane citotoksičnosti uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH.²³⁴

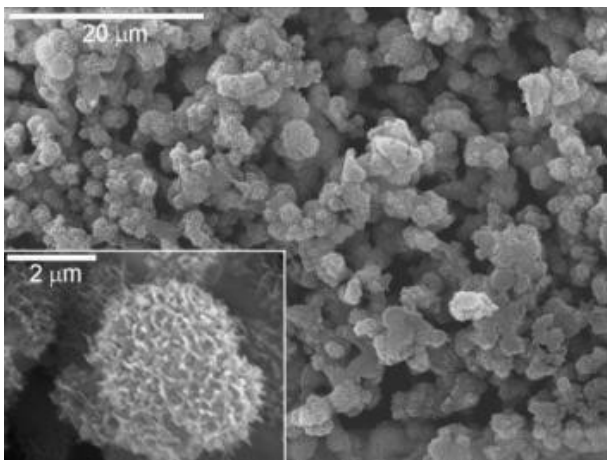
SEM mikrografije neaglomerisanih sfernih i vlaknastih čestica, termički tretiranih na 1200 °C tokom 2h, nakon trodnevnog držanja u SBF prikazane su na slici 8.9. Formiranje nove hidroksiapatitne faze nastale precipitacijom tokom držanja u SBF vidljivo je na površini svih uzorka. Uočava se da postoje razlike u stepenu pokrivenosti hidroksiapatitnom fazom koja se formira na silicijumom-dopiranoj i nedopiranoj površini sfernih i trakastih čestica HA. Naime, na mikrografijama nedopiranih sfernih i vlaknastih čestica (Sl. 8.9a i b) primećuje se delimična pokrivenost površine istaloženim igličastim kristalima HA. Bolja prekrivenost površine i formiranje gušće mreže nanometarskih čestica HA može se uočiti na mikrografijama uzorka S1.50SiL i W1.50SiL (Sl. 8.9c i d) dopiranih manjom količinom silicijuma. Gušća i uniformnija struktura istaloženih čestica HA uočljiva je na površini sfernih čestica (uzorak S1.50SiH) sintetisanih pri većoj koncentraciji silicijuma (Sl. 8.9e). Mikrograf vlaknastih čestica dopiranih većom količinom silicijuma (Sl. 8.9f) pokazuje nešto drugačiju strukturu hidroksiapatitne prevlake formirane na površini vlakana u poređenju sa hidroksiapatitnom fazom koja je formirana na površini sfernih čestica, sintetisanih pri istoj koncentraciji silicijuma u polaznom rastvoru. Razlika u morfologiji HA čestica koje se formiraju na površini čestica uzorka W1.50SiH je izraženija u poređenju na razliku koja se uočava poređenjem uzorka W1.50 i W1.50SiL. Igličasti kristaliti hidroksiapatita, formirani na površini uzorka W1.50SiH su manji i nepovezani, a uočljivi su i delovi površine koja nije prekrivena HA (Sl. 8.9f).



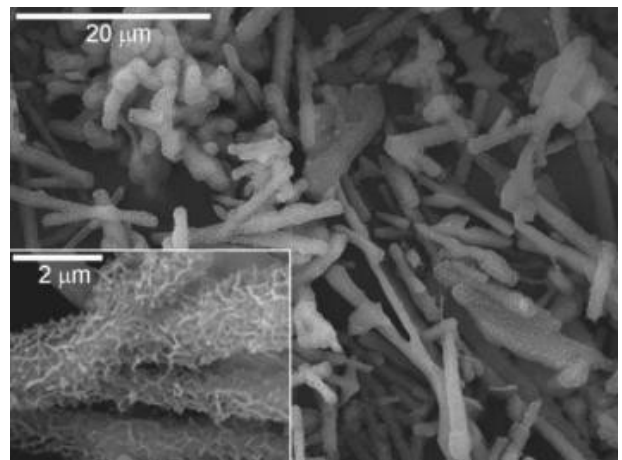
a)



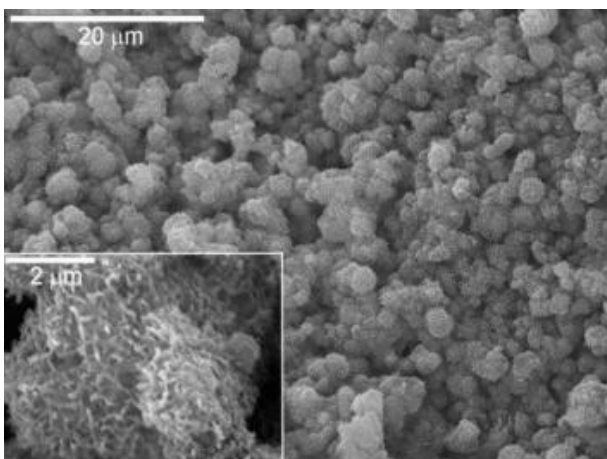
b)



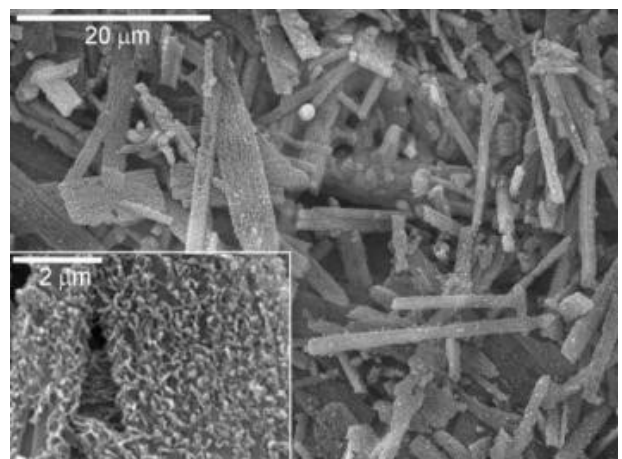
c)



d)



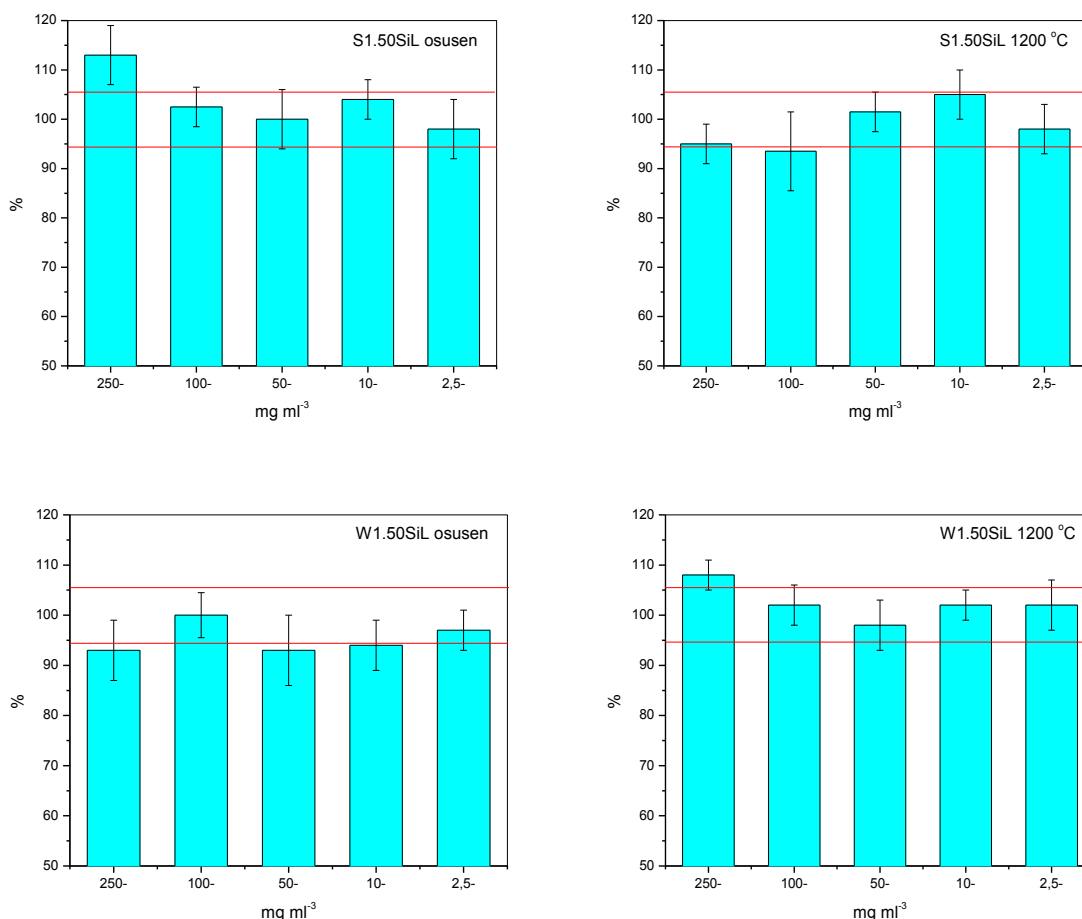
e)



f)

Sl. 8.9. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih uzoraka nakon držanja u SBF tokom 72 h
(a) S1.50, (b) W1.50, (c) S1.50SiL, (d) W1.50SiL, (e) S1.50SiH i (f) W1.50SiH

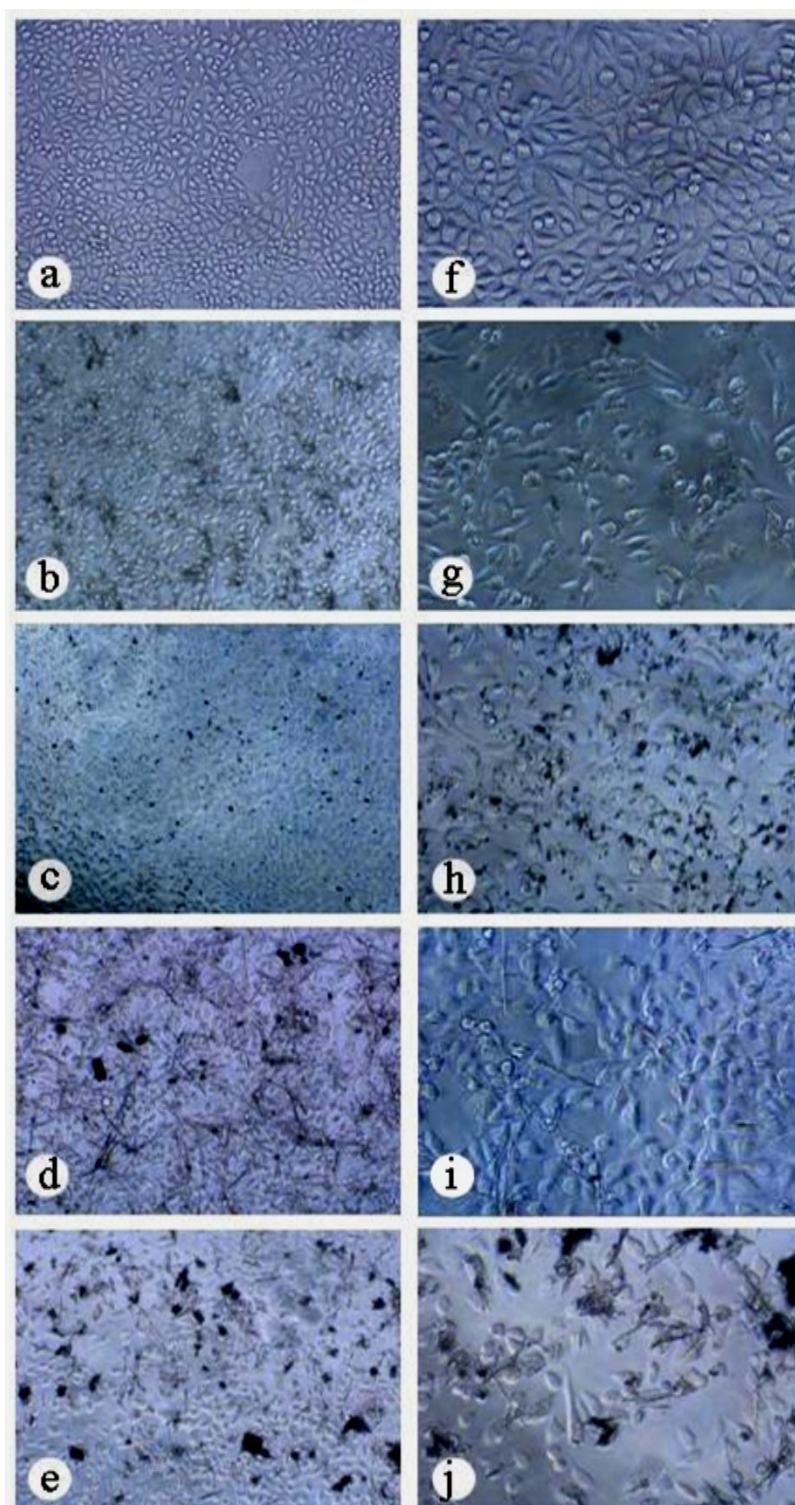
U cilju detaljnijeg ispitivanja citotoksičnosti sintetisanih prahova HA izvršeno je dodatno testiranje u kulturi L929 ćelija. L929 ćelije su inkubirane u rastvore sa različitim koncentracijama uzoraka S1.50SiL i W1.50SiL od 2,5 µg/ml do 250 µg/ml. Rezultati predstavljeni na slikama 8.10 i 8.11 pokazuju da ni jedna od pomenutih koncentracija ispitivanih uzoraka nije delovala citotoksično na L929 ćelije na osnovu morfološke analize ćelija u kulturi i metaboličke aktivnosti. Naime, pokazalo se da medijum sa najvećom koncentracijom sfernih, termički netretiranih čestica stimuliše metaboličku aktivnost L929 ćelija, što se ogleda pre svega u stimulaciji rasta ćelija (Sl. 8.11).



Sl. 8.10. Uticaj termičkog tretmana i morfologije čestica hidroksiapatita na metaboličku aktivnost L929 ćelija

* = $p < 0,05$ upoređen sa kontrolnim uzorkom ($100,0 \pm 5,6$ %); oščenjena oblast

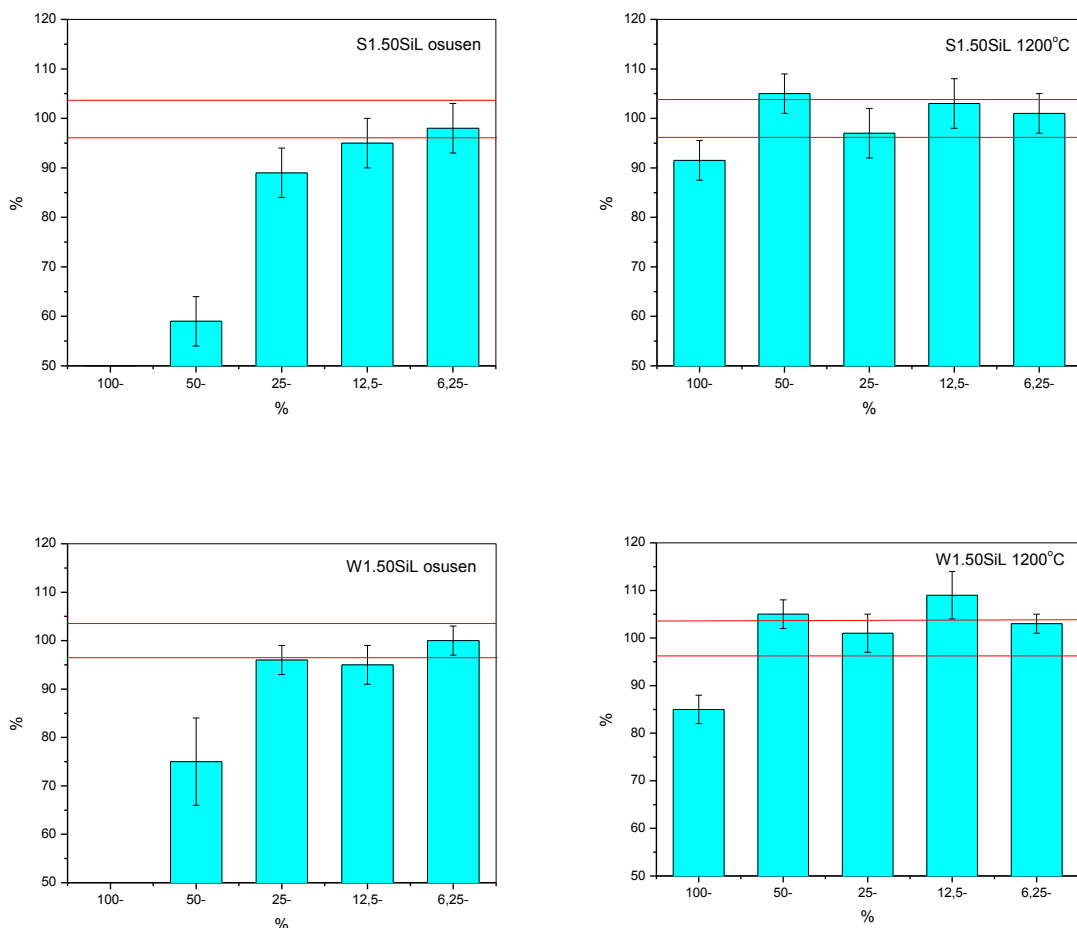
U slučaju kada je ispitivan uticaj kondicionirajućeg medijuma, pripremljenog sa česticama hidroksiapatita, na ćelijsku kulturu, dobijeni su drugačiji rezultati. Kondicionirajući medijum, pripremljen od termički netretiranih S1.50SiL i W1.50SiL čestica, se pokazao toksičan u većim koncentracijama, što se manifestuje u značajnom, od koncentracije zavisnom, smanjenju metaboličke aktivnosti L929 ćelija (Sl. 8.12), kao i promenom morfologije samih ćelija koja se ogleda u smanjenju ćelijskog rasta, odvajanju ćelija od površine plastičnog suda, smanjenju zapremine ćelija, kao i degradaciji samih ćelija (Sl. 8.13).



Sl. 8.11. Morfološka analiza L929 ćelija kultivisanih na česticama hidroksiapatita: a i f) kontrolne kulture, b i g) S1.50SiL osušen, c i h) S1.50SiL termički tretiran na 1200 °C, d i i) W1.50SiL osušen, e i j) W1.50SiL termički tretiran na 1200 °C (uvećanje a-e 100x, f-j 200x).

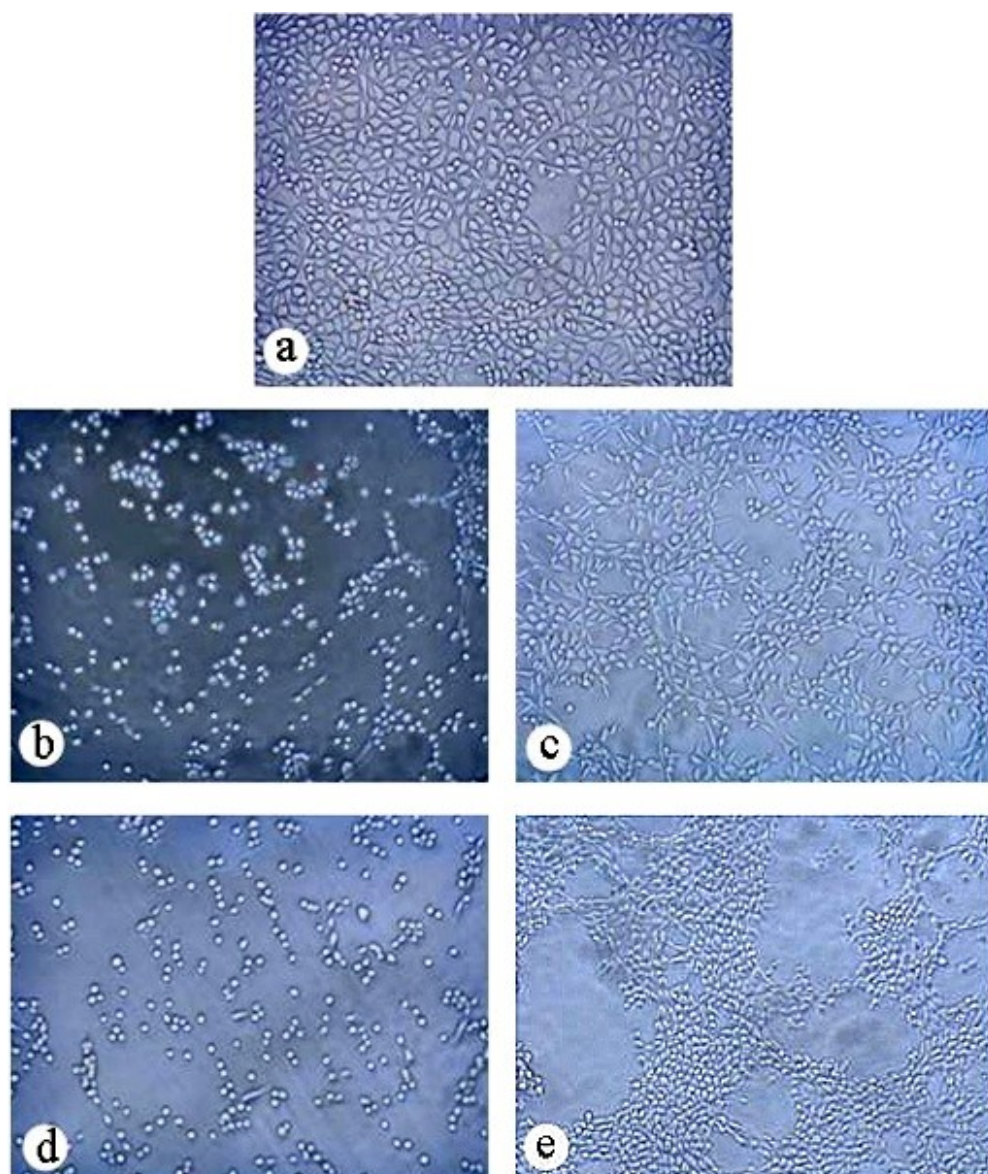
Uticaj kondicirajućeg medijuma se pokazao veći u slučaju kada je medijum pripremljen korišćenjem sfernih čestica u odnosu na medijum sa vlaknastim česticama.

Citoksični efekat kondicionirajućeg medijuma pripremljenog od termički tretiranih na 1200 °C tokom 2h čestica S1.50SiL i W1.50SiL se pokazao znatno manji u poređenju sa efektom koji su dale termički netretirane čestice (Sl. 8.12 i 8.13). Takav efekat je primećen samo u slučaju kada je primenjen ekstrakt u koncentraciji 100%.



Sl. 8.12. Uticaj medijuma za kondicioniranje pripremljenog sa osušenim ili termički tretiranim na 1200 °C česticama hidroksiapatita na metaboličku aktivnost L929 ćelija.

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$ upoređen sa kontrolnim uzorkom ($100,0 \pm 3,4$ %); ošena oblast.



Sl. 8.13. Morfološka analiza L929 ćelija kultivisanih na ekstraktima čestica hidroksiapatita: a) kontrolne kulture, b) S1.50SiL osušen, c) S1.50SiL termički tretiran na 1200 °C, d) W1.50SiL osušen, e) W1.50SiL termički tretiran na 1200 °C (uvećanje a-e 100x)

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sferne i vlaknaste čestice S1.50SiL i W1.50SiL nisu pokazale citotoksičan efekat na L929 ćelijama u koncentracijama između 2,5 i 250 µg/ml tokom 48 h. Međutim, ekstrakt pripremljen kondicioniranjem čestica u kulturi medijuma se pokazao citotoksičan na L929 ćelijama. Termičko tretiranje čestica na povišenim temperaturama u značajnoj meri je dovelo do smanjenja citotoksičnosti ekstrakta.

9. Sinteza skafolda na bazi α -TCP cementa i PMMA vlakana

Na osnovu rezultata karakterizacije sintetisanih nedopiranih i silicijumom dopiranih prahova hidroksiapatita prikazanih u eksperimentalnom delu izvršen je izbor prahova odgovarajuće morfologije, faznog sastava i biološke aktivnosti za sintezu skafolda. U ovom poglavlju prikazano je dobijanje skafolda korišćenjem cementnog praha na bazi silicijumom dopiranog α -TCP dobijenog mlevenjem termički tretiranih na 1200 °C sfernih (S1.50SiH) i vlaknastih čestica (W1.50SiH) HA, polimetil-metakrilatnih vlakana (PMMA) i rastvora vodonik-peroksida. Silicijumom dopirani termički tretirani prahovi S1.50SiH i W1.50SiH su izabrani zbog niže temperature transformacije HA u α -TCP fazu i boljih bioaktivnih svojstava. PMMA vlakna su korišćena u cilju stvaranja kontrolisane makroporoznosti dok je mikroporoznost skafolda kontrolisana količinom koncentrovanog rastvora H₂O₂. Prednosti ovako dobijenih skafolda se zasnivaju na lakoj pripremi skafolda željenog oblika koji ima zadovoljavajuće mehaničke karakteristike i odgovarajuću poroznost nakon vezivanja cementne paste. Takođe, dodavanjem vlakana PMMA moguće je dobiti skafolde znatno veće i povezane poroznosti, ali pomenuti postupak zahteva naknadni termički tretman na temperaturama višim od 800 °C kako bi se uklonila PMMA vlakna.

9.1. Eksperimentalna procedura

Skafoldi su dobijeni umešavanjem praha S1.50SiH ili W1.50SiH (vidi tabelu 9.1) termički tretiranih na 1200 °C tokom 2h i rastvora vodonik-peroksida. Nakon termičkog tretmana na 1200 °C sintetisani prah S1.50SiH je mleven 30 min u planetarnom mlinu sa ahatnim posudama i cirkonijumskim kuglama pri brzini od 150 o min^{-1} . Od praha W1.50SiH i samlevenog praha S1.50SiH napravljene su dve vrste skafolda, sa i bez PMMA vlakana. Pripremljeni prah S1.50SiH ili W1.50SiH je u prvom slučaju na suvo mešan sa polimetil-metakrilatnim vlaknima dužine 3 mm i debljine 0,3 mm, nakon čega je dodat 30 % rastvor vodonik-peroksida, dok u drugom slučaju za pripremu skafolda nisu korišćena polimetil-metakrilatna vlakna. U tabeli 9.1 prikazane su količine jedinjenja korišćene za pripremu skafolda na bazi α -TCP i PMMA.

Tabela 9.1. Količine jedinjenja korišćenih za pripremu skafolda na bazi α -TCP i PMMA.

Uzorak	S1.50SiH (g)	PMMA vlakna (g)	30 % H ₂ O ₂ (ml)
S1.50SiH-H ₂ O ₂	0,40	-	0,5
S1.50SiH-H ₂ O ₂ -PMMA	0,40	0,10	0,5
W1.50SiH-H ₂ O ₂	0,40	-	0,5
W1.50SiH-H ₂ O ₂ -PMMA	0,40	0,10	0,5

Tako pripremljenom cementnom pastom, sa i bez PMMA vlakana, napunjeni su kalupi od pleksiglasa. Nakon 24 h i vezivanja cementne paste dobijeni skafoldi su sinterovani na 1200 °C tokom 2h.

9.2. Metode karakterizacije

Morfologija dobijenih skafolda na bazi α -TCP praha i H_2O_2 , sa i bez PMMA vlakana je analizirana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju JEOL JSM-5800. Pre SEM analize uzorci su napareni legurom Au-Pd.

Aktivnost alkalne fosfataze

Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) određena je kolorimetriškom metodom korišćenjem p-nitro fenol fosfatnog (pNPP) supstrata.²³⁵ Aktivnost je određena na ćelijama SaOs2 nakon perioda kultivacije od 72h. Triton X-100 permeabilizovane ćelije su inkubirane sa supstratom (20mM p-NPP u 100 mM puferu dietanolaminda koji sadrži 10 mM $MgCl_2$, pH = 9.5) na 37 °C tokom 30min. Reakcija je zaustavljena dodatkom 0.1 M EDTA u 1 M NaOH. Enzimska aktivnost je kvantifikovana merenjem absorbance na 405 nm (Mithras, Berthold). Vrednost alkalne fosfataze je normalizovana ćelijskom proliferacijom da bi se uzela u obzir razlika u rastu ćelija. Svi eksperimenti su ponovljeni dva puta. Dobijeni rezultati su normalizovani na vrednosti MTS analize da bi se u obzir uzela razlika u broju ćelija.

Aktivnost alkalne fosfataze je određena na osušanim i termički tretiranim na 1200 °C diskovima pripremljenim od prahova S1.50SiH i W1.50SiH, kao i na diskovima dobijenim mešanjem prahova S1.50SiH i W1.50SiH u odnosu 80-20 mas.% (Tabela 9.2). S1.50SiH i W1.50SiH prahovi su prethodno termički tretirani na 1200 °C tokom 2h nakon čega je prah S1.50SiH samleven u planetarnom mlinu sa ahatnim posudama tokom 30 min pri brzini od 150 o min^{-1} . Za pravljenje cementne paste korišćen je 30 % stabilisani vodonik-peroksid, kako

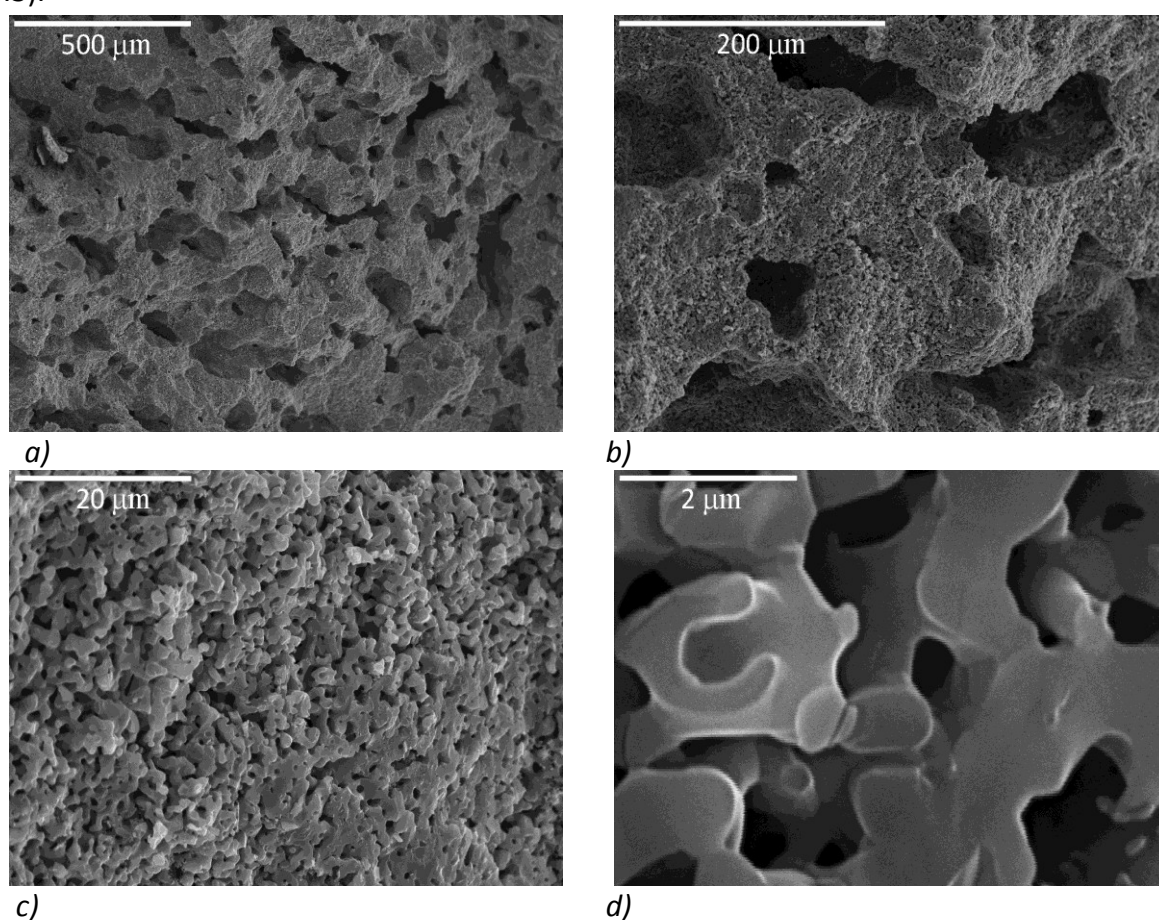
Tabela 9.2. Sastav diskova korišćenih u ALP testu

Uzorak	S1.50SiH 1200 °C (mas.%)	W1.50SiH 1200 °C (mas.%)	Termički tretman
S-osušen	100	0	-
SW-osušen	80	20	-
W-osušen	0	100	-
S-1200 °C	100	0	Termički tretirani nakon vezivanja na 1200 °C 2h
SW-1200 °C	80	20	
W-1200 °C	0	100	

bi se sprečilo naglo oslobađanje kiseonika i dobili uzorci male poroznosti u cilju boljeg praćenja proliferacije SaOs2 ćelija na površini diskova.

