

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
TAIKOMOSIOS CHEMIJOS KATEDRA

Giedrė Lubienė

**NANOKRISTALINIO HIDROKSIAPATITO (HAP) SINTEZĖ IR
KOMPOZITINIO JUNGINIO POLILAKTINĖ RŪGŠTIS (PLA)-HAP
FORMAVIMAS BEI TYRIMAS**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovė: doc.dr. Edita Garškaitė

Įvertinimas:

Vilnius, 2016

TURINYS

SUTRUMPINIMAI.....	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪRINĖ DALIS.....	6
1.1. Neorganinės biomedžiagos – apatitai.....	6
1.1.1. Hidroksiapatito (HAP) struktūra.....	7
1.1.2. Hidroksiapatito (HAP) sintezės metodai.....	8
1.2. Organinės medžiagos (polimerai) taikomos medicinoje: poliglikolinė rūgštis(<i>Polyglycolicacid (PGA)</i>), polilaktinė rūgštis (<i>polylacticacid (PLA)</i>).....	10
1.3. Neorganinės-organinės kompozitinės biomedžiagos (HAP-PLA).....	12
1.4. Biomedžiagų paviršiaus struktūrinimas.....	14
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS.....	17
2.1. Reagentai ir tirpalai.....	17
2.2. Eksperimento metodika.....	17
2.2.1. HAP sintezė, panaudojant polimerinę matricą (<i>PEG, PEG-TEA ar PVA</i>).....	17
2.2.2. Kompozitinio <i>PLA-cHAP</i> junginio paruošimas.....	18
2.2.3. Kompozitinio <i>PLA-cHAP</i> junginio paviršiaus struktūrinimas su DLW.....	18
2.3. Aparatūra ir priemonės.....	20
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	20
3.1. Kaitinimo temperatūros įvertinimas (TG/DTA).....	21
3.2. HAP fazinio grynumo tyrimas (XRD).....	23
3.3. HAP spektroskopinis tyrimas (FT-IR).....	26
3.4. HAP morfologijos tyrimas (FE-SEM).....	27
3.5. Kompozito <i>PLA-cHAP</i> topografinis struktūrinimas su DLW.....	28
3.6. <i>PLA-cHAP</i> kompozito griovelių paviršiaus morfologijos tyrimas.....	29
IŠVADOS.....	32
KONFERENCIJOS.....	33
PADĖKA.....	34
SUMMARY.....	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36

SUTRUMPINIMAI

- HAP hidroksiapatitas;
- Karbonatinis hidroksiapatitas (c-HAP).
- FAP fluorapatitas;
- PVA polivinilo alkoholis;
- PEG polietileno glikolis (*PGA*);
- TGA termogravimetrinė analizė;
- DTA diferencinė terminė analizė;
- SEM skenuojanti elektroninė mikroskopija;
- FE-SEM lauko emisijos skenuojanti elektroninė mikroskopija;
- EDX Rentgeno spindulių energijos dispersinė analizė;
- XRD Rentgeno spindulių difrakcija;
- IR infraraudonųjų spindulių spektroskopija;
- TLR tiesioginis lazerinis rašymas (*DLW, Direct Laser Writing*);
- FT-IR Furjė infraraudonųjų spindulių spektrometrija;
- TEA trietanolaminas.

IVADAS

Pagerinti žmogaus gyvenimo kokybę po įvairių traumų, pašalinus naviką pasitelkiama implantologija. Tai yra vienas iš šiuolaikinių metodų, galinčiu suteikti žmogui pilnavertį gyvenimą, patyrus traumą. Nors baigus gydymą implantas tolesniame paciento gyvenime leidžia beveik pamiršti apie kadaise patirtą problemą ir nereikalauja ypatingos priežiūros, pats implantacijos procesas gali būti tiek sąlyginai paprastas, tiek ir sudėtingas. Rekonstrukcija laikoma sėkminga, kuomet žaizda gyja be jokių komplikacijų [1].

Kaulinio audinio inžinerija – viena sparčiausiai besivystančių mokslo sričių [2]. Technologijoms sparčiai vystantis atsirado naujų medžiagų, kurios naudojamos kaulinio audinio rekonstrukcijai, vienos tokių – keraminiai ir sintetiniai polimerai, kaulų cementas. Naudojant šias medžiagas gali atsirasti nesklandumų, trikdančių gijimą, suaugimą, todėl šių laikų mokslininkai tiria ir ieško geresnių, biologiškai labiau suderinamų medžiagų, tinkančių kaulų deformacijoms tvarkyti [3].

Hidroksiapatitas yra biologiškai suderinama medžiaga. Organizme HAP yra pagrindinis kaulų (sudaro 45% kaulų masės), danties emalio (90%), sukietėjusių kremzlių, dentino (80%) ir dantų mineralinis komponentas [4]. Sintetinis HAP plačiai naudojamas kaulinės masės gamyboje arba kaip dengiamoji medžiaga metalų implantams [5]. Kadangi, hidroksiapatitas yra trapios struktūros, jį sustiprinti galima papildomai, kuomet pagaminama kompozitinė medžiaga savo sudėtyje turi polimerinės medžiagos.

Audinių regeneracijos inžinerijoje naudojamos organinės medžiagos gali būti skirstomos į dvi pagrindines grupes - natūralūs ir sintetiniai polimerai [6]. Audinių vystymasis priklauso nuo struktūros įvairovės, ląstelės ir biomedžiagos tarpusavio sąveikos, kurią sukelia implantuotos medžiagos. Naudojamų polimerų biosuderinamumas užtikrina ląstelių funkcionavimą *in vivo* [7], o tam tikros jų fizikinės savybės įgalina pagerinti hidroksiapatitų mechanines savybes.

