

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Nenad L. Ignjatović

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

doktorska disertacija

Beograd, 2001

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nenad L. Ignjatović

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

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2001

Apstrakt

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

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

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

Abstract

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

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

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

Naučna oblast: hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: nauka o materijalima

PA 17297

11707

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Učesnik: Prof. dr Milenko Plavčić
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Članovi komisije: Prof. dr Dragana Učković

Mr Nenad L. Ignjatović, dipl. ing

Sinteza i dizajniranje strukture i osobina
hidroksiapatit-polilaktid kompozitnih biomaterijala

Doktorska disertacija

Prof. dr Vojin Savić
Medicinski fakultet, Nis

Datum odbrane: 24.11.2001.

Datum promocije:

Beograd, 2001

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
РАЈСКИ ПАРКОВИ - БЕОГРАД
Б. Бр. 117502

Универзитет у Београду
Технолошко-металуршки факултет, Београд

Mr Nenad L. Jaganović, dipl. ing.

Štampa i dizajnerske strukture i osobine
hidroksipolipolimerne kompozitne biomaterijala



Београд, 2011

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

Milenko Plavšić

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

Dr. Uskoković

Prof. dr Radoslav Aleksić
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

R. Aleksić

Prof. dr Slobodan Jovanović
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

S. Jovanović

Prof. dr Vojin Savić
Medicinski fakultet, Niš

V. Savić

Datum odbrane: 24. IX 2001.

Datum promocije:

Sinteza i karakterizacija strukture i osobina hidroksilapalmitat-poliaktid kompozitnih biomaterijala

Abstrakt

U ovom radu opisano je sintezno i karakteriziranje kompozitnih biomaterijala na bazi hidroksilapalmitat-poliaktid (HAP/PLA). Sinteza kompozitnih biomaterijala obavljena je reakcijom kondenzacije između hidroksilapalmitatne i polilaktidne kiselinske komponente. Karakterizacija kompozitnih biomaterijala obavljena je pomoću FTIR i DSC metoda. Rezultati pokazuju da kompozitni biomaterijal HAP/PLA ima veći modul elastičnosti i veći koeficijent toplinske ekspanzije u odnosu na PLA. Ova ista kompozitna je materija pogodna za primenu u stomatološkim implantatima. U ovom istraživanju korišćen je model predviđanja za određivanje svojstava kompozitnih biomaterijala. Modeli su PLA i kompozitni biomaterijal. Rezultati su prikazani u tabeli 1. Ovi rezultati su u skladu sa literaturom. Ovi rezultati su u skladu sa literaturom. Ovi rezultati su u skladu sa literaturom.

S. Chinmoy

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



Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksiapatit/polilaktid kompozitnih biomaterijala

Abstrakt:

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

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

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

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

Synthesis and designing structure and properties of composite biomaterials hydroxyapatite-poly lactides

Abstract:

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

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

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

Predgovor

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

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

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

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



<i>Izvod</i>	I
<i>Predgovor</i>	III
<i>Sadržaj</i>	IV
Uvod	1
1. Teorijski deo	23
1.1 Biomaterijali	3
1.2 Vrste biomaterijala	4
1.2.1 Metalni biomaterijali	4
1.2.2 Polimerni biomaterijali	5
1.2.2.1 Bioneresorbilni polimeri	5
1.2.2.1.1 Elastomerni bioneresorbilni polimeri	6
1.2.2.2 Bioresorbilni polimeri	6
1.2.2.2.1. Polilaktid (PLA)	6
1.2.2.2.2 Kopolimeri i drugi bioresorbilni polimeri	9
1.2.3 Keramički i biomaterijali na bazi stakla	9
1.2.3.1 Kalcijum hidroksiapatit (HAp)	10
1.2.3.1.1 Dobijanje HAp	11
1.2.3.1.2 Porozna i gusta HAp keramika	12
1.2.3.1.3 HAp tanki slojevi i prevlake	13
1.2.4 Prirodni biomaterijali	13
1.3. Kompozitni biomaterijali	14
1.3.1. Kompozitni biomaterijali iz prirode - koštano tkivo	15
1.3.2. HAp/metal kompoziti	17
1.3.3. HAp/prirodni kompoziti	18
1.3.4. HAp/keramika kompoziti	19
1.3.5. HAp/bioaktivno staklo kompoziti	20
1.4. HAp/polimer kompoziti	21
1.4.1 HAp/bioneresorbilni polimer kompoziti	22
1.4.2 HAp/bioresorbilni polimer kompoziti	24
1.5. HAp/PLLA kompozitni biomaterijali	28
1.5.1 Dobijanje	28

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

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

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

polimerizacija kalcijata HAp ili magnezijata MgO u matrici PLLA. U ovom radu istraženo je uticaj toplote na strukturu, deponovane prevlake i mehaničke osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Opširnjem radu, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Pored mehaničkih osobina, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Dopunom istraživanja, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA. Također, istraženo je uticaj toplote na povećavanje mehaničkih osobina kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.



UVOD

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

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

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

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

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

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



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

Imajući ovo u vidu rad je koncipiran sa sledećim ciljevima:

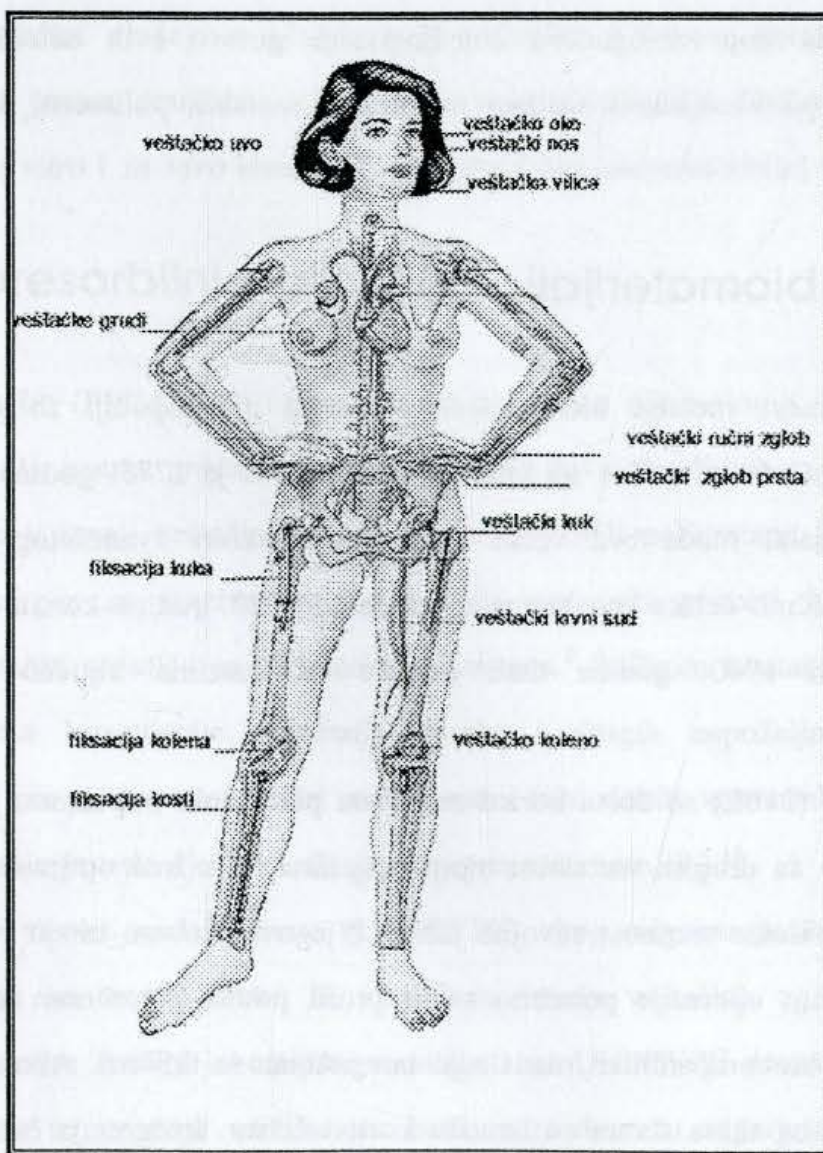
1. Sinteza i priprema biokompatibilnog HAp u obliku bioneresorbibilnih granula ili praha, pogodnog za dobijanje kompozitnog biomaterijala na bazi HAp-a. Priprema bioresorbibilnog i biokompatibilnog PLLA pogodnog za kombinovanje sa granulama ili prahom HAp-a.
2. Sinteza, dizajniranje strukture i osobina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