9.3. Rezultati i diskusija

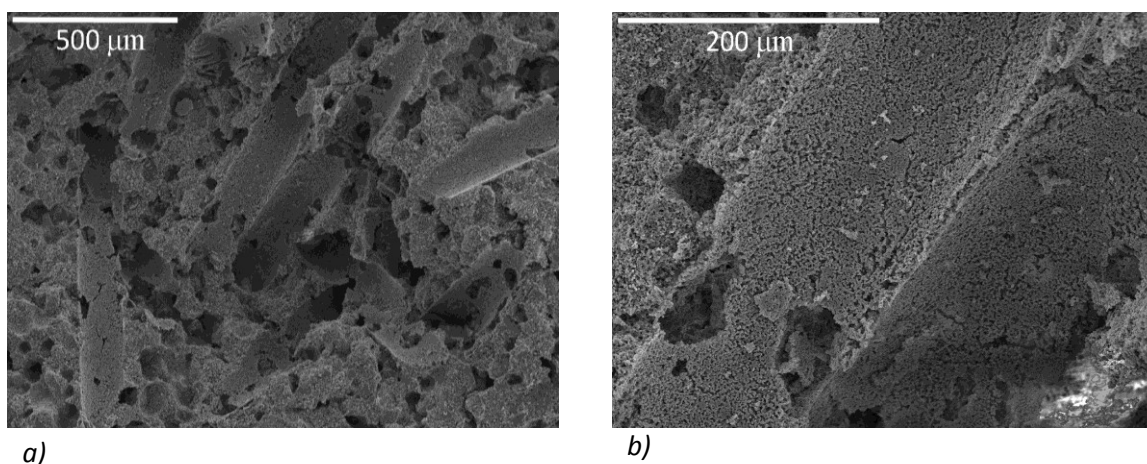
Na slici 9.1 prikazane su SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H₂O₂ pri različitim uvećanjima nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h. Na slici 9.1a se vidi uniformna makroporoznost sa veličinom pora od 50-200 μm (Sl. 9.1b). Formiranje makropora i mikropora veličine 1-2 μm (Sl. 9.1c i 9.1d) unutar skafolda se javlja kao posledica razlaganja vodonik-peroksida na vodu i kiseonik. Kiseonik koji nastaje razgradnjom vodonik-peroksida ostaje zarobljen u cementoj pasti tokom procesa vezivanja α-kalcijum-fosfata, koji predstavlja osnovnu fazu uzorka S1.50SiH nakon termičkog tretmana na 1200 °C (vidi sliku 8.3).



Sl. 9.1. SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H₂O₂ nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h

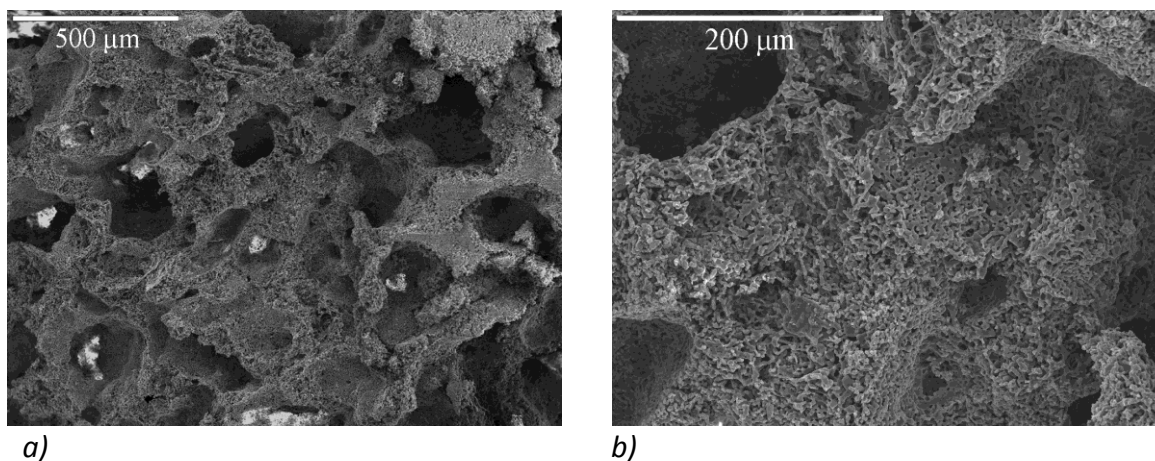
Na slici 9.2 prikazane su SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H₂O₂-PMMA nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h. Na prikazanim mikrografijama se uočava uniformna makroporoznost sa veličinom pora od 50-200 μm koje potiču od kiseonika koji se oslobađa razgradnjom vodonik-peroksida, kao i pore cilindričnog oblika, prečnika oko 200 μm, nastale sagorevanjem vlakana PMMA dodatih u cementnu pastu (Sl. 9.2a). Ovako nastale cilindrične pore u znatnoj meri dovode do stvaranja povezane poroznosti. Na zidovima cilindričnih pora se jasno uočavaju makropore, nastale izdvajanjem kiseonika u

cementnoj pasti, dok se na celoj površini zida (Sl. 9.2b) jasno vidi prisustvo mikropora zaostalih nakon procesa sinterovanja na 1200 °C.



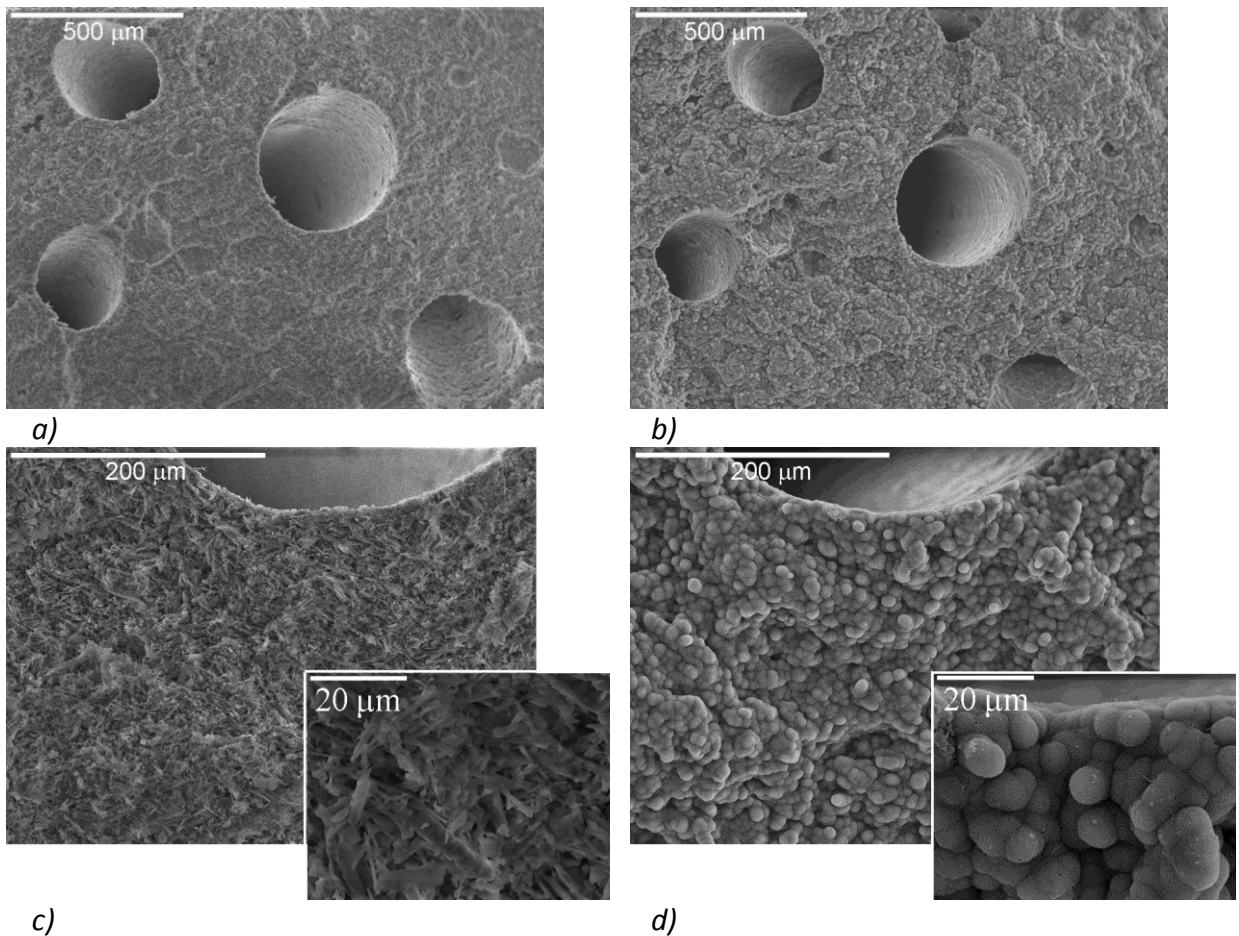
Sl. 9.2. SEM mikrografije skafolda S1.50SiH-H₂O₂-PMMA nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h

Na slici 9.3 prikazane su SEM mikrografije skafolda W1.50SiH-H₂O₂ na različitim uvećanjima nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h. Na slici 9.3a se vidi izrazito velika makroporoznost sa veličinom pora od 150-450 μm. Formiranjem znatno većih makropora unutar skafolda je rezultat vlaknaste morfologije koju imaju čestice W1.50SiH, sa velikim odnosom dužina-širina (vidi sliku 7.5).



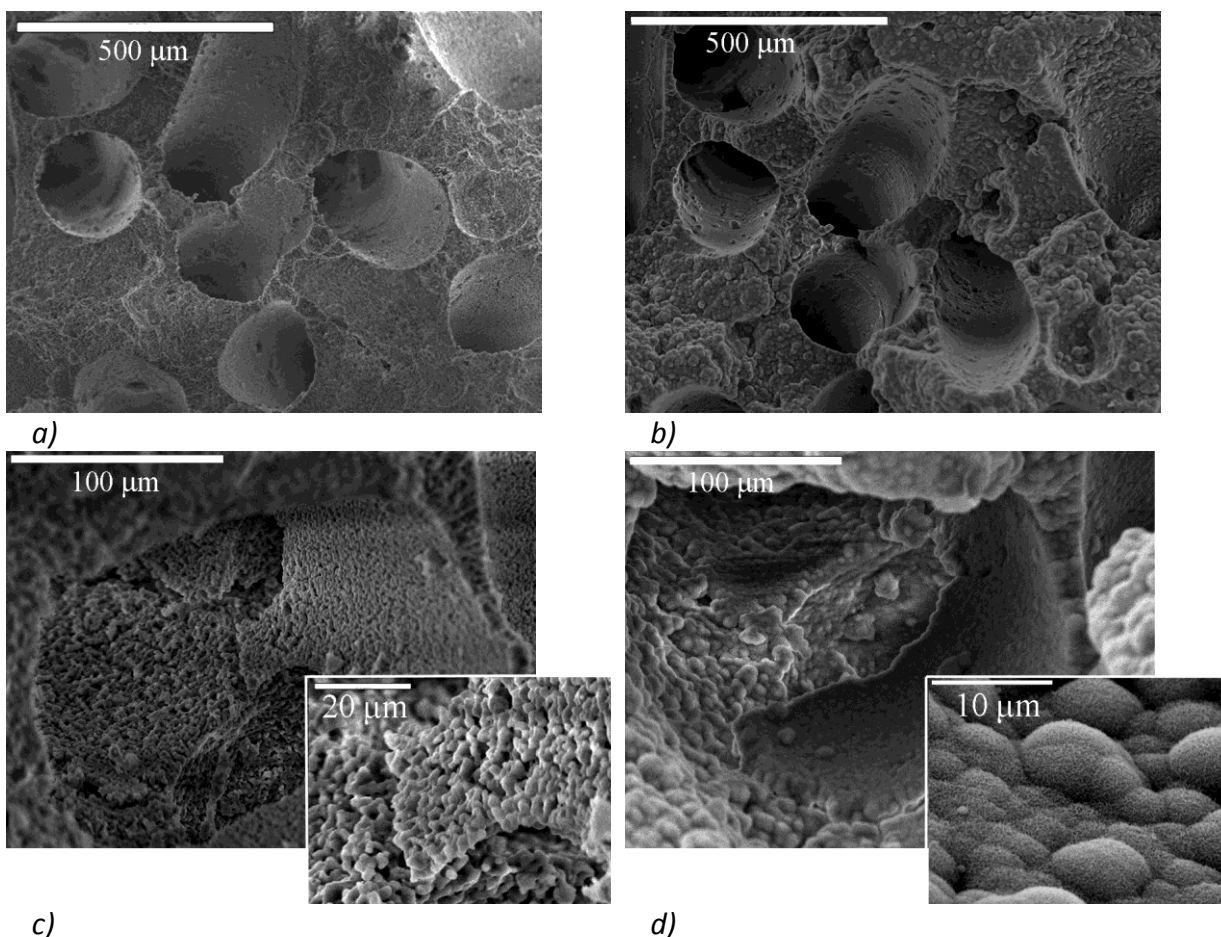
Sl. 9.3. SEM mikrografije skafolda W1.50SiH-H₂O₂ nakon termičkog tretmana na 1200 °C tokom 2h

Na slikama 9.4 i 9.5 prikazane su mikrografije skafolda W1.50SiH-H₂O₂-PMMA i S1.50SiH-H₂O₂-PMMA pre i nakon držanja u simuliranom telesnom fluidu tokom 7 dana. Uporednom analizom mikrografija skafolda W1.50SiH-H₂O₂-PMMA snimljenim na istom mestu pre i nakon 7 dana držanja u SBF-u (Sl. 9.4) jasno se vidi formiranje nanostrukturnih čestica hidroksiapatita na površini skafolda držanog u SBF-u (Sl. 9.4b i d). Na mikrografima uzorka držanog 7 dana u SBF se ne primećuje vlaknasta struktura (Sl. 9.4c i d) površine skafolda jer novoformirani sloj HA u potpunosti prekriva celu površinu skafolda W1.50SiH-H₂O₂-PMMA.



Sl. 9.4. Mikrografije skafolda W1.50SiH-H₂O₂-PMMA snimljene na istom mestu pre a i c) i posle b i d) držanja u simuliranom telesnom fluidu tokom 7 dana

In vitro ispitivanje skafolda u SBF-u je pokazalo da i skafold S1.50SiH-H₂O₂-PMMA pokazuje isto ponašanje kao i W1.50SiH-H₂O₂-PMMA. Na slici 9.5 se jasno vidi da fazni sastav i mikrostruktura skafolda S1.50SiH-H₂O₂-PMMA pogoduju formiranju nanostrukturnih čestica hidroksiapatita držanjem u SBF-u. Na mikrografima skafolda S1.50SiH-H₂O₂-PMMA (Sl. 9.5c i d) držanog 7 dana u SBF se vidi potpuno prekrivanje površine skafolda novoformiranim slojem HA.



Sl. 9.5 Mikrografije skafolda S1.50SiH-H₂O₂-PMMA snimljene na istom mestu pre a i c) i posle b i d) držanja u simuliranom telesnom fluidu tokom 7 dana

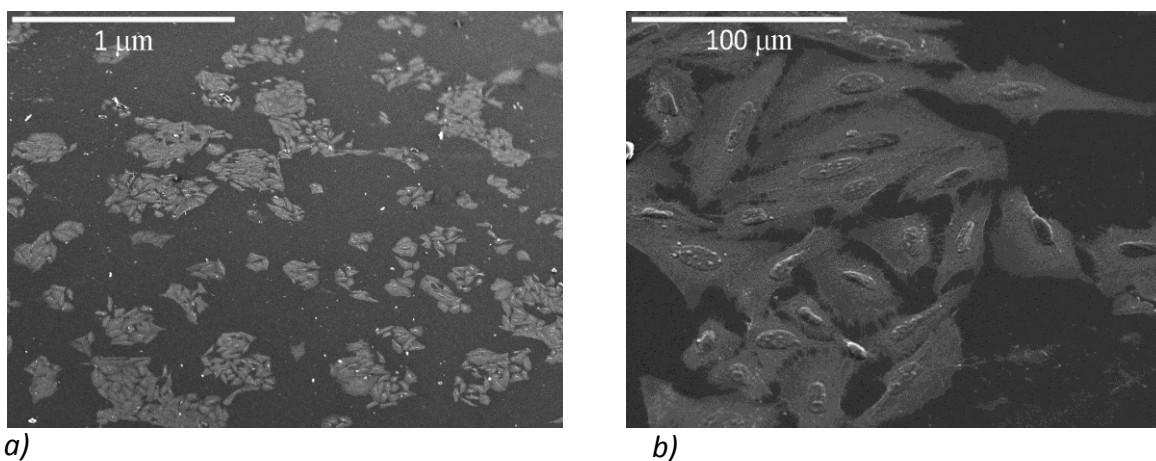
Vezivanje ćelija za površinu biomaterijala predstavlja prvi korak u procesu koji se odvija na granici između ćelija i površine materijala a koji uslovljava dalji odgovor tkiva i ćelija. Vezivanje ćelija za supstrat prati translacija i transkripcija ćelija. Proces vezivanja i adhezije ćelija se odvija brzo uz stvaranja fizikohemijskih veza između ćelija i materijala, uključujući jonske sile. Proces adhezije ćelija koji se dešava u dužem vremenskom intervalu uključuje različite biomolekule poput proteina ekstracelularne matrice, proteina ćelijskih membrana i citoskeleta koji međusobno reaguju indukujući signalnu transdukciju, pospešujući faktore transkripcije, regulišući gensku ekspresiju.²³⁶

Ćelije osteosarkoma SaOs2 zasejane na kontrolnom uzorku od stakla, pokazuju uobičajenu morfologiju nakon vezivanja za površinu supstrata (Sl. 9.6).

Na slici 9.7 prikazano je širenje ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda S-osušen, SW-osušen i W-osušen (vidi Tabelu 9.2).

Fluorescentna mikroskopska analiza pripremljenih uzoraka merenjem fokalnog kontakta uz bojenje vinkulinom nije mogla biti prikazana zbog velike pozadinske fluorescencije karakteristične za hidroksiapatit.

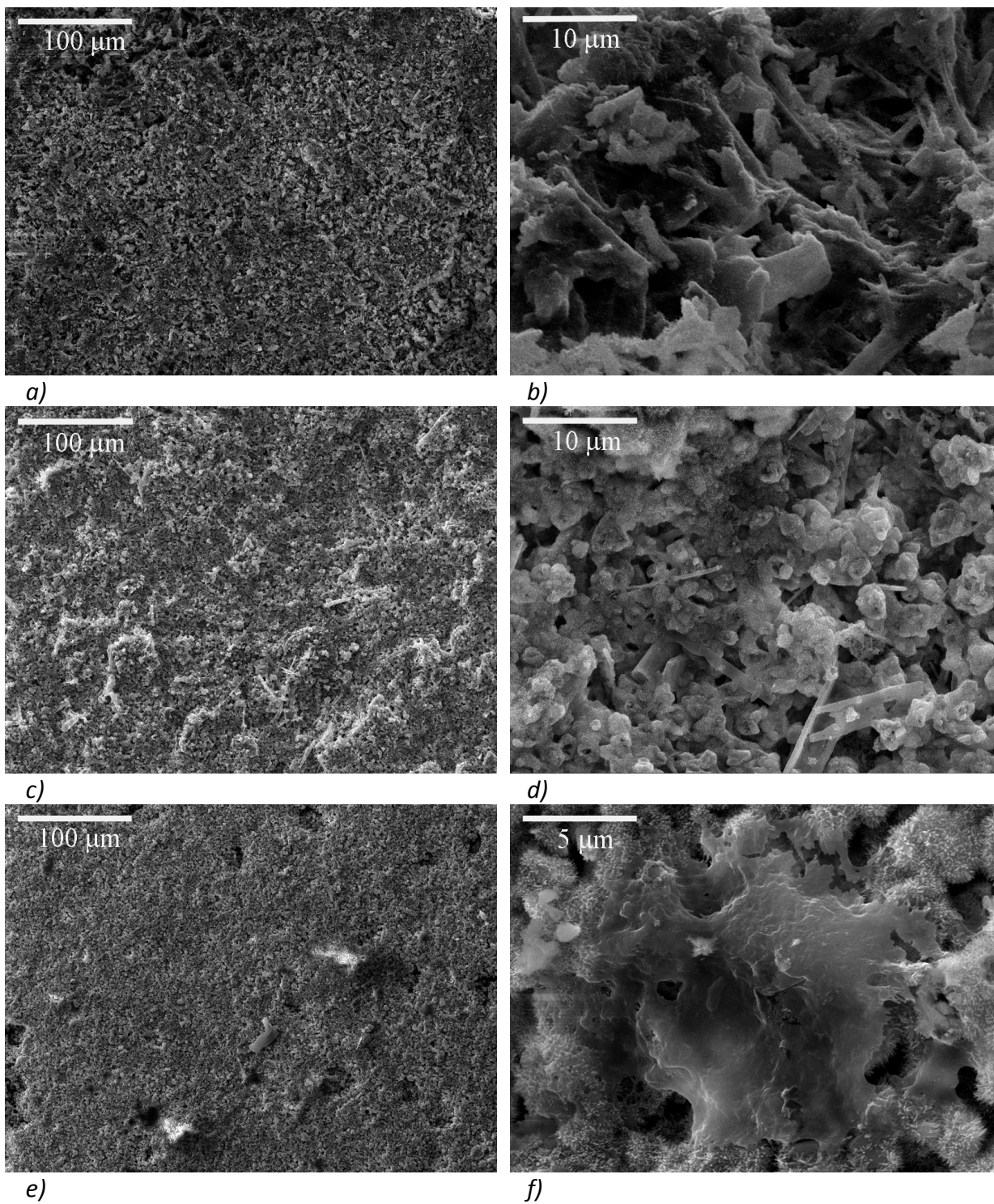
Na uzorcima SW-osušen i W-osušen (Sl. 9.7) se ne primećuje značajnije vezivanje ćelija na površini u poređenju sa uzorkom S-osušen. Na uzorku S-osušen (Sl. 9.7f) jasno se vidi radijalno širenje ćelija osteo sarkoma vezanih za površinu uzorka uz razvijanje filopoda. Rasprostranjene ćelije pokazuju ravnu površinu. Širenje ćelija koje se vezuju na površini ispitivanih uzoraka predstavlja bitan pokazatelj ćelijskog delovanja koji vodi ćelijskoj proliferaciji. Smanjena adhezija ćelija koja je primećena na uzorcima W-osušen i SW-osušen, a koja se može uzeti kao mera citotoksičnosti materijala, ukazuje na povećanu citotoksičnost ovih uzorka. Loša adhezija suspendovanih ćelija na različitim substratima zavisi pre svega od fiziko-hemijski svojstava i topografije uzorka.²³⁷



Sl. 9.6. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 zasejanih na kontrolnom staklu nakon perioda kultivacije od 72 h snimljene pri različitom uvećanju

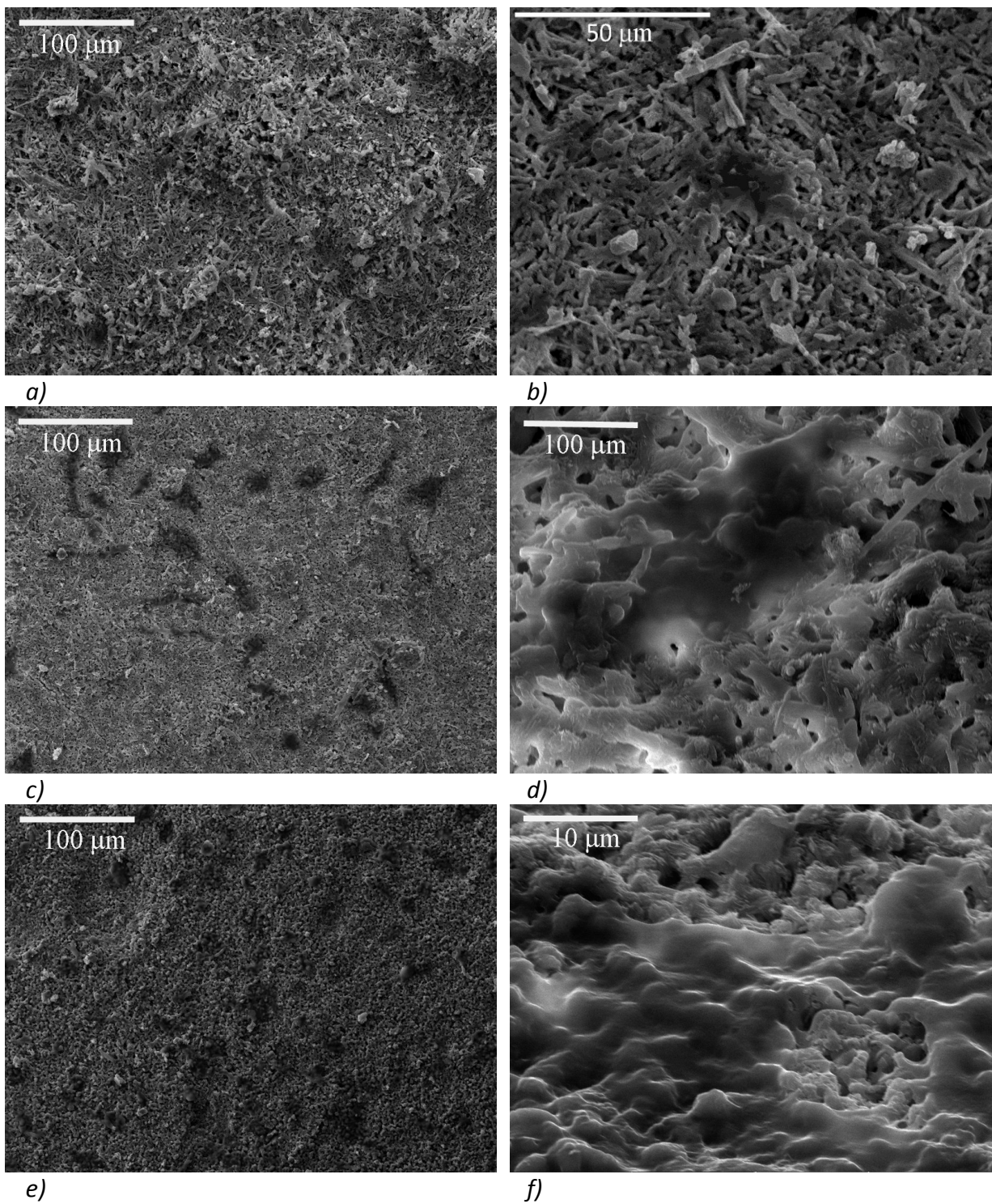
Na slici 9.8 prikazana je proliferacija ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda S-1200 °C, SW-1200 °C i W-1200 °C.

Na uzorcima S-1200 °C, SW-1200 °C i W-1200 °C (Sl. 9.8), termički tretiranim na 1200 °C tokom 2h primećuje se znatno bolji ćelijski odgovor u poređenju sa odgovarajućim osušanim skafoldima. Na uzorku S-1200 °C (Sl. 9.8f) uočava se veliki broj ćelija osteosarkoma čvrsto vezanih za površinu skafolda koje se radijalno šire uz razvijanje filopoda. Nešto manji broj ćelija osteosarkoma po jedinici površine vidi se na uzorku SW-1200 °C, dok se na površini uzorka W-1200 °C jedva uočava prisustvo ćelija. Rasprostranjene ćelije pokazuju ravnu površinu. Na osnovu mikrografija prikazanih na slici 9.8 i faznog sastava uzoraka nakon termičkog tretmana na 1200 °C (Sl. 9.3) može se zaključiti da pored velikog broja faktora koji utiču na ćelijsku proliferaciju, topografija uzoraka ima najveći uticaj. Ovakav zaključak se može izvesti poređenjem faznih sastava osušanih i termički tretiranih uzoraka, a onda i topografije istih uzoraka. Naime, uočava se da razlika u α -TCP/HA odnosu između sfernih i trakastih čestica korišćenih za pripremu uzoraka S-osušen, SW-osušen, W-osušen, S-1200 °C, SW-1200 °C i W-1200 °C nije toliko velika da bi imala tako značajan uticaj na ćelijsku proliferaciju, obzirom da su i α -TCP i HA bioaktivne faze. Ono što se primećuje na mikrografijama (9.7 i 9.8) je izrazito neravna površina W-osušen i W-1200 °C skafolda,



Sl. 9.7. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda: a, b) S-osušen, c, d) SW-osušen i e, f) W-osušen nakon perioda kultivacije od 72 h

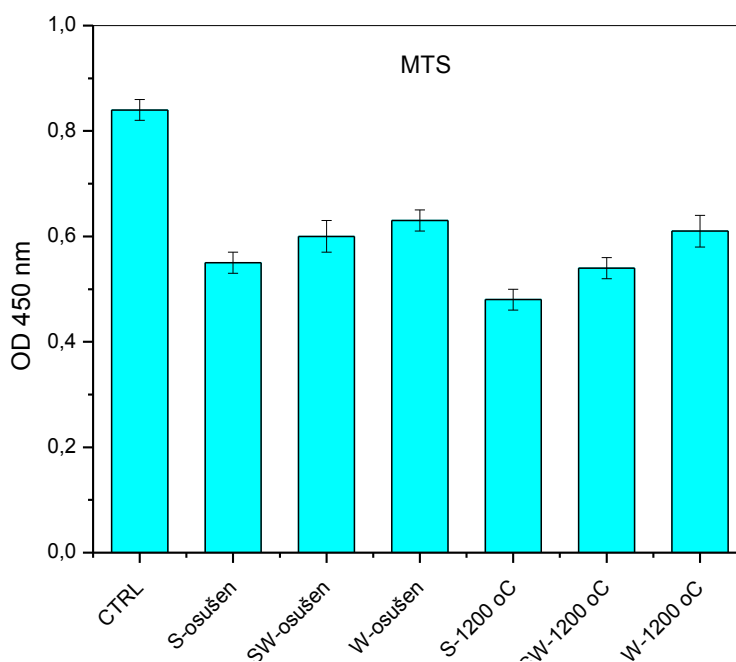
uslovljena morfologijom osnovnih trakastih čestica korišćenih za njihovo dobijanje. Ni na jednom od pomenutih uzoraka nije primećena značajnija ćelijska proliferacija u odnosu



Sl. 9.8. SEM mikrografije ćelija osteosarkom SaOs2 na površini skafolda: a, b) S-1200 °C, c, d) SW-1200 °C i e, f) W-1200 °C nakon perioda kultivacije od 72 h

na kontrolni uzorak i uzorke S-osušen i S-1200 °C. Takođe, uočava se da se proliferacija povećava sa povećanjem udela sfernih čestica. Ovo se može objasniti morfologijom i boljim pakovanjem sfernih čestica u uzorcima S-osušen i S-1200 °C, što za posledicu ima formiranje znatno ravnije površine i bolji ćelijski odgovor.

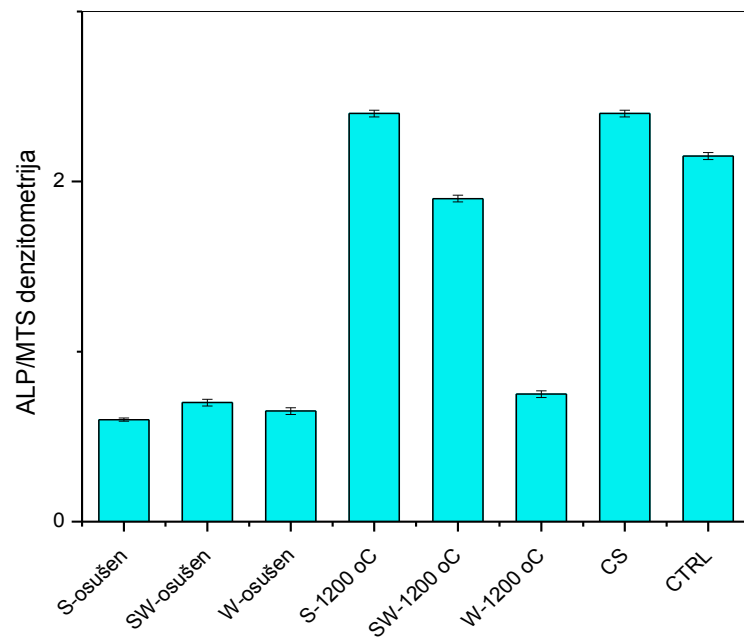
Rezultati MTS analize skafolda S-osušen, SW-osušen, W-osušen, S-1200 °C, SW-1200 °C i W-1200 °C na ćelijama osteosarkoma nakon 72 h inkubacije prikazani su na slici 9.9. Standardno mikroskopsko pokrovno staklo (CS) je uzeto za pozitivnu kontrolu. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti je proliferacija ćelija osteosarkoma povećana na uzorcima S-osušen i S-1200 °C, što potvrđuje prethodno prikazane rezultate dobijene mikroskopskom analizom.



Sl. 9.9. MTS analiza osušenih i termički tretiranih uzoraka na ćelijama osteosarkoma nakon 72 h inkubacije

Rezultati merenja aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) ćelija osteosarkoma SaOs2 na uzorcima S-osušen, SW-osušen, W-osušen, S-1200 °C, SW-1200 °C i W-1200 °C nakon 72h prikazani su na slici 9.10. Standardna plastika za uzgoj ćelijskih kultura (CTRL) i mikroskopsko pokrovno staklo (CS) su uzeti kao pozitivna kontrola.

Alkalna fosfataza predstavlja glavni pokazatelj diferencijacije osteoblasta, čija aktivnost je u korelaciji sa optimalnom funkcijom koštanih ćelija. Na osnovu dobijenih rezultata jedina dva uzorka koja podržavaju ćelisku funkciju su skafoldi S-1200 °C i SW-1200 °C, koji pokazuju aktivnost ALP sličnu onoj koju ima standardni materijal za uzgajanje ćelijske kulture (CTRL i CS) (Sl. 9.10).



