

Priprava kompozitnog materijala na temelju visoko poroznog hidroksiapatita i funkcionaliziranog poliestera

Cvetković, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:241850>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Sara Cvetković

**PRIPRAVA KOMPOZITNOG MATERIJALA NA TEMELJU VISOKO
POROZNOG HIDROKSIAPATITA I FUNKCIONALIZIRANOG
POLIESTERA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Dajana Milovac

dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2017.

Zahvala

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. H. Ivankoviću na prihvaćenom mentorstvu i odobrenoj temi.

Veliko hvala asistentici dr. sc. Dajani Milovac na pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada. Hvala na uloženom trudu i vremenu, na strpljenju i na brojnim savjetima.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentski život. Posebno bih zahvalila svojim prijateljicama, Marini i Tamari, koje su uvijek bile uz mene kada je trebalo, uz koje je sve bilo lakše, zanimljivije i ljepše.

Hvala mom Matiji na velikoj podršci, razumijevanju i poticanju tijekom diplomskog studija.

Također, veliko hvala mojim roditeljima, sestri i bratu na pomoći, ogromnoj podršci i razumijevanju, a najveća hvala mojoj majci Eleonori. Hvala joj što mi je bila ogromna podrška tijekom studiranja, što me uvijek znala motivirati, što je uvijek bila uz mene i uvijek vjerovala u mene.

SAŽETAK

U ovom istraživanju pripremljeni su kompozitni materijali na temelju hidroksiapatita (HA) i kopolimera Boltorn H40/polikaprolakton (BH40/PCL). Hidrotermalnom pretvorbom aragonita iz sipine kosti sintetiziran je visokoporozni HA s potpuno očuvanom mikrostrukturom sipine kosti. Uranjanjem HA komadnih uzoraka u otopinu kopolimera BH40/PCL dobiven je kompozit hidroksiapatit/BoltornH40/polikaprolakton (HA/BH40/PCL). Kvalitativnom XRD analizom kompozitnih uzoraka dokazano je nastajanje HA te prisustvo kopolimera BH40/PCL u kompozitu. Rezultati dobiveni DRIFT metodom prikazuju vibracije veza karakteristične za HA i kopolimer u kompozitnom materijalu. SEM analiza uzoraka prikazuje očuvanu lamelarnu i poroznu strukturu sipine kosti na kojoj se nakon impregnacije kopolimer kapljičasto raspodjeljuje po površini hidroksiapatita. *In vitro* ispitivanja provedena u HBSS otopini tijekom 21 dan ukazuju na mineralizaciju kalcijevih fosfata na površini kompozitnog materijala. TGA metodom određeno je da kompozitni uzorci sadrže oko 37.7 mas.% kopolimera BH40/PCL.

Ključne riječi: *inženjerstvo tkiva, hidroksiapatit, BH40, PCL, kompozit*

ABSTRACT

Composite materials of hydroxyapatite (HA) and copolymer Boltorn H40/Polycaprolactone (BH40/PCL) were prepared. The hydroxyapatite was synthesized by the hydrothermal conversion of aragonite from the cuttlebone while completely preserving the original microstructure of the bone. The composite material hydroxyapatite/Boltorn H40/Polycaprolactone (HA/BH40/PCL) was prepared by immersing the HA in the solution of the copolymer. XRD analysis of the composite showed the diffraction peaks belonging to HA and BH40/PCL copolymer. The results obtained by the DRIFT method show the presence of the bands characteristic for the HA as well as for the copolymer in the composite material. SEM analysis of the composites shows the preserved lamellar and porous structure of the cuttlebone after impregnation and the presence of the copolymer clusters (drop shape) on the surface of HA. *In vitro* mineralization of calcium phosphate was observed on the composite material after 21 days of soaking in HBSS. TGA analysis showed that the composite material contains 37.7 wt.% of the BH40/PCL copolymer.

Key words: *tissue engineering, hydroxyapatite, BH40, PCL, composite material*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA.....	2
2.2. STRUKTURA KOSTI.....	3
2.3. SVOJSTVA OKOSNICA U INŽENJERSTVU KOŠTANOG TKIVA.....	4
2.4. MATERIJALI U INŽENJERSTVU KOŠTANOG TKIVA.....	6
2.4.1. BIORAZGRADIVI POLIMERI.....	6
2.4.1.1. Polikaprolakton.....	7
2.4.1.2. Boltorn H40.....	9
2.4.1.3. BH40/PCL.....	10
2.4.2. BIOKERAMIKA.....	10
2.4.2.1. Hidroksiapatit.....	11
2.4.2.2. Biološki izvori za sintezu hidroksiapatita – sipina kost.....	12
2.4.2.3. Sinteza hidroksiapatita iz sipine kosti.....	13
2.4.2.4. Kompozit HA/BH40/PCL.....	14
2.5. HANKOVA OTOPINA (HBSS).....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. SINTEZA HIDROKSIAPATITA.....	16
3.2. PRIPREMA OTOPINE BH40/PCL.....	17
3.3. KOMPOZIT HA/BH40/PCL.....	17
3.4. ISPITIVANJA U HBSS-u.....	18
3.5. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA.....	18
3.5.1. RENDGENSKA DIFRAKCIJSKA ANALIZA (XRD).....	18
3.5.2. DIFUZNA REFLEKTIRAJUĆA SPEKTROSKOPIJA S INFRACRVENIM ZRAČENJEM (DRIFT).....	18
3.5.3. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA).....	19
3.5.4. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM).....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1. RENDGENSKA DIFRAKCIJSKA ANALIZA (XRD).....	20
4.2. DIFUZNA REFLEKTIRAJUĆA SPEKTROSKOPIJA S INFRACRVENIM ZRAČENJEM (DRIFT).....	21
4.3. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA).....	23
4.4. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM).....	24
5. ZAKLJUČAK.....	29

1.UVOD

Principi inženjerstva koštanog tkiva temelje se na razvoju 3D struktura, okosnica, koje služe kao predložak za adheziju i proliferaciju stanica, odnosno stvaranje novog koštanog tkiva. Ugrađena u tijelo, takva okosnica se povezuje s okolnim koštanim tkivom i na taj način obnavlja ili zamjenjuje oštećenu kost. Da bi oponašala prirodno koštano tkivo, okosnica mora ispuniti niz zahtjeva, stoga je izuzetno važan odabir materijala okosnice. Tako je sve veće zanimanje u tom području usmjereno na organsko/anorganske kompozitne materijale koji imitiraju prirodnu kost. Naime, prirodno koštano tkivo predstavlja kompozit organske matrice, uglavnom kolagena i neorganske mineralne faze, hidroksiapatita (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Unatoč neodgovarajućim mehaničkim svojstvima visokoporoznog skeleta HA, njegova izrazita biokompatibilnost, posebice sintetiziranog iz bioloških sirovina, te bioaktivnost, tj. sposobnost da potakne specifični biološki odgovor organizma, čini ga vrlo prikladnim za regeneraciju koštanog tkiva. Druga grupa materijala koja se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva jesu biorazgradivi polimerni materijali i to ponajviše zbog biokompatibilnosti, biorazgradivosti i odgovarajućih mehaničkih svojstava.

Mogućnost kombiniranja svojstava biokeramike (HA, Bioglass, TCP) i biorazgradivih polimernih materijala, koja podliježu zahtjevima inženjerstva koštanog tkiva, navodi na daljnja istraživanja i razvoj ovih kompozitnih materijala. Prednost ovakvih materijala u odnosu na ostale koji se koriste za regeneraciju koštanog tkiva (metalni, keramički, kompozitni materijali koji nisu biorazgradivi) je ta što se nakon početne mehaničke stabilnosti kompozitnog skeleta polimerna i keramička faza postepeno razgrađuje, oslobađajući pritom mjesto novostvorenom koštanom tkivu, što znači da nakon potpune resorpcije kompozitne okosnice u organizmu ne zaostaje strano tijelo. Osim toga, polimerna faza može služiti kao nosač lijekova ili biomolekula kojima se dodatno povećava funkcionalnost i bioaktivnost okosnice.[1,2]

2. OPĆI DIO

2.1. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje u kojem se primjenjuju principi inženjerstva, biologije, kemije, fizike i medicine da bi se razvili biološki nadomjesci koji obnavljaju, održavaju i poboljšavaju funkciju tkiva.[1] Glavna ideja inženjerstva koštanog tkiva je razvoj okosnice (engl. scaffold) koja u kombinaciji sa živim koštanim stanicama i biološkim stimulansima ubrzava oporavak i regeneraciju oštećenog koštanog tkiva.

Dosadašnji razvoj materijala u inženjerstvu koštanog tkiva dao je široki spektar biorazgradivih materijala različitog sastava, strukture i fizikalno-kemijskih svojstava. Iako se dio istraživanja i dalje temelji na modifikaciji površine bioinertnih masivnih ili poroznih nosača, najveći naglasak u području regenerativne medicine je na potpuno biorazgradivim poroznim materijalima. S obzirom da je prirodno koštano tkivo kompleksan kompozitni materijal sastavljen od mineralizirane organske faze, tj. kolagenskih vlakana s nanometarskim kristalima kalcijevih fosfata (pretežito karbonatnog hidroksiapatita), kombinacija svojstava polimernih i anorganskih komponenata kod proizvodnje koštanih nadomjestaka je neizbježna. Žilavost i biorazgradivost polimerne matrice kao imitacije kolagenskih vlakana te bioaktivnost, osteoprovodnost (poticanje koštanog zacjeljivanja) i resorpcija bioaktivne keramike kao anorganske komponente omogućuju razvoj i pripremu biomaterijala koji može zamijeniti prirodnu kost.