1. Teorijski deo

1.1 Biomaterijali

Potpuna ili delimična zamena određenog živog tkiva ili organa ostvarena je sa više ili manje uspeha u cilju da se omogući dalje normalno funkcionisanje ljudske jedinice. Zamenjeni su delovi koštanog tkiva veštačkim kostima ili zglobovima u vidu parcijalnih ili totalnih proteza. Različite vrste implanta omogućile su normalno funkcionisanje više desetina miliona ljudi širom sveta. Sve ovo dovelo je do formiranja nove grupe materijala sa specifičnim osobinama i namenom – biomaterijala.¹

Postoje brojne definicije biomaterijala, ali do sada najviše korišćena je ona koja kaže da su to materijali koji se koriste za zamenu ili obnavljanje telesnog tkiva i pri tome su kontinualno ili diskontinualno u kontaktu sa telesnom tečnošću.² Na slici 1.1 prikazani su organi ili tkiva koja su se do sada najčešće zamenjivala ili reparisala sa biomaterijalima.



Slika 1.1. Organi ili tkiva najčešće supstituisana sa biomaterijalima

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

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

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

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

1.2 Vrste biomaterijala

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

1.2.1 Metalni biomaterijali

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

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

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

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

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

1.2.2 Polimerni biomaterijali

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

1.2.2.1 Bioneresorbilni polimeri

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

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

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

1.2.2.1.1 Elastomerni bioneresorbilni polimeri

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

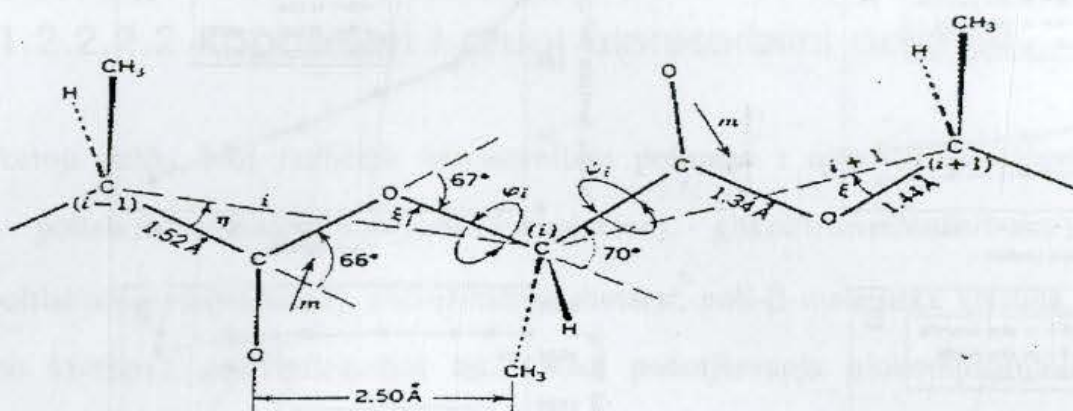
U estetskoj hirurgiji (veštačke grudi i sl) silikonski elastomeri nalaze široku upotrebu.^{14, 17, 20} Dobijanje silikonskih mreža, umrežavanjem silikonskih lanaca ostvareno je različitim postupcima. Jedan od uspešnih umrežavanja ostvaren je uz pomoć organohidrogensiloksana.¹⁷

1.2.2.2 Bioresorbilni polimeri

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

1.2.2.2.1. Polilaktid (PLA)

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



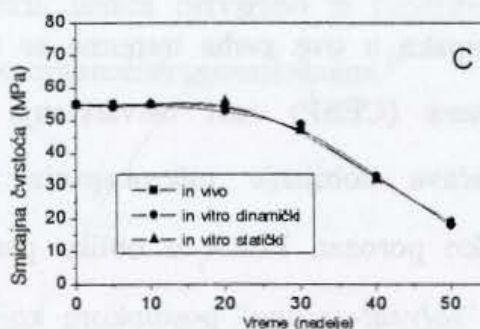
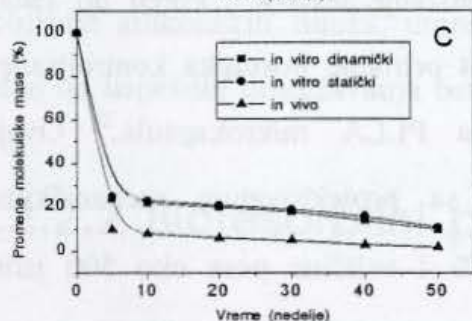
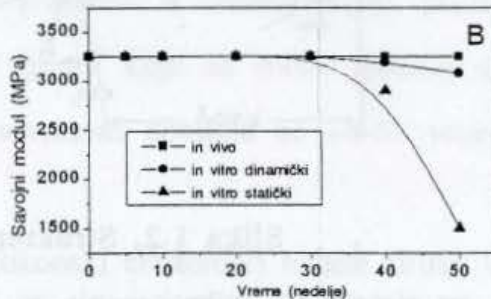
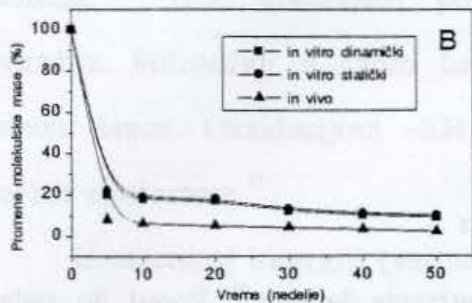
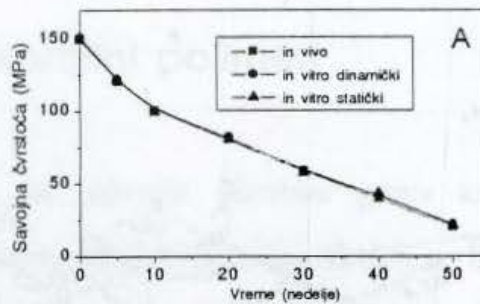
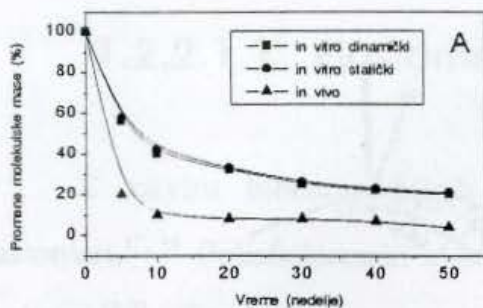
Slika 1.2. Struktura lanca PLLA²⁵

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

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

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





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

Slika 1.4. Promena mehaničkih osobina PLLA³⁴

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

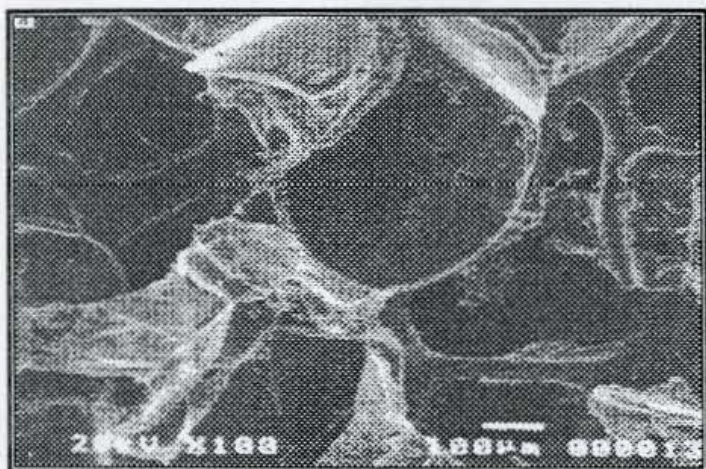
Sa membranama od PLLA izvršen je niz reparacija koštanih defekata.³⁵⁻³⁷ Adhezija ćelija i proliferacija tkiva kroz PLLA ispitana je i definisana u *in vivo* uslovima.³⁸ Od PLLA načinjena je trodimenzionalna porozna matrica u čije pore može se distribuirati želatin, polisaharidi, proteini i soli, a koja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