SI. 9.10. Aktivnost alkalne fosfataze ćelija osteosarkoma SaOs2 na osušenim i termički tretiranim skafoldima nakon 72 h inkubacije

10. Silicijumom dopirani bifazni α -kalcijum-fosfat/hidroksiapatit skafoldi dobijeni tehnikom replike poliuretanskog suđera

U nastavku rada prikazano je dobijanje skafolda korišćenjem metode replike suđera. Za pripremu suspenzije za dobijanje skafolda korišćene su sferne čestice HA kontrolisane veličine, nedopirane i dopirane različitom količinom silicijuma s ciljem da se snizi temperatura fazne transformacije HA u α -TCP, uz očuvanje sferne morfologije čestica nakon termičkog tretmana. Pored toga, cilj dopiranja sfernih čestica HA silicijumom je da se poboljša bioaktivnost samih čestica a samim tim i skafolda koji se od njih dobijaju. Zahvaljujući opisanom hidrotermalnom postupku sinteze i odgovarajućem termičkom predtretmanu sfernih čestica moguće je dobiti mikronske sferne čestice α -TCP-a uniformne veličine čime se izbegava proces mlevenja koji je neizostavan u slučaju kada se α -TCP dobija reakcijama u čvrstoj fazi.

10.1. Eksperimentalna procedura

Skafoldi su dobijeni metodom potapanja poliuretanskog suđera u suspenziju praha α -TCP/HA. Suspenzija je dobijena dispergovanjem sintetisanih prahova S150, S1.50SiL i S1.50SiH (vidi tabelu 8.1), termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h, u destilovanoj vodi u kojoj je prethodno rastvoren polivinil alkohol (PVA). Suspenzija je homogenizovana u ultrazvučnoj kadi. Suspenzija željene viskoznosti, koja omogućava najbolje prevlačenje suđera prahom, izabrana je ispitivanjem više suspenzija različitog odnosa prah/voda/polivinil-alkohol. Maseni sastav suspenzije optimalne viskoznosti za prekrivanje poliuretenaskog suđera je: 65% vode, 32,5% praha, 2,5% PVA.

U tabeli 10.1 prikazani su sastavi suspenzija korišćenih za pripremu skafolda metodom replike suđera.

Poliuretanski suđeri, prethodno isečeni u cilindre, su potapani u suspenziju, nakon čega su valjani između dve staklene pločice kako bi se istisnuo višak suspenzije iz natopljenog suđera. Tako pripremljeni suđeri su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Nakon sušenja, uzorci su termički tretirani na 800 °C pri brzini zagrevanja od 2 ° min⁻¹ da bi

Tabela 10.1. Sastavi suspenzija korišćenih za pripremu skafolda metodom replike suđera

Skafold	Prah termički tretiran na 1150 °C 2h, (g)			H ₂ O (g)	PVA (g)
	S1.50	S1.50SiL	S1.50SiH		
SK-S1.50	10	-	-	20	0,80
SK-S1.50SiL	-	10	-	20	0,80
SK-S1.50SiH	-	-	10	20	0.80

sagoreo poliuretanski sunder, a onda sinterovani na temperaturama od 1200, 1300, 1400 i 1450 °C tokom 3h, pri brzini zagrevanja od 5 °min⁻¹.

10.2. Metode karakterizacije

Rendgenski difraktogrami polikristalnih uzoraka dobijeni su korišćenjem konvencionalnog difraktometra za prahove (Ital Structure APD 2000) sa Bragg-Brentano geometrijom i CuK_{α1,2} zračenjem. Difraktogrami su snimljeni na sobnoj temperaturi pri uglu 2θ između 5–70° i korakom 2θ od 0.02°, i vremenom snimanja od 2s po svakoj tački merenja. Korišćeni su 1/2° slit na izvoru i prijemni slit od 0.1 mm.

Morfologija sintetisanih prahova i skafolda je proučavana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju TESCAN Mira3 XMU na 20 kV. Pre SEM analize, praškasti uzorci su napareni legurom Au-Pd.

Linearno skupljanje do 1400 °C sintetisanih prahova HA određeno je na termičkom mikroskopu E. Leitz pri brzini od 10 °C min⁻¹.

Raspodela veličina čestica određena je na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK). Pre samog merenja prahovi su deaglomerisani 1 min u ultrazvučnoj kadi (frekvencija 40 kHz i snaga 50W).

Pritisna čvrstoća skafolda određena je na uređaju Instron 1332 sa kontrolnom elektronikom Fast Track 8800 i silomerom od 500 N, pri brzini od 0,5 mm/min.

In vitro ispitivanja su vršena na ćelijskoj liniji humanih fibroblasti pluća (MRC-5), koje rastu zalepljene za podlogu suda (Costar, 25 cm³) u medijumu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, UK) sa 4,5 g/l glukoze i 10 % FCS (fetal calf serum, Sigma) korišćenjem kolorimetrijskog testa sa tetrazolijum solima (MTT- test) i DET testa (Dye exclusion test). Korišćeni medijum sadrži antibiotike: penicilin 100 IU/ml i streptomycin 100 µg/ml. Ćelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5 % CO₂ (Heraeus). Presađivanje je vršeno dva puta nedeljno a u eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1 % tripan plavim⁽²³⁸⁻²³⁹⁾. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90 %.

MTT test

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije u koncentraciji 2·10⁵/ml su posejane u Petrijeve šolje (50mm, Center well, Falcon) u kojima su se nalazili ispitivani skafoldi. Kontrolni uzorci nisu sadržali ispitivane skafolde. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljane su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ naredna 48 časa. Po isteku inkubacije izvršeno je presejavanje ćelija sa ispitivanih supstanci u svež medijum. Vijabilne ćelije su posejane (5x10³/100µl) u kvadrilikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama

ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ naredna 48, 72, 96 časa. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µl /otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂). Po isteku inkubacije u svaki otvor je dodato po 100 µl 0,04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba.

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - A_s / A_k) \cdot 100 \quad (10.1)$$

gde je A_k apsorbancija kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbancija uzoraka sa ispitivanim skafoldima.

Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema formuli:

$$\% K = (N_s / N_k) \cdot 100 \quad (10.2)$$

gde je N_k broj ćelija kontrolnih uzoraka, a N_s broj ćelija uzoraka sa ispitivanim skafoldom.

DET analiza

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje (Center well, Falcon) na ispitivane skafolde u koncentraciji 2·10⁵/ml. U kontrolnim uzorcima nije bilo skafolda. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO₂ naredna 48 h. Po isteku inkubacije, nakon 48 h ćelije su izbrojane uz pomoć invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je Neubauer-ova komorica gde se ćelije broje u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata. Dalje se uzima 100 µl ćelija i tome doda 100 µl boje 0,1 % tripan-plavo. Intenzivno je promućkano i nanoseno nekoliko kapi na oba polja komorice za brojanje. Tripan-plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju neobojene. Broj ćelija u 1 ml suspenzije se izračunava iz formule:

$$X = x \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000 \quad (10.3)$$

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

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

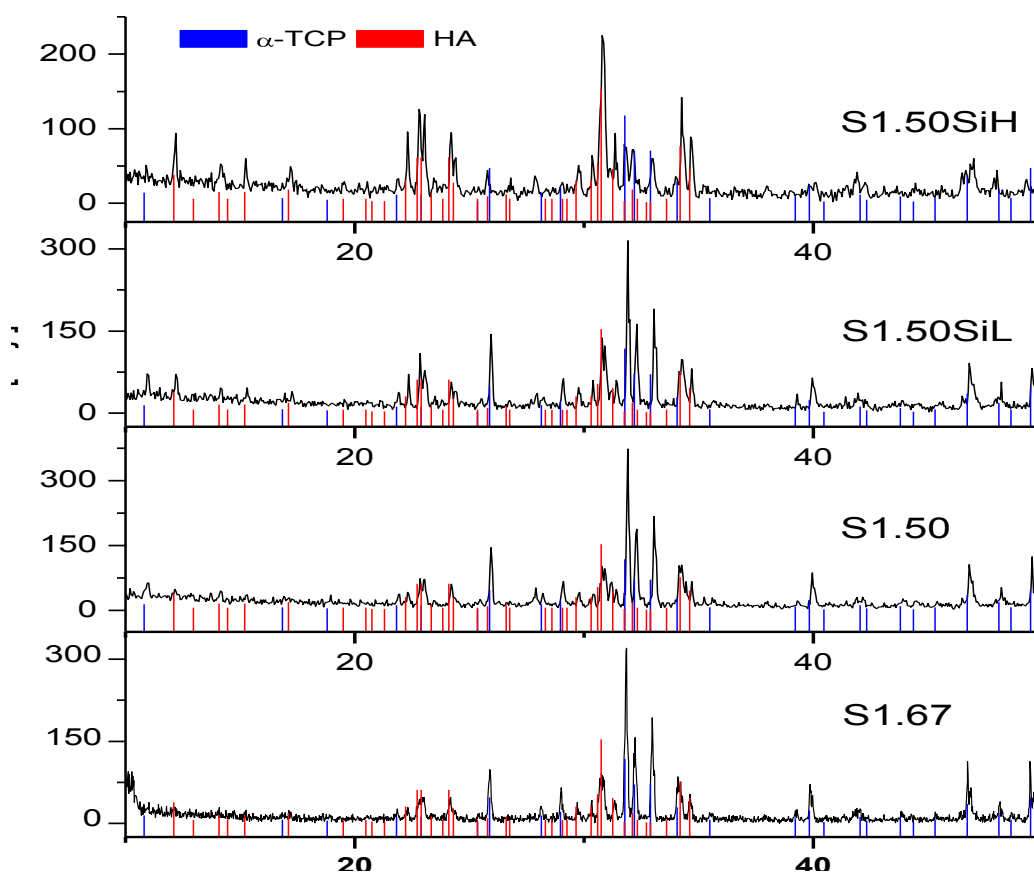
$$CI = (1 - N_s / N_k) \cdot 100 \quad (10.4)$$

gde je N_k broj ćelija kontrolnih uzoraka, a N_s broj ćelija uzoraka sa ispitivanim supstancom.

Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema jednačini 10.2.

10.3. Rezultati i diskusija

Rendgenski difraktogrami dobijenih dopiranih i nedopiranih prahova HA korišćenih za pripremu skafolda, termički tretiranih na 1150 °C prikazani su na slici 10.1. Analizom difraktograma uočava se različito ponašanje tokom zagrevanja između uzoraka S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH, koje se ogleda u različitoj količini prisutnih HA i α -TCP faza. Svi, na difraktogramima označeni pikovi odgovaraju JCPDS standardu za HA (PDF kartica br. 9-432), pri čemu Si- α -TCP faza kristalografski odgovara α -TCP fazi (PDF kartica br. 9-348). Poređenjem difraktograma uzoraka apatita sintetisanih pri različitom Ca/P odnosu u polaznom rastvoru; 1,67 (uzorak S1.67) i 1,50 (uzorak S1.50), uočava se da polazni Ca/P odnos ne utiče značajnije na fazni sastav na ovoj temperaturi. Fazna transformacija HA i α -TCP se primećuje na difraktogramima svih uzoraka. Povećanje količine silicijuma u polaznom

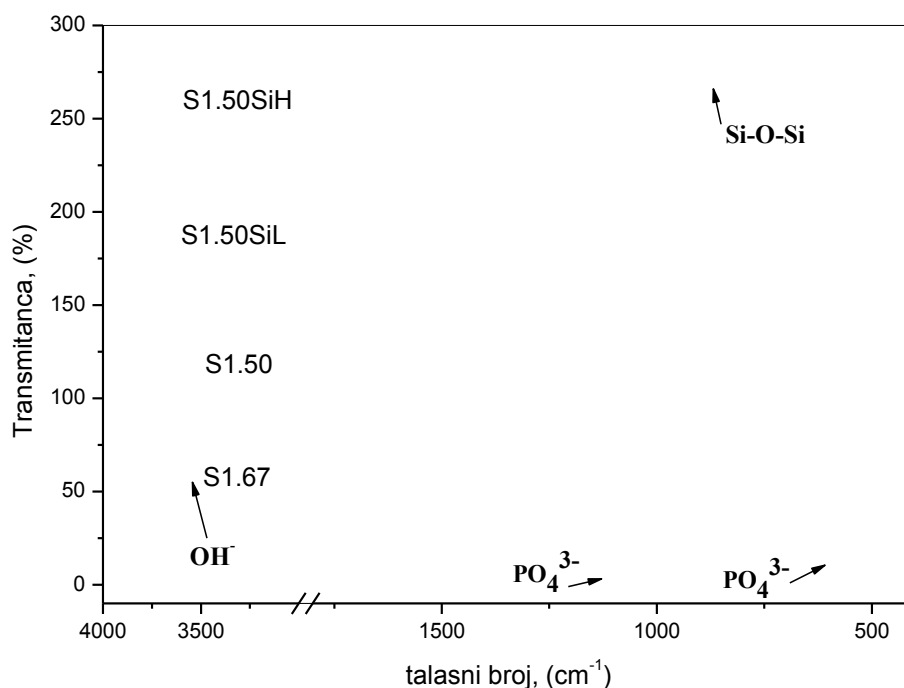


Sl. 10.1. Rendgenski difraktogrami hidrotermalno sintetisanih uzoraka S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h

rastvoru dovodi do znatnije transformacije HA u α -TCP. Uticaj dodatog silicijuma je najuočljiviji na uzorku S1.50SiH na čijem se difraktogramu vidi prisustvo HA faze u vrlo maloj količini. Značajno je da se na difraktogramima uzoraka ne primećuju pikovi koji odgovaraju nekom kalcijum-silikatnom jedinjenju, što ukazuje na to da se silicijum nalazi ili kao supstituent ili kao dispergovana faza unutar fosfatnih ravni u HA. Poznato je da dopiranje silicijumom favorizuje formiranje i stabilizaciju α -TCP faze na nižim temperaturama.⁴⁰ Prema ovim rezultatima, formiranje Si- α -TCP faze može biti objašnjeno kristalografijom kalcijum-fosfatnih sistema gde supstitucija silicijumom dovodi do defekata unutar kristalne strukture i narušavanja stehiometrije.

FTIR spektri sintetisanih prahova S1.67, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH, termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h uzoraka prikazani su na slici 9.2. Na FTIR spektrima prahova S1.67, S1.50, S1.50SiL se uočavaju trake koje odgovaraju istežućim OH vibracijam na 3575 cm^{-1} , koje nisu prisutne na FTIR spektru uzorka S1.50SiH. Nestanak pikova koji potiču od OH vibracija je najverovatnije posledica OH šupljina koje se formiraju unutar kristalne rešetke HA kako bi se kompenzovao efekat promene naelektrisanja uzrokovan supstitucijom Si^{4+} na mestu P^{5+} .

Značajniji uticaj supstitucije silicijumom uočava se poređenjem FTIR spektara osušenih (vidi sliku 8.2) i termički tretiranih na 1150 °C uzoraka u područjima između 800 i 1000 cm^{-1} i 450 i 700 cm^{-1} koji potiču od PO_4 veza. Na spektrima termički tretiranih uzoraka se uočavaju karakteristične ν_3 i ν_1 trake na 1088, 1030 i 962 cm^{-1} i ν_4 trake na 631, 604 i



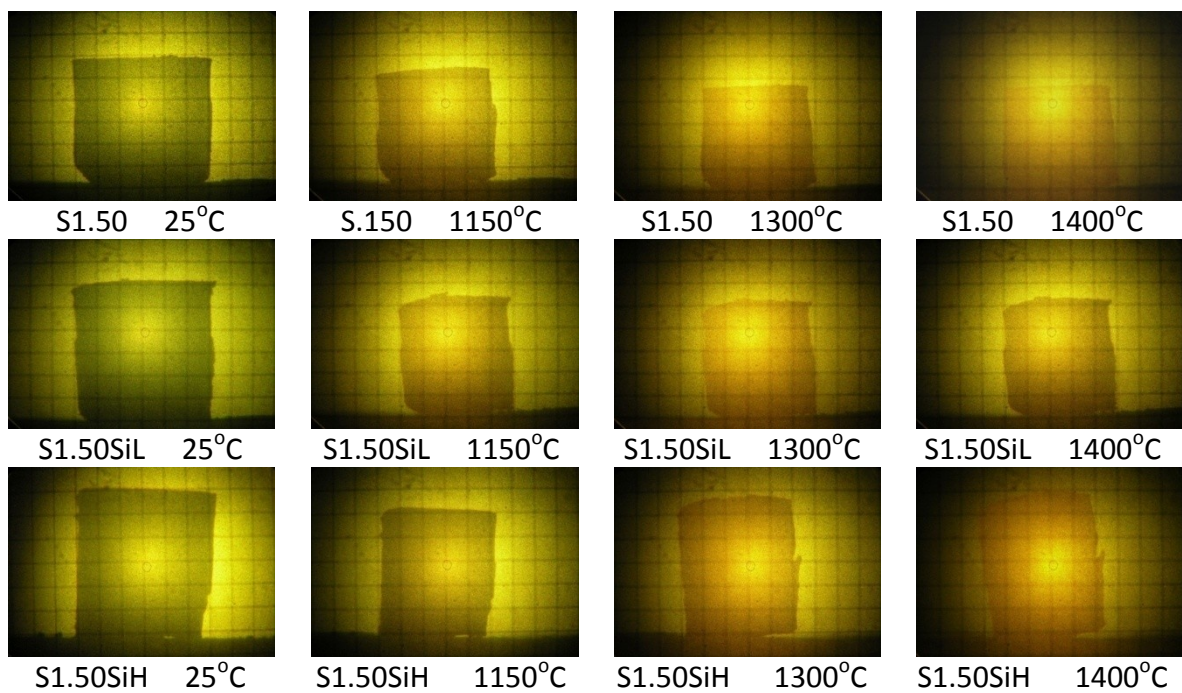
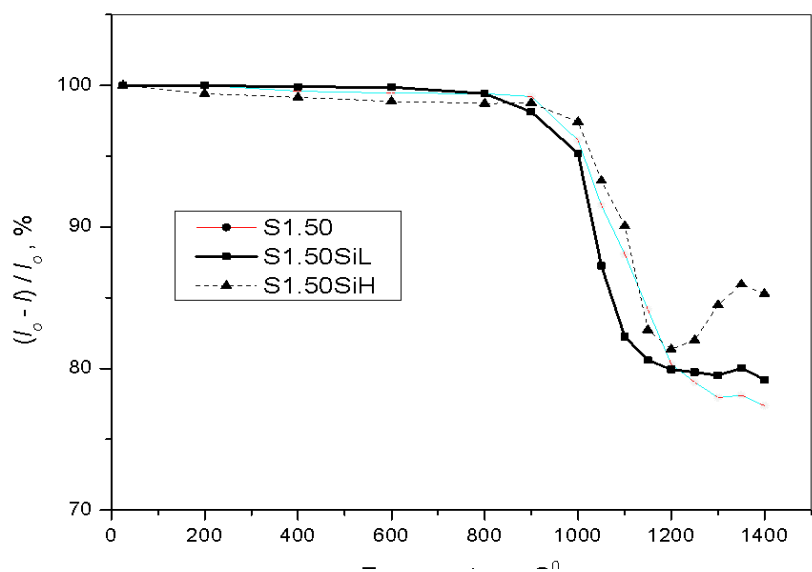
Sl. 10.2. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih uzoraka S.167, S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h

560 cm^{-1} .²²⁷ Primećuje se malo pomeranje pika na 630 cm^{-1} na spektru uzoraka S1.67, S1.50 i S1.50SiL. Pored pomenutih, na FTIR spektrima uzoraka S1.67, S1.50 i S1.50SiL uočava se prisustvo novih pikova na 945 cm^{-1} koji se javljaju kod termički tretiranih uzoraka, kao i pikova na 890 cm^{-1} kod uzoraka S1.67, S1.50 i S1.50SiL, i pikova na 860, 800, 730 i 493 cm^{-1} , na spektru uzoraka S1.50SiH. Trake koje se javljaju na 730 cm^{-1} su karakteristične za β -TCP fazu, dok trake na 800 cm^{-1} ukazuju na postojanje O–Si–O veza.²²⁸

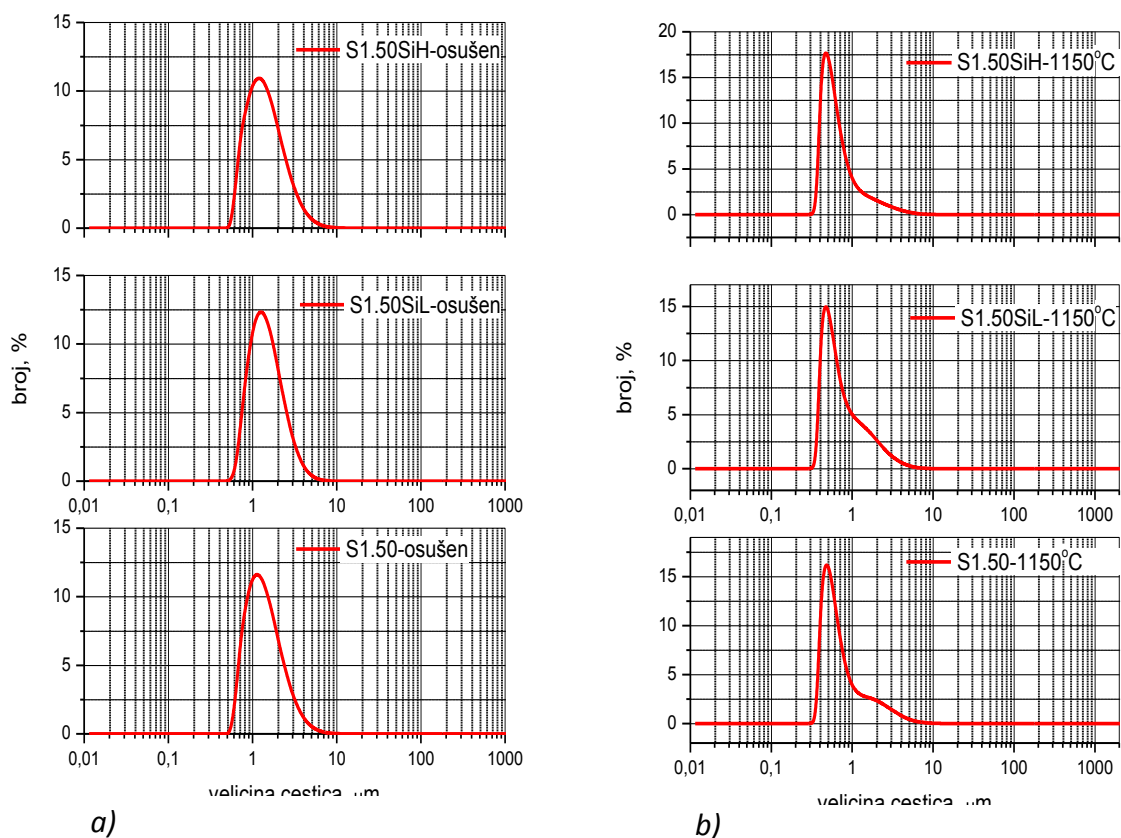
Temperatura od 1150 °C, na kojoj su termički tretirani uzorci tokom 2h, izabrana je nakon merenja linearnog skupljanja uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH na termičkom mikroskopu, kao i SEM analize sfernih čestica na pojedinim temperaturama. Na slici 10.3 prikazana je kriva skupljanja uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH. Uočava se da skupljanje sfernih čestica počinje iznad 850 °C i dostiže maksimum na 1150, 1200 i 1250 °C za uzorke S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH, redom. Takođe, primećuje se da na 1300 °C dolazi do bubrenja svih uzoraka koje je naizraženije kod uzorka S1.50SiH. Ova pojava bubrenja koja se uočava na temperaturi od oko 1300 °C se može objasniti formiranjem α -TCP faze koja ima znatno manju gustinu u odnosu na HA fazu (gustina α -TCP 2,866, a HA 3,16 g cm^{-3}). Ovaj efekat, koji je najizraženiji kod uzorka S1.50SiH je posledica skoro potpune transformacija HA u α -TCP fazu.

Rezultati dobijeni merenjem linearnog skupljanja potvrđeni su analizom veličine čestica (Sl. 10.4). Na dijagramu raspodele veličina čestica se može videti da se veličina čestica smanjuje sa 1-2 μm , koliko je izmereno na osušenim uzorcima, na vrednost od 0,5-0,7 μm , koliko iznosi veličina čestica uzoraka termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h.

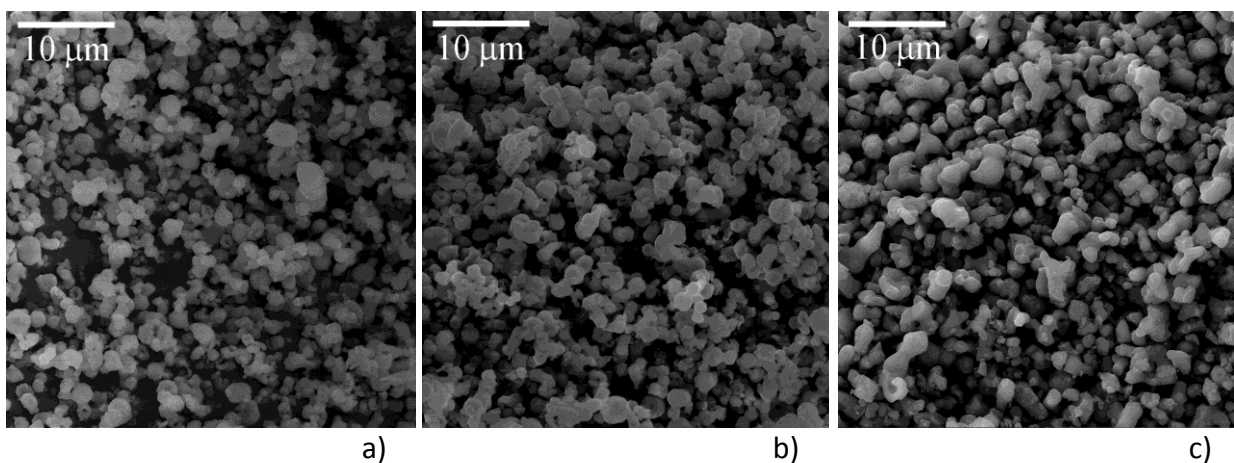
Sferne čestice dopirane većom količinom silicijuma transformišu u α -TCP na nižim temperaturama u odnosu na nedopirane i dopirane u manjem procentu silicijumom sferne čestice, pri čemu sferna morfologija čestica ostaje očuvana, što se može videti i na SEM mikrografijama uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH, prikazanim na slici 10.5. Opisanim postupkom moguće je dobiti sferne čestice α -TCP kontrolisane veličine, za razliku od klasičnih metoda dobijanja α -TCP-a reakcijama u čvrstoj fazi, koje zahtevaju naknadno mlevenje u cilju dobijanja α -TCP praha.²⁴⁰



Sl. 10.3. Linearno skupljanje uzoraka S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH na temperaturama do 1400 °C i odgovarajuće fotografije istih uzoraka na 25, 1150, 1300 i 1400 °C, snimljene na termičkom mikroskopu



SI. 10.4. Raspodela veličine čestica dobijenih prahova S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH nakon sušenja na 105 °C a) i žarenja na 1150 °C b)



SI. 10.5. SEM mikrografije uzoraka a) S1.50, b) S1.50SiL i c) S1.50SiH termički tretiranih na 1150 °C tokom 2h

U procesu oblikovanja keramičkih materijala, korišćenje odgovarajućih aditiva, često u koncentracijama manjim od 1%, predstavlja ključan faktor u kontroli svojstava materijala (suspenzije), u cilju postizanja odgovarajućeg oblika i kontrole uniformnosti pakovanja čestica keramičkog materijala (green body). Upotreba odgovarajućih aditiva je naročito bitna kada se keramički materijal dobija metodom livenja traka (tape casting) i injekcionog modelovanja (injection molding). Korišćeni aditivi mogu biti neorganskog ili organskog

porekla. Organski aditivi, sintetičkog ili prirodnog porekla su našli veliku primenu u procesu dobijanja savremenih keramičkih materijala zbog lakog uklanjanja (npr. pirolizom) tokom samog procesa sinterovanja. Na taj način sprečava se degradacija mikrostrukture krajnjeg proizvoda kao posledica prisustva rezidualnog aditiva. Pored toga, moguće je sintetisati veoma veliki broj aditiva različitog hemijskog sastava za različite primene.

Neorganski aditivi, uopšteno govoreći, ne mogu biti uklonjeni nakon formiranja keramičkog materijala, zbog čega oni imaju značajnu primenu u industriji tradicionalnih keramičkih materijala, gde rezidualni aditiv nema negativan uticaj na svojstva krajnjeg proizvoda.

Aditivi imaju nekoliko različitih funkcija, koje se mogu podeliti u četiri osnovne kategorije: rastvarači, disperzanti (deflokulanti), vezivna sredstva i plastifikatori. Ponekad neke metode formiranja keramičkih materijala zahtevaju korišćenje i drugih aditiva kao što su sredstva za kvašenje i podmazivanje.

Iako postoje opšti hemijski principi i praktične smernice za izbor aditiva za odgovarajući proces, zbog velikog broja na tržištu dostupnih aditiva, kao i nepotpunog poznavanja hemijske strukture i mehanizama, ne postoji jednostavan način za izbor aditiva za odgovarajući sistem, tako da se izbor najpogodnijeg aditiva vrši metodom probe i greške.²⁴¹

Izbor rastvarača, čija je osnovna uloga da obezbede tečljivost praha tokom procesa formiranja i rastvaranje aditiva dodatih u keramički prah, u cilju homogenijeg dispergovanja aditiva u samom prahu, se zasniva na izboru između vode i organskih tečnosti. Organski rastvarači, uopšteno gledajući imaju veći napon pare, manju latentnu toplotu isparavanja, nižu tačku ključanja, manji površinski napon u odnosu na vodu (Tabela 10.2). Nekoliko najčešće korišćenih organskih rastvarača imaju i manju viskoznost u poređenju sa vodom. Stvarni izbor rastvarača za određenu primenu podrazumeva razmatranje i kombinovanje nekoliko karakteristika kao što su: 1) sposobnost rastvaranja drugih aditiva; 2) brzina isparavanja; 3) sposobnost kvašenja praha; 4) viskoznost; 5) reaktivnost u odnosu na prah; 6) sigurnost, i 7) cena. Poznato je da je rastvorljivost čvrste faze u tečnosti povećana ukoliko jedinjenja imaju slične funkcionalne grupe, kao npr. polivinil alkohol i voda, koji sadrže OH grupe, ili sličnu polarnost molekula (npr. polivinil-butirat i etanol).

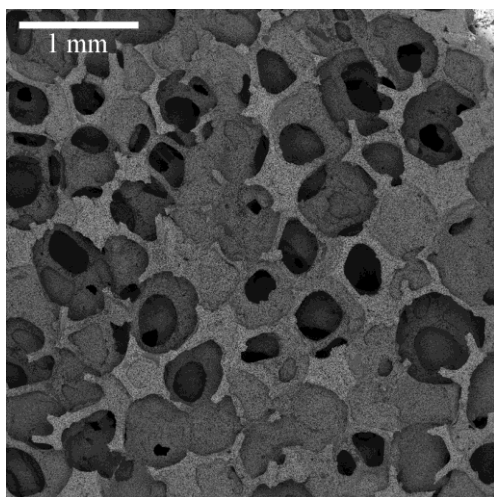
Voda ima relativno visoku viskoznost, a težnja da formira vodonične veze sa hidroksilnim grupama na površini oksidnog praha često može pojačati efekat koncentracije praha na viskoznost suspenzije. Rešenje često leži u smanjivanju sadržaja praha do postizanja odgovarajuće viskoznosti. Teškoće koje se javljaju sa vodenim suspenzijama danas ne predstavljaju ozbiljan problem, pre svega zbog sve većeg napretka koji je postignut u poslednje vreme u razumevanju i upotrebi dispergatora u vodenim sistemima. Ipak, znatno veći procenat čvrste faze se postiže u suspenzijama sa organskim rastvaračima.