Iako se danas u razvoju biomaterijala primjenjuje veliki broj polimernih i keramičkih vrsta, i dalje je zahtjevno sintetizirati materijal na kojem bi se mogao predvidjeti stanični odgovor *in vivo*. Regeneracija tkiva može se potaknuti *in vitro* i *in vivo* metodama. *In vivo* metoda uključuje izolaciju koštanih stanica, nasađivanje stanica na okosnicu i direktnu ugradnju u oštećeno tkivo pacijenta kako bi se potaknulo stvaranje novog tkiva *in situ*. *In vitro* uvjeti podrazumijevaju uzgoj koštanog tkiva u bioreaktoru gdje se na okosnice nasađuju koštane stanice kojima se omogućuje kontrolirana ekspanzija i diferencijacija do konačnog stvaranja kosti. Nakon toga slijedi ugradnja okosnice u oštećeno tkivo pacijenta.[1,2]

2.2. STRUKTURA KOSTI

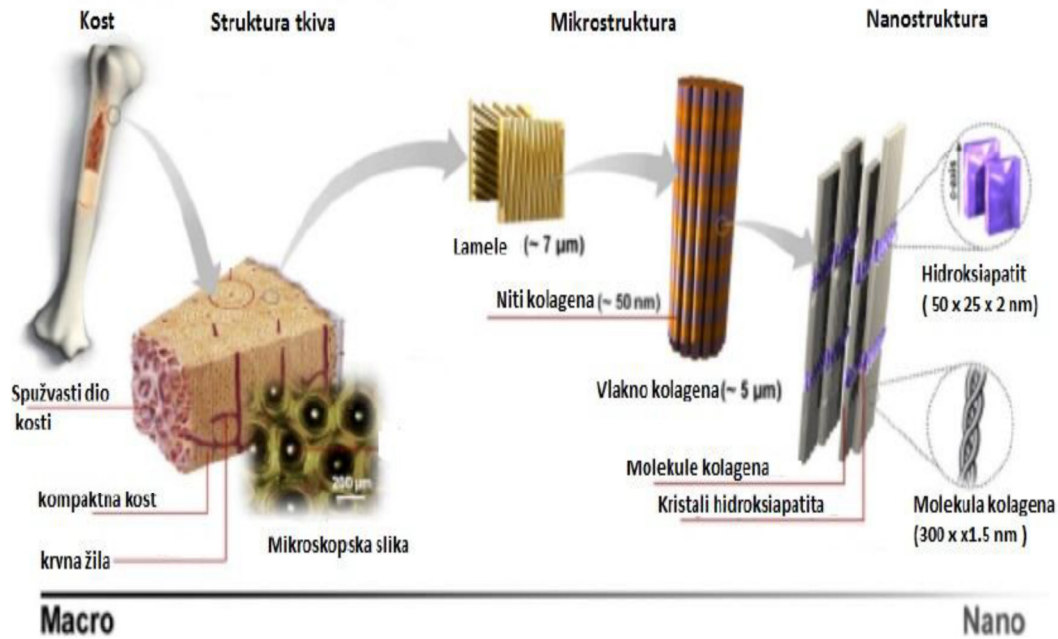
Kosti su međusobno povezane pokretljivim zglobovima i mišićima tako da mogu pokrenuti tijelo brzinom do 45 km/h. Kosti su čvrste i jake, šuplje unutrašnjosti, stoga nisu teške te čine samo 14% naše ukupne tjelesne mase (lakše su od mišića). Kosti nisu mrtve tvari u našem organizmu pa se zato obnavljaju kad se prelome. Ljudski kostur ima 206 kostiju.

Kost se sastoji od mineralne faze (kalcijeva fosfata u obliku karbonatnog hidroksiapatita na koji otpada 2/3 mase kosti), organskog dijela (najvećim dijelom kolagenskih vlakana) i vode. Hidroksiapatitni pločasti kristali, smješteni između kompaktan posloženih kolagenskih vlakana, kosti pružaju čvrstoću i tvrdoću, a kolagenska vlakna elastičnost i fleksibilnost.[3]

Glavne funkcije su:

- Zaštita- kosti štite unutrašnje organe kao što kosti lubanje štite mozak, a prsni koš štiti srce i pluća.
- Podupiranje - kosti čine kostur i tako drži organe na mjestu.
- Produkcija krvi - koštana srž, koja se nalazi u dugim ili cjevastim kostima, stvara krvne ćelije.
- Skladištenje minerala - u kostima se stvaraju rezerve minerala važnih za tijelo, najviše kalcij i fosfor.
- Kretanje - kosti, mišići, zglobovi, ligamenti i drugi zajedno pokreću naše tijelo.
- Detoksifikacija - koštano tkivo može da skladišti teške metale, vadeći ih iz krvi i tako štiteći druge organe. Ovi otrovi se kasnije polako razgrađuju u tijelu.
- Provođenje zvuka -slušne kosti (čekić, stremen i nakovanj) smješteni u uhu provode zvučne vibracije te su bitni za sluh.

U kostima se nalazi više od 98% kalcija, oko 85% fosfata i više od 50% magnezija od ukupne količine u organizmu. Inače, smatra se da se oko 27% mineralnih soli u tijelu nalazi u kostima u obliku kristala. Kristali soli prirodno su sredstvo za učvršćivanje kostiju. Svako kolagensko vlakno sastoji se od segmenata koji se periodično ponavljaju, a kristali leže čvrsto vezani uz svaki segment vlakna što osigurava čvrstoću kosti. Kost se može podijeliti na dva dijela, vanjski (kompaktni) i unutarnji (porozni) dio (slika 1). [1]



Slika 1 Struktura (morfologija) kosti pri različitim uvećanjima[3]

Kompaktni dio kosti je vrlo čvrst i ima zaštitnu, strukturalnu i mehaničku ulogu. Sastoji se od mineraliziranih kolagenskih vlakana umotanih u koncentrične lamele oko središnjeg kanala kroz koji prolaze krvne žile. Nasuprot tome, unutarnji dio kosti, trabekularnu kost karakterizira visoka poroznost, između 30% i 90%, odnosno velika specifična površina.[1,4]

2.3. SVOJSTVA OKOSNICA U INŽENJERSTVU KOŠTANOG TKIVA

Ideja inženjerstva koštanog tkiva je da okosnica pruži početnu 3D formu na kojoj stanice prijanjaju, rastu i stvaraju ekstracelularnu matricu, odnosno novu kost koja se integrira s okolnim koštanim tkivom. S obzirom na vrlo kompleksan biološki sustav kao što je ljudska kost, skup zahtjeva koje okosnica mora zadovoljavati je prilično izazovan. Neki od osnovnih zahtjeva su:

- Biokompatibilnost

Biokompatibilnost podrazumijeva svojstvo materijala da bude prihvaćen od strane živog organizma u koji se ugrađuje, ne smije imati toksično, kancerogeno ili alergijsko djelovanje na živi organizam.[5-8]

- Biorazgradivost

Razgradnja okosnica mora biti usklađena s rastom i razvojem koštanog tkiva, što znači, kad se u potpunosti stvori novo koštano tkivo, okosnica mora biti u potpunosti razgrađena.[8]

- Poroznost

Okosnice moraju imati otvorene i međusobno spojene pore te veliku specifičnu površinu kako bi se omogućilo prijanjanje i pravilna raspodjela stanica unutar okosnice. Pore omogućavaju vaskularizaciju okosnice, prijenos kisika i hranjivih tvari do stanica kao i otpremanje metaboličkog otpada.[9]

- Veličina pora

Veličina pora je vrlo važan faktor u dizajniranju okosnice. Neadekvatna veličina pora može dovesti do začepjenja pora uslijed stvaranja ekstracelularne matrice te tako onemogućiti razvoj koštanog tkiva. Opće je prihvaćeno da bi veličina pora trebala biti u rasponu od 200 do 900 μm . [8,10,11]

- Mehanička svojstva

Okosnice ispitivane *in vitro* posjeduju čvrstoću koja podnosi hidrostatske tlakove medija u kojem se nalaze te se zadržava poroznost potrebna za rast stanica [7], no u realnim uvjetima na kost djeluju velika naprezanja. Zbog tih naprezanja čvrstoća okosnice bi trebala biti jednaka čvrstoći kosti kako bi bila funkcionalna i pogodna za rast tkiva.[5-8]

- Bioaktivnost

Bioaktivan materijal ima svojstvo da tvori direktnu vezu sa živim tkivom što poboljšava obnavljanje i oporavak oštećenog tkiva.

- Svojstva površine

Kemijska i topografska svojstva površine utječu na adheziju i razmnožavanje stanica.[12-14] Istraživanja su pokazala da je razvoj ekstracelularne matrice bolji na hrapavoj nego na glatkoj površini materijala.[15,16]

2.4. MATERIJALI U INŽENJERSTVU KOŠTANOG TKIVA

Vrlo važan korak u dizajniranju okosnice je odabir materijala koji mora ispunjavati niz zahtjeva potrebnih za razvoj novog koštanog tkiva. Materijali koji se koriste u inženjerstvu koštanih tkiva, odnosno biomaterijali, mogu se podijeliti u tri osnovne grupe: biorazgradivi polimeri, biokeramika i kompoziti.

2.4.1. BIORAZGRADIVI POLIMERI

Biorazgradivi polimeri primjenjivi u inženjerstvu koštanog tkiva, dijele se u dvije skupine:

- *sintetske* kao što su poli(mliječna kiselina) (PLA), poli(glikolna kiselina) (PGA), kopolimeri laktida i glikola (PLGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)
- *prirodne*, među kojima su kolagen, hijaluronska kiselina i njeni derivati, škrob, želatina, alginati, hitin te kitozan i njegovi derivati.

Biorazgradivi polimeri imaju prednost korištenja u medicini zbog toga što ih ljudski organizam metabolički razgrađuje te nije potrebno raditi dodatne kirurške zahvate vađenja materijala. U inženjerstvu koštanog tkiva njihov je cilj dati strukturalnu potporu kosti kao i potporu njezinoj ponovnoj izgradnji te su zbog tih svojstava dobri kandidati za upotrebu u tom području. Proces biorazgradnje polimera podrazumijeva cijepanje polimernih makromolekula na manje molekulske jedinice reakcijama hidrolize ili uz pomoć enzima.

Prirodni i sintetski biorazgradivi polimeri imaju svoje prednosti i nedostatke. Jedna od prednosti sintetskih polimera je mogućnost dobivanja jednolikog materijala pri svakoj šarži sinteze te veća žilavost i bolja mehanička svojstva. Pored toga, razlike u brzini razgradnje s obzirom na mjesto razgradnje *in vivo* su vrlo male te su svojstva polimera lako predvidljiva. Međutim, sintetski polimeri su općenito biološki inertni i njihova se razgradnja odvija hidrolitičkim reakcijama u dužem vremenu što može ograničiti primjenu za regeneraciju određenih dijelova koštanog tkiva.

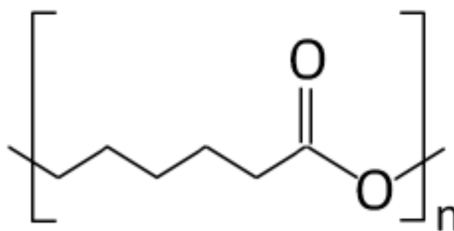
Prirodni polimeri su primjenjivi upravo zbog svoje sličnosti s biološkim molekulama izvanstanične matrice i proteinima što olakšava prepoznavanje materijala od strane koštanih stanica koje se nasaduju. Ključni nedostatak prirodnih polimera su ograničena mehanička svojstva koja je moguće modificirati primjenom umrežavanja, kemijskim cijepanjem ili fizikalnim umješavanjem odgovarajućih sintetskih polimera.[2]

2.4.1.1. Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL) je alifatski, semikristalični poliester sa širokim spektrom praktičnih ili potencijalnih primjena. Iako je već dugo poznat, veći znanstveni interes za PCL je prisutan tek posljednjih 10 do 15 godina. PCL ima sposobnost formiranja spoja s nizom drugih polimera (drugi poliesteri, polietilen, polipropilen, poli (metil metakrilat), poli (vinil acetat), kitozan, itd.) koji proširuje niz svojstava samog PCL-a, te se time može utjecati na kinetiku razgradnje i olakšano oblikovanje sukladno potrebama.