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

1.2.2.2 Kopolimeri i drugi bioresorbilni polimeri

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

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



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

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

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

Za rekonstrukciju meniskusa uspešno je iskorišćen porozni bioresorbilni poliuretani.⁵⁰

1.2.3 Keramički i biomaterijali na bazi stakla

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3.1 Kalcijum hidroksiapatit (HAp)

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

Tabela 1.1. Kristalografski parametri sintetisanog i prirodnog HAp¹

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

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

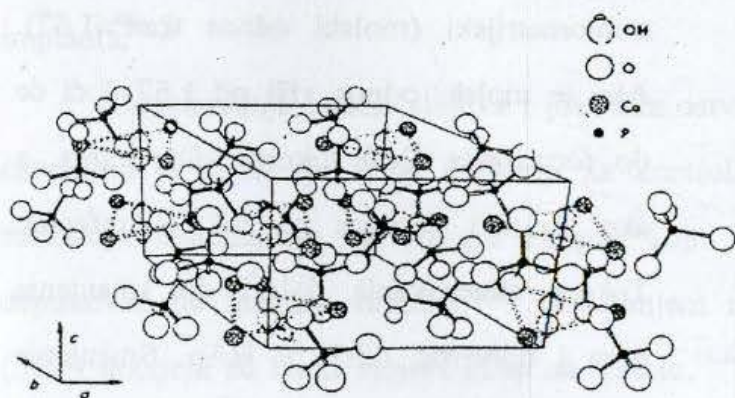
Analizom međufazne površine kost – hidroksiapatit, utvrđen je značaj bliskog kontakta HAp implanta i okolnog tkiva radi uspešnosti implantacije.⁶³ Pored hemiskog sastava i drugi faktori utiču na odgovor organizma među kojima je poroznost, veličina i raspored pora.⁶² Postoje različita mišljenja o optimalnom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

1.2.3.1.1 Dobijanje HAp

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

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

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



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

Slika 1.6. Heksagonalna struktura kristala HAp⁷⁰

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

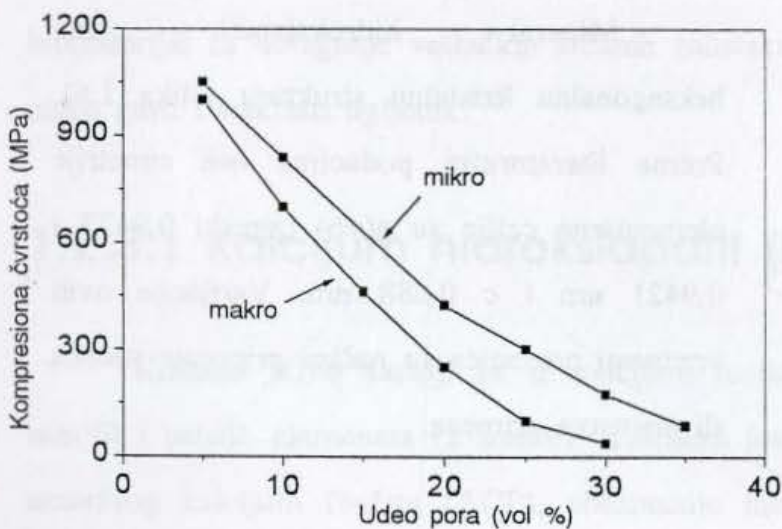
istraživanja je bila sinteza praha HAp-a sa deficitarnim sadržajem kalcijuma, pomoću modifikovane precipitacione metode.^{71,72}

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

1.2.3.1.2 Porozna i gusta HAp keramika

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

Dobijanje guste HAp keramike sa visokim vrednostima mehaničke čvrstoće moguće je



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

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

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

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

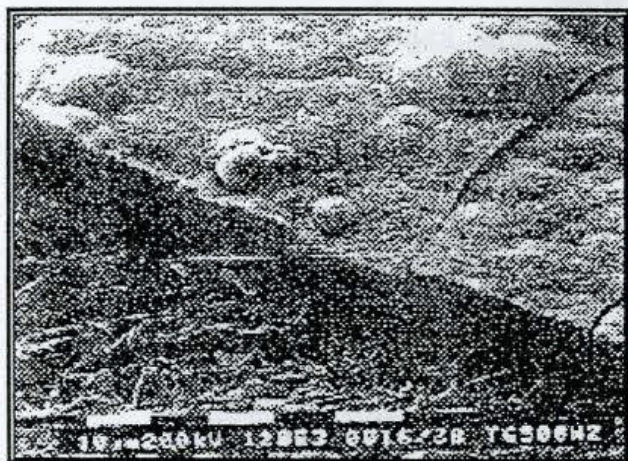
Temperatura sinterovanja utiče na mogućnost pojave trodimenzionalnih defekata u heksagonalnoj kristalnoj strukturi. Ova vrsta defekta ima bitan uticaj na ponašanje HAp u *in vivo* uslovima.⁷⁸

1.2.3.1.3 HAp tanki slojevi i prevlake

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

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

Slika 1.8. SEM deponovanog HAp na substratu od titana⁷⁹



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

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

1.2.4 Prirodni biomaterijali

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

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

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

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

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

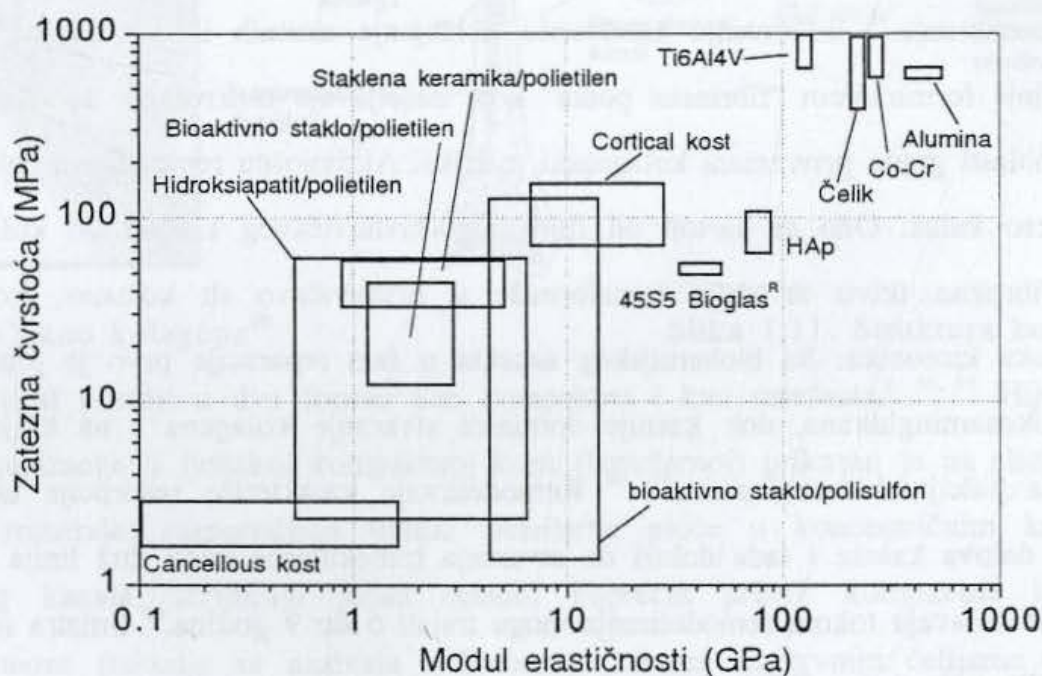
Porast broja bolesti kardiovaskularnog sistema u poslednje dve decenije, posebno broja izvršenih hirurških intervencija zamene srčanih arterija (baj-pas), postavio je zahtev za primenu veštački dobijenih arterija u te svrhe. Arterija se sastoji od tri osnovna sloja koja ispunjavaju mehaničke i biohemijske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