Tabela 10.2. Fizičke karakteristike nekih organskih tečnosti na 20 °C

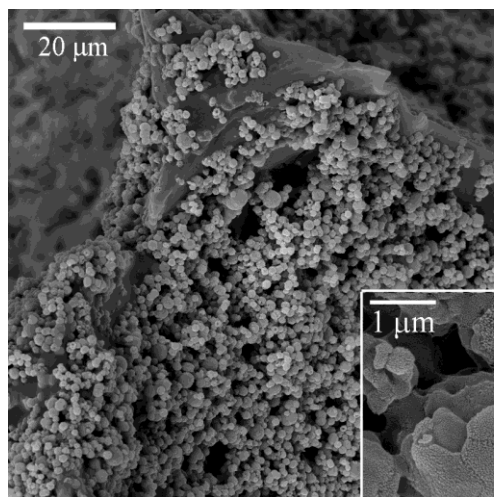
Tečnost	Gustina (g/cm ³)	Dielektrična konstanta	Površinski napon (10 ⁻³ N/m)	Viskoznost (10 ⁻³ Pas)	Latentna toplota isparavanja (kJ/g)	Tačka ključanja (°C)	Tačka paljenja (°C)
Voda	1,0	80	73	1,0	2,26	100,0	Nema
Metanol	0,789	33	23	0,6	1,10	64,6	18
Etanol	0,789	24	23	1,2	0,86	78,4	20
Izopropanol	0,785	18	22	2,4	0,58	82,3	21
Aceton	0,781	21	25	0,3	0,55	56,0	-17
Metil-etil keton	0,805	18	25	0,4	0,44	80	-1
Toluen	0,867	2,4	29	0,6	0,35	111	3
Ksilen (orto)	0,881	2	28	0,7	0,33	140	32
Trihlor- etilen	1,456	3	25	0,4	0,24	87	Nema
n-heksan	0,659	1,9	18	0,3	0,35	68,7	-23
Cikloheksanon	0,947	18	35	0,8	0,43	155	46
Mineralna ulja	0,752	-	-	-	-	179-210	57

Na slici 10.6 prikazani su skafoldi dobijeni metodom potapanja poliuretanskog sunđera u suspenziju praha S.150 ili S1.50SiL ili S1.50SiH i PVA optimalne viskoznosti (65% vode, 32,5% praha, 2,5% PVA). Na slici se uočava uniformna prekrivenost površine poliuretanskog sunđera prahom S1.50 (Sl. 10.6a i b), S1.50SiL (Sl. 10.6c i d) i S1.50SiH (Sl. 10.6e i f), termički tretiranim na 1150 °C tokom 2 h. Ovakvo uniformno prekrivanje poliuretanskog sunđera termički tretiranim česticama S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH je od izuzetne važnosti za dalji proces dobijanja skafolda velike čvrstoće i eliminisanja poroznosti tokom procesa sinterovanja. Na umetnutim slikama 10.6b, d i f jasno se uočava sloj polivinil alkohola koji prekriva čestice S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH. Ovde je veoma važno istaći ulogu vezivnog sredstva u procesu formiranja skafolda metodom replike sunđera. Pod vezivnim sredstvima koja se najčešće koriste u procesiranju keramički materijala smatraju se polimeri sa dugim lancima, čija je osnovna uloga da daju polaznu čvrstoću keramičkom materijalu povezujući čestice pre procesa sinterovanja. U nekim tehnikama (npr. injekciono modelovanje) vezivna sredstva obezbeđuju plastičnost suspenzije pomažući proces formiranja. Veliki broj organskih supstanci poput vinila, akrilata i etilen oksida može biti korišćen u ovu svrhu, pri čemu su neke rastvorne u vodi, a neke u organskim tečnostima.

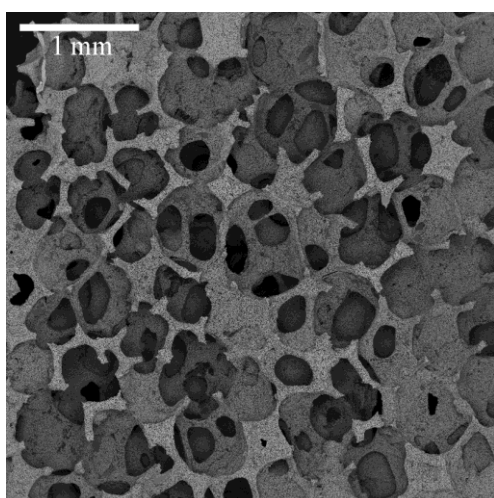
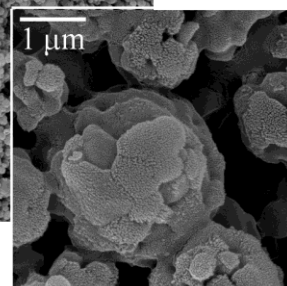
Izbor vezivnog sredstva za pojedine procese formiranja podrazumeva razmatranje nekoliko faktora kao što su: 1) karakteristike sagorevanja vezivnog sredstva; 2) molekulska masa; 3) temperatura staklastog prelaza; 4) kompatibilnost sa disperzantom; 5) uticaj na viskoznost rastvarača i 6) rastvorljivost u rastvaraču.



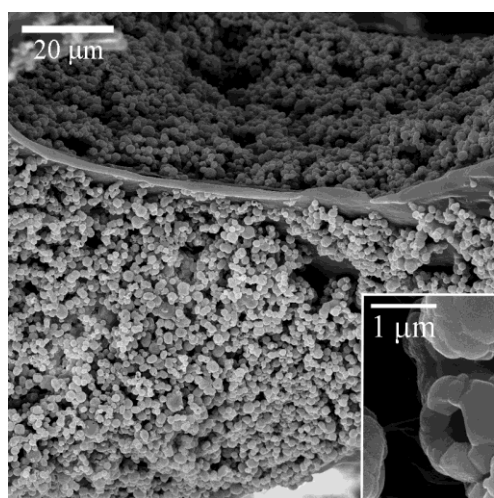
a)



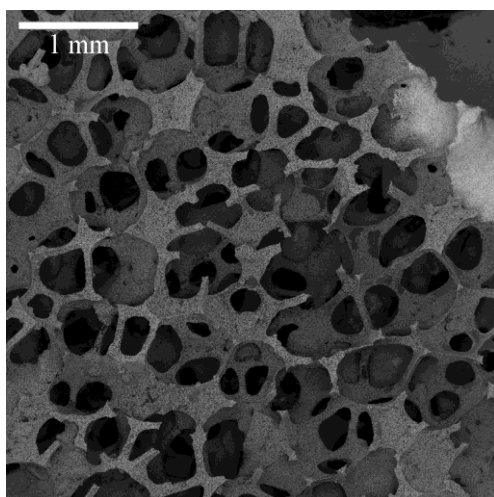
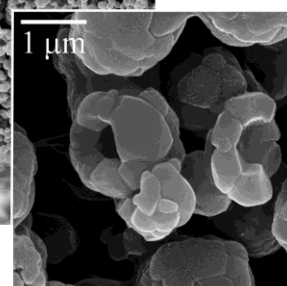
b)



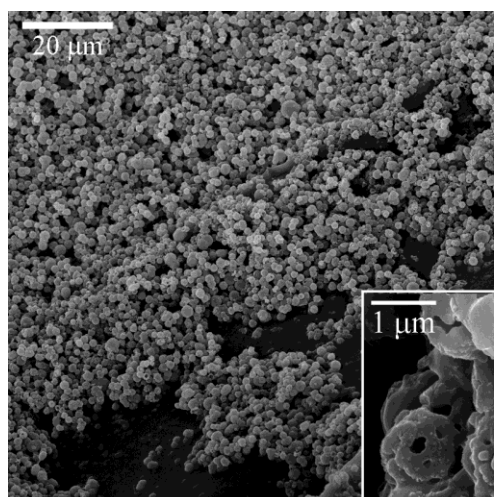
c)



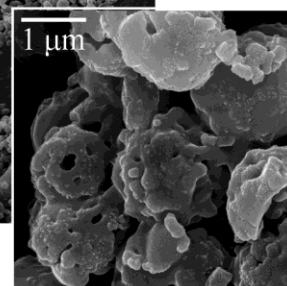
d)



e)



f)



Sl. 10.6. Mikrografije poliuretanskih sunđerâ nakon potapanja u suspenziju PVA i praha a,b) SK-S1.50, c,d)SK-S1.50SiL i e,f) SK-S1.50SiH

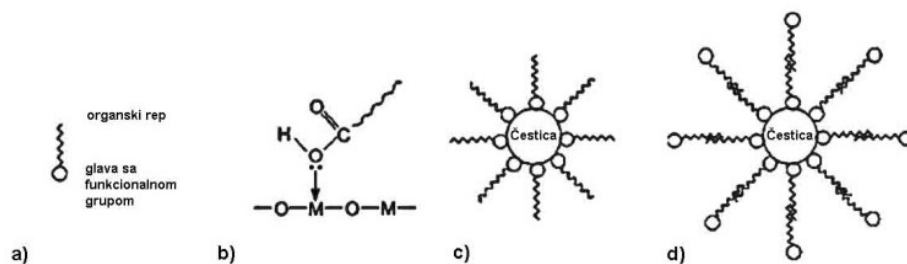
Koncentracija vezivnog sredstva prisutnog u suspenziji je znatno veća u poređenju sa drugim aditivima, tako da su karakteristike sagorevanja vezivnog sredstva od osnovne važnosti pri izboru odgovarajućeg vezivnog sredstva. Uopšteno govoreći, za veliku čvrstoću vezivnog sredstva najvažnije je da ono ima veliku relativnu molekulsku masu. Međutim, temperatura staklastog prelaza T_g (temperatura koja označava temperaturu prelaza iz stanja gume u staklasto stanje) polimera mora biti veoma niska (bliska sobnoj temperaturi) kako bi se pospešilo deformisanje veziva tokom formiranja. Smanjenje vrednosti T_g podrazumeva smanjenje otpora kretanju polimernih lanaca. Ovo se postiže korišćenjem polimera sa manje krutim i polarnim bočnim grupama, polimera manje relativne molekulske mase, ili smanjenjem međumolekulskog vezivanja među lancima upotrebom plastifikatora. Veoma je važno, da u slučaju, da se u procesu formiranja koristi disperzant, on bude kompatibilan sa vezivnim sredstvom. Uticaj vezivnog sredstva na reološke osobine rastvarača je od izuzetnog značaja za izbor odgovarajućeg vezivnog sredstva u zavisnosti od tehnike korišćene u procesiranju keramičkog materijala. U tabeli 10.3 date su vrednosti viskoznosti nekih od najčešće, u vodenim rastvorima korišćenih vezivnih sredstava. Izbor PVA u procesu dobijanja skafolda metodom replike sunđera korišćene u ovom radu leži pre svega u širokom opsegu viskoznosti koje pokriva PVA u poređenju sa drugim korišćenim vezivnim sredstvima (tabela 10.3). Pored pomenutih vezivnih sredstava za postizanje stabilne suspenzije neophodno je korišćenje disperzanata (deflokulanta), koji stabilizuju suspenziju smanjenjujući flokulaciju na taj način što povećavaju odbojne sile između čestica. Iako se normalno koriste u veoma malim koncentracijama (delovi masenog procenta), disperzanti imaju veoma veliku ulogu u povećanju koncentracije čestica i viskoznosti prihvatljive za dalje procesiranje skafoldnih materijala. Disperzanti se veoma razlikuju u pogledu hemijskog sastava, a osnovna podela izvršena je na: proste jone i molekule, polimere kratkih lanaca sa funkcionalnim grupama na početku ili kraju lanca, polimeri male i srednje molekulske težine.

Disperzanti koji se sastoje od prostih jona i molekula su efikasni u vodenim rastvorima. Oni se formiraju disocijacijom rastvorenih neorganskih jedinjenja, elektrolita (soli, kiseline i baze). Kod nejonskih surfaktanata, grupe na početku lanca mogu biti polarne ali jonizacijom ne stvaraju naelektrisane vrste, tako da su ovi surfaktanti efikasni u organskim rastvaračima. Njihova adsorpcija na površini čestica se odvija ili van der Waalsovom privlačenjem ili koordinatnim vezivanjem. Jonski mogu biti anjonski, u slučaju kada funkcionalne grupe na početku lanca jonizujuć stvaraju negativno naelektrisane vrste, ili katjonski, u slučaju formiranja pozitivno naelektrisanih grupa. Ovi surfaktanti su efikasni u vodenim rastvorima. Adsorpcija jonskih surfaktanata se najčešće dešava elektrostatičkim privlačenjem.

Tabela 10.3. Viskoznost nekih od najzastupljenijih, u vodi rastvornih vezivnih sredstava

Vezivno sredstvo	Viskoznost					Elektrohemijski tip			
	veoma niska	niska	srednja	visoka	veoma visoka	nejonska	anjonska	katjonska	biodegradabilna
Gumarabika	o						x		x
Lignosulfonat	o						x		x
Lignin	o						x		x
Melasa	o					x			x
Dekstrini	o	o				x			x
Polivinilpirolidin	o	o				x			
Polivinil alkohol	o	o	o			x			
Polietilen oksid		o	o			x			
Skrob		o	o			x			x
Akril		o	o				x		
Polietilenimin		o	o					x	
Metilceluloza			o	o		x			x
Natrijum karboksimetil celuloza			o	o	o		x		x
Hidroksipropil metilceluloza			o	o	o	x			
Hidroksietil celuloza			o	o	o	x			x
Natrijum-alginat				o			x		x
Poliakrilamid					o	x			

Polimerini disperzanti male i srednje molekulske težine (od nekoliko stotina do nekoliko hiljada) mogu takođe biti nejonski i jonski. Najčešći nejonski polimerni disperzanti su: polietilen-oksidi (PEO), polietilen-glikol (PEG), polivinil-pirolidin (PVP), polivinil alkohol (PVA), polistiren (PS), i blok-kopolimeri PEO/PS. Mnogi od pomenutih polimera veće relativne molekulske mase su veoma efikasni i kao vezivna sredstva. U slučaju kada se u lancu nalazi OH grupa ili polarne vrste, disperzanti su efikasni u vodi, u ostalim slučajevima oni su efikasni u organskim rastvaračima. U organskim ili vodenim rastvorima, adsorpcija polimera se odvija preko slabih van der Waalsovih sila ili snažnijim koordinatnim vezivanjem (vidi sliku 10.7). Iz napred navedenog se vidi da PVA korišćen za dobijanje skafolda u ovom radu ima dvostruku funkciju u procesu dobijanja skafolda, jer služi i kao vezivno sredstvo i kao disperzant, čime se u znatnoj meri olakšava proces homogenizacije suspenzije i njeno stabilisanje.



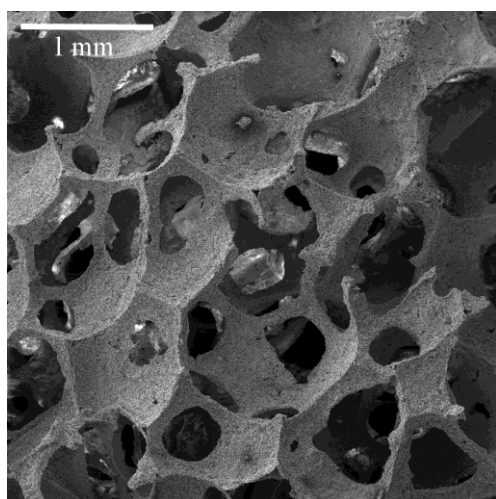
Sl. 10.7. a) Shema molekule surfaktanta, b) Ilustracija adsorpcije surfaktanta na površini čestice koordinatnim vezivanjem, c) sterna stabilizacija čestica, d) stabilizacija micela

U cilju dobijanja skafolda odgovarajućih mehaničkih karakteristika, kao i odgovarajućeg faznog sastava, prethodno osušeni skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH su termički tretirani na temperaturi od 1200, 1300, 1400 i 1450 °C tokom 3h. Na slici 10.8 prikazani su skafoldi dobijeni termičkim tretiranjem na 1200 °C tokom 3h. Na slikama 10.8a, c i e se jasno uočava izrazito porozna makrostruktura skafolda sa veličinom pora od 0,3-1 mm. Ispitivanje je pokazalo da skafoldi dobijeni termičkim tretmanom na 1200 °C tokom 3h imaju veoma loše mehaničke karakteristike. Razlog ovako loših mehaničkih karakteristika pored izrazite makroporoznosti koja karakteriše sve skafolde dobijene ovom tehnikom leži pre svega i u velikoj mikroporoznosti zidova skafolda koja se jasno vidi na slikama 10.8b, d i f. Mikroporoznost, koja se kreće od 0,3 do nekoliko mikrometara, i koja je prisutna kod svih skafolda nezavisno od toga koji je prah (S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH) korišćen, je posledica niže temperature od 1200 °C na kojoj su skafoldi sinterovani, a koja je nedovoljna da bi se formirala kristalna zrna i eliminisala mikroporoznost zaostala nakon sušenja keramičke suspenzije na poliuretanskom sušeru.

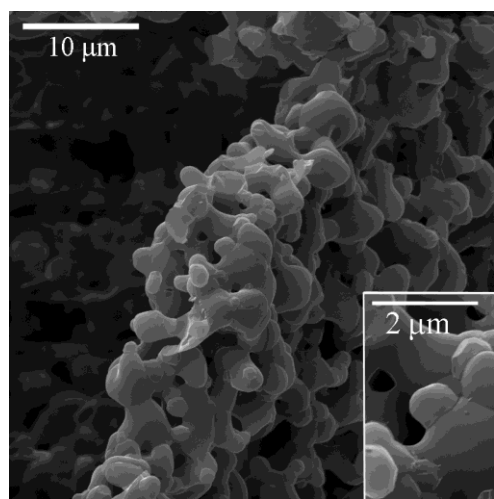
Na slici 10.9 prikazani su skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretirani na temperaturi od 1300 °C tokom 3h. Na slikama 10.9a, c i e se vidi izrazito makroporozna struktura skafolda sa veličinom pora od 0,3-1 mm. Ispitivanje je pokazalo da skafoldi dobijeni termičkim tretmanom na 1300 °C tokom 3h imaju i dalje nezadovoljavajuće mehaničke karakteristika, koje su uzrokovane zaostalom mikroporoznošću prisutnom u zidovima skafolda SK-S1.50 i SK-S1.50SiL (Sl. 10.9b i d). U poređenju sa skafoldima termički tretiranim na 1200 °C jasno se vidi znatno manji broj mikropora unutar zidova skafolda, dok se kod skafolda SK-S1.50SiH ne uočava prisustvo mikropora.

Rast zrna u mnogim poroznim keramičkim sistemima tokom procesa sinterovanja može biti opisan na način sličan onom koji se javlja sinterovanjem TiO_2 .²⁴² U ranim fazama sinterovanja, rast zrna je ograničen, ali se ukрупnjavanje mikrostrukture može javiti kao posledica površinske difuzije i transporta u parnoj fazi. Promene koje se javljaju u ovim ranim stupnjevima imaju značajan uticaj na razvoj mikrostrukture u kasnijim fazama.

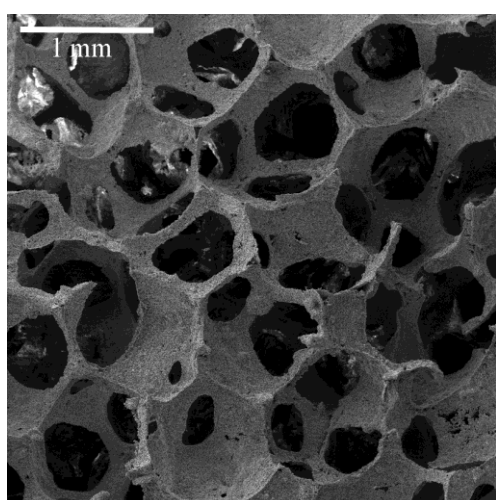
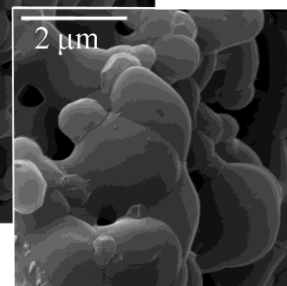
Jedan od načina na koji se može opisati rast zrna predložen je od strane Greskovicha i Laya na osnovu posmatranja koja su vršena na kompaktima praha Al_2O_3 .²⁴² U slučaju kada se dve čestice razlikuju u veličini, pretpostavlja se da površinska difuzija učestuje u zaobljavanju čestica i rastu vrata između samih čestica. Da li će granice moći da se pomeraju zavisi od toga da li to dozvoljava sama struktura (npr. mora doći do smanjenja ukupne energije sistema pri svakom dodatnom pomeranju granice). Pretpostavlja se da površinska difuzija dovodi do strukturnih promena koje bi favorizovale pomeranje granice. Brzina migracije granice zavisi od razlike u polaznoj veličini između čestica. Što je veća razlika u veličini čestica, veće je zakrivljenje granice i veća pokretačka sila za prelazak granice preko manjeg zrna. Rast vrata između zrna izgleda mnogo sporiji nego migracija granice, tako da poslednji proces kontroliše brzinu procesa ukрупnjavanja.



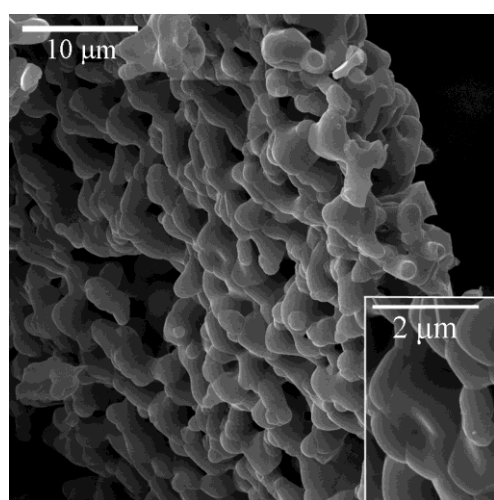
a)



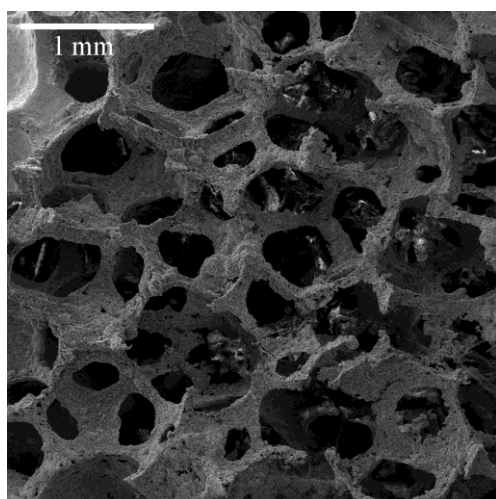
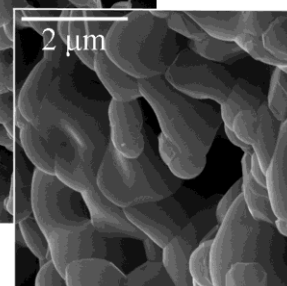
b)



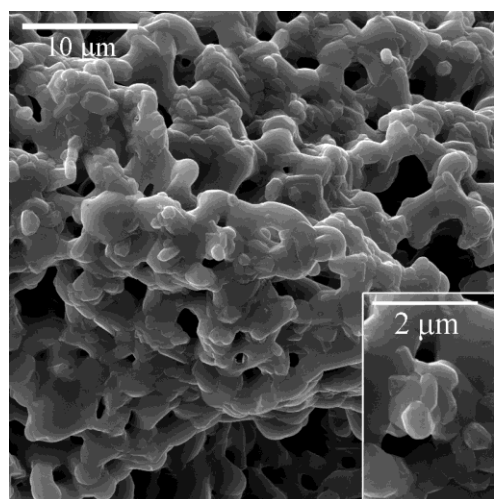
c)



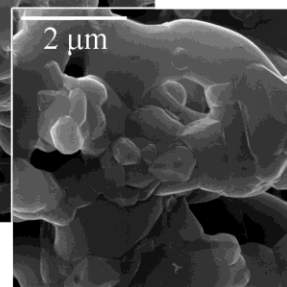
d)



e)



f)



SI. 10.8. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1200 °C tokom 3h

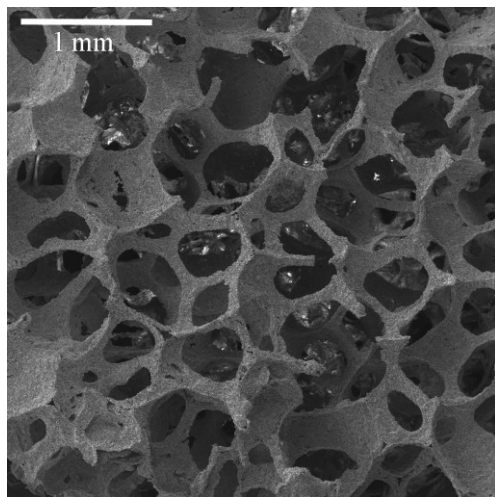
Greskovich i Lay smatraju da površinska difuzija predstavlja dominantan mehanizam rasta vrata, transport u parnoj fazi može biti veoma izražen u sistemima sa prilično visokim pritiskom napona pare. Takođe, ukрупnjavanje zrna, kontrolisano rastom vratova, se ne može smatrati jedinim procesom koji se javlja kod veoma poroznih sistema. Tako će kod heterogeno pakovanih čestica nakon izvesnog vremena sinterovanja kompakt sadržati veoma porozne regione, kao i regione sa velikom gustom. Kod ovog strukturnog tipa, ukрупnjavanje može biti kontrolisano putem dva nezavisna mehanizma: (1) rast vratova kod sasvih poroznih sistema i (2) migriranjem granice na zakrivljenim površinama kod veoma gustih regiona. Drugi način koji opisuje rast zrna u poroznim kompaktima predstavljen je od strane Edelsona i Glaesera⁽²⁴²⁾. U slučaju postojanja velike razlike u veličini zrna, iščezavaju granice zrna što dovodi do oslobađanja dovoljne energije koja ubrzava ukupan proces sinterovanja. Na taj način, manja zrna nestaju na račun rasta većih.

Takođe, tokom rasta zrna može doći do zarobljavanja pora, što ograničava vrednost krajnje gustine. Ipak, ovaj proces se ređe dešava u ranim stupnjevima sinterovanja jer prilično velike, kontinualne pore koje su blisko raspoređene pružaju značajan otpor na granici zrna, menjajući njihovu pokretljivost.

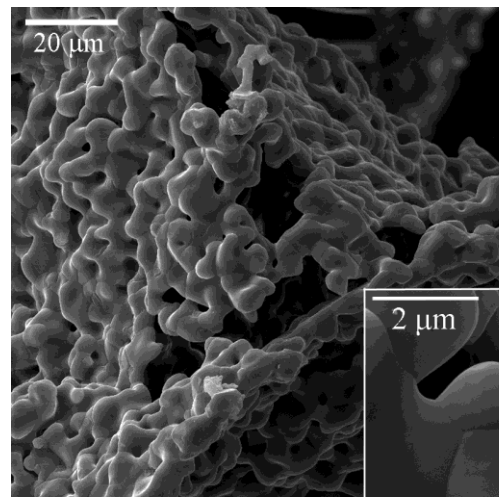
Rast zrna se povećava sa povećanjem gustine kompakta, ali rast zrna ne postaje izražen sve do poslednjeg stupnja sinterovanja kada pore počinju da se skupljaju i postanu izolovane.

Uopšteno, ukрупnjavanje postaje izraženije u kasnim srednjim i završnim stupnjevima sinterovanja. Prosečna veličina zrna raste polako i skoro linearno sa porastom vrednosti relativne gustine na oko 0,85-0,90 teorijske vrednosti, nakon čega se rast odvija veoma brzo.²⁴² Pomeranje granica dovodi do stapanja pora, tako da prosečna veličina pora raste. Veruje se da proces rasta zrna i stapanja pora doprinosi ukрупnjavanju zrna u kasnijim stupnjevima sinterovanja.

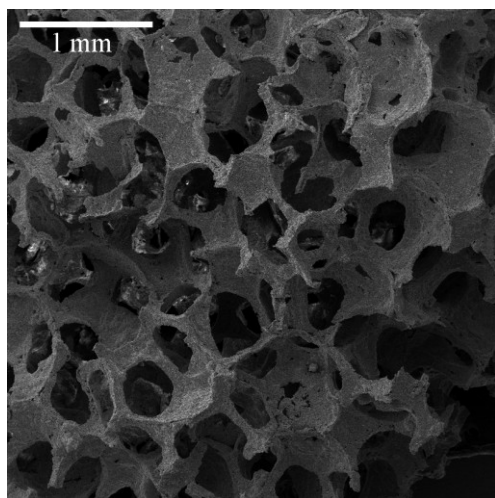
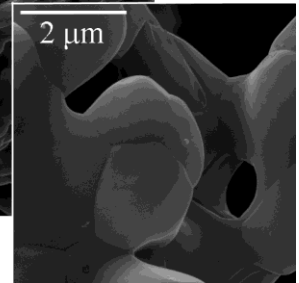
Može se očekivati da će kod kompakta formiranih iz potpuno gustih čestica, polazna poroznost biti povezana. Kako proces sinterovanja napreduje, sve više i više otvorena poroznost prelazi u zatvorenu. Konverzija je ipak zavisna od uniformnosti pakovanja.



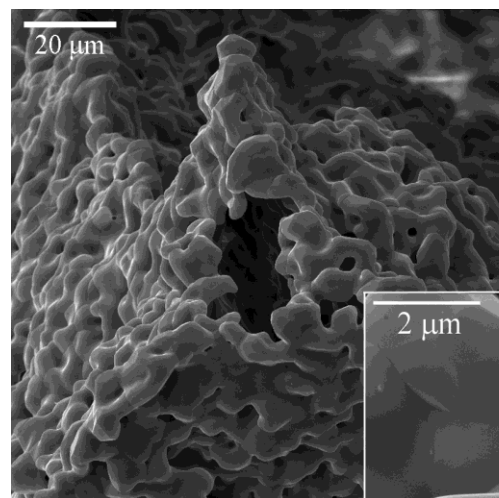
a)



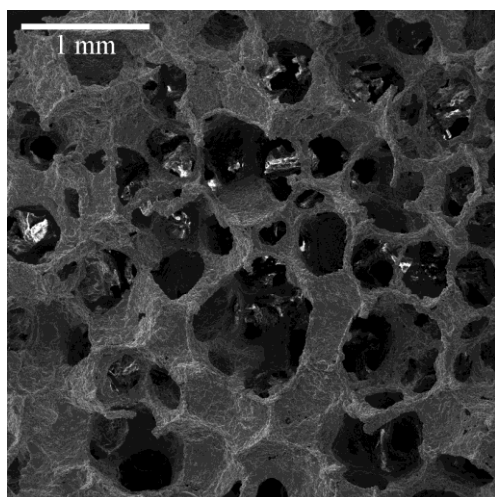
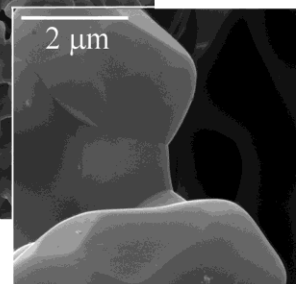
b)



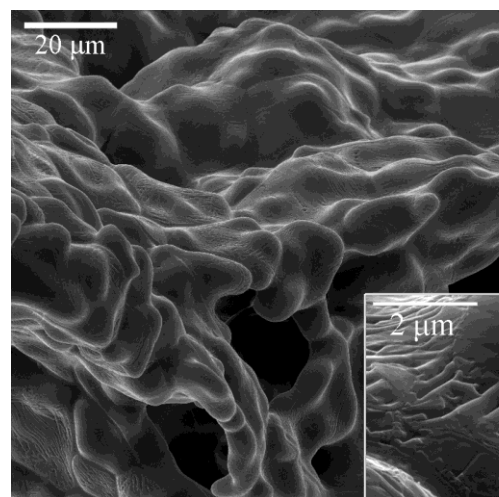
c)



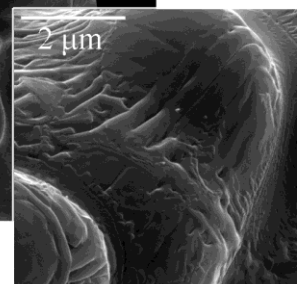
d)



e)



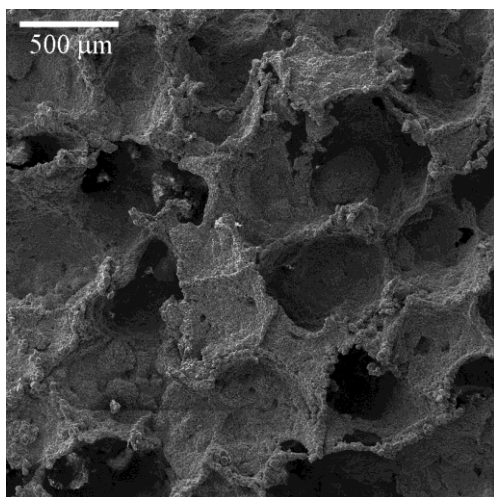
f)



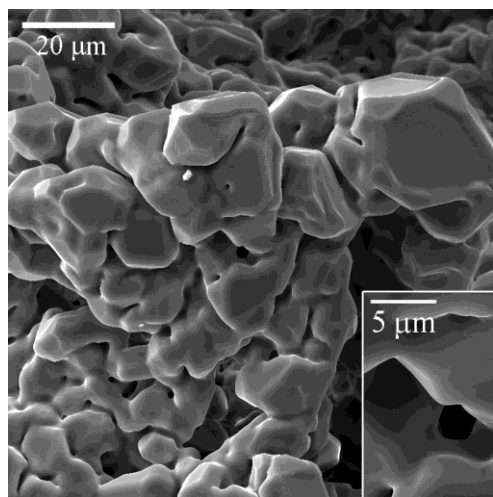
Sl. 10.9. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1300 °C tokom 3h

Na slikama 10.10 i 10.11a, b i c prikazani su skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretirani na temperaturi od 1400 °C tokom 3h. Na slikama 10.10b i d se vidi smanjenje poroznosti u odnosu na poroznost koja se uočava na istim skafoldima termički tretiranim na 1300 °C. Na slici 10.10 b i d se uočava početak formiranja tetrakaidekahedara na rubnim delovima skafolda SK-S1.50 i SK-S1.50SiL. Uočeno formiranje tetrakaidekahedara i povezanih cilindričnih pora kod skafolda SK-S1.50 je karakteristično za srednji stupanj sinterovanja. Prisustvo znatno manjih pora vidljivo je na mikrografiji skafolda SK-S1.50SiL (Sl. 10.10d). Na mikrografijama skafolda SK-S1.50SiH vidljivo je formiranje zrna veličine od 10-50 μm , sa jasno uočljivim granicama zrna bez prisustva pora. Na slici 10.11.a,b i c prikazana je izrazito makroporozna struktura skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH.