Jedno od glavnih svojstava PCL-a koje je vrlo značajno u inženjerstvu koštanog tkiva je njegova biorazgradivost koja mu omogućuje da se koristi kao implantat u ortopedskoj kirurgiji te vrlo često u pakiranju hrane.[17] Pogodan je i za kontrolirani prijenos lijekova zbog svoje visoke propusnosti na mnoge lijekove, biokompatibilnosti i sposobnosti da se potpuno izluči iz tijela nakon biorazgradnje. Njegova razgradnja je spora (2-4 godine) u usporedbi sa drugim polimerima pa je on zbog toga najpogodniji za dugoročno otpuštanje lijekova (duže od godine dana).

PCL je topiv u širokom rasponu otapala. Temperatura staklastog prijelaza PCL-a je oko $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a temperatura taljenja $60 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prosječna molekulska masa uzoraka PCL-a varira od 3 000 do 80 000 g/mol. Na sobnoj temperaturi je polukruti materijal, ima nisku rasteznu čvrstoću (oko 23 MPa) i visoko istežanje (više od 700%). Zahvaljujući niskom staklištu, PCL se često koristi i kao kompatibilizator, a enzimi i gljivice ga lako razgrade.[18] Molekularna struktura PCL-a sastoji se od pet nepolarnih metilenskih skupina ($-\text{CH}_2-$) i jedne esterske skupine (esterska skupina je relativno polarna) povezanih u lanac (slika 2).[19]



Slika 2 Struktura PCL-a[19]

Polimerizacija otvaranjem prstena (ROP) (engl. *ring-opening polymerization*) je jedan od načina dobivanja poli(ϵ -kaprolaktona) (slika 3). To je polimerizacija u kojoj otvaranje prstena monomera rezultira monomernom jedinicom koja ili nije prstenaste strukture ili sadrži manje prstenova nego ciklički monomer. PCL se može dobiti tako da se prsten ϵ -kaprolaktona otvori koristeći anionske, kationske ili koordinacijske katalizatore. Nakon otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona slijedi polimerizacija.[20]



Slika 3 Sinteza poli(ϵ -kaprolaktona) polimerizacijom otvaranja prstena (engl. *ring-opening polymerization*, ROP)[20]

Posljednjih 30 godina razgradnja PCL-a je temeljito istražena te se PCL pokazao razgradiv u nizu okruženja. Može se razgraditi djelovanjem mikroorganizama kao što su bakterije ili gljivice, ali nije biorazgradiv u životinjskom ili ljudskom tijelu zbog nedostatka odgovarajućih enzima. Zbog toga se ne može reći da PCL nije bioresorbirajući, već sam taj proces razgradnje traje puno duže jer se odvija mehanizmom hidrolitičke razgradnje. Također, i kemijska struktura PCL-a čini ga hidrofobnim i visoko kristalastim što rezultira slabim upijanjem vode i zato je brzina razgradnje spora.

PCL ima vrijeme ukupne razgradnje dvije do četiri godine ovisno o početnoj molekulskoj masi. Brzina razgradnje može se mijenjati kopolimerizacijom s drugim laktonima ili latidima te kombinacijom temperature i mikroorganizama. Razgradnja PCL-a *in vivo* odvija se u dva stupnja. Prvi stupanj uključuje ne-enzimatsko nasumično hidrolitičko cijepanje esterskih veza, dok je drugi stupanj karakteriziran početkom gubitka mase zbog difuzije oligomera iz unutrašnjosti polimera. [18]

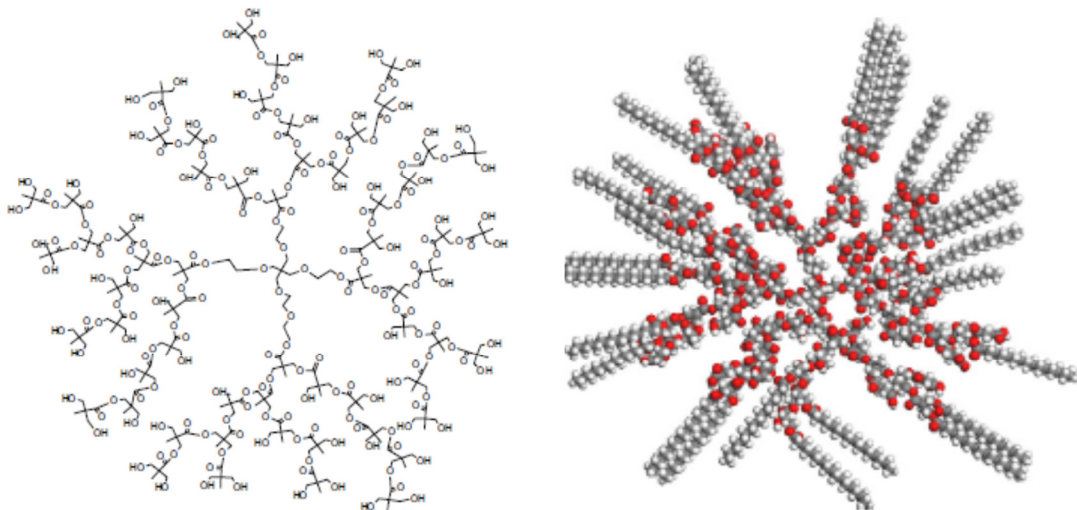
2.4.1.2. Boltorn H40

Zbog svoje visokorazgranate strukture i velikog broja funkcionalnih skupina, hiperrazgranati polimeri posjeduju jedinstvena svojstva koja ih čine zanimljivima za uporabu u širokom rasponu. Hiperrazgranati polimeri imaju bolju topljivost, nižu viskoznost, nižu temperaturu taljenja i stupnja kristalizacije od njihovih linearnih analoga.

Neki od najraširenijih ispitivanih hiperrazgranatih polimera su poliesteri koji se temelje na 2,2-bis (metilol) propionskoj kiselini. Jedan od takvih poliestera je i Boltorn H40 (BH40). BH40 je hidroksi-funkcionalni alifatski hiperrazgranati poliestar sa 64 -OH skupine (teoretski) (slika 4). Istraživanja hiperrazgranatog polimera BH40 najčešće se vežu uz njegovu primjenu kao nosača lijeka.[21,22,23]

Istraživanja Reula i suradnika rađena s polimernim BH40 nanočesticama pokazala su gubitak mase polimera od 30% uslijed degradacije tijekom 3 tjedna. Također, ispitana je i citotoksičnost polimera te kinetika otpuštanja lijeka i zaključeno je da BH40 ima potencijala kao nanosustav u dostavi lijekova.[24]

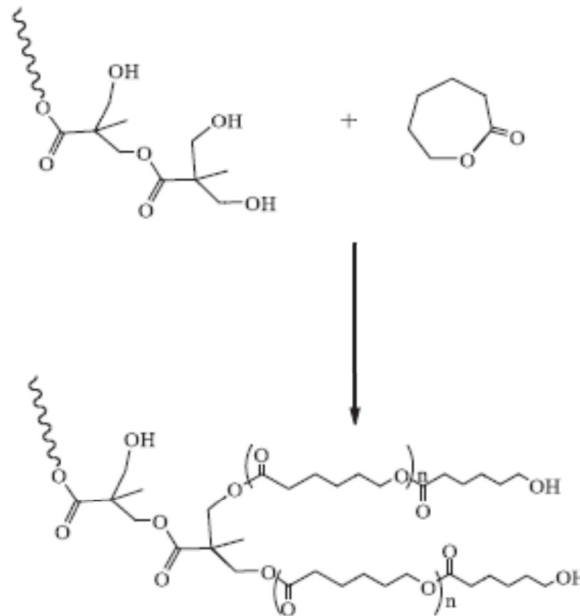
U posljednjih nekoliko godina sve je veći interes za sintezu hiperrazgranatih polikaprolakton polimera i kopolimera čime se znatno povećava mogućnost utjecaja na širok niz svojstava materijala te time i veće područje primjene.[25]



Slika 4 Struktura Boltorn H40 (BH40)[25]

2.4.1.3. BH40/PCL

Pulko i suradnici sintetizirali su kopolimer hiperrazgranati poliester, Boltorn H40 i polikaprolaktona (PCL). Tijekom graftiranja, krajnje OH skupine BH40 reagiraju s kaprolaktonom, dok one linearne ostaju gotovo netaknute, osim pri visokom udjelu reaktanata i produženom vremenu reakcije kada može doći i do njihova graftiranja (slika 5).[17]



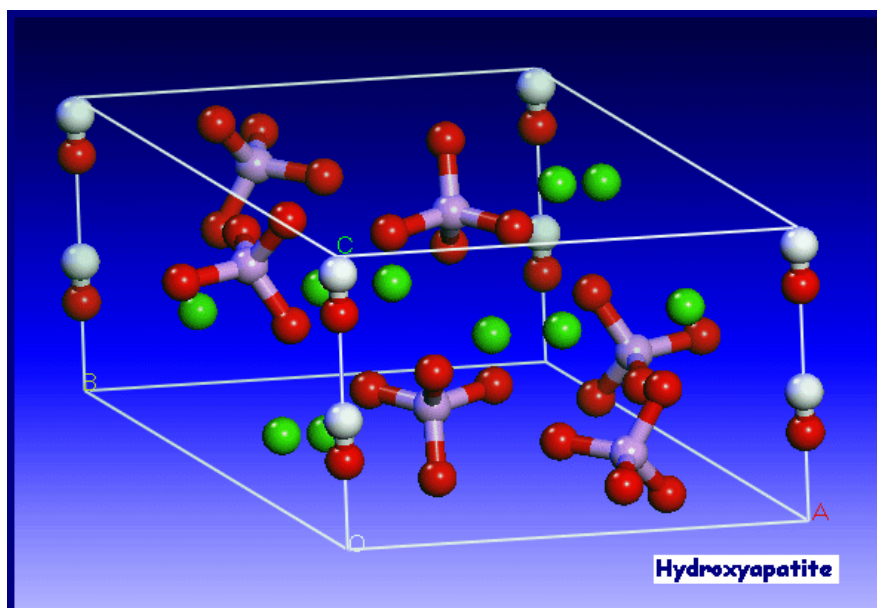
Slika 5 Graftiranje PCL-a na BH40[17]

2.4.2. BIOKERAMIKA

Najčešće korišteni biokeramički materijali su hidroksiapatiti i njemu slični kalcijevi fosfati. Zbog svoje sličnosti prirodnom koštanom tkivu, izvrsne biokompatibilnosti, afiniteta prema biopolimerima i velikog osteogenog potencijala, sintetski hidroksiapatit (HA) je među najistraživanijim materijalima za biomedicinske nadomjestke. Bioaktivno svojstvo keramike čini keramičku okosnicu idealnom platformom za stvaranje novog dijela kosti pomoću zrelih osteoblasta koji su migrirali iz okolnog koštanog tkiva i izravno povezivanje biokeramike i novonastalog koštanog tkiva.[1,2,26]