1.3. Kompozitni biomaterijali

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

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

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



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

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

1.3.1. Kompozitni biomaterijali iz prirode – koštano tkivo

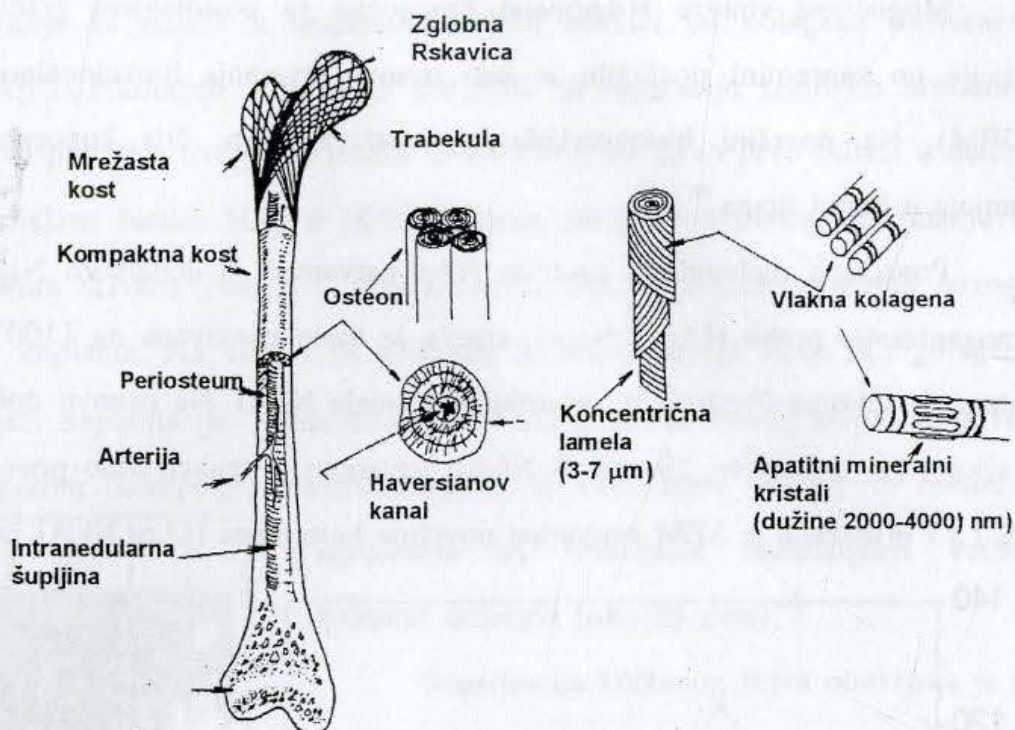
Koštano tkivo (kost) predstavlja kompozitni materijal koji je formirala i dizajnirala priroda. Kost se sastoji iz neorganske komponente koju predstavlja kalcijum fosfatna keramika (69 mas%), proteinske komponente kolagenske prirode (20 mas%), vode (9 mas%) i ostalih elemenata (2 mas%). Kalcijum fosfatna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

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

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

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

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



Slika 1.10. Vlakno kolagena⁹⁸

Slika 1.11. Struktura kosti¹

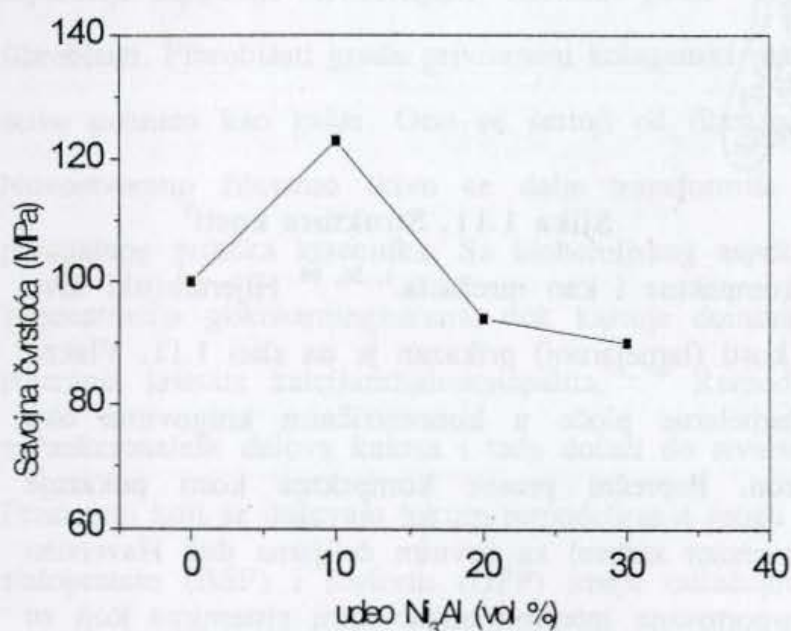
Zrela kost postoji u dve forme: kao kompaktna i kao mrežasta.^{1, 56, 95} Hijerarhijski nivo strukturne organizacije u ljudskoj kompaktnoj kosti (lamelarnoj) prikazan je na slici 1.11. Vlakna koja sadrže minerale, raspoređena unutar lamelarne ploče u koncentričnim krugovima oko Haversianovog kanala,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

1.3.2. HAp/metal kompoziti

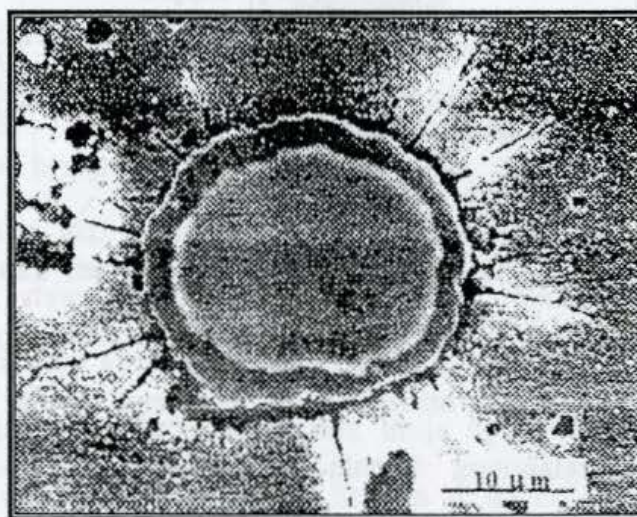
Kompoziti tipa HAp/metal najčešće se javljaju kod tankih slojeva ili prevlaka HAp na metalnim substratima.³ Kao što je i ranije naznačeno (poglavlje 1.2.3.1.3) moguće tehnike depozicije su brojne, a takodje i supstrati mogu biti različiti. Natapanjem substrata od zlata u SBF uz pomoć piezoelektričnog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

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

Povećanje mehaničkih osobina HAp ostvareno je dodatkom Ni_3Al u prah HAp.¹⁰⁰ Nakon homogenizacije praha HAp i Ni_3Al , smeša je toplo presovana na 1100°C a dobijenom kompozitu ispitana je savojna čvrstoća u zavisnosti od udela Ni_3Al . Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih na slici 1.12, dodatkom 10 vol % Ni_3Al ostvareno je maksimalno povećanje savojne čvrstoće. Na slici 1.13 prikazana je SEM prelomne površine kompozita HAp/ Ni_3Al koji sadrži 10 vol% Ni_3Al .