Sintetiniai polimerai suteikia gaminamiems karkasams platesnę cheminių ir fizikinių savybių įvairovę (pvz.: į karkasus implantuoja bioaktyvius faktorius, kurie reguliuoja ląsteles) [8]. Karkasų gamybai naudojamos medžiagos tokios kaip alifatiniai poliesteriai (pvz.: poliglikolinė rūgštis, polilaktinė rūgštis, polilaktinė-co-glikolinė rūgštis). Šie polimerai naudojami audinių regeneracijai: kraujagyslių, kepenų, ortopedinės sistemos atkūrimui. Polianhidridai ir polifosfozanai – medžiagos, kurios naudojamos ortopedijoje [9].

Porėti karkasai yra vieni svarbiausių ląstelių dauginimosi procesuose bei naudojami 3D audinių formavime. Idealaus pobūdžio karkasas turi pasižymėti biosuderinamumu, greitai suirti, sąveikauti su ląstelėmis bei išsiskirti geresnėmis mechaninėmis ir fizikinėmis savybėmis.

Karkasai dažniausiai gaminami iš metalo, keramikos, polimerų (natūralių arba sintetinių). Suformuoti iš polimerų turi nesukelti imunologinės ar svetimkūnio atmetimo reakcijos. Netinkamai pasirinktas polimeras gali stabdyti augimo procesą. Degradacijos produktai negali būti toksiški, privalo būti pašalinami metabolinių procesų metu [2].

Darbo tikslas – susintetinti nanokristalinį HAP, panaudojant atitinkamą polimerinę matricą, ir paruošti topografiškai struktūrizuotą kaulinio audinio kompozitinę medžiagą, sudarytą iš susintetinto HAP ir bioaktyvaus polimero. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Surinkti ir susisteminti mokslinę literatūrą.
2. Susintetinti įvairaus dydžio HAP daleles, naudojant skirtingus polimerus (polietilenoglikolį (*PEG*), polivinilo alkoholį (*PVA*) ir trietanolaminą (*TEA*) bei išanalizuoti jų struktūrinės ir morfologinės savybes.
3. Suformuoti patvarią kompozitinę medžiagą, sudarytą iš HAP ir polilaktinės rūgšties (*PLA*).
4. Suformuoti įvairias topografines struktūras gautos kompozitinės medžiagos paviršiuje, panaudojant tiesioginio lazerio rašymo metodą (*DLW*).

1. LITERATŪRINĖ DALIS

1.1. Neorganinės biomedžiagos –apatitai

Apatitas – vienas iš nedaugelio mineralų, kuris yra gaminamas ir naudojamas ir biologinėse sistemose [10]. Hidroksiapatitai (HAP) ir fluorapatitai (FAP) – nuodugniausiai ištyrinėti apatitų klasės junginiai.

HAP – yra pagrindinė sudedamoji dantų emalio ir kaulų mineralų medžiaga. Pagrindinė priežastis dėl ko kalcio ortofostatai, kaip kaulų sudedamoji dalis, naudojama dėl jų panašumo į mineralinius komponentus esančius žinduolių kauluose ir dantyse. Kadangi, jie nėra toksiški, biologiškai suderinami, organizmas neatmeta jo kaip svetimkūnio ir lengvai integruojasi į naują persodintą audinį. Atsiranda fizikocheminis betarpiškas ryšys tarp implanto ir kaulo, tai vadinama osteointegracija. Kalcio ortofostatai naudojami kaip užpildai ir dangos dėl jų mažo poringumo (efektyviam kraujagyslių tinklo susidarymui ir kaulinių ląstelių augimui dalelės turi būti $>100 \mu\text{m}$) [11, 12]. Šio darbo vienas iš tikslų ir buvo susintetinti nanokristalinį HAP, siekiant kuo didesnio homogeniškesnio hidroksiapatito pasiskirstymo polimerinėje matricoje. Tad skirtingi sintezės metodai ir sintezės sąlygos bei parametrų kaita leidžia susintetinti skirtingo dydžio ir formos apatitus, o tai svarbu integruojant kologeno ląsteles į kaulinį audinį, tokiu būdu pagerinant jų mechanines savybes. Dėmesys yra skiriamas pernašos mechanizmui aktyvių komponentų iki augančio audinio, sumažina infekcijos riziką ir kovojant su nepageidaujamu šalutiniu poveikiu. Nanodalelės suteikia didesnę paviršiaus plotą aktyviajam veikimo centrui, o sferinės dalelės optimizuoja transportavimą [13].

Bendra apatitų formulė $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_3)_4\text{X}$, kur X- OH^- , F^- , Cl^- , ir Br^- anijonai gali pakeisti OH^- ir F^- jonus. Apatito pagrindinė sudedamoji dalis „ PO_4^{3-} “ gali būti pakeista VO_4^{3-} [14], AsO_4^{3-} [15]. Į apatitų struktūrą gali būti įvesti HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} [10].

Pagal tirpimo greitį hidroksiapatitus ir giminingus kalcio fosfatus galima klasifikuoti tokia tvarka: amorfinis CaP > amorfinis HA > kristalinis CaP > kristalinis HA [16].