2.4.2.1. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) je kalcijev fosfat kemijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ s molarnim omjerom $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ te pripada mineraloškoj skupini apatita. Stehiometrijski HA je kemijski i toplinski vrlo stabilan, ali posjeduje mogućnost supstitucije određenih kationa (Mg^{2+} , Na^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) i aniona (HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^-) unutar kristalne rešetke, što definira njegova konačna kemijska i fizikalna svojstva. Kristalna struktura hidroksiapatita može se opisati kao kompleksna heksagonska slagalina kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u slagalini (slika 6).[1,2]



Slika 6 Prikaz kristalne strukture hidroksiapatita[27]

Kristalna struktura hidroksiapatita može prihvatiti druge ione kao supstituente. Te supstitucije se mogu odvijati na mjestima kalcijevih iona, fosfatnih ili hidroksilnih skupina. Ionske supstitucije mogu utjecati na parametre ćelije, kristalnu morfologiju, kristaliničnost, topivost i termalnu stabilnost hidroksiapatita. Kationski supstituenti najčešće se pojavljuju u područjima zauzetim kalcijevim atomima te uključuju natrij, magnezij, kalij, stronciji i mangan. Postoje dva tipa karbonatne supstitucije navedene u literaturi, a to su supstitucija CO_3^{2-} skupina na mjesto OH^- skupina (tip A) i CO_3^{2-} skupina na mjesto PO_4^{3-} skupina (tip B). Karbonatni HA češće se formira oko implantanata velike gustoće u usporedbi s čistim hidroksiapatitom. Povećanoj bioaktivnosti karbonatnog hidroksiapatita pridonosi to što karbonatni hidroksiapatit ima veću topljivost.[1]

Specifična svojstva hidroksiapatita omogućila su njegovu primjenu u industriji i tehnologiji kao katalizatora, fluorescentnog materijala, senzora, adsorbensa, ali najveći naglasak je na primjeni za biomedicinske svrhe: nadomjestak za koštane defekte, usadak srednjeg uha, nosač lijekova, proteina i ostalih biomolekula i bioaktivna prevlaka metalnih nadomjestaka. Dosadašnja istraživanja bioloških svojstava sintetičkog HA potvrdila su da potiče rast novog koštanog tkiva bez stvaranja lokalne toksičnosti, upalnih reakcija ili odgovora domaćina.[2]

2.4.2.2. Biološki izvori za sintezu hidroksiapatita – sipina kost

Sipa (*Sepia officinalis L.*) je morska životinja koja spada u red glavonožaca (slika 7). Njezin plašt se sastoji od tri mišićna sloja. Vanjski i unutarnji su kružne građe i protežu se oko cijelog organizma, dok je srednji sloj građen od poprečnih vlakana okomitih na okolna dva. Unutar tijela nalazi se kost koja se još naziva sipina kost ili sipovina (slika 8). To je ostatak vanjske ljuštire njenih predaka mekušaca.

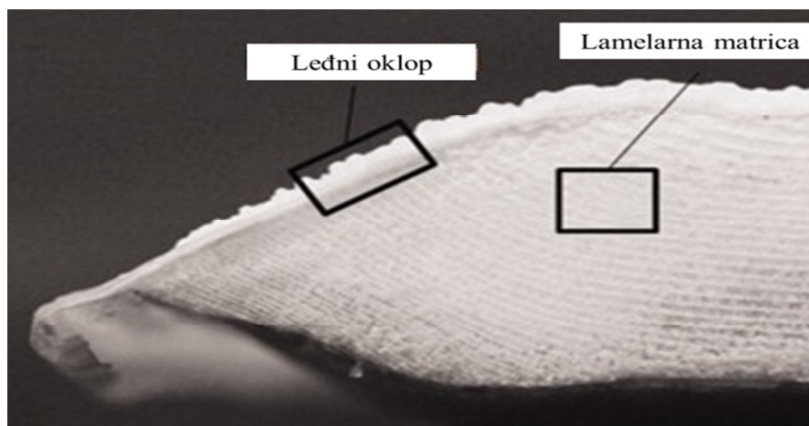


Slika 7 Sipa u prirodnom okruženju[7]



Slika 8 Sipina kost[28]

Sipina kost ima izrazito poroznu strukturu (oko 90%) i zauzima 9% volumena sipe. Kost se sastoji od dva dijela: leđnog oklopa, plašta i unutarnje lamelarne matrice. Lamelle su međusobno odvojene potpornim stupićima (Slika 9).



Slika 9 Uvećani prikaz sipine kosti koji prikazuje leđni oklop i lamelarnu matricu kosti[1]

Lamele ili paralelni listovi izgrađeni su od aragonitne modifikacije kalcij karbonata (CaCO_3) te tvore odjeljke koji su međusobno izolirani. Unutar svakog odjeljka se nalazi tekućina i plin koji se mogu slobodno kretati. Razmak između lamela je različit i uglavnom iznosi od 200 do 600 μm . Sipina kost se koristi kao nadomjestak za tvrda koštana tkiva zbog svoje strukture jer ima poroznost sličnu ljudskoj kosti. Sipina kost se sastoji od aragonita, a to je nestabilna modifikacija kalcijevog karbonata te je kao takva neupotrebljiva. Potrebno ju je prevesti u hidroksiapatit, a da se pri tome ne naruši njezina struktura.[1]

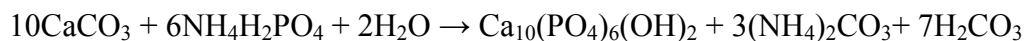
2.4.2.3.Sinteza hidroksiapatita iz sipine kosti

Uporaba bioloških struktura i materijala, poput koralja, morskih školjkaša, životinjskih skeleta i sličnog u medicinske svrhe motivirana je jednostavnim načinom pripreme HA i visokoporoznom strukturom spomenutih bioloških materijala. Sinteza se može provoditi na dva načina: precipitacijskom metodom i hidrotermalnom sintezom.

Precipitacijska metoda temelji se na simultanom miješanju vodenih otopina kalcijevih i fosfatnih spojeva pri $\text{pH} > 7$ ili dokapavanjem vodene otopine fosfata u vodenu otopinu kalcijeve soli. Metoda precipitacije omogućuje sintezu u rasponu temperatura od sobne do vrelišta otapala (najčešće vode) te u širokom spektru pH vrijednosti vodenog medija od 4,2 do

13. Najčešće se sinteza hidroksiapatitnih nanokristala reakcijama precipitacije temelji na reakciji kalcijeva nitrata tetrahidrata, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ili kalcijeva hidroksida, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ s diamonijevim hidrogenfosfatom, $(\text{NH}_2)_2\text{HPO}_4$ ili fosfornom kiselinom, H_3PO_4 uz regulaciju pH otopine amonijevom ili natrijevom lužinom.[2]

Hidrotermalna sinteza je postupak u kojem se odvijaju jednofazne ili više fazne reakcije u vodenom mediju pri povišenim temperaturama ($T > 25^\circ\text{C}$) i tlakovima ($p > 100 \text{ kPa}$) u cilju dobivanja kristaličnog HA direktno iz otopine. Uspješnu sintezu HA iz anorganske komponente sipine kosti hidrotermalnom konverzijom proveli su Ivanković i suradnici[17] utvrdivši da je aragonit u potpunosti moguće prevesti u AB-tip karbonatnog HA, a da se pritom potpuno očuva originalna mikrostrukura i arhitektura sipine kosti. Kao polazne komponente koristili su sipinu kost i amonijev dihidrogenfosfat, a reakcija hidrotermalne sinteze dana je jednadžbom:[1]



2.4.2.4. Kompozit HA/BH40/PCL

Zamjenski supstrati kosti trebaju imati kombinaciju svojstava u svrhu promicanja rasta stanica i adhezije, visoke poroznosti koja bi olakšala prijenos hranjivih tvari i izlučivanje otpadnih proizvoda, ali i odgovarajuću mehaničku čvrstoću.

Kako bi se nadišli poznati problemi polimernih okosnica kao što su nedovoljna čvrstoća, tvrdoća i nezadovoljavajuća struktura za uporabu u inženjerstvu koštanog tkiva, težište istraživanja prebačeno je na kompozite keramičkih materijala i polimera.

Jedan od njih je upravo kompozit HA/BH40/PCL. Biokompatibilnost HA s ljudskom kosti i biorazgradivost BH40/PCL čine ga pogodnim kompozitnim materijalom u inženjerstvu koštanog tkiva. Pregledom literature ustanovljeno je da do sada nisu rađena istraživanja na kompozitnom sustavu HA i BH40/PCL.

2.5. HANKOVA OTOPINA (HBSS)

Hankova otopina soli standardna je slana otopina koja se često koristi u biomedicinskim istraživanjima u svrhu poticanja rasta mnogih vrsta stanica.[29]

Njena glavna uloga je osigurati navodnjavanje i opskrbu vodom i anorganskim anionima bitnih za normalni metabolizam stanica te održati stalan pH i osmotski tlak. To je važno zbog očuvanja strukture stanica jer pogrešna količina iona u otopini može dovesti do skupljanja ili pucanja stanica. Glavne komponente HBSS-a su: natrij, kalij, kalcij, magnezij i kloridi (tablica 1).[30]

Tablica 1 Sastav Hankove balansirane otopine

	<i>Liquid</i>				
	HBSS 1X	HBSS 10X without Ca & Mg	HBSS 1X without Phenol Red	HBSS 1X without Ca & Mg	HBSS 1X without Ca & Mg without Phenol Red
<i>Catalog Nos.</i>	9220	9230 (10X)	9224	9228	9232
<i>Component</i>	<i>mg/L</i>	<i>mg/L</i>	<i>mg/L</i>	<i>mg/L</i>	<i>mg/L</i>
Sodium Chloride	8000	80000	8000	8000	8000
Potassium Chloride	400	4000	400	400	400
Potassium Phosphate, monobasic KH_2PO_4	60	600	60	60	60
Glucose	1000	10000	1000	1000	1000
Phenol Red, Na salt	10	100	—	10	—
Sodium Phosphate, dibasic Na_2HPO_4 anhyd.	48	479	48	48	47.86
Magnesium Sulfate, anhyd. MgSO_4	98	—	98	—	—
Calcium Chloride, anhyd.	140	—	140	—	—
Sodium Bicarbonate	350	—	350	350	350

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. SINTEZA HIDROKSIAPATITA

Kao polazni materijal za hidrotermalnu sintezu hidroksiapatita korištena je aragonitna sipina kost. Kost je mehanički očišćena tako što je skinut plašt kosti, a porozni dio je izrezan cirkularnom pilom na komade debljine 5-6 mm. Izrezani komadi su stavljeni u otopinu natrijeva hipoklorita (NaClO , 13% akt. Cl_2 , Gram-mol) na 24 sata kako bi se uklonila organska komponenta kosti. Nakon uklanjanja organske komponente, sipina kost je ispirana destiliranom vodom i sušena pri 105°C . Komadi sipine kosti zajedno s amonijevim dihidrogenfosfatom ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Fisher Chemical) stavljeni su u teflonsku posudu u hidrotermalni reaktor na 200°C tijekom 72 sata. Po završetku hidrotermalne sinteze uzorci su izvađeni, isprani destiliranom vodom i sušeni (slika 10).