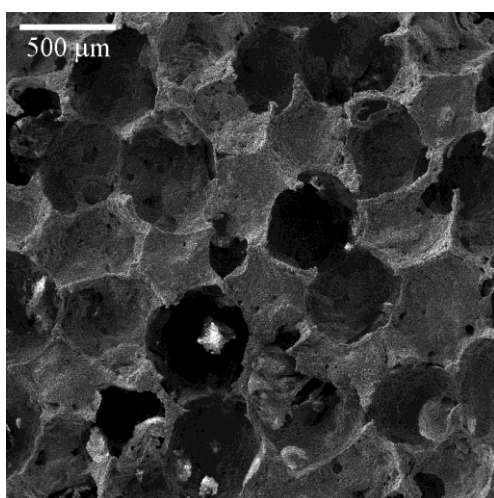
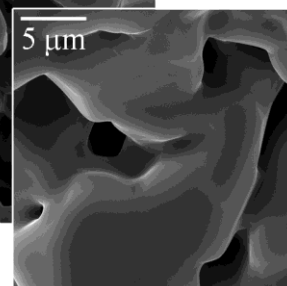
Značaj korišćenja termički predtretiranih sfernih čestica na 1150 °C tokom 2h za dobijanje skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH najbolje se vidi poredeći mikrografije pomenutih skafolda sa mikrografijama skafolda SK-S1.50OS dobijenim polazeći od termički netretiranog, već samo osušenog praha S1.50 (Sl. 10.11d,e i f). Naime, pokazalo se da je korišćenjem osušenog praha S1.50, kao i prahova S1.50SiL i S1.50SiH, za pripremu suspenzije istog sastava kao što je i sastav suspenzije korišćene za pripremu skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i S1.50SiH, moguće dobiti skafold uniformne strukture, ali sa znatno lošijim mehaničkim karakteristikama. Uzrok loših mehaničkih karakteristika ovako dobijenih skafolda leži pre svega u velikom skupljanju osušenih sfernih čestica tokom procesa sinterovanja od oko 20% (vidi sliku 10.3), što za posledicu ima stvaranje napona unutar strukture. Ovi naponi dovode do stvaranja makropukotina tokom termičkog tretmana na povišenim temperaturama (Sl. 10.11e i f), što uslovljava znatno slabljenje mehaničkih karakteristika skafolda, što ih čini neupotrebljivim na mestima gde je implantirani materijal izložen većem opterećenju.



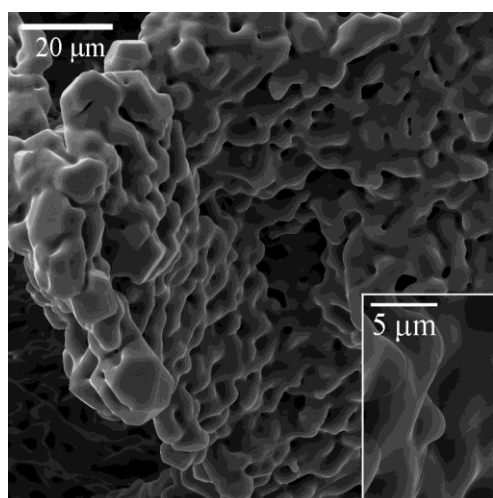
a)



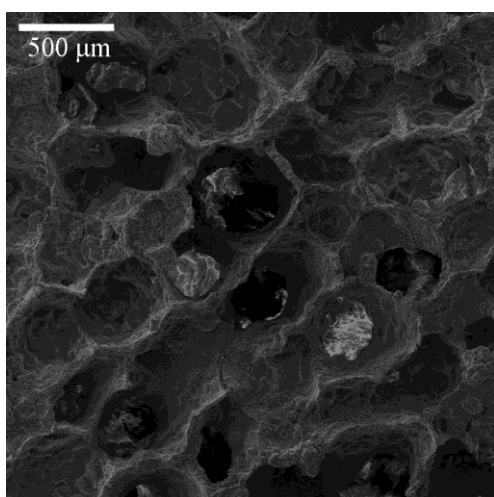
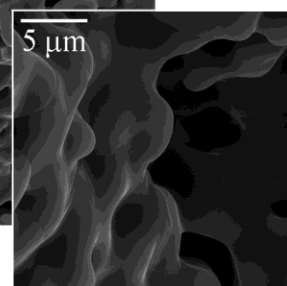
b)



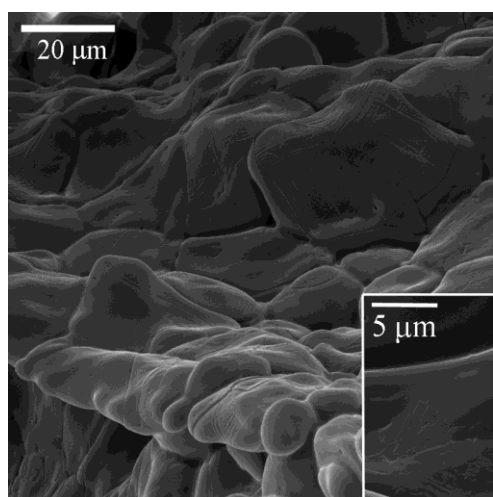
c)



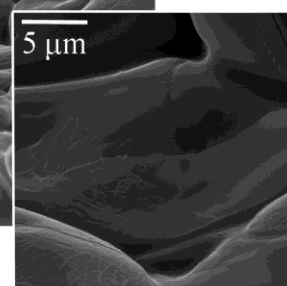
d)



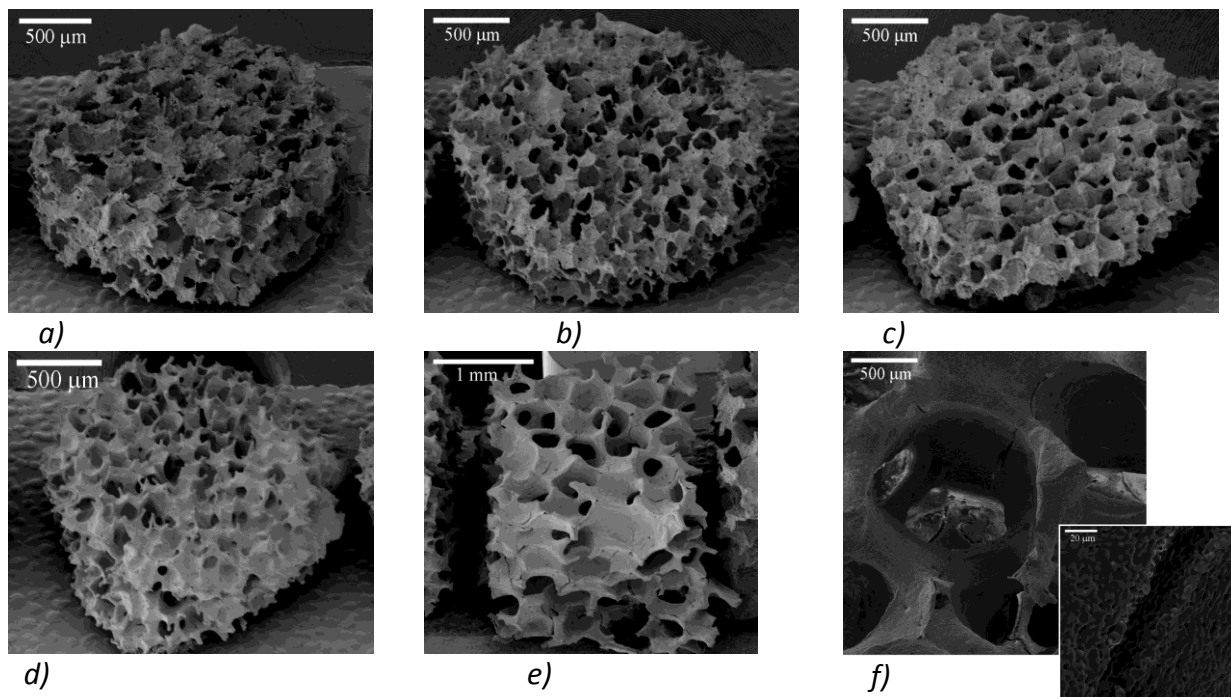
e)



f)

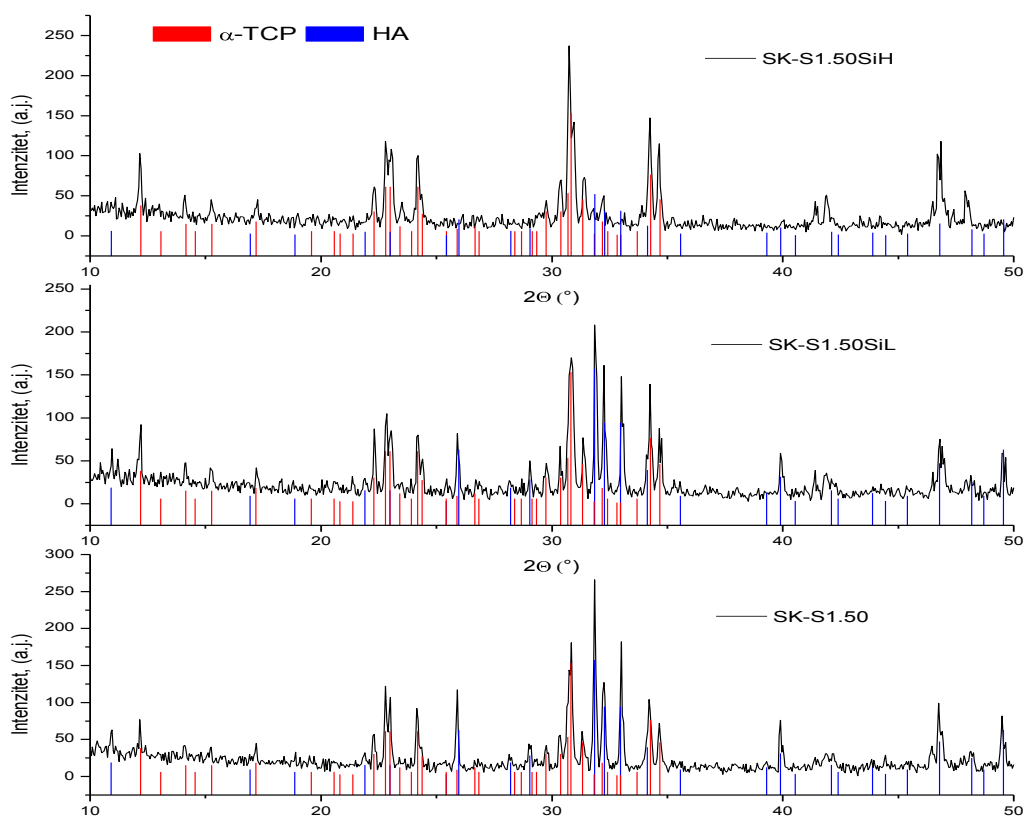


Sl. 10.10. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h



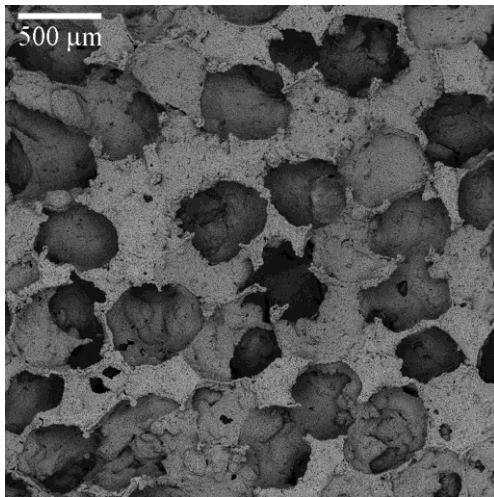
Sl. 10.11. Makroskopski prikaz skafolda: a) SK-S1.50, b) SK-S1.50SiL, c) SK-S1.50SiH i d, e, f) SK-S1.50OS termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h

Difraktogrami skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h prikazani su na slici 9.12. Analizom difraktograma se vidi da svi pikovi koji se uočavaju odgovaraju ili HA fazi ili α -TCP fazi (PDF kartica br. 9-348). Prisustvo β -TCP faze nije primećeno ni na jednom od difraktograma snimljenih uzoraka. Poređenjem rendgenograma skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH može se uočiti, na osnovu fazne transformacije, da su skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL termički stabilniji u odnosu na skafold SK-S1.50SiH, što je uzrokovano većom supstitucijom silicijumom unutar kristalne rešetke HA u prahu S1.50SiH korišćenom za pripremu skafolda SK-S1.50SiH. Takođe, na difraktogramu (Sl. 10.12) se uočava da je odnos α -TCP/HA faza veći kod skafolda SK-S1.50SiL nego kod SK-S1.50, što je posledica dopiranja silicijumom.

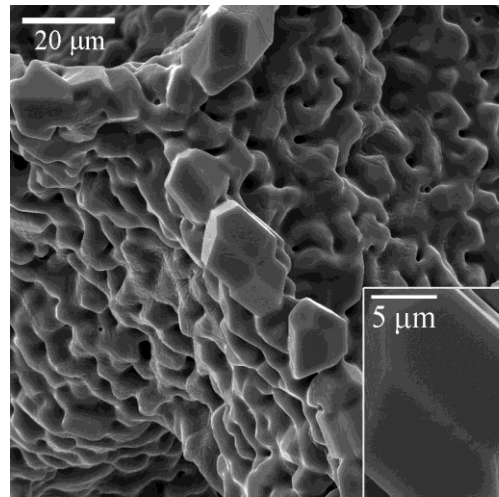


Sl. 10.12. Rendgenski difraktogrami skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C tokom 3h

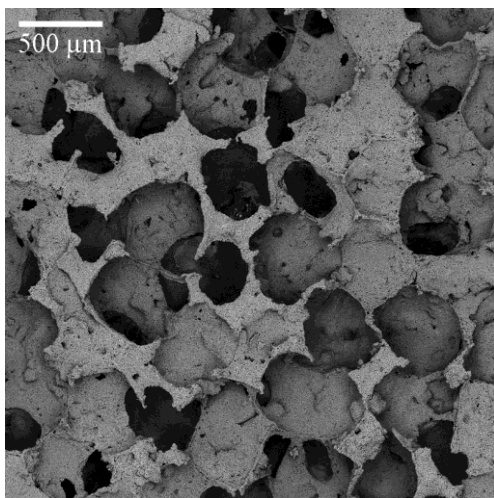
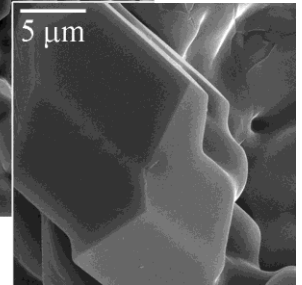
Na slici 10.13. prikazani su skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretirani na temperaturi od 1450 °C tokom 3h. Na slikama 9.13. b i d se jasno vide formirani tetrakaidekaedri na zidovima skafolda SK-S1.50 i SK-S1.50SiL. Takođe, na mikrografijama oba pomenuta skafolda se uočava prisustvo pora sfernog oblika veličine 1-3 μm , koje pored jasno izraženih tetrakaidekardara ukazuju da se radi o završnoj fazi sinterovanja. Detaljnijom strukturnom analizom uočava se da kod skafolda SK-S1.50SiL dolazi do formiranja manjih zrna unutar zidova skafolda (Sl. 10.13. d). Formiranje manjih zrna može biti objašnjeno prisustvom silicijuma unutar kristalne strukture koji nastoji da inhibira rast zrna stvarajući materijal finije mikrostrukture^(31, 45, 51). Gibson i saradnici su utvrdili da silicijum u svim koncentracijama inhibira rast zrna silicijumom dopiranog HA⁽³¹⁾. Na mikrografu skafolda SK-S1.50SiH (Sl. 10.13. e i f) vidi se gusta struktura sa jasno formiranim zrnima veličine od 10-30 μm . Na mikrografu se ne uočava prisustvo pora unutar zida skafolda (Sl. 10.13. f). U višefaznim mešavinama dodatak silicijuma dovodi do preferentnog rasta zrna Si- α -TCP, iako je rast zrna i HA i TCP faze ograničen prisustvom silicijuma u većim koncentracijama⁽⁵¹⁾. Analize koje su vršili Reid i saradnici su pokazale prisustvo silicijuma u većim koncentracijama na granici zrna i na površini materijala sa većim udelom silicijuma, što dovodi do stvaranja heterogene mikrostrukture koja može imati specifičan efekt na biološku aktivnost materijala.³⁴



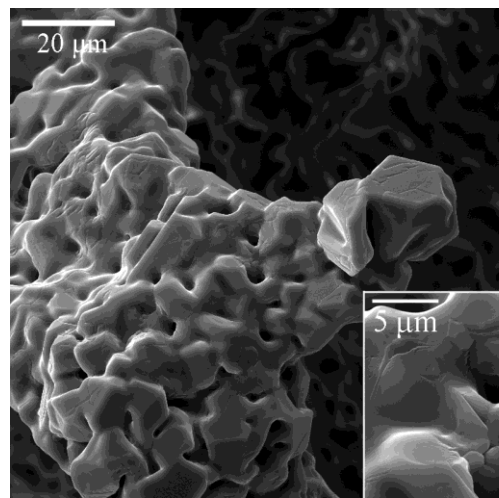
a)



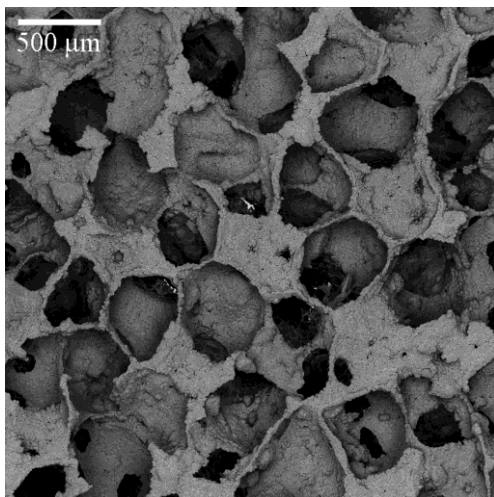
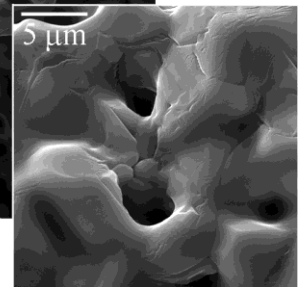
b)



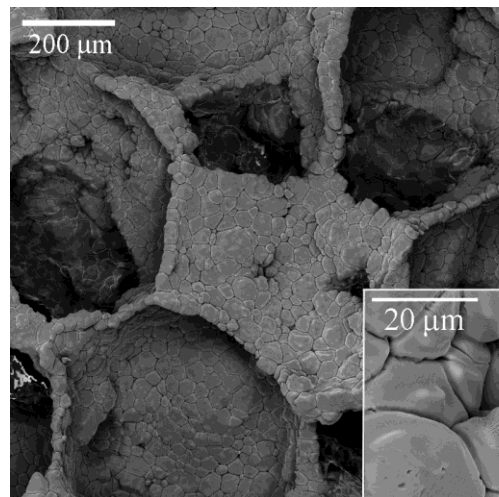
c)



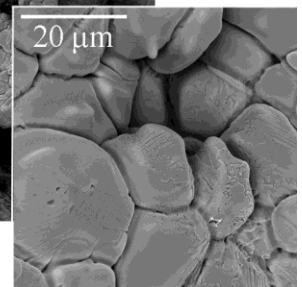
d)



e)

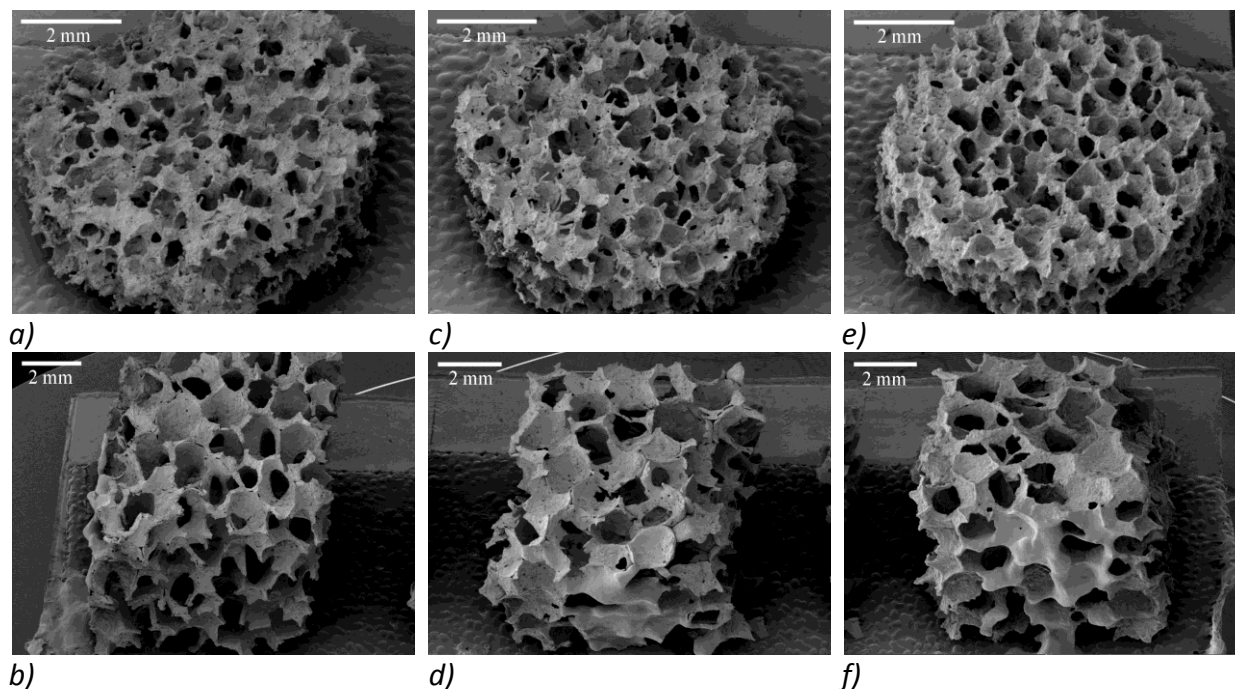


f)



Sl. 10.13. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h

Makroskopski prikaz skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH različite makroporoznosti termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h dat je na slici 10.14. Korišćenom metodom replike sundera moguće je dobiti skafolde različite poroznosti u zavisnosti od poroznosti poliuretanskog sundera.



Sl. 10.14. Makroskopski prikaz skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL, e, f) SK-S1.50SiH različite makroporoznosti termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h

Difraktogrami skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h prikazani su na slici 10.15. Uočava se da difrakcioni maksimumi koji se javljaju na difraktogramima skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH potiču od HA ili α -TCP faze. Poređenjem difraktograma skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C sa difraktogramima skafolda termički tretiranim na 1400 °C može se uočiti promena u odnosu α -TCP/HA kao posledica izraženije fazne transformacije na povišenoj temperaturi. Tako se na difraktogramu skafolda SK-S1.50SiH (Sl. 10.15) uočava jedino prisustvo α -TCP faze u poređenju sa faznim sastavom istog skafolda termički tretiranog na temperaturi od 1400 °C.

SEM mikrografije skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h nakon 7 dana držanja u SBF-u prikazane su na slici 10.16. Površina skafolda je analizirana nakon i pre inkubacije u SBF-u. Pre inkubacije na površini skafolda se jasno uočavaju samo zrna i granice zrna bez vidljivih specifičnih naslaga drugog materijala (Sl. 10.13).

Na mikrografijama uzorka SK-S1.50 i SK-S1.50SiL dobijenog žarenjem na 1450 °C tokom 3h, nakon 7 dana inkubacije u SBF-u jasno se uočava sloj novoformiranog hidroksiapatita (Sl. 10.16. a, b, c i d). Ovako formirani nanostrukturni sloj hidroksiapatita na

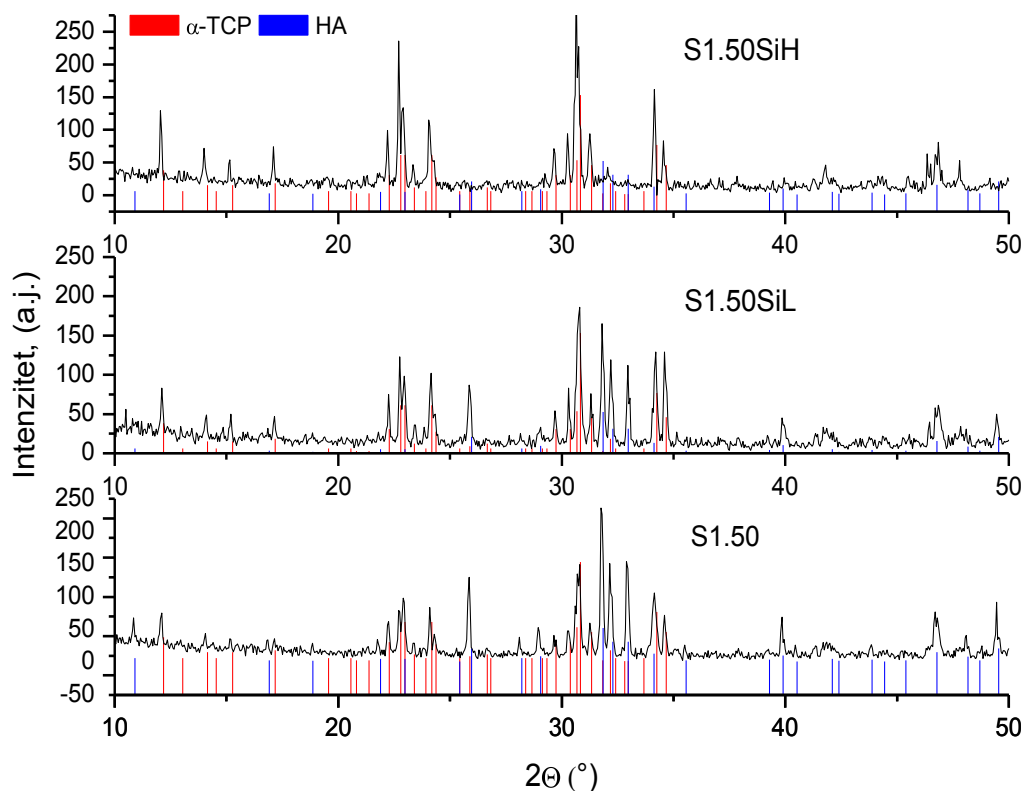
površini skafolda ukazuje na dobra bioaktivna svojstva materijala u *in vitro* uslovima. Slični igličasti, nanostrukturni kristali HA su uočeni i u ljudskim kostima, a pretpostavlja se da oni povoljno utiču na adheziju i proliferaciju ćelija, kao i brže stvaranje tkiva unutar samog skafolda.^{243,244} Takođe, uočava se da na površini pomenutih skafolda (Sl. 10.16. b i d) postoje mesta koja nisu u potpunosti prekrivena slojem HA, na kojima je još uvek moguće jasno uočiti zrna, što je najverovatnije posledica manje reaktivnosti zrna na rubnim delovima zidova skafolda uzrokovane većom kristaliničnošću.

Na mikrografijama uzorka SK-S1.50H (Sl. 10.16. e i f) dobijenog žarenjem na 1450 °C tokom 3h, nakon 7 dana inkubacije u SBF-u uočava se znatno deblji, uniformni sloj formiranog hidroksiapatita na površini materijala u poređenju sa skafoldima SK-S1.50 i SK-S1.50L tokom istog vremena inkubacije u SBF-u. Na SEM mikrografijama skafolda SK-S1.50H (Sl. 10.17. e i f) jasno je vidljivo rastvaranje zrna u pojedinim regijama skafolda. Primećuje se da je broj zrna koja se nalaze u fazi rastvaranja znatno veći u rubnim regijama skafolda, gde je tokom procesa sinterovanja došlo do formiranja krupnijih zrna, nastalih najverovatnije usled intenzivnijeg prenosa toplote zračenjem. Ovako formirana zrna pokazuju smanjenu reaktivnost u odnosu na manja zrna, kao rezultat smanjene rastvorljivosti. Sporije formiranje hidroksiapatita na površini ovih zrna je uzrokovano i manjom koncentracijom jona kalcijuma i fosfatnih jona na samoj površini skafolda u odnosu na dublje delove skafolda usled smanjenog kretanje fluida i povećanja lokalne koncentracije kalcijumovih i fosfatnih jona.

Takođe, može se zaključiti da i povećanje sadržaja silicijuma dovodi do bržeg stvaranja hidroksiapatita na površini materijala tokom inkubacije u SBF-u. Ovo može biti uslovljeno, kako samim silicijumom koji inicira nukleaciju hidroksiapatita na površini zrna, tako i α -TCP fazom, čiji se procenat povećava sa povećanjem sadržaja silicijuma u polaznom prahu hidroksiapatita (Sl. 10.1) korišćenom za dobijanje skafolda.

Izdvajanje biološkog apatita na površini HA keramike u *in vivo* i *in vitro* uslovima opisana je u mnogim istraživanjima.²⁴⁵ U istraživanju Portera i saradnika je zapaženo formiranje velikih, igličastih kristalita na površini Si-HA u dubljim regijama implanta u poređenju sa malim pljosnatim (plate-like) kristalitim na spoju kost-HA. Primećene razlike ukazuju da se dve pomenute nanostrukturne forme javljaju kao posledica dva različita biološka procesa. Formiranje igličastih kristalita na površini zrna ukazuje na to da se igličasti kristaliti stvaraju kao posledica gubitka materijala u zrnima Si-HA a ne kao posledica heterogene nukleacije biološkog apatita. Ovakvo zapažanje sugerise da se strukturne promene javljaju od fronta rastvaranja razvijajući se okomito na površinu zrna HA. Front rastvaranja može biti rezultat rastvaranja koje se dešava sa površine zrna duž dislokacione linije.²⁴⁶

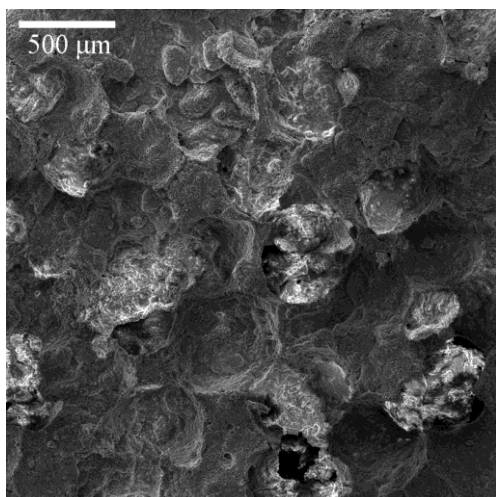
Moguće je da silicijum pospešuje biomimetičko taloženje na Si- α -TCP i Si-HA povećanjem rastvorljivosti materijala formiranjem defekata u kristalnoj rešetki^(44, 247-249), stvarajući elektronegativniju površinu i smanjujući veličinu zrna.²⁴⁷



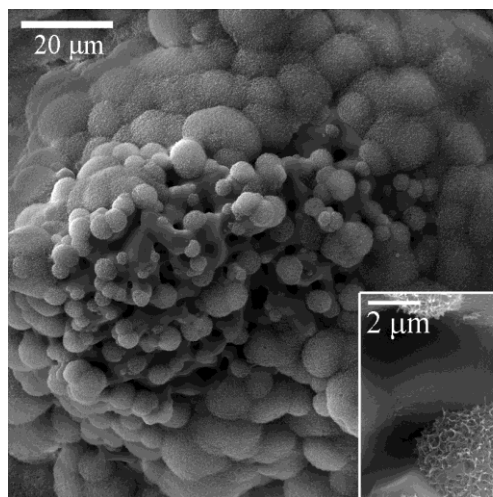
Sl. 10.15. Rendgenski difraktogrami skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h

Patel i saradnici su upoređivali brzinu apozicije kosti na HA i Si-HA keramičkim implantima i utvrdili da je koštana apozicija znatno izraženija na površini Si-HA implanata⁽²⁵⁰⁾. Iako mehanizam kojim joni silicijuma povećavaju *in vitro* i *in vivo* bioaktivnost HA nije u potpunosti razjašnjen, određeni broj istraživanja je obavljen u cilju proučavanja rastvorljivosti HA i Si-HA biomaterijala u *in vivo* uslovima, koja predstavlja ključni faktor za bolje razumevanje pomenutih procesa.