1.1.1. Hidroksiapatito (HAP) struktūra

Hidroksiapatitas ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP) - kristalinis kalcio ortofosforohidroksidas [17, 18]. Grynas hidroksiapatitas yra balti milteliai, netirpūs vandenyje ar vandeniniuose tirpaluose. Gamtoje jis randamas kaip mineralas fosfatinėse uolienose. Nedidelė dalis OH^- jonų gali būti pakeisti kitais jonais – F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , susidarant $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ar $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$. Dėl šių pokyčių natūraliai randami apatitai gali būti rusvo, gelsvo ar žalsvo atspalvio. Hidroksiapatito kristalų, kaip granulių, taip pat gali būti mitochondrijose, mažuose kalcifikacijos centruose, kankorėžinėje liaukoje ir kt. Norint pagerinti ortopedijai naudojamų implantų integravimą į kaulinį audinį, daugelis jų yra padengiami hidroksiapatitu [19]. Sintetinis HAP dėl savo biologinio suderinamumo dažnai naudojamas dantims protezuoti [18]. Aplink kiekvieną kaulą yra išsidėstęs kraujagyslių tinklas, kuris maitina kaulinio audinio ląsteles, todėl implantai vertinami pagal jų gebėjimą sudaryti kraujagyslių tinklą. Kraujų atiteka deguonis ir kitos maistinės medžiagos, būtinos naujų ląstelių augimui. Po implanto „įsodinimo“ į organizmą, susidaręs uždegimas ir atsivėrusi žaizda skatina spontanišką kraujagyslių tinklo susidarymą. Praėjus 1 dienai po biomedžiagos implantacijos į audinį, susidarę monocitai ir makrofagai inicijuoja gijimo procesą [20]. Monocitai – svarbūs fagocitinės mononuklearų sistemos komponentai. Jie susiformuoja kaulų čiulpuose, šalina iš cirkuliacijos ląstelių irimo produktus, dalyvauja imuninėse reakcijose [21]. Atsiradę kaulų čiulpuose monocitai juose išbūna apie 30-60 valandų. Po to, jie nesudarydami jokio kaulų čiulpo rezervo, dalijasi ir iš karto patenka į periferinį kraują. Makrofagai – tai didieji (14-20 μm) daugiabranduoliai fagocitai, aptinkami beveik visuose organuose. Jie yra mezenchiminės kilmės ląstelės, gebančios aktyviai suirti ir suvirškinti bakterijas, žuvusių ląstelių liekanas ir kitas organizmui svetimas ir toksines daleles [22]. Fibroblastai - tai skaidulinio jungiamojo audinio ląstelės, kurios gamina tropokolageną ir formuoja skaidulas ir ląstelės implante ima daugintis bei formuoti granulinius audinius. Tai specialus audinys, atsakingas už uždegimų gyjimą. Priklausomai nuo žaizdos dydžio granulinis audinys po implanto „įsodinimo“ į audinį gali atsirasti po 3 - 5 dienų. Formuojasi kraujagyslių tinklas, dar šis procesas vadinamas neovaskulizacija arba angiogenezė [23].

Implanto „įsodinimą“ į audinį organizmas „priima“ kaip svetimkūnį ir iššaukia atmetimo reakciją, t.y. sparčiai ima formuoti aplink svetimkūnį ląstelės ir granulinius audinius. Granulinį audinį sudaro makrofagai, fibroblastai ir kapiliarų tinklas, o tai priklauso nuo implanto formos ir topografijos [22]. Tyrimai rodo, jog paviršius topografija įtakoja ląstelių sukibimą, morfologiją, diferenciaciją, osteokonduktyvumą [24, 25]. Audinio atsakas į implantą priklauso nuo paviršiaus paviršiaus drėkinimo, šiurkštumo, cheminės sudėties, elektros krūvio, kristališkumo, mobilumo

[26]. Tad ir sintetinio hidroksiapatito pritaikymas priklauso nuo kristalinių dalelių dydžio, fazinio grynumo, morfologijos.

1.1.2. Hidroksiapatito (HAP) sintezės metodai

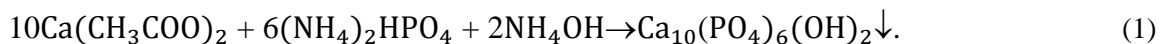
Sintezės metodai ir sintezės parametrai (pH, temperatūra, koncentracija, reakcijos trukmė, maišymo greitis) įtakoja HAP fazinį grynumą bei dalelių morfologiją [7]. Jeigu pH sintezės metu būna mažiau nei 9 – susidaro trikalciofosfatas (Ca_3PO_4), kurio savybės skiriasi nuo HAP. Kaitinant Ca_3PO_4 700 – 1125 °C temperatūroje susidaro β - trikalciofosfatas (β -TCP), o kaitinant 1450 °C temperatūroje jau susiformuoja α – trikalciofosfatas (α -TCP). Temperatūros kėlimo greitis veikia hidroksiapatito kristališkumą – susidaro monokristalinė ir polikristalinė struktūros. Pavyzdžiui, jeigu temperatūra yra keliami 1 °C/min. – 800 °C iškaitinti milteliai susidarė 82 – 92% kristalinės, 8 – 18% amorfinės fazės. Keliant temperatūrą 5 °C/min. – susidarė 11 – 14% kristalinės, 86 – 88% - amorfinės fazės [13]. Temperatūra ir pH yra svarbiausi parametrai, lemiantys HAP kristališkumą. Nustatyta, kad didesniu osteokonduktyvumu pasižymi HAP, kuris buvo kaitintas žemesnėje temperatūroje, ir tai buvo susieta su didesniu faziniu grynumu, dalelių bei susidariusių porų dydžiu [27, 28].

Dažniausiai HAP sintetinamas nusodinimo ir zolių-gelių (nevandenėje ir vandeninėje terpėje) metodu [29].

Vandeninių zolių-gelių metodu sintetinamas HAP pradinėmis medžiagomis naudojami kalcio alkoholiatai ir fosforo organiniai junginiai. Vienas iš šios sintezės pavyzdžių gali būti HAP sintezė iš jūros kriauklių. Jūros kriauklės valomos mechaniškai, plaunamos verdančiu vandeniu ir džiovinamos 24 val. kambario temperatūroje. Po to gautas kriauklių mėginys trinamas agatinėje grūstuvėje kol susidaro smulkūs milteliai. Ištirpintas jūros kriaukles maišant su etilendiamintetra acto rūgštimi (EDTA) ir diamonio fosfatu ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), ištirpintu distiliuotame vandenyje. Gauti skaidrūs bespalviai tirpalai šildomi iki 70 °C ir sumaišomi su šlapalo (urėja ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)) tirpalu. Po to tirpalai buvo koncentruojami atvirose stiklinėse 90 °C temperatūroje. Maišymas baigtas tuomet, kai tirpalai virsta skaidriu, klampiu geliu. Gauti geliai džiovinami krosnyje (100 °C), sumalti agatinėje grūstuvėje ir kaitinti 5 val. 800 °C temperatūroje (temperatūros kėlimo greitis 1 °C/min). Po to mėginys dar kartą sutrinamas agatinėje grūstuvėje ir kaitinimas 1000 °C temperatūroje 10 val., keliant temperatūrą 2 °C/min greičiu. Tarp kaitinimų medžiagos sugrūdamos agatinėje grūstuvėje [29]