Slika 10 Dobiveni HA

3.2. PRIPREMA OTOPINE BH40/PCL

Kopolimer BH40/PCL otopljen je u vrućem etanolu. U 50 mL etanola otopljeno je 10 g krutog kopolimera na magnetskoj mješalici uz konstantno miješanje i zagrijavanje pri 60° C (slika 11). Time je pripravljena 20%-tna otopina kopolimera BH40/PCL.



Slika 11 Prikaz zagrijavanja i miješanja otopine kopolimera BH40/PCL na magnetskoj mješalici

3.3. KOMPOZIT HA/BH40/PCL

Kako bi dobili kompozitni materijal HA/BH40/PCL, uzorci HA su uronjeni najprije u čisti etanol zagrijan na 60°C, a zatim u pripravljenu 20%-tnu otopinu kopolimera BH40/PCL zagrijanu na 60° C. U otopini na toj temperaturi uzorci su držani 3 h. Nakon 3 h, uzorci su izvađeni, sušeni na 105° C u sušioniku te karakterizirani.

3.4. ISPITIVANJA U HBSS-U

HBSS otopina s ionskim sastavom sličnim onome ljudske krvne plazme korištena je kao otopina za procjenu bioaktivnosti pripremljenog kompozita HA/BH40/PCL. Pripremljena je 1L ove otopine s početnim pH 7,44 koja sadrži 0,1396 g CaCl₂, 0,09767 g MgSO₄, 0,4 g KCl, 0,06 g KH₂PO₄, 8,0 g NaCl, 0,04788 g Na₂HP0₄, 1,0 g D-glukoze i 0,35 g NaHCO₃ (H1387, Sigma-Aldrich). Tikvica od 1L napunjena je sa 0,9L vode i u nju je kvantitativno prenesen prašak soli. Dobivena otopina je lagano miješana bez zagrijavanja sve dok prašak nije u potpunosti otopljen. U otopinu je dodano 0,35 g natrijeva hidrogenkarbonata, NaHCO₃ i miješano je dok se nije otopio. Nakon što se otopio, izmjereno je pH otopine koji je iznosio 7,44 te je tikvica nadopunjena do oznake. U dvije bočice uliveno je po 50 mL otopine te je u njih stavljen uzorak (kompozit HA/BH40/PCL). Bočice s otopinom i uzorkom stavljen su na mućkalicu na temperaturu T=37° i brzinu okretaja 50 tijekom 21 dana. Izmjena otopine HBSS-a je rađena svaka 3 dana. Nakon 21 dan, površina uzorka analizirana je elektronskim mikroskopom.

3.5. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA

3.5.1. RENDGENSKA DIFRAKCIJSKA ANALIZA (XRD)

Mineraloški sastavi pripremljenih uzoraka određeni su rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) na Shimadzu XRD-6000 instrumentu s CuK α zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva $5^\circ < 2\theta < 70^\circ$ pri brzini snimanja od 0,2°/s.

3.5.2. DIFUZNA REFLEKTIRAJUĆA SPEKTROSKOPIJA S INFRACRVENIM ZRAČENJEM (DRIFT)

Analiza funkcionalnih skupina kompozitnog materijala provedena je DRIFT metodom na FTIR uređaju (Bruker VERTEX 70). Uzorak je usitnjen u tarioniku te pomiješan s KBr-om u masenom omjeru 1(KBr)/0,05(uzorak) i analiziran u apsorpcijskom području od 400 do 4000 cm⁻¹, pri rezoluciji od 4 cm⁻¹.

3.5.3. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA)

Uzorci su analizirani termogravimetrijskom analizom u platinskim lončićima na uređaju za TGA (TA Instruments Q500) u rasponu od 40 do 1000°C, brzinom zagrijavanja 5°C/min.

3.5.4. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

Morfologija HA, kompozitnih uzoraka (hidroksiapatit/BH40/PCL) te kompozitnih uzoraka (HA/BH40/PCL) nakon uranjaja u HBSS proučavana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM TESCAN VEGA TS5136LS). S obzirom da su uzorci nevodljivi, prethodno su napareni vodljivim slojem zlata (slika 12 a) i b)).

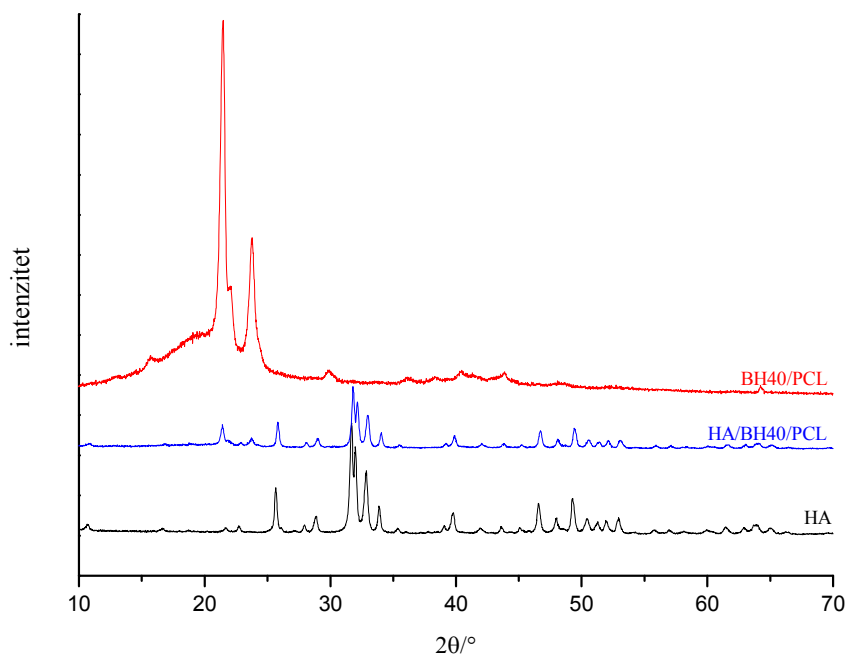


Slika 12 a) Uređaj za neparivanje **b)** Uzorci napareni vodljivim slojem zlata

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RENDGENSKA DIFRAKCIJSKA ANALIZA (XRD)

Difrakcijski spektri HA i kompozita HA/BH40/PCL, te kopolimera BH40/PCL prikazani su na slici 13. Difrakcijski maksimumi na $2\theta = 10.8^\circ$, 16.8° , 21.8° , 22.8° , 25.7° , 27.9° i 28.9° karakteristični su za hidroksiapatit (JCPDS 09-0432), a pojavljuju se i na difrakcijskom spektru kompozitnog uzorka. Intenziteti difrakcijskih maksimuma HA u kompozitnom uzorku su niži u odnosu na čisti HA. Također, na difraktogramu kompozita vidljivi su maksimumi na $2\theta = 21.4^\circ$ i 23.8° koji su karakteristični za kopolimer PCL, dok se za BH40 u kopolimeru javlja amorfno područje između 15.0° i 25.0° te difrakcijski maksimumi na 30.0° i 42.0° čime se potvrđuje prisustvo kopolimera u kompozitu.[30]

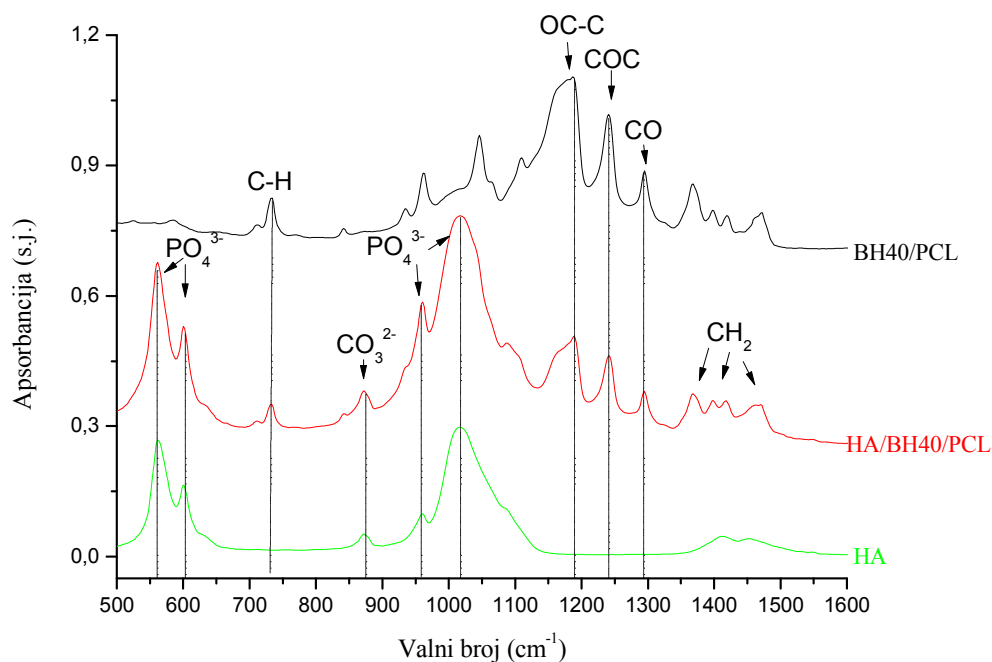


Slika 13 XRD spektar HA, kompozita HA/BH40/PCL i kopolimera BH40/PCL

4.2. DIFUZNA REFLEKTIRAJUĆA SPEKTROSKOPIJA S INFRACRVENIM ZRAČENJEM (DRIFT)

DRIFT tehnikom dobiveni su spektri HA i kompozita HA/BH40/PCL te kopolimera BH40/PCL koji prikazuju karakteristične vrpce navedenih materijala.