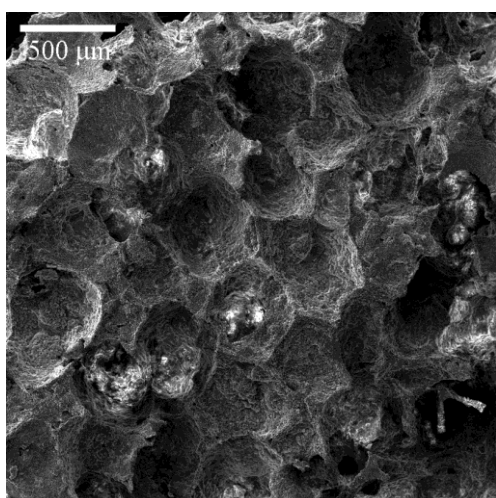
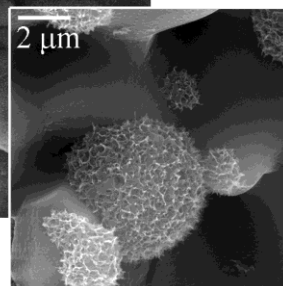
Prva istraživanja koja su se bavila praćenjem koncentracije jona kalcijuma i fosfatnih jona iz HA keramike i koštanog apatita u *in vivo* uslovima su pokazala da proces rastvaranja započinje na dislokacijama i granicama zrna,²⁵¹ dok Wen i saradnici tvrde da struktura na granici zrna ima preovlađujući uticaj na proces rastvaranja bioloških apatita.²⁵² Takođe, u istraživanju Portera i saradnika utvrđeno je da supstitucija silicijuma unutar kristalne rešetke HA povećava broj strukturnih defekata, kao i da rastvorljivost opada sa smanjenjem stepena supstitucije.²⁵³ U slučaju da je stepen bioaktivnosti uzrokovan predloženim mehanizmom rastvaranja i taloženja, pomenuta saznanja, kao i saznanja proistekla iz studije Patela i saradnika ukazuju na to da povećana rastvorljivost Si-HA dovodi do povećanja koštane apozicije u pomenutim biokeramičkim materijalima.²⁵⁰



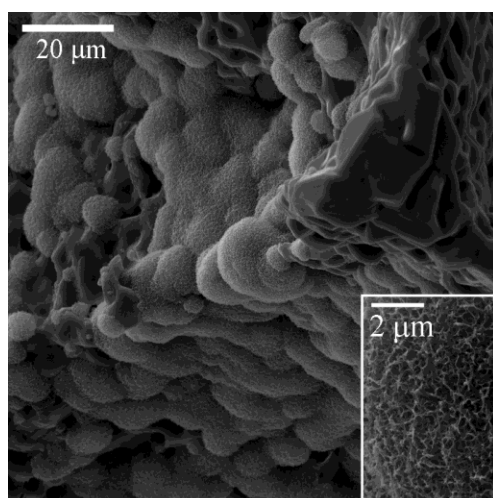
a)



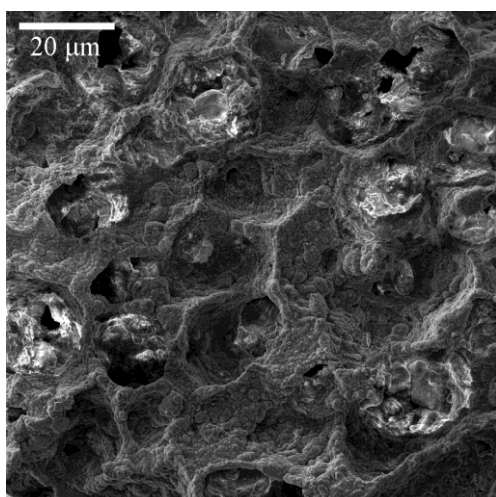
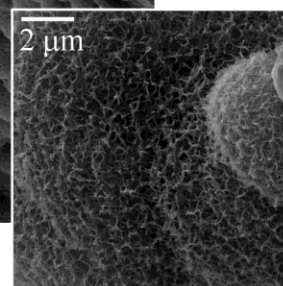
b)



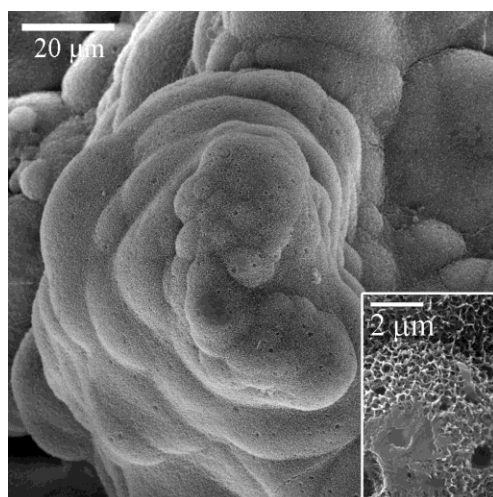
c)



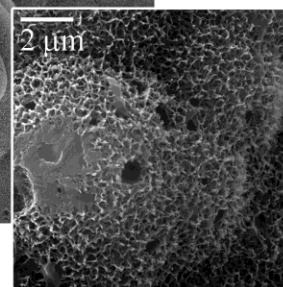
d)



e)



f)



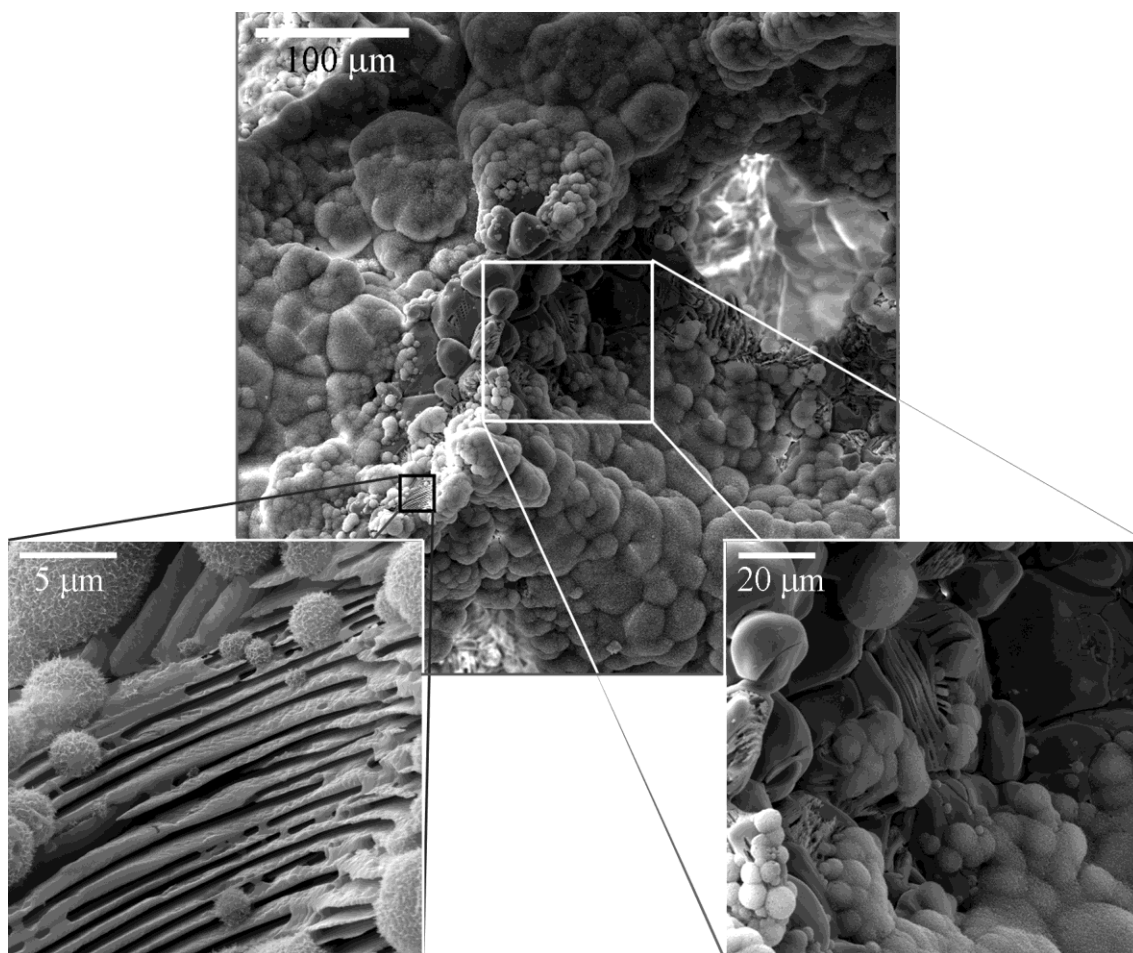
Sl. 10.16. SEM mikrografije skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C tokom 3h nakon 7 dana držanja u SBF-u

Istraživanja su pokazala da postoji i nekoliko drugih mehanizama koji utiču na proces rastvaranja u *in vivo* uslovima.²⁵⁴ Tako npr., razlike u veličini kristala uzrokuju razlike u brzini rastvaranja, što može kasnije usloviti drugačiji ćelijski odgovor.²⁵⁰ Porter i saradnici su potvrdili da na spoju zrna dolazi do rastvaranja malih zrna, što ukazuje da smanjenje veličine zrna povećava rastvorljivost materijala.²⁵³ SEM analiza je pokazala značajno smanjenje veličine zrna u Si-HA u poređenju sa čistim HA. Prema Wu i Nancollasu povećanje rastvorljivosti se može iskazati sledećom jednačinom:²⁵⁵

$$\ln\left(\frac{S_r}{S_\infty}\right) = \frac{2M\gamma_{SL}}{\rho\nu RT} \cdot \frac{1}{r} \quad (10.5)$$

gde S_r predstavlja rastvorljivost čestica poluprečnika r , S_∞ je normalna rastvorljivost (na ravnoj površini), M je molarna masa (502 g/mol), R je gasna konstanta ($=8,314$ J/molK), T je temperatura (310 K), ν predstavlja broj mola jona nastalih iz jednog mola elektrolita ($= 9$) a γ_{SL} je međupovršinski napon ($= 0,01$ J/m²).

Iako vrednost površinskog napona varira od istraživanja do istraživanja, može se izvesti zaključak da povećanje rastvorljivosti od 10 % postiže jedino kod čestica čija je veličina od 1-3 nm.



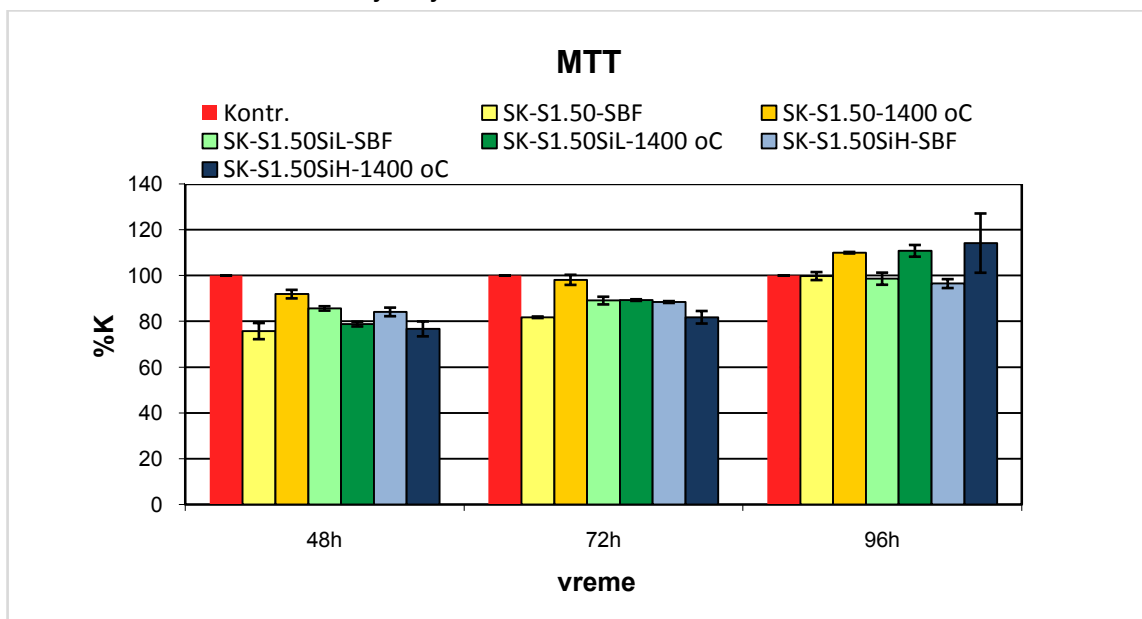
Sl. 10.17. SEM mikrografije površine uzorka skafolda SK-S1.50SiH termički tretiranog 1450°C pri različitim uvećanjima, nakon držanja u SBF-u tokom 7 dana

Interakcije koje se dešavaju između ćelija i skafolda, a koje vode stvaranju novog tkiva u velikoj meri zavise od karakteristika površine i od vrste ćelija koje dolaze u kontakt sa površinom materijala. U cilju ispitivanja ćelijske reakcije na površinu materijala neophodno je sprovesti *in vitro* ispitivanje materijala na odgovarajućim ćelijskim kulturama. Površina skafolda se odlikuje složenom, od procesa dobijanja zavisnom, trodimenzionalnom topografijom koju karakterišu pravilne ili nepravilne mikronske ili nanometarske neravnine. Potvrđeno je da topografija i fizičko-hemijska svojstva površine u značajnoj meri utiču na adsorpciju proteina i kasniju ćelijsku aktivnost, ali je zbog složenosti mehanizam još uvek nedovoljno ispitan.

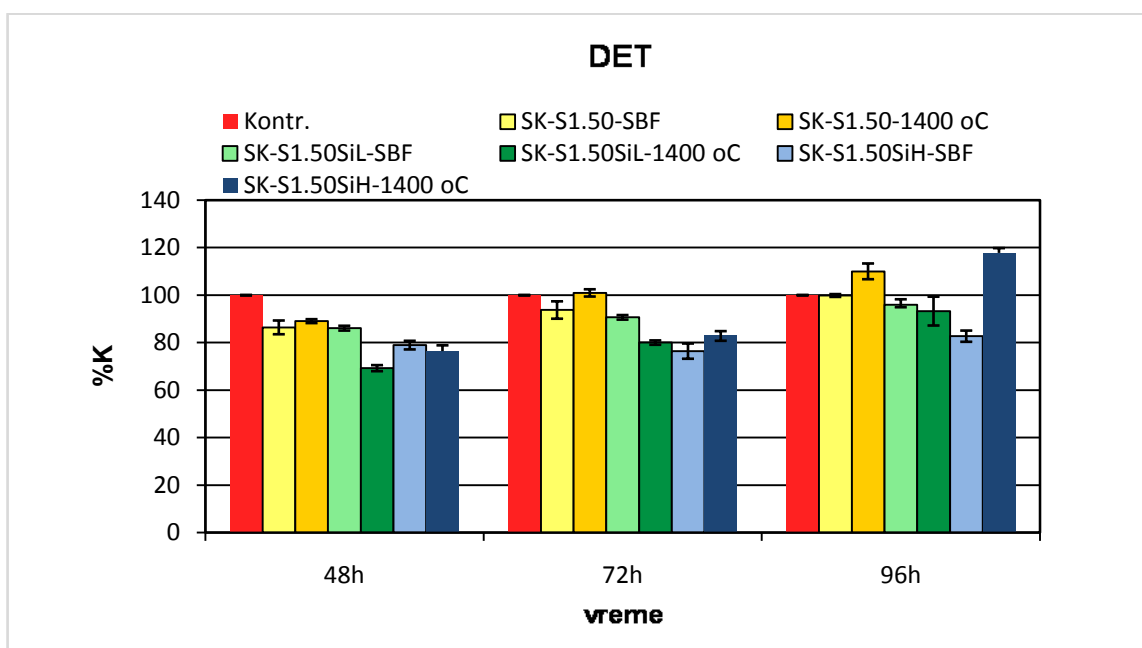
U cilju ispitivanja citotoksičnosti sintetisanih skafolda urađen je test ćelijske proliferacije MTT metodom na ćelijama humanih fibroblasta (MRC-5). Na slici 10.18. prikazani su rezultati MTT analize sprovedene na skafoldima SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH, dobijeni na ćelijskoj liniji humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Poređenjem rezultata dobijenih MTT analizom (Sl. 10.18) može se zaključiti da nakon 48 sati inkubacije najmanju citotoksičnost imaju skafoldi pripremljeni od silicijumom nedopiranih prahova HA (SK-S1.50) sinterovani na 1400 °C. Takođe, uočava se da SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH skafoldi, koji su nakon sinterovanja držani 3 dana u SBF-u, pokazuju manju citotoksičnost u odnosu na sinterovane skafolde. Sa produženjem vremena inkubacije dolazi do povećanja ćelijske proliferacije sinterovanih skafolda SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH u odnosu na iste skafolde koji su nakon sinterovanja držani 3 dana u SBF-u. Poređenjem rezultata MTT analize nakon 48, 72 i 96 h primećuje se da dolazi do povećanja proliferacione moći skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH u odnosu na kontrolni uzorak. Takođe, uočava se i znatno bolja proliferacija ćelija na sinterovanim skafoldima SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH u odnosu na iste skafolde koji su nakon sinterovanja držani 3 dana u SBF-u. Promena bioaktivnosti, izmerene na ispitivanim uzorcima, sa vremenom inkubacije najverovatnije je uzrokovana različitim faznim sastavom skafolda nakon termičkog tretmana na 1400 °C, kao i većom rastvorljivošću α -TCP faze, koja dovodi do povećanja koncentracije jona kalcijuma i fosfatnih jona, što uslovljava bolji ćelijski odgovor.

Na slici 10.19. prikazani su rezultati DET analize skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH dobijeni na ćelijskoj liniji humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Na osnovu dobijenih rezultat DET testa može se uočiti da, kao i kod MTT, testa postoji isti trend rasta bioaktivnosti kod svih uzoraka sa produženjem vremena inkubacije. Takođe, primećuje se nešto manja bioaktivnost sinterovanih skafolda SK-S1.50SiL nakon 96 h inkubacije u odnosu na iste skafolde koji su nakon sinterovanja držani u SBF-u tokom 72 h. Manje neslaganje koje se primećuje upoređivanjem rezultata dobijenih MTT i DET metodom se može objasniti nedostacima DET metode, koja se zasniva na posrednom određivanju vijabilnosti na osnovu integriteta ćelijske membrane. Naime, moguće je da vijabilnost ćelija bude kompromitovana (merenjem kapaciteta rasta ili funkcije) iako se celovitost membrane (pa makar i prolazno) održava i obratno, integritet ćelijske membrane može biti patološki a da je ćelija u stanju da sama sebe repariše i učini potpuno vijabilnom. Drugi potencijalni problem subjektivnog merenja obojenja je da malo obojenje, koje ukazuje na oštećenje, može ostati

neprimećeno ⁽²⁵⁶⁾. Na osnovu rezultata dobijenih MTT i DET analizom može se zaključiti da skafoldi SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH sinterovani na 1400 °C imaju veću bioktivnost od kontrolnog uzorka, dok isti skafoldi nakon držanja u SBF-u pokazuju vrednosti koje su jednake ili bliske vrednosti dobijenoj na kontrolnom uzorku.



Sl. 10.18. MTT analiza ćelija MRC-5 na skafoldima sinterovanim na 1400 °C i skafoldima koji su nakon sinterovanja držani u SBF-u tokom 3 dana

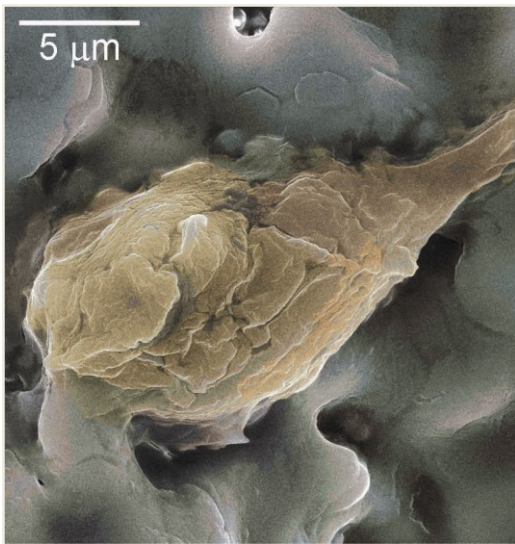


Sl. 10.19. DET analiza ćelija MRC-5 na skafoldima sinterovanim na 1400 °C i skafoldima koji su nakon sinterovanja držani u SBF-u tokom 3 dana

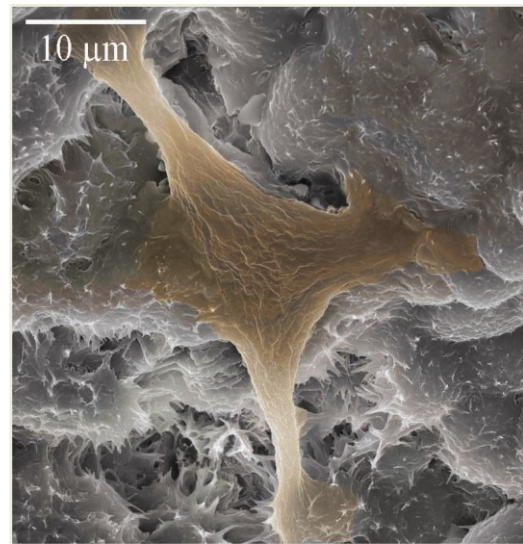
Na slici 10.20. prikazana je proliferacija ćelija humanih fibroblasta pluća (MRC-5) na skafoldima SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH sinterovanim na 1400 °C, kao i na istim skafoldima koji su nakon sinterovanja na 1400 °C držani u SBF-u tokom 72 h.

Dobijeni rezultati MTT i DET analize potvrđeni su SEM analizom (slika 10.20). Na SEM mikrografijama se jasno uočava prisustvo ćelija na površini skafolda. SEM analizom pojedinačnih skafolda primećuje se da se proliferacija fibroblasnih ćelija odvija i na površini i u unutrašnjosti skafolda. Ćelijske interakcije sa površinom materijala predstavljaju vrlo dinamičan proces koji zavisi od velikog broja parametara i koji se odvija u nekoliko faza. Utvrđeno je da ćelije ne reaguju sa površinom dok prethodno ne dođe do kondicioniranja biološkim fluidom, na šta u velikoj meri utiče pH vrednost i jonski sastav rastvora, kao i temperatura i funkcionalne grupe proteina. Adsorpcija proteina predstavlja inicijalni stupanj u interakciji ćelija/materijal, a adsorbovani proteini omogućavaju kontakt između materijala i ćelije. Poređenjem mikrografija sinterovanih skafolda i skafolda koji su bili potopljeni u SBF tokom tri dana može se uočiti da na površini skafolda koji su držani u SBF pre zasejavanja fibroblastnim ćelijama dolazi do formiranja proteinskog sloja.

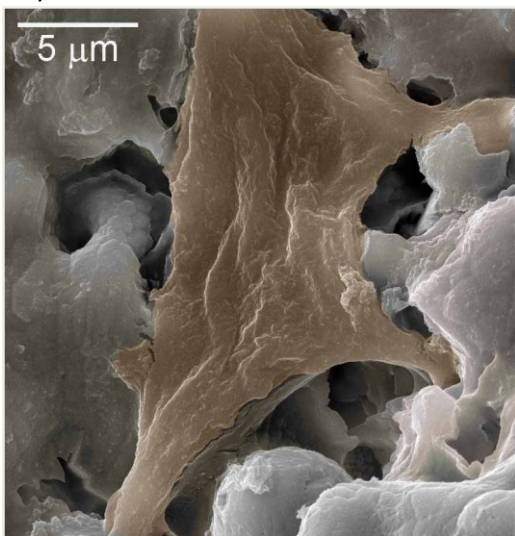
Vezivanje ćelija za površinu primećeno na svim analiziranim skafoldima. Na mikrografijama (Sl. 10.20) se primećuje vezivanje ćelija za površinu materijala na određenim kontaktnim mestima, koja se klasifikuju, u zavisnosti od udaljenosti ćelije od supstrata i prisustva odgovarajućih proteina, kao fokalni kontakti, bliski kontakti i ekstracelularni kontakti matriksa.²³⁷ Vezivanje ćelija predstavlja osnovni uslov koji vodi daljoj proliferaciji i diferencijaciji ćelija. Nakon vezivanja dolazi do širenja ćelija i migracije na površini skafolda. Analizom mikrografija ispitivanih skafolda može se uočiti da na površini skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH, koji su pre zasejavanja fibroblastnim ćelijama držani u SBF-u tokom 72 h, dolazi do formiranja igličastih kristala HA. Formiranje HA nije primećeno na skafoldima koji su zasejavani ćelijama odmah nakon sinterovanja na 1400 °C, sem kod skafolda SK-S1.50SiH, na kome je primetno formiranje igličastih kristalita na površini zrna. Ova razlika, koja je primećena na skafoldu SK-S1.50SiH je najverovatnije posledica velike brzine rastvaranja α -TCP faze, koja predstavlja dominantnu fazu nakon sinterovanja pomenutog skafolda na 1400 °C. Istraživanja su pokazala da ista morfologija površine različito utiče na različite ćelijske linije. Zbog toga, važno je istaći da nije moguće porediti uticaj morfologije na različitim ćelijskim linijama, jer nema precizne definicije strukture površine koja bi trebala biti zadovoljena u *in vitro* ispitivanjima različitih materijala.²³⁷ Razlog za nešto bolju proliferaciju ćelija na skafoldima koji nisu držani u SBF-u nakon sinterovanja najverovatnije leži i u činjenici da se ćelije znatno bolje vežu na površinama sa uniformnijom strukturom, kakvom se može okarakterisati površina sinterovanih skafolda koji nisu držani u SBF-u. Takođe, porast ćelijske proliferacije sa vremenom kod skafolda SK-S1.50SiH može biti objašnjen većom rastvorljivošću α -TCP-a u odnosu na HA, kao i većom koncentracijom silicijuma.



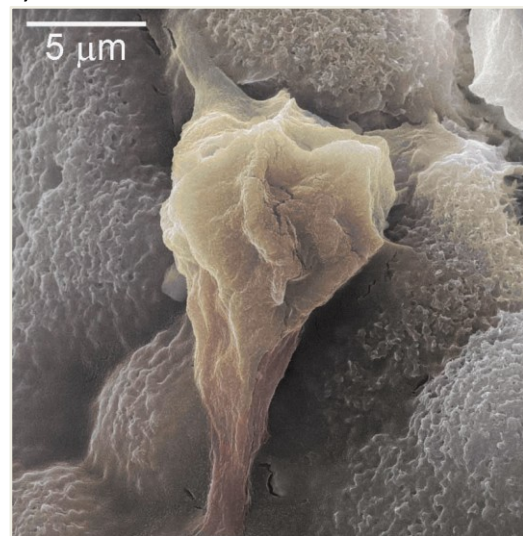
a)



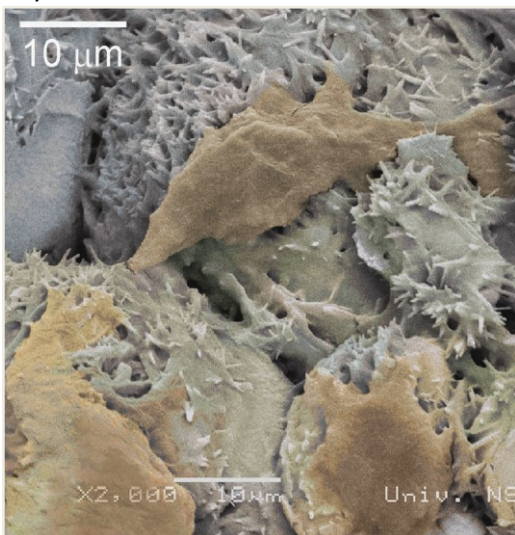
b)



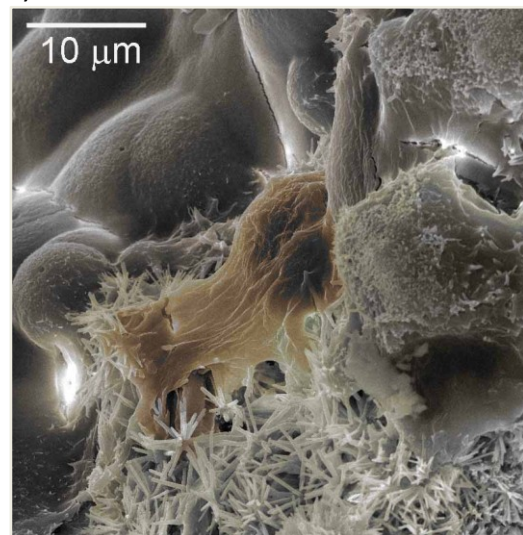
c)



d)



e)



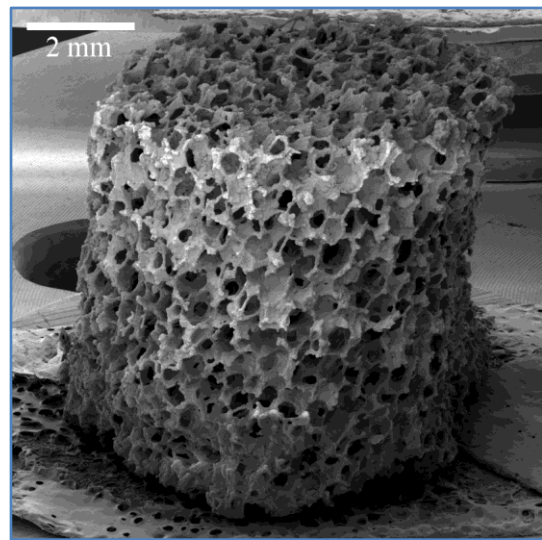
f)

Sl. 10.20. SEM mikrografije ćelija humanih fibroblasta pluća MRC-5 nakon perioda kultivacije od 72 h na površini skafolda: a, b) SK-S1.50, c, d) SK-S1.50SiL i e, f) SK-S1.50SiH sinterovanih na 1400 °C tokom 3h a, c, e) i nakon 3 dana u SBF-u b, d, f)

Na slici 10.21. prikazan je način određivanja pritiskne čvrstoće na skafoldima SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranim tokom 3 h na 1400 i 1450 °C, kao i oblik i dimenzije skafolda korišćenih za ispitivanje. Vrednosti pritiskne čvrstoće skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1400 °C iznose 0,79, 0,83 i 1,84 MPa, a na 1450 °C 3,4, 3,8 i 5,7 MPa, respektivno. Značajno povećanje pritiskne čvrstoće skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH termički tretiranih na 1450 °C u odnosu na iste skafolde termički tretirane na 1400 °C je rezultat smanjene poroznosti unutar zidova skafolda sa povećanjem temperature sinterovanja za 50 °C. Izmerena vrednost pritiskne čvrstoće od 5,7 MPa je znatno veća od vrednosti koja je izmerena na skafoldima od čistog HA (2 MPa) i nešto niže od vrednosti 7,5 MPa, izmerene na skafoldima koji su dobijene metodom elektroraspršivanja.^{227,228}



a)



b)

Sl. 10.21. Prikaz: nosača i silomera od 500N a,) oblika i dimenzija b) skafolda SK-S1.50, SK-S1.50SiL i SK-S1.50SiH korišćenih za određivanje pritiskne čvrstoće

11. Sinteza skafolda modifikovanom tehnikom replike poliuretanskog sunđera

11.1. Eksperimentalna procedura

U cilju dobijanja skafolda sa uniformnom povezanom poroznošću razvijena je nova tehnika kojom se dobija inverzna struktura strukture dobijene korišćenjem tehnike replike sunđera. Za razliku od tradicionalne tehnike replike sunđera, koja se zasniva na potapanju poliuretanskog sunđera u suspenziju, ovde se poliuretanski sunđer prethodno potapa u rastopljeni parafin. Nakon potapanja u parafin koji je prethodno istopljen u sušnici na 150 °C, sunđer se vadi i na toplom staklu valja staklenim štapićem kako bi se iz pora sunđera istisnuo višak parafina. Takav, parafinom prevučen sunđer, se ostavlja nekoliko minuta na vazduhu da bi rastopljeni parafin očvrsnuo, a onda se potapa u suspenziju keramičkog praha. Radi boljeg prodiranja suspenzije u unutrašnjost sunđera, potapanje se vrši u vakumu. Nakon vakumiranja, suspenzijom natopljeni sunđer se ostavlja 24 h da se osuši, ali se za razliku od tradicionalne tehnike replike sunđera iz natopljenog sunđera ne istiskuje višak suspenzije. Nakon sušenja, uzorci su termički tretirani na 800 °C pri brzini zagrevanja od 2 °/min da bi sagoreo poliuretanski sunđer, a onda sinterovani na temperaturi od 1450 °C tokom 3h, pri brzini zagrevanja od 5 ° min⁻¹. Za pripremu suspenzije za dobijanje skafolda korišćene su termički tretirane sferne čestice HA kontrolisane veličine, nedopirane i dopirane različitom količinom silicijuma, iste one koje su korišćene za dobijanje skafolda tradicionalnom tehnikom replike sunđera (Tabela 10.1). Suspenzija je dobijena dispergovanjem sintetisanih prahova (S.150, S1.50SiL i S1.50SiH) u destilovanoj vodi u kojoj je prethodno rastvoren polivinil alkohol (PVA). Suspenzija je homogenizovana u ultrazvučnoj kadi. Dobijeni maseni sastav suspenzije optimalne vrednosti viskoznosti za prekrivanje poliuretanskog sunđera je: 65% vode, 32,5% praha, 2,5% (PVA).

11.2. Metode karakterizacije

Morfologija sintetisanih skafolda je proučavana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju TESCAN Mira3 XMU na 20 kV. Pre SEM analize, praškasti uzorci su napareni legurom Au-Pd.