Atliekant HAP sintezę zolių – gelių metodu nevandenėje terpėje, pradinėmis medžiagomis naudojami įvairūs dialkylfosfitai [30]. Ca-P-O geliai sintetinti gaunami lėtai hidrolizuojant kalcio butanoato ir dialkylfosfito mišinį. Vienfaziai $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pavyzdžiai gaunami kaitinant pradinius Ca-P-O gelius 15 valandų 1000 °C temperatūroje [31].

HAP nanodalelių sintezė gali būti vykdoma ir nusodinimo metodu, kaip aprašė Tagai ir Aoki [32]. Sintezė vykdoma pagal lygtį:



$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (5,285 g, 0,03 mol) ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2,37 g, 0,018 mol) tirpinami distiliuotame vandenyje, laikantis Ca ir P santykio 5:3. Laikantis tokio Ca/P santykio, susidaro HAP, kitu atveju gali susidaryti trikalciiofosfatas ar kitos medžiagos. Tirpalai supilami kartu ir palikti kol išgaruos tirpiklis, vėliau išdžiovinami ir kaitintinami 400-800 °C temperatūrose. Gaunami balti milteliai susmulkinami agatinėje grūstuvėje [13].

1.2. Organinės medžiagos (polimerai) taikomos medicinoje: poliglikolinė rūgštis

(Polyglycolicacid (PGA)), polilaktinė rūgštis (polylacticacid (PLA))

Polihidroksinės rūgštys, įskaitant poliglikolinę, polilaktinę rūgštis bei jų kopolimerus yra vieni dažniausiai naudojamų sintetinių polimerų, naudojamų kaulinio audinio inžinerijoje. Esterinis ryšys šiuose polimeruose yra hidrolitiškai labilus, polimerai sumažėja nefermentinės hidrolizės metu. *PGA*, *PLA* ir jų kopolimerų degradacijos produktai yra netoksiški, natūralūs metabolitai bei iš organizmo pasišalina CO_2 ir H_2O pavidalu [2].

Poliglikolinė rūgštis (*PGA*) - regeneracinėje medicinoje plačiai naudojamas poliesteris. Tai biologiškai suskaidomas, linijinis, alifatinis poliesteris, susintetinamas iš glikolinės rūgšties polikondensacijos būdu. Poliglikolidai - žinomi nuo 1954 m. kaip sudėtingo pluošto formavimo polimerai. Iš pradžių, jie nebuvo plačiai naudojami dėl šio polimero hidrolizinio nestabilumo. Šiuo metu poliglikolidą ir jo kopolimerus (polilaktinė-co-glikolinė rūgštis su pieno rūgštimi, poliglikolidas-co-trimetilenkarbonatas su ϵ - kaprolaktamu ir poliglikodas-co-trimetilenkarbonatas su trimetilenkarbonatu) plačiai naudojami kaip netirpstantys siūlai chirurgijoje [33].

PGA stiklėjimo temperatūra 35-40 °C, lydymosi temperatūra 225-230 °C. *PGA* kristališkumo laipsnis gali būti įvairus - nuo 45-55 %, o tai įtakoja šio polimero tirpumą. Šis poliesteris dėl savo didelės molekulinės masės mažai tirpus organiniuose tirpikliuose (acetone, dichlormetane), o mažesnės masės oligomerai, besiskiriantys savo fizikinėmis savybėmis, gerai tirpsta. Polimero tirpumas svarbus dėl to, jog degradacijos produktai lengvai pasišalintų metabolinių procesų metu iš organizmo [33].

Viena iš pagrindinių *PGA* panaudojimo sričių – chirurginiai siūlai. Jie gali būti sintetiniai besirezorbuojantys (patys organizme suyra) ir nesirezorbuojantys (nesyrantys). Padengti N-laurin ir L-lizinu dėl to jų paviršius lygus, blizgus, švelnus, minkštas. Kartais būna padengti ir magnio stearatu. Žmogaus organizme tirpstantys siūlai visiškai suyra maždaug per 60-90 dienų. Siūlai iš *PGA* pasižymi aukštu pradiniu atsparumu tempimui, sklandus perėjimas per audinį, lengvas valdymas, tvirtai išlaiko susiūtus audinius šalia vienas kito [34].

Šis polimeras vertinamas ir kitose biomedicinos srityse. Implantuojami medicinos prietaisai, pagaminti iš *PGA*, tokie kaip smeigtukai, strypai, plokštelės, varžtai [35].