Slika 14 prikazuje spektre HA, kompozita HA/BH40/PCL i kopolimera BH40/PCL u području od 260 do 1600 cm^{-1} . Na spektru kompozita HA/BH40/PCL vidljive su vrpce PO_4^{3-} tetraedara pri 561, 601, 960 i 1019 cm^{-1} karakteristične za HA. HA u svoju strukturu može primiti supstituente kao što je CO_3^{2-} skupina, pa tako postoje dva tipa karbonatnih supstitucija: supstitucija CO_3^{2-} skupina na mjesto OH^- skupina (tip A) i CO_3^{2-} skupina na mjesto PO_4^{3-} skupina (tip B). Iz spektra kompozita HA/BH40/PCL vidljivo je da u kompozitu postoji B tip supstitucije karbonatnih iona čija se vrpca javlja pri 872 cm^{-1} . B-tip supstitucije koji je nađen u sintetiziranom HA dominira u sastavu anorganske faze prirodne kosti (2-8 mas.%) te povećava bioaktivnot i biokompatibilnost materijala.[1]

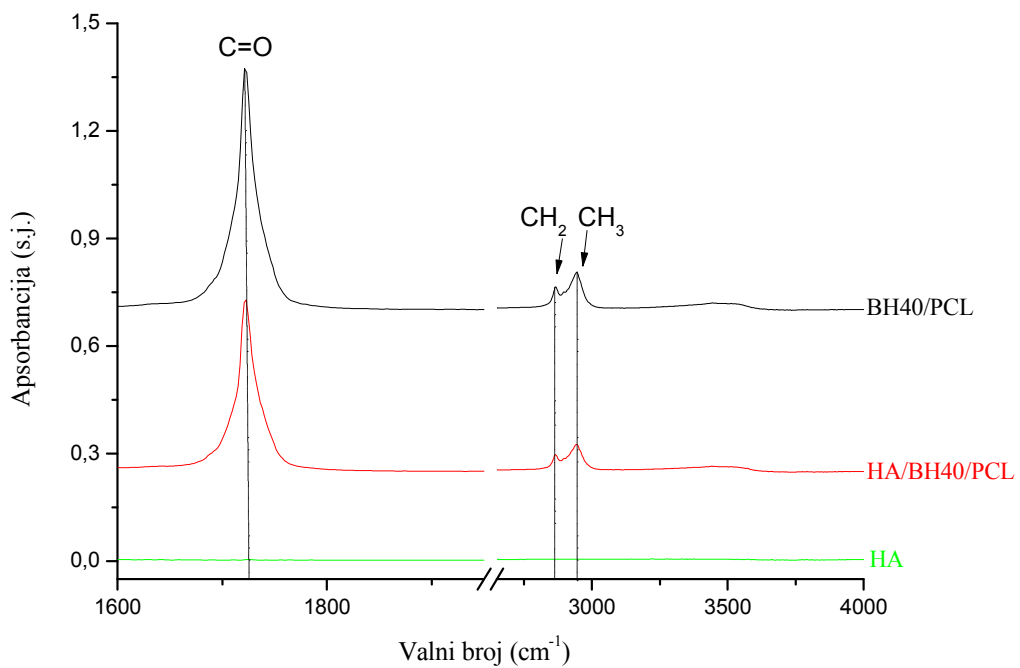


Slika 14 Grafički prikaz spektara HA, kompozita HA/BH40/PCL i polimera BH40/PCL u području od 500 do 1600 cm^{-1}

Karakteristične vrpce PCL-a pojavljuju se na spektru kompozita HA/BH40/PCL te upućuju na prisustvo PCL-a u kompozitu. Tako se na 1473, 1397 i 1361 cm^{-1} javljaju vrpce CH_2

savijanja, na 1293 cm^{-1} vrpca C-O i C-C istežanja kristalne faze, na 1242 cm^{-1} asimetrično COC istežanje, a na 1190 cm^{-1} OC-O istežanje.

Na slici 15 prikazani su spektri HA, kompozita HA/BH40/PCL i kopolimera BH40/PCL u području od 1600 do 4000 cm^{-1} . Na 2949 cm^{-1} vidljiva je vrpca asimetričnog CH_3 istežanja, a na 2865 cm^{-1} simetričnog CH_2 istežanja i karakteristična vrpca C=O istežanja na 1724 cm^{-1} koje također potvrđuju kopolimer u kompozitu. Široka vrpca oko 3450 cm^{-1} karakteristična je za asimetrično rastezanje OH^- skupina.[31]

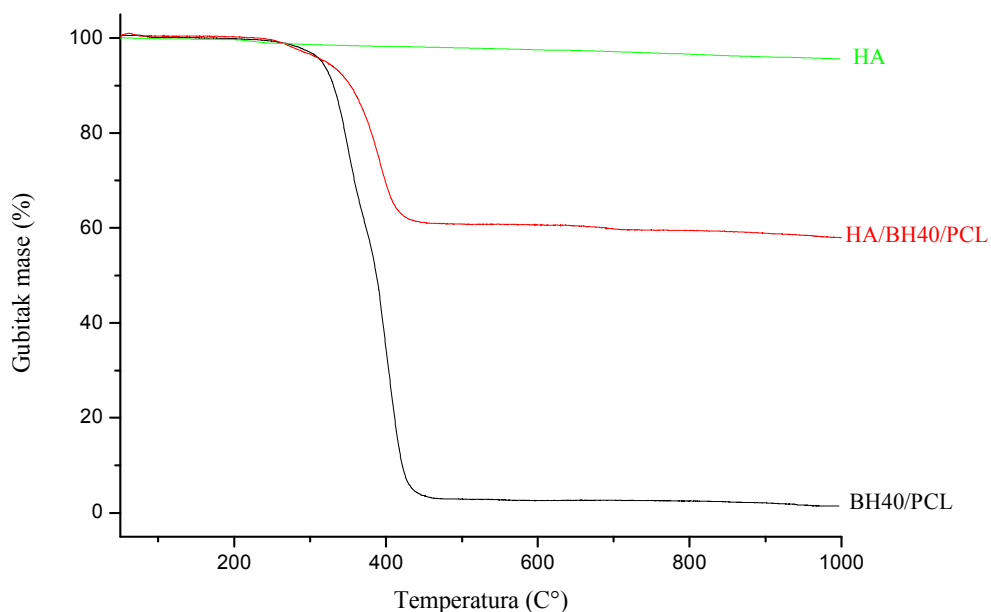


Slika 15 Grafički prikaz spektara HA, kompozita HA/BH40/PCL i kopolimera BH40/PCL u području od 1600 do 4000 cm^{-1}

4.3. TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA)

Da bi se odredila količina kopolimera BH40/PCL impregnirana u hidroksiapatitne okosnice, kompozit HA/BH40/PCL analiziran je termogravimetrijski do 1000°C. Radi usporedbe, analiziran je i uzorak čistog HA i kopolimera BH40/PCL.

Termogravimetrijska krivulja hidroksiapatita ukazuje na njegovu termalnu stabilnost. Gubitak mase čistog HA od 4.4% pripisuje se gubitku fizikalno adsorbirane vode, kao i gubitku CO₂ procesom dekarbonizacije koji nastupa u temperaturnom intervalu od 600°C do 1000°C (slika 16).

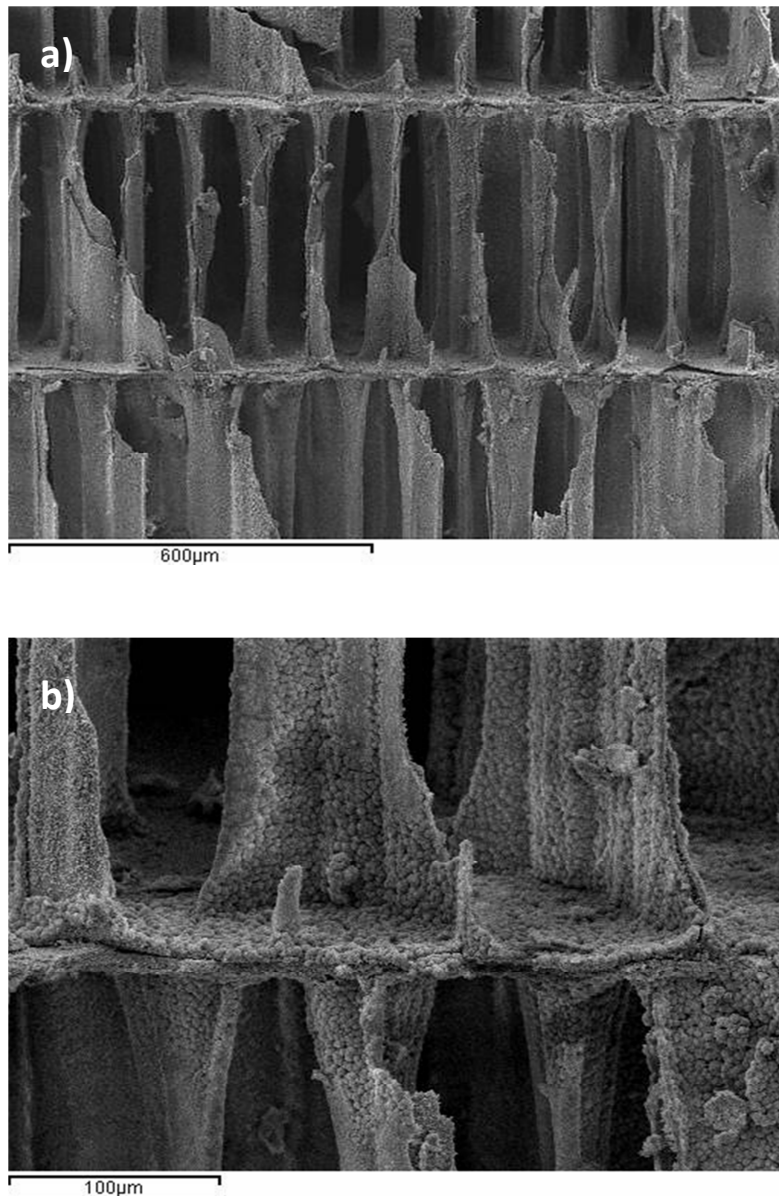


Slika 16 TGA krivulje HA, kompozitnog materijala HA/BH40/PCL i kopolimera BH40/PCL

Iz termogravimetrijske krivulje BH40/PCL-a vidljivo je da dolazi do potpunog raspada kopolimera pri temperaturi od oko 470°C. Na termogravimetrijskoj krivulji kompozita HA/BH40/PCL vidljiv je gubitak mase od 42.1% koji ukazuje da kompozit sadrži 37.7% kopolimera BH40/PCL-a.