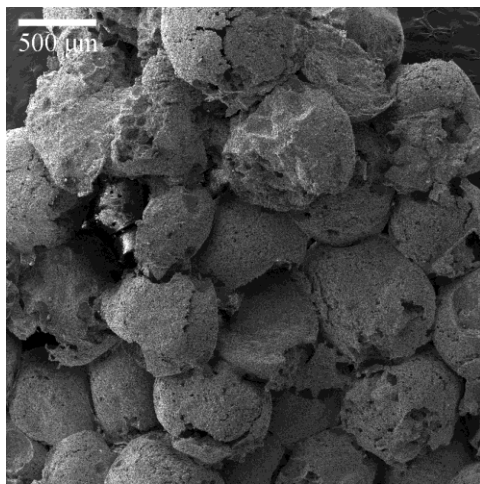
11.3. Rezultati i diskusija

SEM mikrografije skafolda dobijenih modifikovanom tehnikom replike sunđera nakon termičkog tretmana na 1450 °C tokom 3 h prikazani su na slici 11.1. Tokom potapanja parafinom prevučenog poliuretanskog sunđera u suspenziju praha HA, pod vakumom dolazi

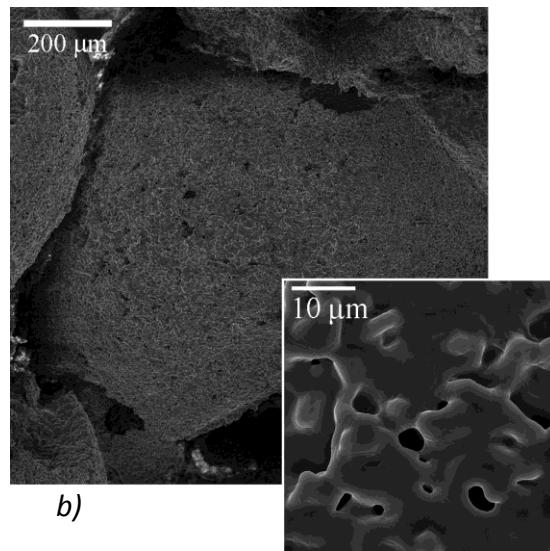
do potpunog ispunjavanja prostora unutar sunđera. Tokom procesa sušenja na sobnoj temperaturi suspenzijom natopljenog sunđera postepeno dolazi do otparavanja vode iz suspenzije, pri čemu se suspenzija zadržava na parafinom prevučenom poliuretanu. Na taj način u šupljinama sunđera se nakon potpunog otparavanja vode formiraju šuplje sfere čiji je spoljašnji prečnik jednak prečniku pora sunđera. Termičkim tretmanom na temperaturama iznad 70 °C dolazi prvo do topljenja parafinskog sloja, a zatim na temperaturama višim od 600 °C i do sagorevanja poliuretanskog sunđera. Daljim tretmanom na temperaturama višim od 1300 °C dolazi do sinterovanja HA. Nakon procesa sinterovanja dobijeni skafoldi imaju izuzetno poroznu strukturu (Sl. 11.1). Na mikrografijama uzoraka se uočava da skafoldi, pored poroznosti koja se javlja unutar samih sfera, imaju i dodatnu poroznost koja nastaje kao posledica topljenja i sagorevanja parafinom impregniranog sunđera. Veličina pora nastala topljenjem i sagorevanjem parafinom impregniranog sunđera se kreće od 200 do 300 µm, što je znatno veće od pora koje bi nastale u slučaju da poliuretanski sunđer nije bio impregniran parafinom. Pored toga, znatno veća i hidrofobna površina parafinskog sloja omogućava formiranje poroznih sfera već tokom procesa sušenja čiji se oblik zadržava i nakon procesa sinterovanja. Na slici 11.1c se na preseku skafolda jasno vidi poroznost unutar formiranih sfera, kao i poroznost koja potiče od sagorevanja parafinom prevučenog poliuretanskog sunđera.

Radi postizanja zadovoljavajućih mehaničkih karakteristika skafoldi su termički tretirani na temperaturama od 1300 do 1450 °C. Na slici 11.1 se uočava da jedino kod skafolda dobijenim od praha S1.50SiH dolazi do potpunog sinterovanja i formiranja zrna veličine 10-40 µm bez vidljivih pora unutar samog zida sfera. Posmatranjem mikrografija skafolda termički tretiranih na istoj temperaturi (Sl. 11.1. b i d) jasno se primećuju mikropore koje su zaostale nakon procesa sinterovanja, bez jasno vidljivog formiranja zrna. Veličina pora unutar samog zida se kreće od 1-5 µm, pri čemu je njihovo prisustvo izraženije kod skafolda dobijenih od praha S1.50. Uočena razlika u mikrostrukturi skafolda dobijenih od praha S1.50, S1.50SiL i S1.50SiH nakon termičkog tretmana na 1450 °C se može objasniti pre svega razlikom u faznom sastavu, što je detaljnije prikazano u 10. poglavlju.

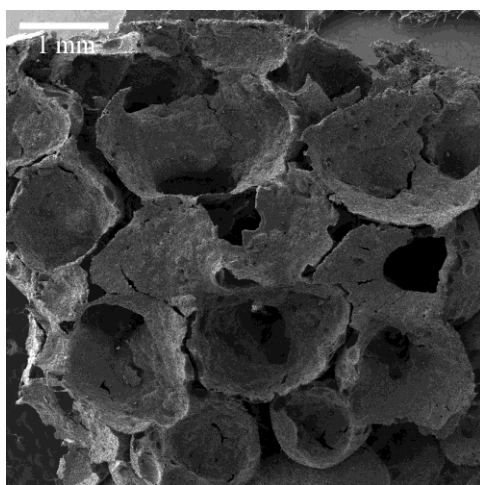
Skafoldi dobijeni korišćenjem modifikovane tehnike replike sunđera, u kojoj je poliuretanski sunđer pre potapanja u suspenziju keramičkog praha impregniran slojem parafina, se odlikuju izuzetno poroznom struktrom koja se kreće od nekoliko mikrometara (pore zaostale unutar zida sfera nakon procesa sinterovanja), pa do nekoliko stotina mikrometara (pore nastale sagorevanjem parafinom impregniranog sunđera). Kontrolom debljine parafinskog sloja i temperature sinterovanja moguće je sprečiti spajanje šupljih sfera koje se formiraju tokom procesa sušenja i sinterovanja. Šuplje sfere kontrolisanog bifaznog sastava α -TCP/HA bi mogle biti korišćenje za ispunu manjih koštanih defekata.



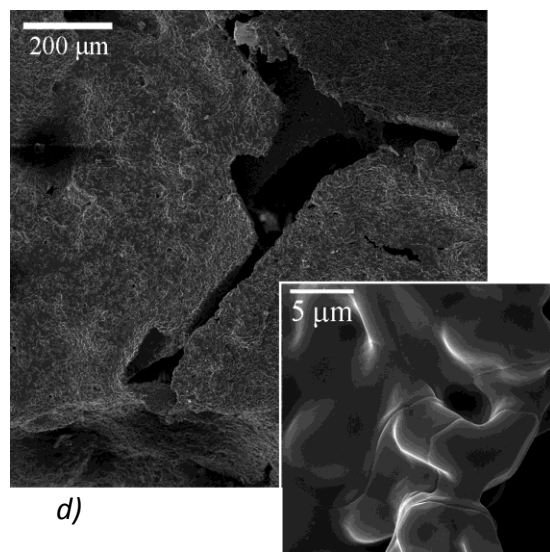
a)



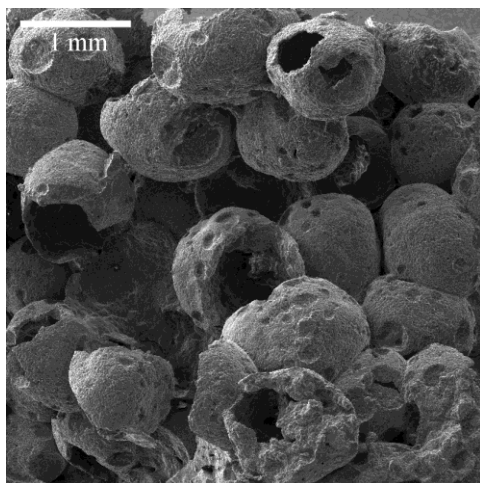
b)



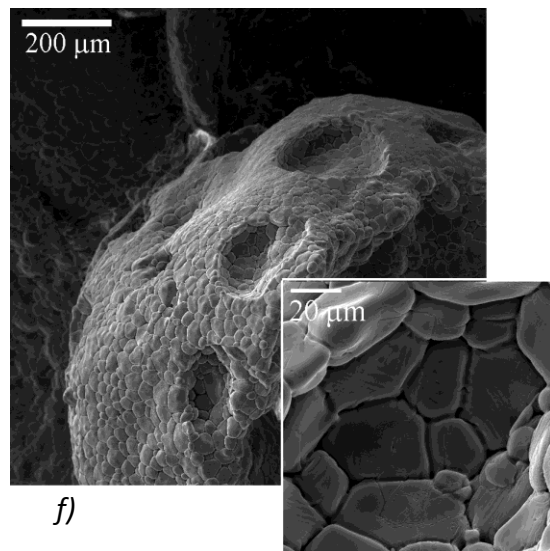
c)



d)



e)



f)

Sl. 11.1. SEM mikrografije skafolda dobijenih modifikovanom tehnikom replike sunđera nakon termičkog tretmana na 1450 °C tokom 3h: a, b) S1.50, c, d) S1.50SiL i e, f) S1.50SiH

12. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije prikazana je sinteza vlakana hidroksiapatita različitog odnosa širina-dužina, hidrotermalnim postupkom na povišenoj temperaturi u direktnoj reakciji između kalcijum-nitrata tetrahidrata i natrijum-dihidrogenfosfata dihidrata uz korišćenje uree kao agensa za homogenu precipitaciju. Utvrđeno je da se vlakna hidroksiapatita razvijaju iz centralne, primarne heksagonalne forme obrazujući makročesticu pahuljaste morfologije.

Utačnjavanje parametara kristalne strukture vlakana hidroksiapatita je potvrdilo preferentnu orijentaciju duž *c*-pravca heksagonalne kristalne strukture, drugačiju od one koja se uobičajeno sreće kod HA sa slučajnom orijentacijom kristalita a TEM analizom pojedinačnih vlakana HA potvrđena je monokristalnu strukturu vlakana.

Pokazano je da je hidrotermalnim postupkom moguće dobiti kristale monetita i hidroksiapatita kontrolisane morfologije i veličine jednostavnim podešavanjem krajnje pH vrednosti rastvora dodatkom odgovarajuće količine uree u polazni rastvor.

U cilju poboljšanja bioaktivnosti hidroksiapatita sintetisan je silicijumom dopirani hidroksiapatit hidrotermalnim postupkom na povišenoj temperaturi. Za dobijanje hidroksiapatita kontrolisane morfologije i hemijskog sastava, bitne za medicinsku primenu HA, primenjena su dva postupka sinteze, polazeći od čestica hidroksiapatita vlaknaste i sferne morfologije različitog Ca/P odnosa.

Silicijumom-supstituisani apatiti dobijeni su pri odnosu Ca/P = 1,50 uz dodatak različitih količina tetraetil-ortosilikata (TEOS), kao izvora jona silicijuma.

Utačnjeni parametri jedinične ćelije dobijenih prahova HA su pokazali da sa povećanjem očekivanog sadržaja silicijuma u uzorcima HA dolazi do povećanje parametra *a* i *c* kod sfernih i trakastih čestica HA sa Ca/P odnosom 1,50, kao posledica zamene PO_4^{3-} anjona unutar kristalne strukture SiO_4^{4-} anjonima. Na difraktogramima uzoraka sferne i trakaste morfologije uočava se različito ponašanje tokom zagrevanja na 1200 °C, koje se ispoljava različitim stepenom transformacije HA u α -TCP fazu.

Rendgenska difrakciona analiza je pokazala da su čestice HA koje kristališu u formi vlakana mnogo stabilnije tokom zagrevanja na temperaturama do 1200 °C u odnosu sferne čestice HA.

Rendgenskom difrakcionom analizom uzorka HA vlaknaste morfologije sintetisanih iz rastvora sa polaznim odnosom Ca/P = 1,67, pored HA faze primećeno je i prisustvo CaO faze u maloj količini. Takođe, rendgenska difrakciona analiza je pokazala da sferne čestice dopirane silicijumom u većoj količini skoro potpuno transformišu u α -TCP fazu. Značajno je da ni na jednom od difraktograma sintetisanih uzoraka nisu uočeni pikovi koji odgovaraju kalcijum-silikatnoj fazi.

Na osnovu *in vitro* ispitivanja i rezultata dobijenih MTS analizom utvrđeno je da su ekstrakti osušenih sfernih čestica, dopiranih ili nedopiranih silicijumom, toksični za ćelije, dok ekstrakti silicijumom dopiranih i nedopiranih vlaknastih čestica hidroksiapatita nisu pokazali takav efekat pri istim uslovima. Pomenuti efekat je prevaziđen žarenjem sfernih čestica HA na 1200 °C tokom 2h. Pored toga, ekstrakti svih termički tretiranih uzoraka hidroksiapatita na 1200 °C su pokazali povećanu biokompatibilnost, osim vlaknastih čestica HA dopiranih silicijumom u većem procentu. Utvrđeno je da sferne i vlaknaste čestice dopirane manjom količinom silicijuma pokazuju biokompatibilnost koja odgovara biokompatibilnosti standardnog materijala korišćenog za razvoj ćelijskih kultura. Različita bioaktivnost koja je uočena na ekstraktima prahova sferne i vlaknaste morfologije je posledica različitog stepena supstitucije silicijumom unutar kristalne strukture sfernih i vlaknastih čestica.

Takođe, na osnovu rezultata LC-MS/MS analize utvrđeno je da je povećana citotoksičnost ekstrakta praha osušenih čestica sferne morfologije na SaOs2 ćelijama posledica prisustva EDTA zaostalog tokom procesa sinteze.

Rezultati citotoksičnosti dobijeni na osnovu morfološke analize ćelija L929 i metaboličke aktivnosti nakon inkubacije u rastvorima sfernih i trakastih čestica HA različite koncentracije (2,5 µg/ml do 250 µg/ml) su pokazali da nijedna od pomenutih koncentracija ispitivanih uzoraka ne deluje citotoksično na L929 ćelije. Naime, pokazalo se da medijum sa najvećom koncentracije sfernih, termički netretiranih čestica stimuliše metaboličku aktivnost L929 ćelija, što se ogleda pre svega u stimulaciji rasta ćelija.

U slučaju kada je ispitivan uticaj kondicionirajućeg medijuma, pripremljenog sa česticama hidroksiapatita, na ćelijskoj kulturi, dobijeni su drugačiji rezultati. Kondicionirajući medijum pripremljen od termički netretiranih čestica se pokazao toksičan u većim koncentracijama što se manifestovalo u značajnom, od koncentracije zavisnom, smanjenju metaboličke aktivnosti L929 ćelija, kao i promenom morfologije ćelija praćene smanjenjem ćelijskog rasta, odvajanju ćelija od površine plastičnog suda, smanjenju zapremine ćelija, kao i degradaciji samih ćelija. Uticaj kondicionirajućeg medijum se pokazao veći u slučaju kada je medijum pripremljen korišćenjem sfernih čestica u odnosu na medijum sa vlaknastim česticama.

Ispitana je mogućnost dobijanja skafolda korišćenjem cementnog praha na bazi silicijumom dopiranog α -TCP, polimetil-metakrilatnih vlakana (PMMA) i rastvora vodonik-peroksida u cilju dobijanja skafolda kontrolisane mikro- i makro-poroznosti, gde je mikro-poroznost kontrolisana količinom dodatog rastvora H₂O₂, a makro-poroznost količinom dodatih PMMA vlakana.

Skafoldi dobijeni nakon očvršćavanja cementne paste u reakciji između silicijumom-dopiranog α -TCP i rastvora vodonik-peroksida imaju uniformnu makroporoznost sa veličinom pora od 50-200 µm i mikroporoznost od 1-2 µm. Skafoldi dobijeni od cementnog praha na bazi silicijumom dopiranog α -TCP, vodonik-peroksida uz dodatak PMMA vlakana imaju uniformnu makroporoznost sa veličinom pora od 50-200 µm, koja se javlja kao posledica

oslobađanja kiseonika tokom razgradnje vodonik-peroksida, kao i pore cilindričnog oblika, prečnika oko 200 μm , nastale naknadnim sagorevanjem vlakana PMMA dodatih u cementnu pastu. Ovako nastale cilindrične pore u znatnoj meri dovode do stvaranja povezane poroznosti. Na zidovima cilindričnih pora se jasno uočavaju mikropore zaostale nakon procesa sinterovanja na 1200 °C. Prednosti ovako dobijenih skafolda se zasnivaju na lakoj pripremi skafolda željenog oblika koji ima zadovoljavajuću čvrstoću i odgovarajuću poroznost nakon vezivanja cementne paste. Takođe, dodavanjem vlakana PMMA moguće je dobiti skafolde znatno veće i povezane poroznosti, ali pomenuti postupak zahteva naknadni termički tretman na temperaturama većim od 800 °C, kako bi se uklonila PMMA vlakna.

In vitro ispitivanje skafolda u SBF-u je pokazalo da fazni sastav i mikrostruktura skafolda pogoduju formiranju nanostrukturnih čestica hidroksiapatita na površini skafolda tokom 7 dana držanja u SBF-u. Rezultati dobijeni merenjem aktivnosti alkalne fosfataze određene na osušenim i termički tretiranim na 1200 °C skafoldima, pripremljenim od sfernih i trakastih, osušenih i termički tretiranih na 1200 °C čestica HA, kao i na skafoldima dobijenim mešanjem pomenutih prahova u odnosu 80-20 mas.% su pokazali znatno bolji ćelijski odgovor skafolda termički tretiranih na 1200 °C u poređenju sa odgovarajućim, termički netretiranim skafoldima.

U devetom poglavlju prikazano je dobijanje skafolda korišćenjem metode replike sundera. Za pripremu suspenzije korišćene u procesu dobijanja skafolda metodom replike sundera korišćene su sferne čestice HA kontrolisane veličine, nedopirane i dopirane različitom količinom silicijuma, termički tretirane na 1150 °C tokom dva sata.

Dopiranje sfernih čestica silicijumom je izvršeno u cilju snižavanja temperature fazne transformacije HA u α -TCP, uz očuvanje sferne morfologije čestica nakon termičkog tretmana. Pomenuta temperatura od 1150 °C je izabrana nakon merenja linearnog skupljanja na termičkom mikroskopu, kao i SEM analize sfernih čestica termički tretiranih na različitim temperaturama. Utvrđeno je da sferne čestice dopirane većom količinom silicijuma transformišu u α -TCP na nižim temperaturama u odnosu na nedopirane čestice i čestice dopirane silicijumom u manjem procentu. Pored toga, cilj dopiranja sfernih čestica HA silicijumom je bio poboljšanje bioaktivnosti prahova, a samim tim i skafolda dobijenih korišćenjem pomenutih prahova. Zahvaljujući ovom postupku sinteze, sferne čestice α -TCP uniformne veličine su dobijene bez procesa mlevenja, koji je neizostavan proces u slučaju kada se α -TCP dobija reakcijama u čvrstoj fazi. U cilju dobijanja skafolda odgovarajućih mehaničkih karakteristika kao i odgovarajućeg faznog sastava prethodno osušeni skafoldi su termički tretirani na 1200, 1300, 1400 i 1450 °C tokom 3h. Ispitivanje mehaničkih karakteristika skafolda je pokazalo da vrednosti pritiska čvrstoće rastu sa povećanjem temperature sinterovanja i koncentracije silicijuma u polaznom prahu od 0,79 MPa, koliko je izmereno na skafoldu pripremljenom od nedopiranih čestica HA i sinterovanom na 1400 °C, pa do 5,7 MPa, koliko je izmereno na skafoldima pripremljenim od silicijumom dopiranih čestica HA i sinterovanim na 1450 °C.

U desetom poglavlju prikazano je dobijanje skafolda modifikovanom tehnikom replike sunđera, koja se zasniva na impregnaciji poliuretanskog sunđera parafinom pre nanošenja suspenzije HA. Korišćenjem napred navedene modifikovane tehnike moguće je dobiti skafolde sa povezanom poroznošću koja odgovara formi poliuretanskog sunđera, stim što se impregnacijom parafinom postiže znatno veći prečnik pora od 200 do 300 μm . Pored toga, znatno veća i hidrofobna površina parafinskog sloja omogućava formiranje poroznih sfera već tokom procesa sušenja, čiji se oblik zadržava i nakon procesa sinterovanja.

Bibliography

1. *In: Normal Structure and Function of Bone*. Steiniche T, Hauge E. M. 2003, Handbook of Histology Methods.
2. *Bone tissue engineering u Developmental Biology of the Skeletal System*. Hollinger J. O, Einhorn T. A, Doll B, Sfeir C. 2005, CRC Press New York.
3. *Molecular biology of the cell*. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Rafi M, Roberts K, Walter P. 2008, Garland Science.
4. *Bone Regeneration and Repair-Biology and Clinical Applications*. Lieberman J. R, Friedlaender G.E. 2005, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
5. *Biomineralization of calcium phosphates*. Dorozhkin S, Eppler M. 2002, Agnew Chem Int Ed, Vol. 41, pp. 3130-46.
6. *Tissue engineering of bone: search for a better scaffold*. Mastrogiacoma M, Muraglia A, Komlev V, Peryin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. 2005, Orthod Craniofacial Res, Vol. 8, pp. 277-84.
7. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elliot J. 1994, New York: Elsevier.
8. *Silicon substituted hydroxyapatites: a method to upgrade calcium phosphate based implants*. Vallet-Regi M, Arcos D. 2005, J Mater Chem, Vol. 15, pp. 1509-16.
9. *A bound form of Si in glycosaminoglycans and polyuronides*. Schwarz K. 1973, Proc Nat Acad Sci USA, Vol. 70, pp. 1608-12.
10. *Si: a possible factor in bone calcification*. Carlise E. 1970, Science, Vol. 167, pp. 279-80.
11. *Effects of silicate ions on the formation and transformation of calcium phosphates in neutral aqueous solutions*. Tanizawa Y, Suzuki T. 1995, J Chem Soc Faraday Trans, Vol. 91, p. 3499-3503.
12. *Silica-induced precipitation of calcium phosphate in the presence of inhibitors of hydroxyapatite formation*. Damen J, Ten Cate J. 1992, J Dent Res, Vol. 71, pp. 453-7.
13. *Si: an essential element for the chick*. Carlise E. 1972, Science, Vol. 178, pp. 619-21.
14. *Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in Si deficiency*. Carlise E. 1979, J Nutr, Vol. 110, pp. 1046-55.
15. *Growth promoting effects of Si in rats*. Schwarz K, Milne D. 1972, Nature, Vol. 239, pp. 333-4.
16. *Si deprivation decreases collagen formation in wounds, bone and ornithine transaminase enzyme activity in liver*. Seaborn C, Nielson F. 2002, Biol Trace Elem Res, Vol. 89, pp. 251-61.
17. *The nutritional essentiality of silicon*. Carlise E. 1982, Nutr Rev, Vol. 40, pp. 193-8.
18. *Silicon as an essential trace element in animal nutrition*. Carlise E. 1986, Ciba Found Symp, Vol. 121, pp. 123-39.
19. *Silicon as a trace nutrient*. Carlise E. 1988, Sci Total Environ, Vol. 73, pp. 95-106.

20. *Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort.* Jugdaohsingh R, Tucker K, Qiau N, Cupples L, Kiel D, Powell J. 2004, *J Bone Miner Res*, Vol. 19, pp. 297-307.
21. *Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage.* Calomme M, Vanden-Berghe D. 1997, *Biol Trace Elem Res*, Vol. 56, pp. 153-65.
22. *Short term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats.* Hott M. 1993, *Cal Tiss Inter*, Vol. 53, pp. 174-9.
23. *Dietary Si affects bone turnover and differentiation in ovariectomized and sham operated growing rats.* Nielson F, Poellot R. 2004, *J Trace Elements Exp Med*, Vol. 17, pp. 137-49.
24. *Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro.* Reffitt D, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H, Evans B, Thompson R, i dr. 2003, *Bone*, Vol. 32, pp. 127-35.
25. *Zeolite A increases proliferation, differentiation and TGF-beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro.* Keeting P, Oursler M, Wiegand K, Bonde S, Spelsberg T, Riggs B. 1992, *J Biomed Mater Res*, Vol. 7, pp. 1281-9.
26. *Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution.* Xynos I, Edgar A, Buttery D, Hench L, Polak J. 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 55, pp. 151-7.
27. *The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production.* Valerio P, Pereira M, Goes A, Leite M. 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2941-8.
28. *Silicon doped hydroxyapatite.* Ruys A. 1993, *J Aust Ceram Soc*, Vol. 29, pp. 71-78.
29. *Effect of Si content on the chemical and phase composition of novel Si substituted hydroxyapatites.* Gibson I, Jha L, Santos J, Best S, Bonfield W. 1998, In: LeGeros RaL JP, editor, *Bioceramics*, pp. 105-108.
30. *Chemical characterization of silicon substituted hydroxyapatite.* Gibson I, Best S, Bonfield W. 1999, *J Biomed Mater Res*, Vol. 44, pp. 422-8.
31. *Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite.* Gibson I, Best S, Bonfield W. 2002, *J Am Ceram Soc*, Vol. 85, pp. 2771-7.
32. *Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviours.* Kim S, Lee J, Kim Y, Riu D, Jung S, Lee Y, i dr. 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 1389-98.
33. *Phase formation and evolution in the silicon substituted tri-calcium phosphate/apatite system.* Reid J, Pietak A, Sayer M, Dunfield D, Smith T. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 2887-987.
34. *Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted alpha-tricalcium phosphate.* Reid J, Tuck L, Sayer M, Fargo K, Hendry J. 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2916-25.
35. *Bioactive ceramic composites sintered from hydroxyapatite and silica at 1200 °C: preparation, microstructures and in vitro bone-layer growth.* Li X, Yasuda H, Umakoshi Y. 2006, *J Mater Sci Mater Med*, Vol. 17, pp. 573-81.

36. *Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted hydroxyapatite cement.* Camire C, Saint-Jean S, Mochales C, Nevsten P, Wang J, Lidgren L, et al. 2006, Wiley Interscience, New York.
37. *Synthesis of phosphate–silicate apatites at atmospheric pressure.* Boyer L, Carpena J, Lacout J. 1997, Sol State Ionics, Vol. 95, pp. 121-9.
38. *Obtention of silicon-substituted calcium deficient hydroxyapatite by dry mechanosynthesis.* Mochales C, El Briah-BenAbdeslam M, Ginebra M, Boudeville P, Planell J. 200, Key Eng Mater, Vols. 254–256, pp. 107-110.
39. *Structural characterization of siliconsubstituted hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method.* Tang X, Xiao X, Liu R. 2005, Mater Lett, Vol. 59, pp. 3841-6.
40. *Si, Zn modified tricalcium phosphates: a phase composition and crystal structure study.* Wei X, Akinc M. 2005, Key Eng Mater, Vols. 284–286, pp. 83–6.
41. *α -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature.* Durucan C., Brown P.W. . 2000, J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 11, pp. 365–71.
42. *Structures of Biological Minerals in Dental Research.* Mathew M., Takagy S. . 2001, J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., Vol. 106, pp. 1035–1044.
43. *Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization.* Langstaff S, Sayer M, Smith T, Pugh S, Hesp S, Thompson W. 1999, Biomaterials, Vol. 20, pp. 1727-41.
44. *Structure and composition of silicon stabilized tricalcium phosphate.* Sayer M, Stratilatov A, Reid J, Calderin L, Stott M, Yin X, et al. 2002, Biomaterials, Vol. 24, pp. 369-82.
45. *Silicon incorporation in hydroxyapatite obtained by controlled crystallization.* Arcos D, Rodriguez-Carvajal J, Vallet-Regi M. 2004, Chem Matter, Vol. 16, pp. 2300-8.
46. *Structural analysis of Si substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photo photoelectron.* Botelho C, Lopez M, Gibson I, Best S, Santos J. 2002, J Mater Sci Mater Med, Vol. 13, pp. 1123–7.
47. *Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite.* . Leventouri T, Bunaciu C, Perdikatsis V. 2003, Biomaterials, Vol. 24, pp. 4205–11.
48. *The effect of silicon incorporation on hydroxyapatite structure. A neutron diffraction study.* Arcos D, Rodriguez-Carvajal J, Vallet-Regi M. 2004, Solid State Sci, Vol. 6, pp. 987–94.
49. *Chemical Characterisation of Silicon-substituted Hydroxyapatite.* Gibson I.R, Best S.M, Bonfield W. 1999, J Biomed Mat Res., Vol. 44, pp. 422–8.
50. *Composition and crystal structure of resorbable calcium phosphate thin films.* Tuck L, Sayer M, Dunfield D, Mackenzie M, Hadermann J, Pietak A, i dr. 2005, J Mater Sci, Vol. 41, pp. 4273-84.
51. *Ab-initio simulation of Si doped hydroxyapatite.* Astala R, Calderin L, Yin X, Stott M. 2006, Chem Mater.
52. *Theoretical insights into bone grafting silicon stabilized alpha tricalcium phosphate.* Yin X, Stott M. 2005, J Chem Phys, Vol. 122.

53. *Surface and adsorption properties of alpha tricalcium phosphate.* Yin X, Stott M. 2006, J Chem Phys, Vol. 124.
54. *Ab initio total energy calculations for extremely large systems.* Stich I, Payne M, King-Smith R, Lin J. 1992, Phys Rev Lett, Vol. 68.
55. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Elsevier.* J.C. Elliott. 1994, pp. 169-179.
56. *Triclinic oxyhydroxyapatite.* Alberius-Henning P, Aldolfsson E, Grins J, Fitch A. 2001, J Mater Sci, Vol. 36, pp. 663–8.
57. *First principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption.* Astala R, Stott M. 2006 [submitted], J Chem Phys.
58. *Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone.* De Aza P, Luklinska Z, Martinez A, Anseau M, Guitan F, De Aza S. 2000, J Microsc, Vol. 197, pp. 60–8.
59. *Comparison of osteoblast-like cell responses to calcium silicate and tricalcium phosphate ceramics in vitro.* Siyu N, Chang J, Chou L, Zhai W. 2006, J Biomed Mater Res B, Vol. 80, pp. 174–83.
60. *Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds.* Hing K.A, Revell P.A, Smith N, Buckland T. 2006, Biomaterials, Vol. 27, pp. 5014–26.
61. *Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate.* Mastrogiacoma M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, et al. 2006, Tissue Eng, Vol. 12, pp. 1261–73.
62. *Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite.* Botelho C, Brooks R, Spence G, McFarlane I, Lopes M, Best S, et al. 2006, J Biomed Mater Res A, Vol. 78, pp. 709–20.
63. *A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules.* Patel N, Best S, Bonfield W, Gibson I, Hing K, Damien E, et al. 2002, J Mater Sci Mater Med, Vol. 13, pp. 1199–206.
64. *Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response.* Langstaff S, Sayer M, Smith T, Pugh S, Hesp S, Thompson W. 2001, Biomaterials, Vol. 22, pp. 135–50.
65. *Si excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone.* Lai W, Garino J, Ducheyne P. 2002, Biomaterials, Vol. 23, pp. 213–7.
66. *Quantitative measures of osteoinductivity of a porous poly(propylene fumarate) bone graft extender.* Lewandrowski K.U, Hile D.D, Thompson B.M, Wise D.L, Tomford W.W, Trantolo D.J. 1, 2003, Tissue Eng, Vol. 9, pp. 85–93.
67. *Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5).* Yuan H, de Bruijn J.D, Zhang X, van Blitterswijk C.A, de Groot K. 3, 2001, J Biomed Mater Res, Vol. 58, pp. 270–6.
68. *Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds in vitro.* Cartmell S, Huynh K, Lin A, Nagaraja S, Guldberg R. 1, 2004, J Biomed Mater Res A, Vol. 69, pp. 97–104.

69. *Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds.* Lin A.S, Barrows T.H, Cartmell S.H, Guldborg R.E. 3, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 481–9.
70. *Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering.* Xynos I.D, Hukkanen M.V, Batten J.J, Buttery L.D, Hench L.L, Polak J.M. 4, 2000, *Calcif Tissue Int*, Vol. 67, pp. 321–9.
71. *Bioactive sol–gel foams for tissue repair.* Sepulveda P, Jones J.R, Hench LL. 2, 2002, *J Biomed Mater Res*, Vol. 59, pp. 340–8.
72. *Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells.* van den Dolder J, Farber E, Spauwen P.H, Jansen JA. 10, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 1745–50.
73. *Preparation and analysis of macroporous TiO₂ films on Ti surfaces for bone-tissue implants.* Akin F.A, Zreiqat H, Jordan S, Wijesundara M.B, Hanley L. 4, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 57, pp. 588–96.
74. *Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature.* Rubin J.P, Yaremchuk M.J. 5, 1997, *Plast Reconstr Surg*, Vol. 100, pp. 1336–53.
75. *In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin.* Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. 1999, *J Biomed Mater Res*, Vols. 382–9.
76. *Macrophage responses to silk.* Panilaitis B, Altman G.H, Chen J, Jin H.J, Karageorgiou V, Kaplan D.L. 18, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 3079–85.
77. *Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification.* Yang X.B, Roach H.I, Clarke N.M, Howdle S.M, Quirk R, Shakesheff K.M, et al. 6, 2001, *Bone*, Vol. 29, pp. 523–31.
78. *Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics.* 2007, *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 4023–4032.
79. *Benefit and risk in tissue engineering.* Williams D. 2004, *Mater Today*, Vol. 7, pp. 24–9.
80. *Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments.* Mano J.F, Sousa R.A, Boesel L.F, Neves N.M, Reis R.L. 2004, *Compos Sci Technol*, Vol. 64, pp. 789–817.
81. *Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences.* Drotleff S, Lungwitz U, Breunig M, Dennis A, Blunk T, Tessmar J. 2004, *Eur J Pharm Biopharm*, Vol. 58, pp. 385–407.
82. *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants.* Suchanek W, Yoshimura M. 1998, *J Mater Res*, Vol. 13, pp. 94–117.
83. *Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations.* Groeneveld E.H, van den Bergh J.P, Holzmann P, ten Bruggenkate C.M, Tuinzing D.B, Burger E.H. 4, 1999, *J Biomed Mater Res*, Vol. 48, pp. 393–402.
84. *Form and function of bone.* Kaplan F.S, Hayes W.C, Keaveny T.M, Boskey A, Einhorn T.A, Iannotti J.P. 1994, In: Simon SR, editor. *Orthopaedic basic science*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, pp. 128–84.