Slika 1.12. Zavisnost savojne čvrstoće HAp/ Ni_3Al od udela Ni_3Al ¹⁰⁰



Slika 1.13. SEM kompozita HAp/ Ni_3Al sa 10 vol% Ni_3Al ¹⁰⁰

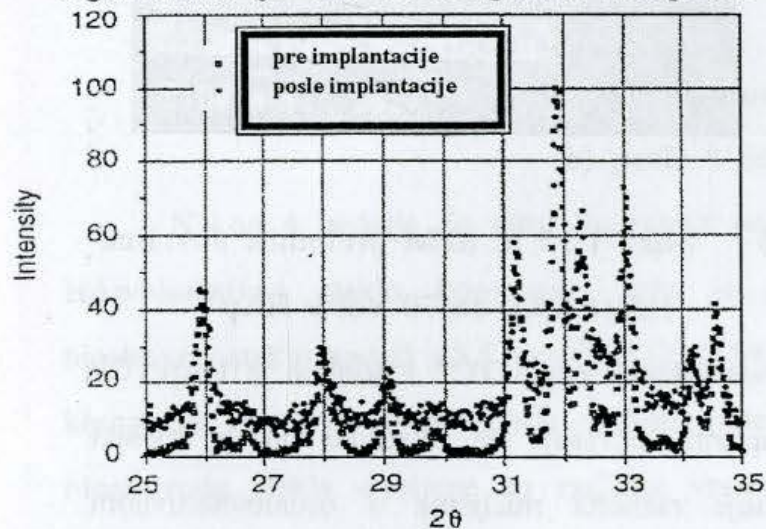
Središnja kružna površina na slici 1.13 potiče od Ni_3Al koji je okružen komponentom HAp. Medufaznu površinu karakteriše niz pukotina koje se nastavljaju ka komponenti HAp. Najverovatnije da su pukotine rezultat naprezanja koja se javljaju usled različitih osobina faza tokom procesiranja kompozita.

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

1.3.3. HAp/prirodni kompoziti

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

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



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

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

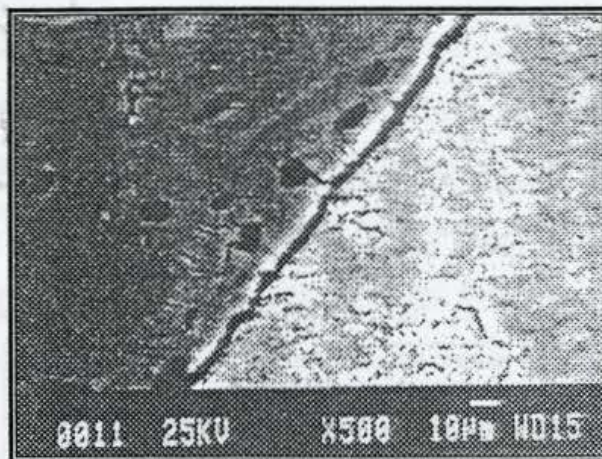
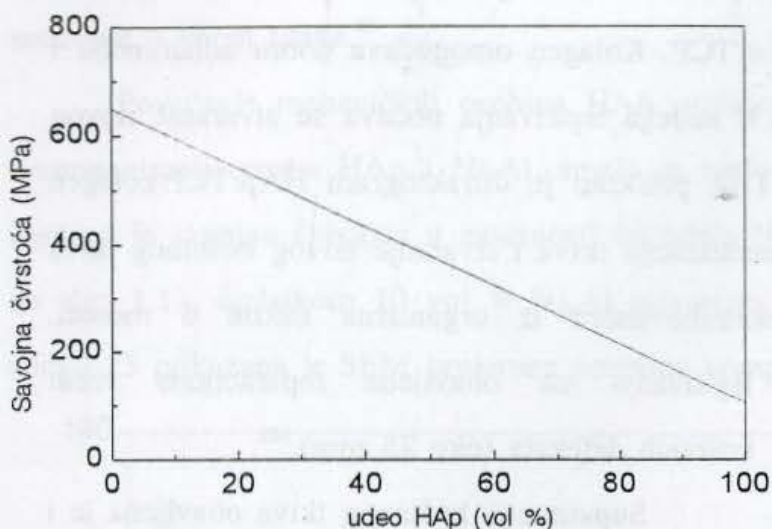
Slika 1.14. Difraktogram HAp/TCP/kolagen kompozita pre i posle 6 meseci od implantacije¹⁰²

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

1.3.4. HAp/keramika kompoziti

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

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



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

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

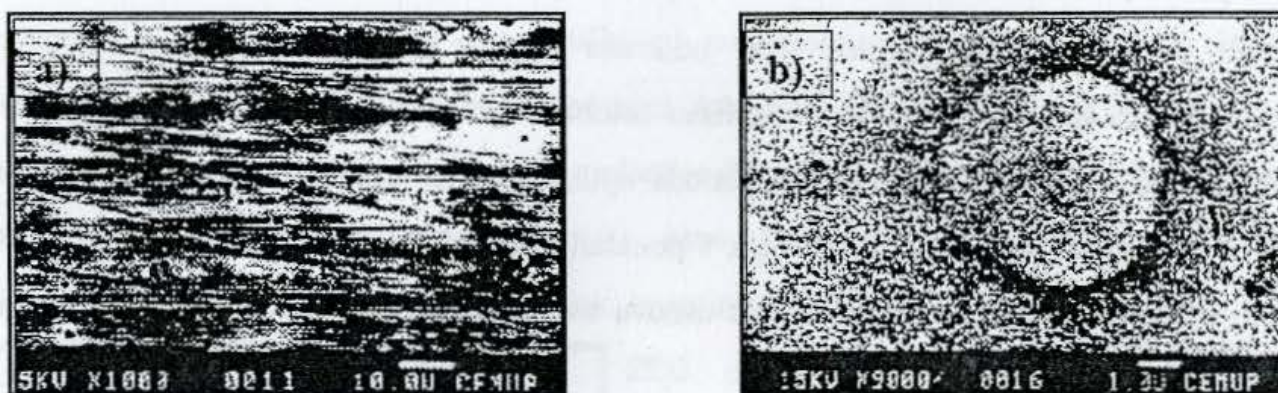
Zbog sličnog hemijskog sastava HAp-u je dodata komponenta TCP i dobijen je HAp/TCP kompozit.^{56, 108} U međufaznoj površini ovog kompozita ostvaruje se relativno blizak kontakt komponenti, bez pojava pukotina. Međutim postoje različita mišljenja o osteoinduktivnom potencijalu i biokompatibilnim osobinama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

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

1.3.5. HAp/bioaktivno staklo kompoziti

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

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



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

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

Tabela 1.2. Osobine komercijalnih kompozita HAp/bioaktivno staklo⁵

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

1.4. HAp/polimer kompoziti

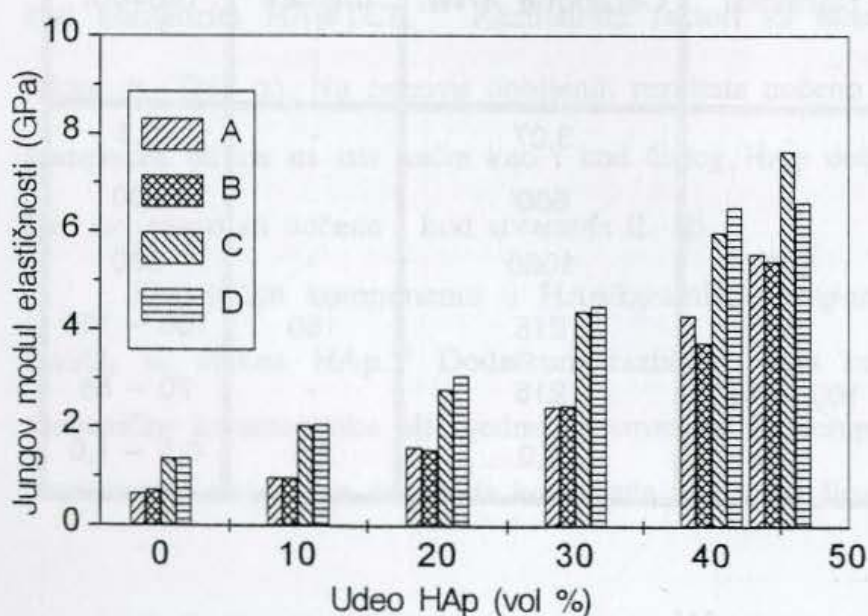
HAp/polimer kompoziti su po mehaničkim osobinama najpribližniji osobinama prirodnog koštanog tkiva (slika 1.9).^{5, 56} Struktura kompozita HAp/polimer najviše podražava strukturu prirodnog koštanog tkiva. Kontinualna matrica od polimera u kojoj je raspoređena HAp komponenta podseća na kolagensku komponentu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