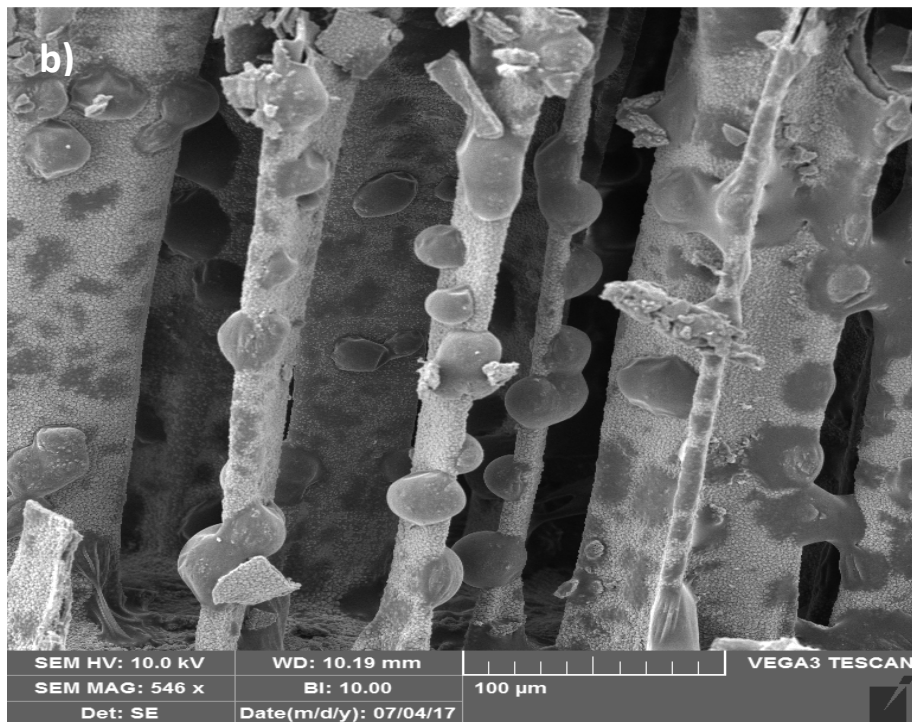
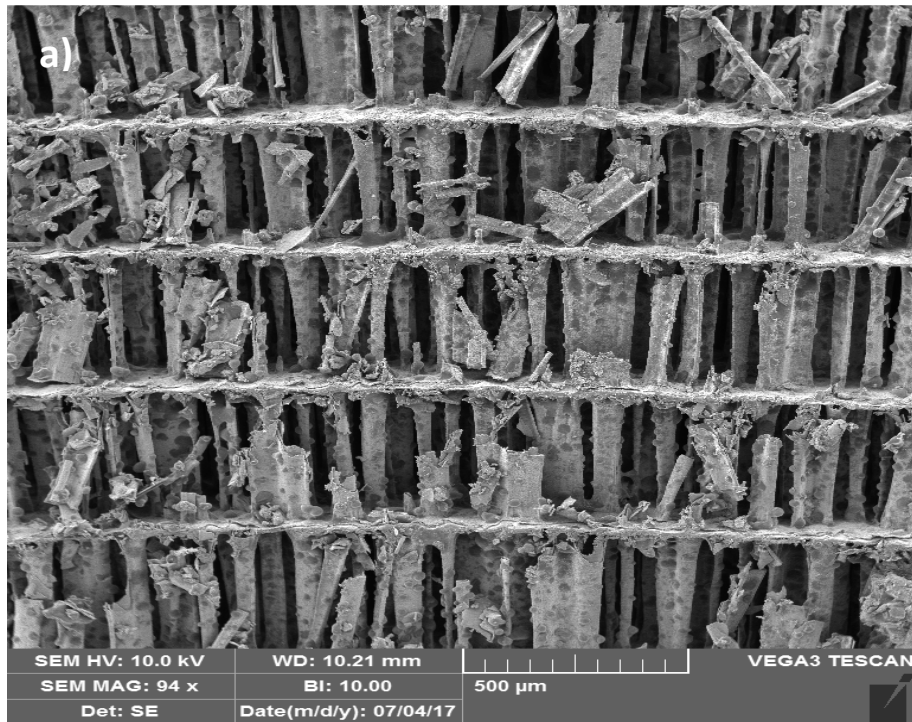
4.4. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

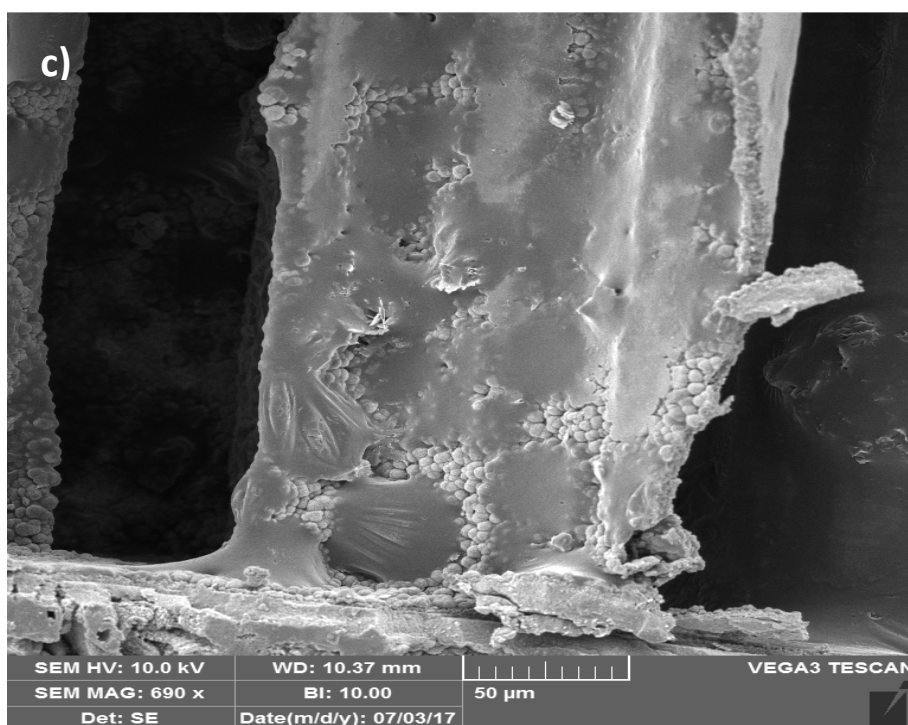
Skenirajuća elektronska mikroskopija korištena je kako bi se dokazala prisutnost kopolimera BH40/PCL u kompozitnom materijalu te analizirala morfologija površine materijala. Mikrografske snimke prikazuju unutarnju i vanjsku površinu materijala kako bi se utvrdila efikasnost ulaska otopine kopolimera BH40/PCL u pore HA.



Slika17 a)SEM mikrograf čistog HA b)SEM mikrograf HA pri većem uvećanju

SEM mikrograf hidroksiapatita sintetiziranog hidrotermalnom sintezom iz sipine kosti na 200°C kroz 72 h pokazuje očuvanu originalnu mikrostrukturu sipine kosti (slika 17 a)). Kristali HA prekrivaju površinu tvoreći sferične forme koje doprinose povećanju specifične površine materijala(slika 17 b)).



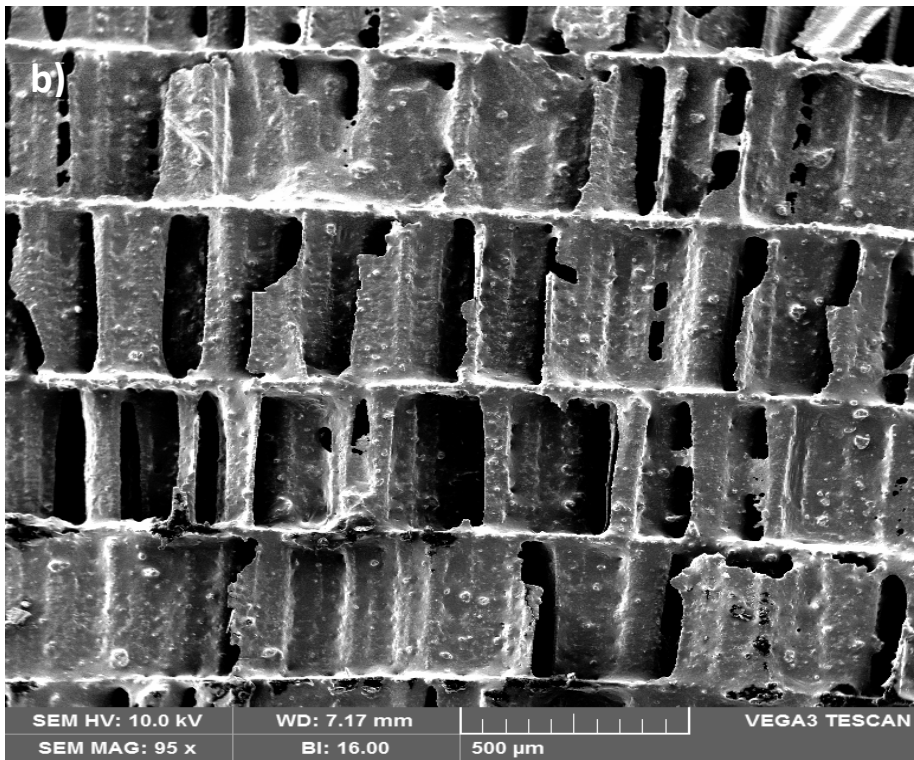
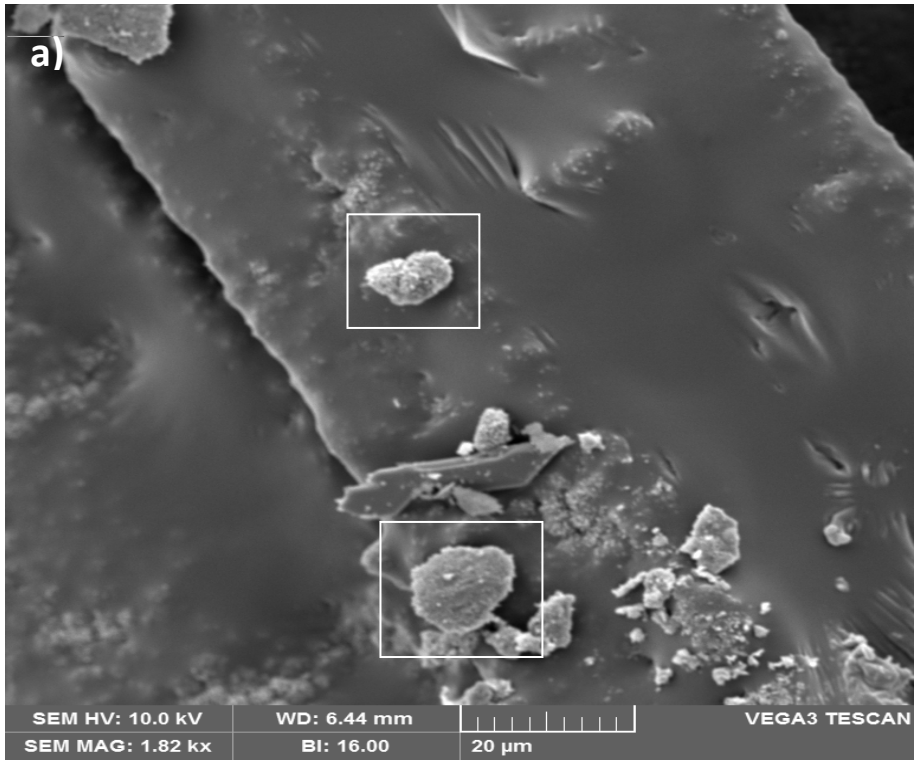