Poli(α -hidroksi) rūgščių klasei priklauso D, L konfigūracijos laktinės rūgštys: *PLA* dar vadinama poliglikoline rūgštimi, polihidroksiacetatinė rūgštis, poliglikolidas (*PGA*). Šios rūgštys ir jų kopolimerai plačiai naudojami audinių inžinerijoje, kaip ląstelių karkasai minkštuosiuose

audiniuose (pvz.: nervinės ląstelės) bei sudėtingesniuose audiniuose (pvz.: kaulas, kraujagyslės). Moksliniais tikslais *PLA* daugiausiai dėmesio susilaukė dėl šio poliesterio atkuriamųjų išteklių, biologinio suderinamumo, biodegradacijos, puikių šiluminių ir mechaninių savybių [36]. *PLA* yra linijinis alifatinis termoplastinis poliesteris, kuris lengvai biologiškai skaidomas naudojant hidrolizinius ir fermentacijos būdus [37]. Jis būna trijų stereoizomerų: poli-(L-pieno rūgštis) (PLLA), poli-(D-pieno rūgštis) (PDLA) ir poli-(D, L-pieno rūgštis) (PDLLA). Gaminamam karkasui keliamas reikalavimas yra jo porėtumo kontroliavimas. Įprastos gamybos technologijos leidžia lengvai suformuoti kontroliuojamąjį porėtą polimerą, kurio poros iki 200 μm dydžio, bet negali kontroliuoti porėtumo esant 200–500 μm dydžiui. PLLA yra maišomas su neorganine biomedžiaga, pvz. HAP [16]. Kiti autoriai teigia, jog porų dydis gali būti kontroliuojamas keičiant sistemos temperatūrą ir pH [27].

PLA naudojamas kaulų gydymui. Viena svariausių priežasčių, kodėl yra naudojami šie polimerai medicinoje – jie susidaro natūralių metabolinių procesų metu ir dėl to pasižymi nedideliu toksiškumu [33]. Tačiau norint gauti didesnės molekulinės masės polimerus reikia naudoti ciklinius monomerus – laktidus arba glikolidus [38]. *PLA* yra biosuderinama, tad iš jos galima gaminti implantus, kurie laikui bėgant organizme būtų rezorbuojami ir nepaliktų jokių žymių [39].

1.3. Neorganinės-organinės kompozitinės biomedžiagos (HAP-PLA)

Polimerinės biomedžiagos atlieka svarbų vaidmenį audinių persodinimo inžinerijoje. Šios medžiagos naudojamos kaip žaizdų gydymo vaistas arba padeda audinių atsinaujinimui. Polimerinės medžiagos, kurios naudojamos, turi gebėjimą tiesiogiai suaugti su ląstelėmis ir sudaro tam tikrą apsauginį audinį, apsaugodama nuo infekcijos išplitimo persodintame audinyje, jos taip pat turi gebėjimą pačios inicijuoti fiziologinį ląstelių atsinaujinimą [40].

Nuo senų laikų biomedžiagos yra žinoma, jog kilusios iš natūralių šaltinių (pvz.: kolagenas, želatinas, šilkas, medvilnė). Polimerų chemijos privalumas tas, jog šiuos natūralius polimerus galima sujungti su medicinoje naudojamais polimerais. Anksčiau buvo naudojami sintetiniai biomedicininiai polimerai – polietilenas, polietilenteraftalatas, poliamidas, poliuretanai. Šie polimerai buvo sėkmingai naudojami audinių persodinimo inžinerijoje, kaip persodintų audinių karkasai (pagrindas). Tačiau jie turi trūkumų. Vienas iš jų – pasižymi nepakankamu biologiniu suderinamumu [41].

Hidrolizuojamus sintetinius polimerus imta naudoti kaip potencialias biomedžiagas nuo 1960 m., kuomet buvo nuodugniau ištirtos poli(α -hidroksi) rūgščių klasei priklausančios biomedžiagos. Klasikinės medžiagos, kaip hiuleronas rūgštis, kolagenas turi be galo daug pritaikymo sričių. Kolagenas - pluoštinis baltymas - yra pagrindinis žinduolių audinių ląstelių matricos (užpildo) sudedamoji dalis, įskaitant tokius audinius kaip kaulai, kraujagyslės, oda, sausgyslės, raiščiai. Kolagenas turi maždaug 25 tipus savo cheminės struktūros bei molekulinę struktūrą. I tipo kolageno struktūra yra dažniausiai naudojama iš visų kitų tipų [2]. Ypač dažnai naudojamos odos atsinaujinimo proceduose (hiuleronas rūgštis lygina raukšles) [38]. Bioorganiniai polimerai, pranašesni savo tvirtumu ir dalinai elastingesni, yra geresnis už natūralius keraminius [12]. Šios medžiagos sukelia specifinį biologinį atsaką – tarp medžiagos paviršiaus ir audinio atsiranda ryšys. Jų klasei priskiriamas bioaktyvus stiklas, ceravitalis – biostiklo ir keramikos junginys. Visos šios medžiagos sudaro tarpfazinį ryšį su gretimu audiniu [18].

Dėl labai gero biologinio suderinamumo viena iš tinkamiausių implantams medžiagų yra HAP. Tačiau jo stiprumas kol kas yra nepakankamas. Tai labai riboja jo naudojimo galimybes. Jo biologinis aktyvumas yra neaukštas, be to, jis lėtai suauga su kaulu. Biologiniam aktyvumui padidinti į HAP sudėtį pridedama kitų kalcio fosfatų arba gaminamas porėtas HAP. Porėtas HAP gerai suauga su kaulu. Kaulo audiniai įauga į HAP poras. Kita vertus, poros mažinajo stiprumą. Norint pagerinti porėtų keraminių biomedžiagų mechanines savybes plačiai naudojamos hibridinės

neorganinės-organinės medžiagos [27]. Daug dėmesio mokslininkai skyrė *PLA*-apatitų, pasižyminčių įvairia mikro ir makro struktūra, tyrimui.

Dauguma biomineralų yra sudarytos iš neorganinių ir organinių kompozitinių medžiagų. Visų stuburinių organizmų kaulai ir dantys yra sudaryti iš neorganinio kalcio fosfato ir organinės matricos. Neorganinis komponentas yra nanokristalinis, kietas su apatito struktūra ir anglies chemine sudėtimi, tai gali būti vadinama karbonatiniu hidroksiapatitu (c-HAP). HAP sudaro 65% visos kaulų masės, kita dalis sudaryta iš organinių medžiagų bei vandens. Neorganiniai komponentai kompozitui suteikia stiprumą ir gebėjimą atlaikyti didesnę slėgį. Organinę matricą (ląstelės užpildą) sudaro kologeno skaidulos, glikoproteinai suteikia neorganiniam/organiniam kompozitui elastingumo, atsparumą lenkimu, lūžiams. Tokia simbiozė dviejų visiškai skirtingų medžiagų, su skirtingomis savybėmis, suteikia geresnes savybes formuojamam biomineralui, negu jas suteiktų kiekviena medžiaga atskirai [42].