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

1.4.1 HAp/bioneresorbilni polimer kompoziti

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

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



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

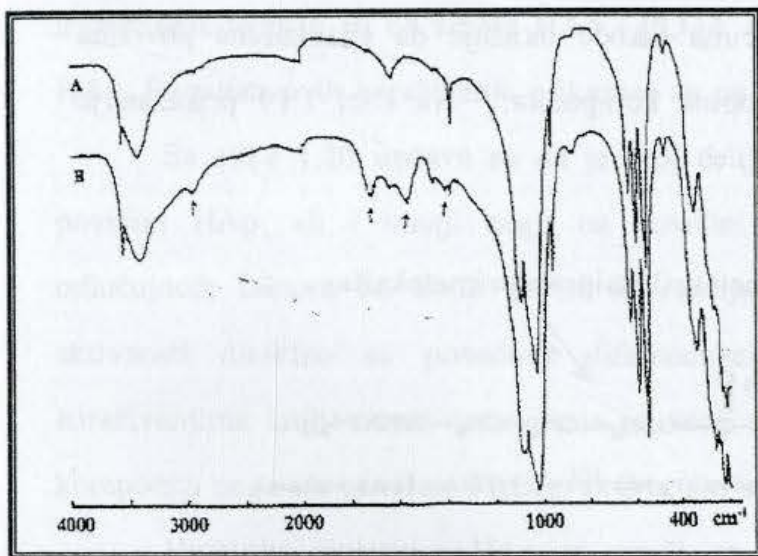
Slika 1.17. Uticaj udela HAp u kompozitu HAp/PE na Jungov modul smicanja za kompozite A, B, C i D¹¹³

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

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

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

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



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

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

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

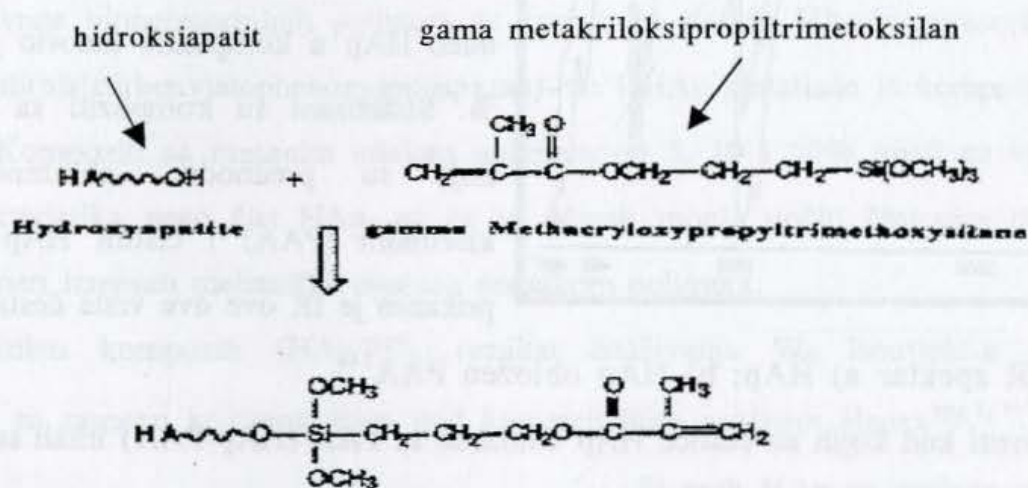
Tabela 1.3. Mehaničke osobine nano kompozita HAp/PEG-PBT¹¹⁴

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

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

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

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



Slika 1.19. Mehanizam dobijanja silanske prevlake¹¹⁵

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

1.4.2 HAp/bioresorbilni polimer kompoziti

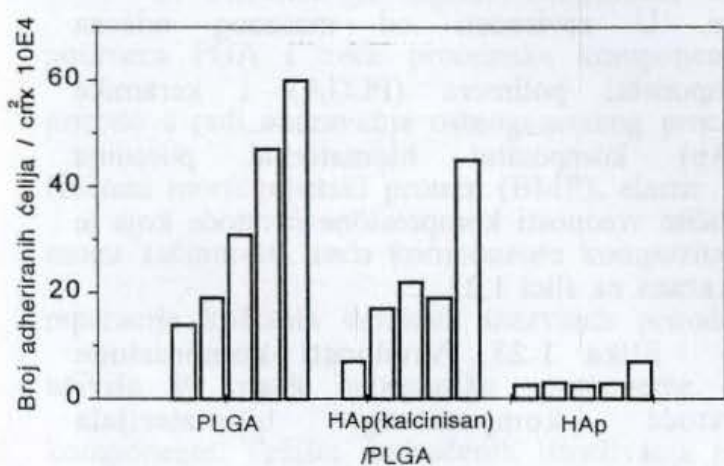
Sintezom i dizajniranjem kompozitnog biomaterijala sa HAp i bioresorbilnim polimerom ostvaren je sasvim nov koncept biomaterijala. Biomaterijali ovog tipa postaju "živi", vremenski se razvijaju i menjaju, a nakon završenog procesa reparacije defekta nestaju i "umiru". Osnovna ideja sadržana je u tome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

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

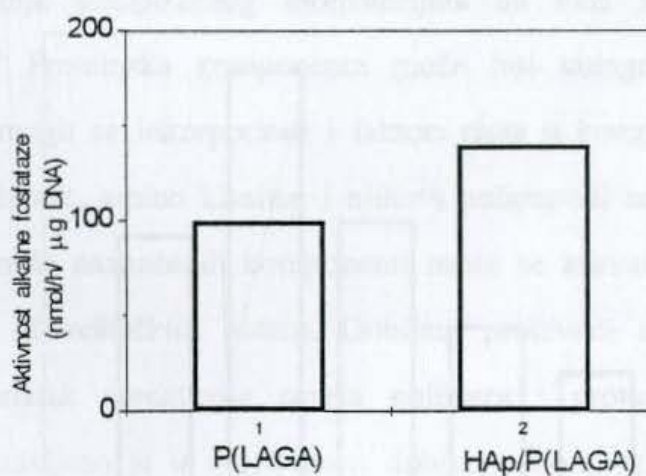
H. Elgendy i saradnici ispitali su diferencijaciju i promenu broja ćelija osteoblasta u *in vivo* uslovima na površini granula HAp i smeše HAp i polilaktid-co-glikolida (PLGA).¹²⁰ Rezultati istraživanja ukazali su da smeša HAp i PLGA indukuje stvaranje većeg broja osteoblasta nego sam HAp. Rezultati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

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

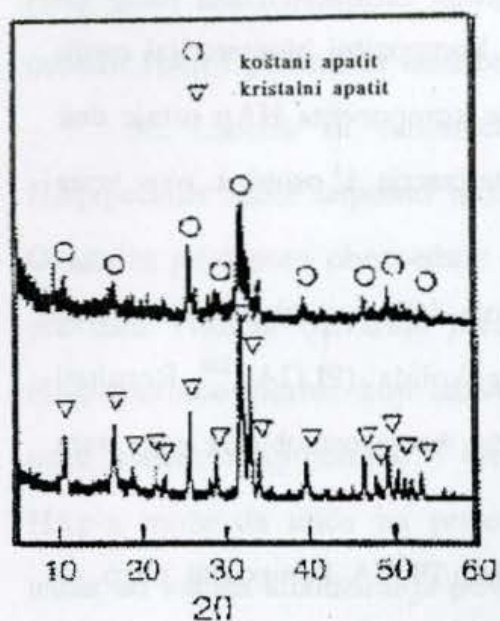
Hemijski sintetisan HAp u smeši sa kopolimerima l-laktida može da omogući dobru adherenciju osteoblasta koji aktivno učestvuju u procesima reparacije. *In vitro* istraživanja, mada ne prikazuju realne osobine biomaterijala mogu ukazati na njegove nedostatke ili prednosti. S. Cho sa saradnicima ispitao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