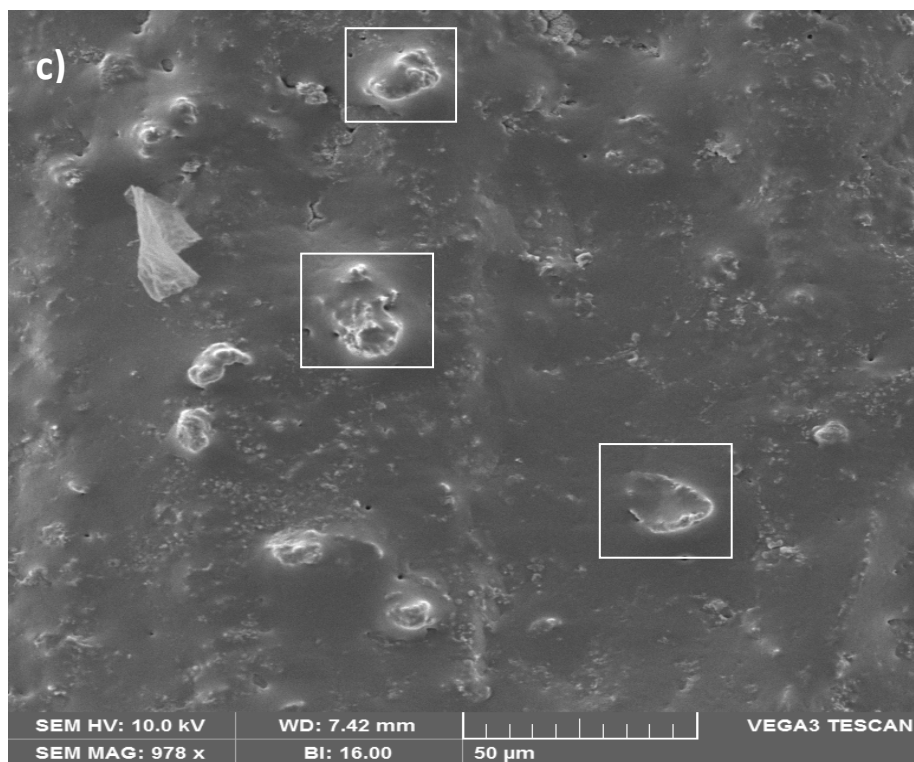
Slika 18 SEM mikrografikompozita HA/BH40/PCL **a)** i **b)** unutarnje površine pri različitim uvećanjima i **c)** vanjske površine

Iz SEM mikrografa kompozita HA/BH40/PCL različitih dijelova uzorka vidljivo je da je kopolimer BH40/PCL uspješno impregniran u porozni HA. Na slici 18 a), na kojoj je prikazana unutarnja površina kompozita HA/BH40/PCL, može se uočiti da je očuvana lamelarna struktura HA te njegova poroznost.

Također je vidljivo da se kopolimer BH40/PCL rasporedio po cijeloj površini uzorka u obliku nakupina, koje na nekim mjestima izgledaju poput mrlja, a na nekim mjestima kopolimer je u obliku kapljica (slika 18 b)).

Slika 18 c) prikazuje SEM mikrograf vanjske površine kompozita HA/BH40/PCL, gdje je vidljivo da je većina površine HA prekrivena kopolimerom BH40/PCL, a tek je mali dio površine HA ostao neprekriven.





Slika 19 SEM mikrograf površine kompozita HA/BH40/PCL nakon stajanja u HBSS-u **a)** unutarnje površine, **b)** i **c)** vanjske površine pri različitim uvećanjima

Iz SEM mikrografa na slici 19 a) koja prikazuje površinu kompozita HA/BH40/PCL nakon stajanja u HBSS-u 21 dan, vidljivo je da su se na sloju kopolimera BH40/PCL pojavile čestice kalcijeva fosfata. Novonastale čestice su nađene u unutrašnjosti uzorka u manjoj količini, ali na slici 19 b) koja prikazuje vanjsku površinu kompozita HA/BH40/PCL nakon stajanja u HBSS-u 21 dan, vidljivo je da je površina znatno drugačija od površine kompozita koji nije bio izložen HBSS otopini (slika 19 a)). Po cijeloj površini su vidljive nakupine tvari na kojima je polimerni sloj. Budući da je uzorak nakon što je izvađen iz otopine HBSS-a sušen pri 105°C, može se pretpostaviti da je došlo do ponovnog taljenja kopolimera BH40/PCL te da je pritom došlo do prekrivanja novonastalih čestica kalcijeva fosfata. Slika 19 c) prikazuje uvećane, “prelivene“ HA čestice te je također vidljiva značajna razlika između njegove površine i površine kompozita koji nije stajao u HBSS otopini.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je hidrotermalnom pretvorbom aragonita iz sipine kosti pri 200°C tijekom 72 h dobiven hidroksiapatit očuvane mikrostrukture sipine kosti te da je kopolimer BH40/PCL uspješno impregniran u pore dobivenog HA.

XRD analizom dokazana je sinteza HA te prisutnost HA i kopolimera BH40/PCL u kompozitu.

Rezultati dobiveni DRIFT metodom također dokazuju prisutnost hidroksiapatita i kopolimera u kompozitnom materijalu.

In vitro ispitivanja provedena u HBSS otopini tijekom 21 dan pokazala su mineralizaciju kalcijevih fosfata na površini kompozitnog materijala.

TGA metodom određeno je da kompozitni uzorci sadrže oko 37.7 mas.% kopolimera BH40/PCL.

SEM analiza uzoraka prikazuje očuvanu lamelarnu i poroznu strukturu sipine kosti nakon impregnacije. Također je vidljiva prisutnost kopolimera unutar kompozita na vanjskoj i unutrašnjoj površini HA.

6. LITERATURA

1. Žagar, D., Priprava i karakterizacija kompozitnog materijala od visokoporozne hidroksiapatitne keramike i kitozana, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
2. Rogina, A., *In situ* sinteza hidroksiapatita u matrici biorazgradivih polimera, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
3. Sdat-Shojai, M., Khorasani, M-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 7591-7621.
4. Hall S., Basic biomechanics, 5th Edition, p.88, McGraw-Hill, New York, 2007
5. Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21:24 2529-2543, 2000.
6. Agrawal, C.M., Ray, R.B., Biodegradable polymeric scaffolds for musculo skeletal tissue engineering, *J. Biomed. Mat. Res.*, 55:2, 141-150, 2001.
7. Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K., Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organ, *Biomaterials*, 24:13 3262-2378, 2003.
8. Yang S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K., The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factor, *Tissue Eng*, 7:6, 679-689, 2001.
9. Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Culture of organized cell communities, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 33:1-2 15-30, 1998.
10. Maquet V., Jerome R., Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation *Mat. Science Forum*, 250, 15- 42, 1997.
11. Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F., Biomaterial developments for bone tissue engineering *Biomaterial*, 21:23, 2347-2359, 2000.
12. Lange, R., Luthen, F., Beck, U., Rychly, Baumann, J., A., Nebe, B., Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material, *Biomol. Eng.*, 19:2-6 255-261, 2002.
13. He, W., Gonsalves, K.E., Batina, N., Poker, D.B., Alexander, E., Hudson, M., Micro/nanomachining of Polymer Surface for Promoting Osteoblast Cell Adhesion, *Biomed. Dev.*, 5:2, 101-108, 2003.

14. Cassinelli, C., Morra, M., Bruzzone, G., Carpi, A., Di Santi, G., Giardino, R., Fini, M., Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis, *Int. J. Oral & Maxillofac. Impl.*, 18:1, 46-50, 2003.
15. Davies, J.E., In vitro modeling of the bone/implant interface, *Anat. Record*, 245:2, 426-445, 1996.
16. Albrektsson, T., Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, C., *Eur. Spine J.*, 10:2 S96-101, 2001.
17. Pulko, I., Huskić, M., The synthesis and characterization of multiarm star-shaped graft copolymers of polycaprolactone and hyperbranched polyester, *European Polymer Journal* 70 (2015) 384–391
18. Stanojević, M., Utjecaj celuloze na razgradnju PCL/PLA mješavina, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2014
19. Milovac, D., Synthesis and characterization of hydroxyapatite-biodegradable polymer composite material, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2014.
20. Blažić, R., Ressler, A., Žagar, D., *In vitro* enzimaska razgradnja poli(ϵ -kaprolaktona) i PCL/GEL mješavine za biomedicinsku primjenu, Natječaj za Rektorovu nagradu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
21. Aryal, S., Prabakaran, M., Pilla, S., Gong, S., Biodegradable and biocompatible multi-arm star amphiphilic block copolymer as a carrier for hydrophobic drug delivery *Int. J. Biol. Macromol.*, 44 (2009), pp. 346-352
22. Haxton, K.J., Burt, H.M., Hyperbranched polymers for controlled release of cisplatin *Dalton Trans.*(2008), pp.5872-5875
23. Kontoyianni, C., Sideratou, Z., Theodossiou, T., Tziveleka, L.A., Tsiourvas, D., Paleos, C.M., Novel Functional Hyperbranched Polyether Polyols as Prospective Drug Delivery Systems, February 10, 2006, Pages 161–169
24. Reul, R., Renette, T., Bege, N., Kissel, T., Nanoparticles for paclitaxel delivery: A comparative study of different types of dendritic polyesters and their degradation behavior, *International Journal of Pharmaceutics*, April 2011, Pages 190-196
25. Ornatska, M., Bergman, K., Goodman, M., Peleshanko, S., Shevchenko, V., Tsukruk, V., Role of functionalized terminal groups information of nanofibrillar morphology of hyperbranched polyesters, *Polymer* 47 (2006) 8137-8146
26. Orlić, S., Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne keramike, Doktorska disertacija

27. https://www.google.hr/search?q=hidroksiapatit&biw=1366&bih=673&source=lnms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwi96YT-rIDSAhUJCBoKHaKwBIgQ_AUIBigB#imgrc=kYS9O3oqdH8j6M_, 15.8.2017.
28. <http://www.dominvrt.si/clanek/ljubljenski/oskrba-krempļjev-in-kljuna-ptice.html>, 16.8.2017.
29. Miškić, A., Avulzija zuba, diplomski rad, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
30. Galić, M., Ispitivanje genetičke nestabilnosti primjenom *in vitro* analize izmjene Sestrinskih kromatida, završni rad, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2014.
31. Syed, M. N., Hydrogen Bond-Mediated Structural Order in Hydroxylated bis-MPA Dendritic Polymers: Experimental and Molecular Dynamics Simulation Study, University of Southern Mississippi, Fall 12-11-2015

ŽIVOTOPIS

[REDACTED] Završila sam Osnovnu školu Velika Mlaka, a 2007. godine upisala XIII. gimnaziju u Zagrebu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Kemija i inženjerstvo materijala, upisala sam 2011. godine. U veljači 2015. godine u sklopu fakulteta odradila sam stručnu praksu u Plivi. 2015. godine upisala sam diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.