Kaulas yra sudarytas iš trijų fazių: organinių skaidulų, neorganinės nanokristalinės fazės ir kaulinės matricos [42]. Kaulinis audinys – jungiamasis audinys su labai kieta tarpląsteline medžiaga. Kaulų tvirtumą sąlygoja tarpląstelinėje medžiagoje susikaupęs kalcis ir kitos neorganinės medžiagos, sudarančios 2/3 kaulų masės. Kaulų lengvumą ir stangrumą nulemia tarpląstelinės medžiagos organiniai junginiai – baltymas kolagenas. Kaulinys audinys atsparus tempimui, spaudimui, išlaiko didelę apkrovą. Šias savybes lemia jame esančių organinių ir neorganinių medžiagų derinys. Žmogui senstant kauluose organinių medžiagų mažėja, o mineralinių daugėja, todėl jie darosi trapūs, lengviau lūžta. Vaikų kauluose yra daugiau organinių medžiagų, dėl to jie yra elastingesni, bet nelabai tvirti ir gali lengvai deformuotis ir iškrypti. Kaulų tankis yra skirtingas. Dauguma kaulų yra sudaryti iš tankaus išorinio sluoksnio, vadinamu žieviniu sluoksniu, kurį supa mažiau tankus ir akytas sluoksnis, vadinamas kaulinių sijų ir yra užpildytas kaulų čiulpais [43].

1.4. Biomedžiagų paviršiaus struktūrinimas

Kaulinių karkasų inžinerija yra kompleksinis ir dinaminis procesas, inicijuojamas osteoprogenitorinių ląstelių, kurios skatina ląstelių augimą, matricos formavimąsi jose, dėl to kaulinis audinys gali sudaryti ryšį su sintetinėmis medžiagomis. Kaulų karkasai dažniausiai yra gaminami iš purios suskaidomos medžiagos, kuri suteikia mechaninį tvirtumą, kuomet yra gydomi pažeisti kaulai [11]. Kaulų implantams naudojamos skirtingos medžiagos: kalcio fosfato pagrindo bioaktyvūs keraminiai karkasai, biostiklo, polimeriniai, kompozitiniai, metaliniai karkasai. Keraminiai karkasai nėra itin patogūs naudojimui dėl savo nedidelio elastingumo, didelio trapumo, prasto atsparumo tempimui, žemo mechaninio patikimumo, kietumo, o tai svarbu mechaninėms savybėms po implantacijos [12].

Karkasai, taikomi audinių regeneracijai, daugiausiai yra gaminami iš šių biologiškai suderinamų medžiagų:

- a) gamtinių arba sintetinių polimerų,
- b) keramikos,
- c) ir jų kompozitų, kuriais siekiama imituoti natūralaus kaulo sudėtį ir struktūrą [16].

Vienas iš karkasų gaminimo būdų yra liejimo. Šis metodas paremtas terminės ekstruzijos 3D spausdinimu ir lazeriniu mikro apdirbimu – šių abiejų technologijų jungimas leidžia greitai ir pigiai gaminti porėtus mikro darinius, lanksčiai keisti jų geometriją, fizikinius, cheminius, biologinius parametrus [39].

Naudojant terminės ekstruzijos 3D spausdintuvą (ang. FFF – *fused filament fabrication* arba FDL – *fused deposition modeling*) išliejamas norimos geometrijos trimatis darinys (1 pav.). Šiuo atveju tai – darinys, turintis ne tik išorinę geometriją, bet ir vidinę mikro architektūrą. Tai pasiekama tiksliai derinant lydamos medžiagos temperatūrą, padavimo srautą ir trajektoriją. Suformuojami dariniai, kurių erdviniai elementai gali būti šimtų mikrometrų, o juos skiriančios poros – dešimčių kubinių mikrometrų dydžio. Šiuo būdu galima kurti darinius, kurių porėtumas (oro ir viso darinio tūrio santykis) svyruoja nuo 20 iki 60 proc. Porų matmenys gana artimi žinduolių ląstelių dydžiams, tad tokie objektai yra tinkami kamieninių ląstelių auginimui, jų migracijos ir diferenciacijos tyrimui. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad visa tai gali būti panaudojama audinių inžinerijoje, pavyzdžiui, pacientui šalinant kaulo defektą [39].



1 pav. Trimatis geometrijos darinys [39].

Kitas paviršiaus struktūrinimo metodas yra polimerizavimas iš skystų fotoaktyvių polimerų matricos. 3D darinius galima sėkmingai papildomai modifikuoti ultratrumpųjų impulsų lazeriu „Pharos“ (MGF „Šviesos konversija“). Tam naudojamas efektyvus paviršiaus ir tūrio mikro apdirbimas šviesos gija. Tai nauja lazerinio formavimo kryptis, leidžianti paveikti tiek skaidrias, tiek neskaidrias terpes, jas graviruoti, gręžti, sulydyti ar tiesiog išpjauti įvairias formas. Standartiškai lazeriniame mikro apdirbime naudojamas aštriai fokusuotas pluoštas, o ultratrumpieji impulsai leidžia tiksliai paveikti norimą paviršiaus ar tūrio sritį. Užliejus bandinį vandeniui, galima jame indukuoti šviesos giją (filamentą), kuri būtų vienodo šviesos intensyvumo (energijos tankio) išilgai pluošto sklidimo krypties. Tai leidžia tiksliai ir tolygiai naudoti šviesos energiją gręžiant skylės ar pjaustant sudėtingos geometrijos darinius [39].