85. *Biomechanics of trabecular bone*. Keaveny T.M, Morgan E.F, Niebur G.L, Yeh O.C. 2001, *Annu Rev BiomedEng*, Vol. 3, pp. 307–33.
86. *The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei*. Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier P.J. 2004, *Bone*, pp. 783–9.
87. *Tensile yieldin compact bone is determined by strain, post-yieldbehavio ur by mineral content*. Currey J.D. 2004, *J Biomech*, pp. 549–56.
88. *Bioresorbable polymers in trauma andbone surgery*. Gogolewski S. 4, 2000, *Injury*, Vol. 31, pp. 28-32.
89. *Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques*. Roy T.D, Simon J.L, Ricci J.L, Rekow E.D, Thompson V.P, Parsons J.R. 2, 2003, *J BiomedMater Res A*, Vol. 66, pp. 283–91.
90. *Absorbable devices in the fixation of fractures*. Rokkanen P, Bostman O, Vainionpaa S, Makela E.A, Hirvensalo E, Partio E.K, et al. 3, 1996, *J Trauma*, Vol. 40, pp. S123–7.
91. *Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft*. Coombes A.G, Meikle M.C. 1, 1994, *Clin Mater*, Vol. 17, pp. 35–67.
92. *Stainless steel in bone surgery*. Disegi J.A, Eschbach L. 4, 2000, *Injury*, Vol. 31, pp. 2–6.
93. *Mechanical properties of implantable biomaterials*. Meaney D.F. 3, 1995, *Clin Podiatr Med Surg*, Vol. 12, pp. 363–84.
94. *Biomechanical properties of calvarium prosthesis*. Park H.K, Dujovny M, Agner C, Diaz F.G. 2-3, 2001, *Neurol Res*, Vol. 23, pp. 267–76.
95. *Unalloyed titanium for implants in bone surgery*. Pohler O.E. 4, 2000, *Injury*, Vol. 31, pp. 7–13.
96. *Art of replacing craniofacial bone defects*. Rah D.K. 6, 2000, *Yonsei Med J*, Vol. 41, pp. 756–65.
97. *Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation*. Berven S, Tay B.K, Kleinstueck F.S, Bradford D.S. 2, 2001, *Eur Spine J*, Vol. 10, pp. S169–77.
98. *Tools for tissue engineering of mineralizedoral structures*. Dard M, Sewing A, Meyer J, Verrier S, Roessler S, Scharnweber D. 2, 2000, *Clin Oral Investig*, Vol. 4, pp. 126–9.
99. *Bioactive factors and biosynthetic materials in bone grafting*. Hollinger J.O, Seyfer A.E. 3, 1994, *Clin Plast Surg*, Vol. 21, pp. 415–8.
100. *Recombinant bone morphogenetic proteins: novel substances for enhancing bone healing*. Kirker-Head C.A. 5, 1995, *Vet Surg*, Vol. 24, pp. 408–19.
101. *Cytokine delivery and tissue engineering*. Lee S.J. 6, 2000, *Yonsei Med J*, Vol. 41, pp. 704–19.
102. *Composition options for tissue-engineeredbone*. Orban J.M, Marra K.G, Hollinger J.O. 4, 2002, *Tissue Eng*, Vol. 8, pp. 529–39.
103. *Tissue regeneration basedon growth factor release*. Tabata Y. 1, 2003, *Tissue Eng*, Vol. 9, pp. S5–S15.
104. *Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review*. Zellin G, Hedner E, Linde A. 1-4, 1996, *Connect Tissue Res*, Vol. 35, pp. 279–84.

105. *Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold.* Warren S.M, Nacamuli R.K, Song H.M, Longaker M.T. 1, 2004, J Craniofac Surg, Vol. 15, pp. 34–7.
106. *Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs.* Ringe J, Kaps C, Burmester G.R, Sittinger M. 8, 2002, Naturwissenschaften, Vol. 29, pp. 338–51.
107. *Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair.* Noel D, Djouad F, Jorgense C. 7, 2002, Curr Opin Investig Drugs, Vol. 3, pp. 1000–4.
108. *New perspectives in mercury porosimetry.* Leon C.A. 1998, Adv Colloid Interface Sci, Vols. 76-77, pp. 341–72.
109. *BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis.* Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, i dr. 2, 1998, J Biomed Mater Res, Vol. 39, pp. 190–9.
110. *In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating.* Story B.J, Wagner W.R, Gaisser D.M, Cook S.D, Rust-Dawicki A.M. 6, 1998, Int J Oral Maxillofac Implants, Vol. 13, pp. 749–57.
111. *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses.* Hulbert S.F, Young F.A, Mathews R.S, Klawitter J.J, Talbert C.D, Stelling F.H. 3, 1970, J Biomed Mater Res, Vol. 4, pp. 433–56.
112. *Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits.* Itala A.I, Ylanen H.O, Ekholm C, Karlsson K.H, Aro H.T. s.l. : 58, 2001, J Biomed Mater Res, Vol. 6, pp. 679–83.
113. *Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures.* Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh W.R. 2000, J Biomed Mater Res, pp. 15–22.
114. *Effect of flexibility of the femoral stem on bone remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement.* Harvey E.J, Bobyn J.D, Tanzer M, Stackpool G.J, Krygier J.J, Hacking S.A. 1, 1999, J Bone Joint Surg Am, Vol. 81, pp. 93–107.
115. *Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants.* Chang Y.S, Gu H.O, Kobayashi M, Oka M. 7, 1998, J Arthroplasty, Vol. 13, pp. 816–25.
116. *Bone response to implant surface morphology.* D’Lima D.D, Lemperle S.M, Chen P.C, Holmes R.E, Colwell Jr C.W. 8, 1998, J Arthroplasty, Vol. 13, pp. 928–34.
117. *Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides.* Sul Y.T, Johansson C.B, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. 3, 2002, Clin Oral Implants Res, Vol. 13, pp. 252–9.
118. *Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodized implants.* Sul Y.T, Johansson C.B, Roser K, Albrektsson T. 8, 2002, Biomaterials, Vol. 23, pp. 1809–17.
119. *Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition.* Sul Y.T, Johansson C.B, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, i dr. 2, 2002, Biomaterials, Vol. 23, pp. 491–501.

120. *The biologic tissue responses to uncoated and coated implanted biomaterials.* Steflik D.E, Corpe R.S, Young T.R, Sisk A.L, Parr G.R. 1999, *Adv Dent Res*, pp. 27–33.
121. *A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics.* Yuan H, Kurashina K, de Bruijn J.D, Li Y, de Groot K, Zhang X. 19, 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, p. *Biomaterials* 1999;20(19):.
122. *Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect.* Simon J.L, Roy T.D, Parsons J.R, Rekow E.D, Thompson V.P, Kemnitzer J, et al. 2, 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 66, pp. 275–82.
123. *Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems.* Hu Y, Grainger D.W, Winn S.R, Hollinger J.O. 3, 2002, *J Biomed Mater Res*, Vol. 59, pp. 563–72.
124. *Resorbable defect analog PLGA scaffolds using CO₂ as solvent: structural characterization.* Maspero F.A, Ruffieux K, Muller B, Wintermantel E. 1, 2002, *J Biomed Mater Res*, Vol. 62, pp. 89–98.
125. *Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery.* Kim H.W, Knowles J.C, Kim H.E. 7-8, 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 1279–87.
126. *In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells.* Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. 2, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 57, pp. 208–16.
127. *Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system.* Botchwey E.A, Pollack S.R, Levine E.M, Laurencin C.T. 2, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 55, pp. 242–53.
128. *Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates.* Chen G, Ushida T, Tateishi T. 1, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 57, pp. 8-14.
129. *Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method.* Oh S.H, Kang S.G, Kim E.S, Cho S.H, Lee J.H. 22, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4011–21.
130. *Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure–bioactivity relationship.* El-Ghannam A.R. 3, 2004, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 69, pp. 490–501.
131. *Biomimetic nano-apatite coating capable of promoting bone ingrowth.* Li P. 1, 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 66, pp. 79–85.
132. *Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin.* Nazarov R, Jin H.J, Kaplan D.L. 3, 2004, *Biomacromolecules*, Vol. 5, pp. 718–26.
133. *Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology.* Zhang R, Ma P.X. 4, 1999, *J Biomed Mater Res*, Vol. 44, pp. 446–55.
134. *Preparation and histological evaluation of biomimetic three dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds.* Zhao F, Yin Y, Lu W.W, Leong J.C, Zhang W, Zhang J, et al. 15, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3227–34.

135. *Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro.* Akay G, Birch M.A, Bokhari M.A. 2004.
136. *Characterization of CO3Ap-collagen sponges using X-ray high-resolution microtomography.* Itoh M, Shimazu A, Hirata I, Yoshida Y, Shintani H, Okazaki M. 13, 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2577–83.
137. *Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.* Takahashi Y, Tabata Y. 1, 2004, *J Biomater Sci Polym Ed*, Vol. 15, pp. 41–57.
138. *Developing porosity of poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft substitutes and the effect on osteointegration: a preliminary histology study in rats.* Lewandrowski K.U, Gresser J.D, Bondre S, Silva A.E, Wise D.L, Trantolo D.J. 8, 2000, *J Biomater Sci Polym Ed*, Vol. 11, pp. 879–89.
139. *Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architecture.* Chu T.M, Orton D.G, Hollister S.J, Feinberg S.E, Halloran J.W. 5, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 1283–93.
140. *Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats.* Kruyt M.C, de Bruijn J.D, Wilson C.E, Oner F.C, van Blitterswijk C.A, Verbout A.J, i dr. 2, 2003, *Tissue Eng*, Vol. 9, pp. 327–36.
141. *Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight bearing nickel-titanium bone graft substitute.* Kujala S, Ryhanen J, Danilov A, Tuukkanen J. 25, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4691–7.
142. *Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model.* Fisher J.P, Vehof J.W, Dean D, van der Waerden J.P, Holland T.A, Mikos A.G, i dr. 3, 2002, *J Biomed Mater Res*, Vol. 59, pp. 547–56.
143. *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis.* Kuboki Y, Jin Q, Takita H. 2001, *J Bone Joint Surg Am*, Vol. 83A(Suppl. 1(Pt 2));, pp. S105–15.
144. *Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP induced osteogenesis.* Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. 2, 1997, *J Biochem (Tokyo)*, Vol. 121, pp. 317–24.
145. *Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants.* Gotz H.E, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben R.G, Stangl R. 18, 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 4057–64.
146. *An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration.* Liu L.S, Thompson A.Y, Heidaran M.A, Poser J.W, Spiro R.C. 12, 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 1097–108.
147. *Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks.* Ayers R.A, Simske S.J, Bateman T.A, Petkus A, Sachdeva R.L, Gyunter V.E. 1, 1999, *J Biomed Mater Res*, Vol. 45, pp. 42–7.
148. *Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation.* Jin Q.M, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. 3, 2000, *J Biomed Mater Res*, Vol. 51, pp. 491–9.

149. *Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis.* Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. 2-3, 2002, *Connect Tissue Res*, Vol. 43, pp. 529–34.
150. *Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair.* Borden M, El-Amin S.F, Attawia M, Laurencin C.T. 4, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 597–609.
151. *An initial investigation of photocurable three-dimensional lactic acid based scaffolds in a critical-sized cranial defect.* Burdick J.A, Frankel D, Dernell W.S, Anseth K.S. 9, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 1613–20.
152. *An investigation of the cytotoxicity and histocompatibility of in situ forming lactic acid based orthopedic biomaterials.* Burdick J.A, Padera R.F, Huang J.V, Anseth K.S. 5, 2002, *J Biomed Mater Res*, Vol. 63, pp. 484–91.
153. *Synthesis and properties of photocross-linked poly(propylene fumarate) scaffolds.* Fisher J.P, Holland T.A, Dean D, Engel P.S, Mikos A.G. 6, 2001, *J Biomater Sci Polym Ed*, Vol. 12, pp. 673–87.
154. *Poly(ethylene glycol) block copolymers.* Tirelli N, Lutolf M.P, Napoli A, Hubbell J.A. 2002, *Rev Mol Biotechnol*, Vol. 90, pp. 3–15.
155. *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.* Berger J, Reist M, Mayer J.M, Felt O, Peppas N.A, Gurny R. 1, 2004, *Eur J Pharm Biopharm*, Vol. 57, pp. 19–34.
156. *Bioceramics.* Hench L.L. 7, 1998, *J Am Ceram Soc*, Vol. 81, pp. 1705–28.
157. *Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass(R) composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications.* Boccaccini A.R, Blaker J.J, Maquet V, Day R.M, Jerome R. 2005, *Mater Sci Eng C*, Vol. 25, pp. 23–31.
158. *In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds.* Hedberg E.L, Shih C.K, Lemoine J.J, Timmer M.D, Liebschner M.A.K, Jansen J.A. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 3215–25.
159. *Processing and properties of porous poly(L-lactide)/bioactive glass composites.* Zhang K, Wang Y, Hillmayer M.A, Francis L.F. 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2489–500.
160. *In vitro and in vivo behavior of self-reinforced bioabsorbable polymer and self-reinforced bioabsorbable polymer/bioactive glass composites.* Niiranen H, Pyhalto T, Rokkanen P, Kellomaki M, Tormala P. 2004, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 69A, pp. 699–708.
161. *The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly(lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering.* Yao J, Radin S, Leboy P.S, Ducheyne P. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 1935–43.
162. *Biodegradable drug delivery system for the treatment of bone infection and repair.* Di Silvio L, Bonfield W. 1999, *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 10, pp. 653–8.
163. *Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering.* Di Martino A, Sittlinger M, Risbud M.V. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5983–90.

164. *Study of gelatin containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method.* Lee S.B, Kim Y.H, Chong M.S, Hong S.H, Lee Y.M. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 1961–8.
165. *The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials.* Chen G.Q, Wu Q. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6565–78.
166. *Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices.* Middleton J.C, Tipton A.J. 2000, *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 2335–46.
167. *Poly(lactic acid).* Lu L.C, Mikos A.G. 1999, In: Mark JE, editor. *Polymer data handbook*. Oxford: Oxford Press, pp. 527–633.
168. *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.* Yang S, Leong K.F, Du Z, Chua C.K. 2001, *Tissue Eng*, Vol. 7, pp. 679–89.
169. *An introduction to biocomposites.* Ramakrishna S, Huang Z.M, Kumar G.V, Batchelor A.W, Mayer J. 2004, London: Imperial College Press, p. 36.
170. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering.* Gunatillak P.A, Adhikari R. 2003, *Eur Cells Mater J*, Vol. 5, pp. 1–16.
171. *Poly(epsilon-caprolactone).* Iroh JO. 1999, In: Mark JE, editor. *Polymer data handbook*. Oxford: Oxford Press, pp. 361–2.
172. *Processing and properties of two different poly(ortho esters).* Kellomak M, Heller J, Tormala P. 2000, *J Mater Sci—Mater Med*, Vol. 11, pp. 345–355.
173. *Poly(phosphazenes), Bioerodible.* Magill J.H. 1999, In: Mark JE, editor. *Polymer data handbook*. Oxford: Oxford Press, pp. 746–9.
174. *A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo.* Damien E, Hing K, Saeed S, Revell P.A. 2, 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 66, pp. 241–6.
175. *Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices.* Lee Y.M, Seol Y.J, Lim Y.T, Kim S, Han S.B, Rhyu I.C, et al. 2, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 54, pp. 216–23.
176. *Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model.* Chen F, Mao T, Tao K, Chen S, Ding G, Gu X. 10, 2002, *J Oral Maxillofac Surg*, Vol. 60, pp. 1155–9.
177. *Replacement of segmental bone defects using porous bioceramic cylinders: a biomechanical and X-ray diffraction study.* Zhang C, Wang J, Feng H, Lu B, Song Z, Zhang X. 3, 2001, *J Biomed Mater Res*, Vol. 54, pp. 407–11.
178. *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.* LeGeros R.Z. 2002, *Clin Orthop*, Vol. 395, pp. 81–98.
179. *45S5-Bioglass-derived-glass-ceramic-scaffolds-for-bone-tissue-engineering'.* Chen Q.Z, Thompson I.D, Boccaccini A.R. 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2414–2425.
180. *Coupling mechanical competence and bioresorbability in Bioglass-derived tissue engineering scaffolds.* Chen Q.Z, Boccaccini A.R. 2008, *Adv. Eng. Mater.*, Vol. 8, pp. 285–289.

181. *Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass(R) composites with tailored pore structure for tissue engineering applications.* Boccaccini A.R, Maquet V. 2003, *Compos Sci Technol*, Vol. 63, pp. 2417–29.
182. *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review.* Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong K.W. 2001, *Compos Sci Technol*, Vol. 61, pp. 1189–224.
183. *Porous poly([alpha]-hydroxyacid)/Bioglass(R) composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation.* Maquet V, Boccaccini A.R, Pravata L, Notingher I, Jerome R. 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 4185–94.
184. *Developing bioactive composite materials for tissue replacement.* Wang M. 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2133–51.
185. *Hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: an animal study on push-out strengths and interface histology.* Verheyen C.C.P.M, de Wijn J, van Blitterswijk C, deGroot K, Rozing P. 1993, *J Biomed Mater Res*, Vol. 27, pp. 433–44.
186. *Biodegradable hydroxyapatite-polymer composites.* Durucan C, Brown P.W. 2001, *Adv Eng Mater*, Vol. 3, pp. 227–31.
187. *Calcium phosphate formation and ion dissolution rates from silica gel-PDLLA composites.* Korventausta J, Jokinen M, Rosling A, Peltola T, Yli-Urpo A. 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 5173–82.
188. *PDLLA foams with TiO₂ nanoparticles and PDLLA/TiO₂-Bioglass foam composites for tissue engineering scaffolds.* Boccaccini A.R, Blaker J.J, Maquet V, Chung W, Jerome R, Nazhat S.N. *J Mater Sci*, in press.
189. *Mechanically anisotropic PDLLA/Bioglass composite foams as scaffolds for bone tissue engineering.* Blaker J.J, Maquet V, Jerome R, Boccaccini A.R, Nazhat S.N. 2005, *Acta Biomater*, Vol. 1, pp. 643–52.
190. *Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams.* Maquet V, Boccaccini A.R, Pravata L, Notingher I, Jerome R. 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 66A, pp. 335–46.
191. *In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds.* Blaker J.J, Gough J.E, Maquet V, Notingher I, Boccaccini A.R. 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 67A, pp. 1401–11.
192. *Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass(R) for tissue engineering applications.* Roether J.A, Boccaccini A.R, Hench L.L, Maquet V, Gautier S, Jerome R. 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3871–8.
193. *PDLLA/Bioglass(R) composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment.* Verrier S, Blaker J.J, Maquet V, Hench L.L, Boccaccini A.R. 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 3013–21.
194. *In vitro and in vivo analysis of macroporous biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass.* Day R.M, Maquet V, Boccaccini A.R, Jerome R, Forbes A. 2005, *J Biomed Mater Res*, Vol. 75A, pp. 778–87.

195. *Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/continuous bioglass fibre composite using monomer transfer moulding for bone implant.* Jiang G, Evans M.E, Jones I, Rudd C.D, Scotchford C.A, Walker G.S. 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 2281–8.
196. *In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly([ϵ]-caprolactone-co-lactide) and bioactive glass (S53P4).* Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Narhi T, Jokinen M, Seppala J, i dr. 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 575–81.
197. *Mechanical properties of cancellous bone in the human mandibular condyle are anisotropic.* Giesen E.B.W, Ding M, Dalstra M, van Eijden T.M.G.J. 2001, *J Biomech*, Vol. 34, pp. 799–803.
198. *A/W glass-ceramic: processing and properties.* Kokubo T. 1999, In: Hench LL, Wilson J, editors. *An introduction to bioceramics*. 2nd ed. London: Word Scientific, pp. 75–88.
199. *Handbook of biomaterial properties.* Black J, Hastings G. 1998, 1st Edition, Chapman & Hall.
200. *Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering.* Gerhardt L.C, Boccaccini A.R. 2010, *Materials*, p. doi:10.3390/ma3073867.
201. *Whisker-reinforced calcium phosphate cements.* Müller F.A, Gbureck U, Kasuga T, Mizutani T, Barralet J.E, Lohbauer U,. 2007, *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 90, pp. 3694-3697.
202. *SiC whisker- and C fiber-reinforced calcium phosphate composites.* Hark K, Sundaresan S, Vasilos T, Sung C. 1994, *J. Mater. Res.*, Vol. 9, pp. 2476-2479.
203. *Hydrothermal sintering of ZrO₂ and Al₂O₃ fiber-reinforced hydroxyapatite.* Ruys A.J, Wei M, Milthorpe M.B. K, Brandwood A, Sorrell C.C,. 1993, *J. Austr. Ceram. Soc.*, Vol. 29, pp. 39-49. .
204. *Hydroxyapatite whiskers provide improved mechanical properties in reinforced polymer composites.* Roeder R.K, Sproul M.M, Turner C.H, 2003, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* , Vol. 67, pp. 801-812.
205. *Hydrothermal synthesis of biocompatible whiskers.* Yoshimura M, Suda H, Okamoto K, Ioku K. 1994, *J. Mater. Sci.*, Vol. 29, pp. 3399-3402 .
206. *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite whiskers with sharp faceted hexagonal morphology.* Neira I.S., Guitian F, Taniguchi T, Watanabe T, Yoshimura M, 2008, *J. Mater. Sci.*, Vol. 43, pp. 2171–2178.
207. *Hydrothermal synthesis of calcium deficient hydroxyapatites with controlled size and homogeneous morphology.* Verges M.A, Gonzalez C.F, Gallego M.M, 1998, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 18, pp. 1245-1250.
208. *Large-sized hydroxyapatite whiskers derived from calcium tripolyphosphate gel.* Mizutani Y, Hattori M, M. Okuyama, T. Kasugab, M. Nogamib. 2005, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 25, pp. 3181–3185.
209. *Chelate decomposition method kinetic effects on hydroxyapatite whiskers synthesized by the chelate decomposition method.* Roeder R.K, Converse G.L, Leng H, Yue W,. 2006, *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 89, pp. 2096–2104.
210. *Syntheses of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations.* Aizawa M, Ueno H, Itatani K, Okada I,. 2006, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 26, pp. 501–507.

211. *Molten salt synthesis of calcium hydroxyapatite whiskers*. Tas C. 2001, J. Am. Ceram. Soc., Vol. 84, pp. 295–300.
212. *Liquid–solid-solution synthesis of hydroxyapatite nanorods*. Wang X, Zhuang J, Peng Q, Y.D. Li Q.Y.D. 2006, Adv. Mater., Vol. 18, pp. 2031–2034. .
213. *Preparation of needle-like hydroxyapatite*. Suzuki S, Ohgaki M, Ichiyanagi M, Ozawa M, 1998, J. Mater. Sci. Lett., Vol. 17, pp. 381–383.
214. *Texture and formation mechanism of fibrous calcium hydroxyapatite particles prepared by decomposition of calcium-EDTA chelates*. Kandori K, Horigami N, Yasukawa A. 1997, J. Am. Ceram. Soc., Vol. 80, pp. 1157–1164.
215. *Preparation of calcium hydroxyapatite using amides*. Yasukawa A, Takase H, Kandori K. 1994, Polyhedron, Vol. 13, pp. 3071–3078.
216. *Precipitation of biocompatible hydroxyapatite whiskers from moderately acid solution*. Zhang H, Wang Y, Yan Y, Li S. 2003, Ceram. Int., Vol. 29, pp. 413–418.
217. *A profile refinement method for nuclear and magnetic structures*. Rietveld H.M. 1969, J. Appl. Cryst., Vol. 2, pp. 65-71.
218. *A fundamental parameters approach to X-ray line-profile fitting*. Cheary R.W, Coelho A.A. 1992, J. Appl. Crystallogr., Vol. 25, pp. 109-121.
219. *Significant precision in crystal structural details: Holly Springs hydroxyapatite*. Sudarsanan K, Young R.A. 1969, Acta Crystallogr. B, Vol. 25, pp. 1534-1543.
220. *The geometry of Wulff crystal shapes and its relations with riemann problems*. Peng D, Osher S, Merriman B, Zhao H.K. 1999, Contemporary Mathematics, Vol. 238, pp. 251-303.
221. *WinPLOTR, a Tool to Plot Powder Diffraction Patterns, Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS), France, 1998*. Roisnel T, Rodriguez-Carvajal J.
222. *PowderCell 2.3 Program, BAM Berlin, 2000*. Nolze G, Kraus W.
223. *Crystal structure of hydroxyapatite*. Kay M.I, Young R.A, Posner A.S. 1964, Nature, Vol. 204, pp. 1050-1052.
224. de Wolff P. Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands, ICDD Grant-in-Aid, PDF 09-0432.
225. *Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate*. Sayer M, Stratilatov A.D, Reid J, Calderin L, Stott M.J, Yin X, MacKenzie M, Smith T.J.N, Hendry A.J, Langstaff S.D. 2003, Biomaterials, Vol. 24, pp. 369–382.
226. *Characterisation of the transformation from Ca-deficient apatite to b-tricalcium-phosphate*. Gibson I.R, Rehman I.U, Best S.M, Bonfield W. 2000, J Mat Sci Mater in Med., Vol. 11, pp. 533–9.
227. *The infrared and Raman spectra of α - and β -tricalcium phosphate $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$* . Jillavenkatesa, A.; Condrate, R. A. 1998, Spectrosc Lett, Vol. 31, pp. 1619-163. .
228. *Silicon oxide particle formation in RF plasmas investigated by infrared absorption spectroscopy and mass spectrometry*. Hollenstein C. Howling A.A, Courteille C, Magni D, Scholz S.M, Kroesen G.M.W, Simons N, de Zeeuw W, Schwarzenbach W. 1998, J Phys D Appl Phys, Vol. 31, pp. 74-84.

229. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press: 1990. Brinker C.J, Scherer G.W.
230. *Human osteoblast behavior on as-synthesized SiO₄ and B-CO₃ co-substitu*. Landi E, Uggeri J, Sprio S, Tampieri A, Guizzardi S. 2010, J Biomed Mater Res Part A., Vol. 94A, pp. 59–70.
231. *Human osteoblast response to silicon substituted hydroxyapatite*. Botelho C.M, Brooks R.A, Best S.M, Lopes M.A, Santos J.D, Rushton N, Bonfield W. 2006, J Biomed Mater Res Part A., Vol. 79A, pp. 723–30.
232. *The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation*. Zou S, Ireland D, Brooks RA, Rushton N, Best S. 2009, J Biomed Mater Res B Appl Biomater., Vol. 90, pp. 123–30.
233. *Dissolution and re-crystallization processes in multiphase silicon stabilized tricalcium phosphate*. Tuck L, Astala R, Reid J.W, Sayer M, Stott M.J. 2008, J Mater Sci: Mater Med., Vol. 19, pp. 917–27.
234. *A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: Root canal irrigants*. Ballal N.V, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BS. 2009, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., Vol. 108, pp. 633–8.
235. Dos Santos E.A, Farina M, Soares G.A, Anselme K. 2009, J Biomed Mater Res, Vol. 89A, pp. 510–520.
236. *osteoblast adhesion on biomaterials*. Anselme K. 2000, biomaterials, Vol. 21, pp. 667-681.
237. *Bone and cartilage engineering*. Mayer U, Wiesmann H.P. 2006, Springer.
238. *In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay*. Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. 4, 1994, Onkološki arhiv, Vol. 2, pp. 181-4.
239. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Mosmann T. J Immunol. Methods : s.n., 1983, Vol. 65, pp. 55-63.
240. *Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement*. Fernández E, Ginebra M.P, Boltong M.G, Driessens F.C.M, Ginebra J, De Maeyer E.A.P. 3, 1996, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 32, pp. 367-374.
241. *Organic Additives and Ceramic Processing*. Shanefield D. J. Kluwer Academic 2nd ed. Publishers: Boston, MA, 2000.
242. *Ceramic Processing and Sintering - 2nd Edition*. Rahman M.N. 2003, CRC Press.
243. *Biological materials: Structure and mechanical properties*. Meyers M.A, Chen, P.Y, Lin A.Y.M, Seki Y. 2008, Prog. Mater. Sci., Vol. 53, pp. 1-206.
244. *Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration*. Zhang L, Webster T.J. 2009, Nano Today, Vol. 4, pp. 66-80.
245. *The ultrastructure of the plasma-sprayed hydroxyapatite–bone inter-face predisposing to bone bonding*. Porter A.E, Hobbs L.W, Benezra Rosen V, Spector M. 2002, Biomaterials, Vol. 23, pp. 725–33.
246. *A review on the dissolution models of calcium apatites*. Dorozhkin S.V. 1, 2002 : s.n., Prog Cryst Growth Charact Mater, Vol. 44, pp. 45–61.

247. *Nanoscale characterization of the interface between bone and hydroxyapatite implants and the effect of silicon on bone apposition.* Porter A. 2006, *Micron*, Vols. 681–8., pp. 681–8.
248. *Electron spin resonance in Si substituted HA and tricalcium phosphate.* Pietak A, Sayer M. 2005, *Biomaterials*, Vols. 3819–30., pp. 3819–30.
249. *Thermoluminescence in Si substituted hydroxyapatite and tricalcium phosphate.* Pietak A, Sayer M. 2006, *J Mater Sci*, Vol. 41, pp. 5025–8.
250. *A comparative study on the in vivo behaviour of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules.* Patel N, Gibson I.R, Hing K.A, Best S.M, Revell P.A, Bonfield W. 2002, *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 13, pp. 1199–206.
251. *Crystal dissolution of biological and ceramic apatites.* Daculsi G, Legeros R.Z, Mitre D. 1989, *Calcif Tissue Int*, Vol. 45, pp. 95–103.
252. *High resolution electron microscopy investigation of interface and other structure defects in some ceramics.* Wen S, Liu Q. 1998, *Microsc Res Tech*, Vol. 40, pp. 177–86.
253. *Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics.* Porter A.E, Patel N, Skepper J.N, Best S.M, Bonfield W. 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4609–4620.
254. *Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).* Botelho C.M, Lopes M.A, Gibson I.R, Best S.M, Santos J.D. 2002, *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 13, pp. 1123–7.
255. *The dissolution and growth of sparingly soluble inorganic salts: a kinetics and surface energy approach.* Wu W. Nancollas G.H. 1998, *Pure Appl Chem*, Vol. 70, pp. 1867–72.
256. *Practical Flow Cytometry, 2nd ed.* Shapiro H.M. 1988, John Wiley & Sons, New York.
257. *Bone formation on the apatite-coated zirconia porous scaffolds within a rabbit calvarial defect.* Kim H.W, Shin S.Y, Kim H.E, Lee Y.M, Chung C.P, Lee H.Y, Rhyu I.C, 2008, *J Biomater Appl*, Vol 22, pp. 485-504.
258. *Improvement of the microstructure and mechanical properties of bioceramic scaffolds using electrohydrodynamic spraying with template modification.* Muthutantri A.I, Edirisinghe M.J, Boccaccini A.R, 2010, *J Mech Behav Biomed*, Vol. 3, pp. 230-39.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

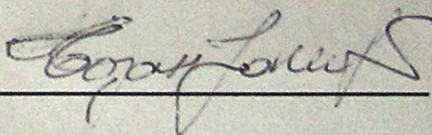
Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

ПРОУЧАВАЊЕ ПРОЦЕСА ФОРМИРАЊА ПОРОЗНИХ БИОКОМПАТИБИЛНИХ
МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ НЕДОПИРАНИХ И СИЛИЦИЈУМОМ ДОПИРАНИХ α -КАЛЦИЈУМ-
ФОСФАТА И ХИДРОКСИАПАТИТА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 21.03.2014.



A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to be 'Branislav'.

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

ПРОУЧАВАЊЕ ПРОЦЕСА ФОРМИРАЊА ПОРОЗНИХ БИОКОМПАТИБИЛНИХ МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ НЕДОПИРАНИХ И СИЛИЦИЈУМОМ ДОПИРАНИХ α -КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА И ХИДРОКСИАПАТИТА

која је моје ауторско дело.

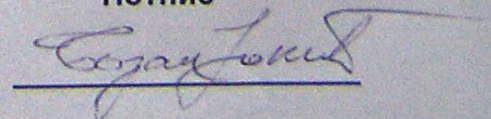
Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, 21.03.2014.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.