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

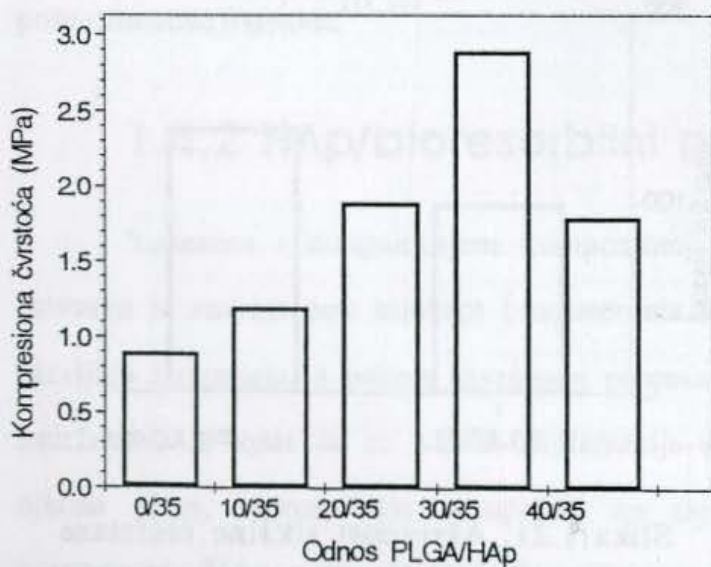


Slika 1.21. Aktivnost alkalne fosfataze u okolini 1-polimera; 2-kompozitnog biomaterijala HAp/P(LAGA)¹²¹



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

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



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

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

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

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

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

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

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

1.5. HAp/PLLA kompozitni biomaterijali

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

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

1.5.1 Dobijanje

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.2 Dizajniranje strukture (strukturiranje)

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

1.5.2.1 Submolekulski nivo

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

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

1.5.2.2 Molekulski nivo

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

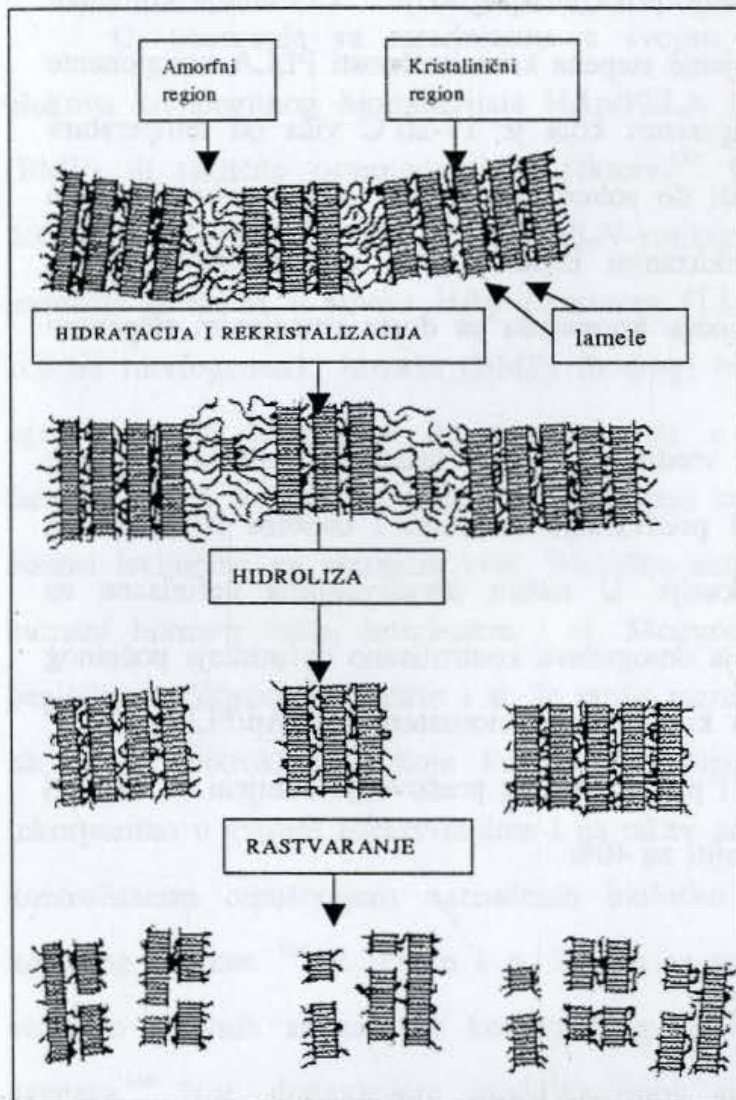
Za dobijanje kompozitnog biomaterijala različiti autori su koristili PLLA različitih molskih masa koja se nalazila u intervalu od 10000-500000 g/mol.^{126-132, 148} U našim istraživanjima korišćen je PLLA niske (50000 g/mol), visoke (430000 g/mol) i srednje vrednosti (100000 g/mol) molske mase jer je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

1.5.2.3 Intermolekulski nivo

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

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

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



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

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

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

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

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

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

1.5.2.4 Supermolekulski nivo

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

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

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

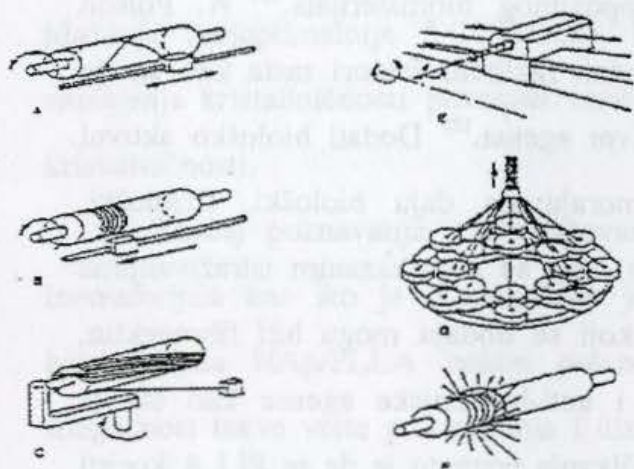
C. Laurencin sa saradnicima u svojim istraživanjima prikazao je mogućnost dobijanja blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji u sebi sadrže koštani morfogenetski protein (BMP) ili različite osteoinduktivne faktore.¹³⁰ Y. Imai sa saradnicima naznačio je mogućnost dobijanja HAp/PLLA/PNV (PNV poli-N-vinilpirolidon)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

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

1.5.2.5 Makro nivo

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

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



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

Slika 1.25. Različiti način namotavanja PLLA vlakana na HAp¹²⁶

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

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

2 mm. Ukupna otvorena poroznost ovako dobijenih kompozita

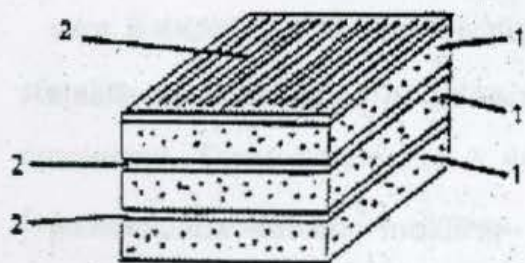
nalazi su u granicama od 20 – 70 %. Upotrebom visoko guste

HAp keramike moguće je dobiti isti blok u besporoznom

stanju (sa beznačajnom poroznošću čija vrednost u prikazanim

istraživanjima nije navedena). PLLA povezuje blokove HAp i

ima ulogu adheziva u kompozitu.