Biomedžiagų paviršiaus struktūrinimą galima atlikti ir lazerinio pjaustymo būdu. Kadangi, šiame darbe suformuotas kompozitas yra kietas, todėl jo paviršiaus pjaustymas buvo atliktas „Pharos“ lazeriu. Juo galima atlikti subtilius ir labai sparčius pjūvius. Trumpi femtosekundiniai lazerio impulsai tam puikiai tinka. Kita šio lazerio taikymo sritis – galimybė pjaustyti vieną kiečiausių medžiagų – safyro, t. y. ruošti pagrindinę detalę šviestukų gamybai. Šie šviestukai daromi ant labai plonos safyro plokštelės. Ją reikia supjaustyti taip, kad nebūtų pažeista struktūra. Tam „Pharos“ ypač tinka. Šviestukai – ateities apšvietimo sistema, tad čia įsitvirtinti „Pharos“ perspektyvos itin geros. Trečioji sritis – medicina, tiksliau, oftalmologija. JAV akių refrakcijos koregavimo operacijoms femtosekundiniai lazeriai pradėti naudoti prieš 5–6 metus. Dabar su jais operuojamas maždaug kas trečias pacientas. Tačiau iki šiol šiais lazeriais tik atpjaunamas plonas ragenos lopelis, o pagrindinį reljefo formavimo darbą atlieka eksimerinis lazeris. Pastarasis medikų ne itin mėgstamas dėl savo trumpaamžiškumo ir dėl naudojamų nuodingų dujų, kurias reikia reguliariai keisti. „Pharos“ jau ne kartą išbandytas kaip tradicinis oftalmologinis femtosekundinis lazeris, tačiau jo dešimteriopai didesnė galia teikė vilčių, kad jis gali pakeisti ir eksimerinį lazerį [44].

„Pharos“ – tai yra vieno vieneto integruota femtosekundinio lazerio sistema, apimanti milijoninę impulsų energiją ir aukštą vidutinę galią. Dauguma "Pharos" parametrų galima lengvai nustatyti per valdymo bloką kompiuteryje. Šis lazeris kompaktiškas, lengvai keičiamos įvairios detalės (osciliatorius, stiprintuvas, kompresorius). Pasižymi impulso trukmė <190 fs - 10 ps, impulso energija iki 2 mJ, vidutinė galia iki 20 W, tvirtas mechaniniu dizainu [45].

Derinant 3D spausdintuvu pagamintų karkasų porėtumą su mikro struktūrizavimu lazerinėmis bei kitomis technologijomis galima valdyti ne tik ląstelių auginimą, bet ir jų diferenciaciją [39].

2.EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1.Reagentai ir tirpalai

Hidroksiapatito sintezei:

- Kalcio acetatas ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, Carl Roth, Vokietija);
- Diamonio fosfatas $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Eurochemicals, Lietuva);
- Amoniakas (NH_4OH , bevandenis, $\geq 99.95\%$; Fluka);
- Polietilenglikolis ($\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, PEG; 4600; Aldrich);
- Polivinilalkoholis ($[-\text{CH}_2\text{CHOH}-]_n$, PVA; 72000; Fluka);
- Amoniakas (NH_3 (sk.), 32 % vandeninis tirpalas, Merck);
- Trietanolaminas ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$, $\geq 99\%$ (GC), Sigma-Aldrich).

Hidroksiapatito–polimero kompozitinės medžiagos sintezei:

- Polilaktinė rūgštis (PLA, DR3D FilamentLtd);

2.2. Eksperimento metodika

2.2.1.HAP sintezė, panaudojant polimerinę matricą (PEG, PEG-TEA ar PVA)

Pagrindinės medžiagos, iš kurių yra gaunami HAP milteliai yra $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (5.285g, 0.03mol) buvo ištirpintas 25 ml distiliuoto vandens. Į Ca^{2+} jonų turintį tirpalą įpilta 6% PEG vandeninio tirpalo ir gautas tirpalas maišomas 30 min. 55-60 °C temperatūroje. Tirpalo pH keliamas iki 11, todėl įlašinta 32% NH_3 vandeninio tirpalo. Gautas mišinys papildomai maišytas 20 min. 65-80 °C temperatūroje. Susiformavę balti Ca-P-O milteliai papildomai maišyti dar 30 min., uždengus stiklinę su latekso dangą, jog neišgaruotų amoniakas. Gauta suspensija išgarinta 80-100 °C temperatūroje ir susidaręs Ca-P-O gelis džiovintas 150 °C temperatūroje 24 h., kaitinamas 400 °C temperatūroje (kaitinimo greitis 1°C/min.). Gauti balti milteliai vėl susmulkinami agatinėje grūstuvėje ir kaitinti 600, 680, 800 ir 1000°C temperatūrose (kaitinimo greitis 5°C/min.) 5h. Analogiškai buvo paruošti HAP milteliai iš vandeninių PVA ir PEG-TEA tirpalų.

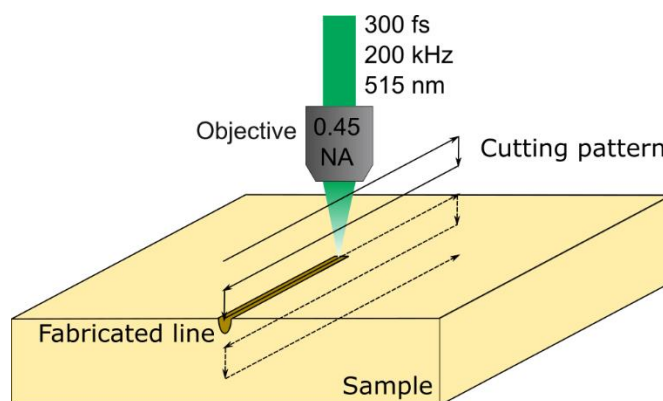
2.2.2. Kompozitinio PLA-cHAP junginio paruošimas

Kompozito sintezei buvo naudojami cHAP milteliai, iškaitinti 680 °C temperatūroje ir 1,75 mm kieto PLA polimero. PLA naudojamas toks, kokį buvome gavę iš gamintojo. cHAP milteliai skirtingais santykiais (2,5; 5; 10; 15%) buvo kaitinami stiklinėlėje ant kaitlentės kartu su PLA 220-235 °C temperatūroje. Gautas PLA-cHAP kompozitas ir grynas išlydytas PLA buvo dedamas ant keramikinės plytelės su 12 įdubimų (25 mm diam.) ir papildomai visa tai buvo lydoma 225 °C temperatūroje 30 min. (kaitinimo greitis 300 °C/h), susidarant standžioms granulėms.