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

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

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

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

1.5.3 Mehaničke osobine i poroznost

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

Tabela 1.4. Mehaničke osobine prirodnog koštanog tkiva⁶

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

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

Tabela 1.5. Uticaj sadržaja HAp u kompozitu na mehaničke karakteristike¹²⁸

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

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

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

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

Tabela 1.6. Mehaničke karakteristike blokova sa i bez samoojačanog polimera¹²⁶

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

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

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

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

1.5.3.1 Poroznost

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

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

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

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

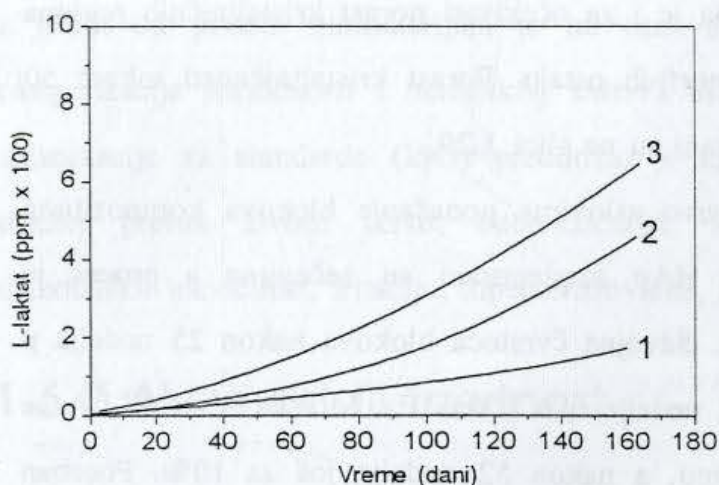
Dobijanje željenog prečnika pora sa veličinama od 100-250 μm , C. Laurencin sa saradnicima, ostvario je dodavanjem agenasa za formiranje pora kao što je natrijumhlorid i/ili polivinilalkohol (PVA).¹³⁰ R. Dunn i A. Tipton prikazali su mogućnost dobijanja prosečnog prečnika pora od 10-1000 μm , takođe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

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

1.5.4 In vitro i in vivo istraživanja

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

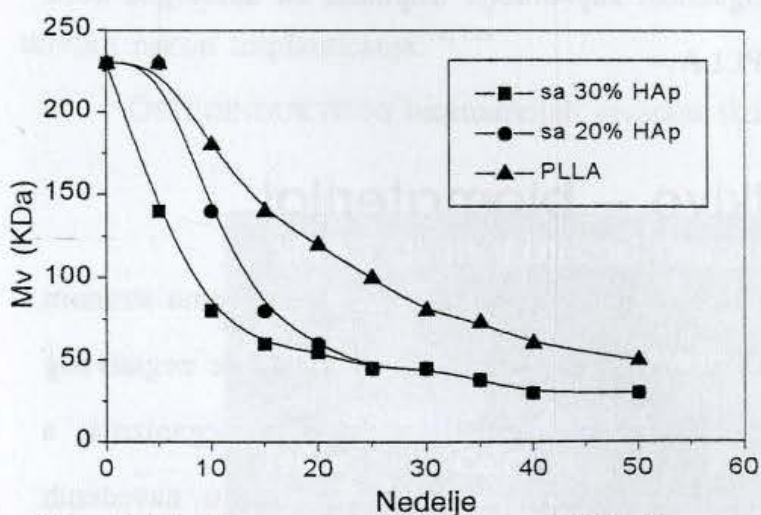
Rezultati *in vitro* istraživanja C. Verheyen-a i saradnika utvrdila su da tokom vremena potencijalne eksploatacije dolazi do promena pH sredine i molske mase PLLA.¹²⁷ Hidroliza PLLA tokom ispitivanja definisana je merenjem koncentracije oslobođenog monomera l-laktida iz PLLA u ispitivanom rastvoru,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



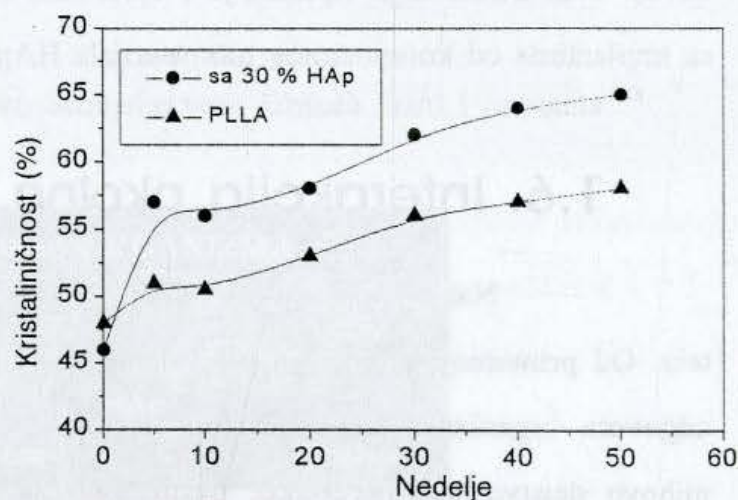
Slika 1.27. Oslobađanje l-laktida iz HAp/PLLA kompozita tokom *in vitro* ispitivanja: (1) sa 50 mas% HAp, (2) sa 30 mas% HAp, (3) čist PLLA¹²⁷

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

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



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



Slika 1.29. Promena kristaliničnosti PLLA iz kompozita sa 30% HAp¹²⁸

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

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

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

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

1.6. Interakcija okolno tkivo – biomaterijal

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

1.6.1 Hemijski sastav

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

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

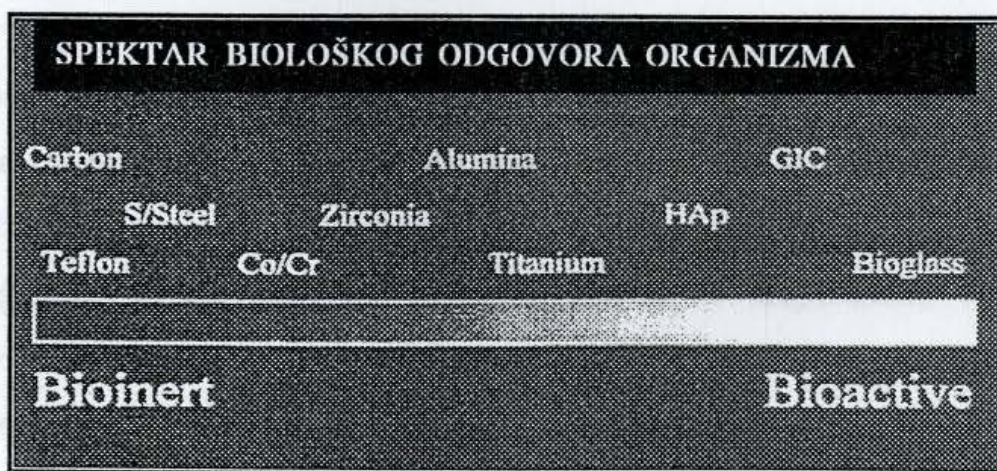
1.6.2 Aktivnost ili inertnost

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

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

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

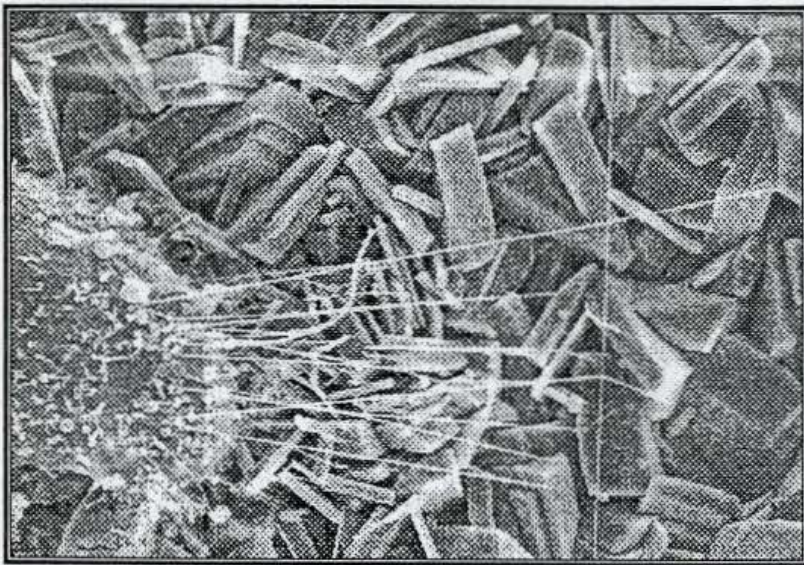
OSTEOINDUKTIVNI biomaterijali stvaraju fizičko-hemijske veze između kosti i implanta.¹²⁴



Slika 1.30. Spektar biološkog odgovora organizma na biomaterijale¹⁴

1.6.3. Biokompatibilnost

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



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

Slika 1.31. Ćelija osteoblasta na površini biomaterijala¹⁵⁷

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

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

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

1.6.4 Površina

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

1.6.5 Stanje okolnog tkiva

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

1.6.6 Hirurška veština

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

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

1.6.7 Sterilizacija

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

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

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

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

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