2.2.3. Kompozitinio PLA-cHAP junginio paviršiaus struktūrinimas su DLW

Pagaminto PLA-cHAP kompozitinio junginio tablečių paviršiuje buvo formuojami įvairaus pločio grioveliai, naudojant tiesioginio lazerio rašymo (DLW) metodą.

Mikro-pjovimai bandinių paviršiuje buvo atlikti naudojant Yb: KGW lazerį „Pharos“ (Šviesos konversija, UAB), veikiančiu su 300 fs impulso trukme, 200 kHz impulso pasikartojimo dažniu ir 515 nm bangos ilgiu. Šviesos fokusavimui naudotas 20 x 0,45 NA objektyvas. Schematinis mikro-pjaustymas yra pavaizduotas 2 paveiksle. Grioveliai bandinio paviršiuje buvo išraižomi naudojant skirtingus transliavimo greičius (*translation velocities*) (250 μm/s, 500 μm/s, 750 μm/s ir 1000 μm/s) ir lazerio galią (*laserpower*) (5 mW, 10 mW, 15 mW ir 20 mW).



2 pav. Mikro-pjaustymoschema.

Smailės intensyvumas I ir impulso energija E apskaičiuojami naudojant šias formules:

$$I = \frac{2PT}{fw^2\pi\tau}$$

$E = \frac{PT}{f}$, kur P – vidutinė lazerio galia; T – objektyvo skaidrumas (0.41 skirta 20x 0.45 NA objektyvui), f – impulsų pasikartojimo dažnis, τ – impulso trukmė, $w = 0.61\lambda NA$ spindulio skersmuo. Perskaičiuoti E ir I parametrai yra pateikti 1 lentelėje:

1 lentelė. P , E ir I duomenys.

P [mW]	E [nJ]	I [TW/cm ²]
5	10.25	4.47
10	20.5	8.93
15	30.75	13.40
20	41	17.86

Lazerio impulsų skaičius vienoje mėginio vietoje buvo skaičiuojamas remiantis formule: $n = \frac{2wf}{v}$, kur v – pritaikymo greitis, ir yra pateiktas 2 lentelėje:

2 lentelė. Lazerio transliavimo greitis v ir paskaičiuotas impulsų skaičius n .

v [μm/s]	n
250	1117
500	558.5
750	372.3
1000	279.2

2.3. Aparatūra ir priemonės

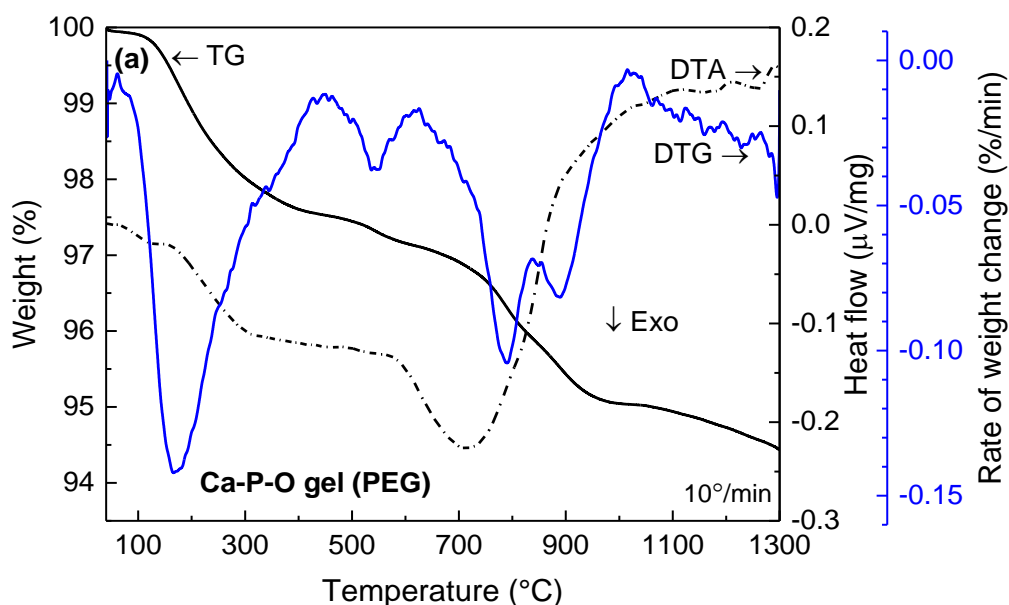
Termogravimetrinė analizė (TG) ir diferencinė termogravimetrija (DTG) atlikta naudojant Netzsch STA 409 CD prietaisą. Paraleliai buvo atliekama masių spektrometrijos (MS) tyrimai. Geliai buvo sudėti į aliuminio oksido tiglius ir kaitinti nuo 400 - 1300°C temperatūrose (kaitinimo greitis 10 °C/min.). Matmenų ir fazės pokyčiai buvo tiriami dilatometriniais metodais. Tabletės buvo paruoštos iš Ca-P-O gelio miltelių iškaitintų 400 °C temperatūroje (*PVA* milteliai buvo naudoti kaip rišamoji medžiaga). Paruoštos tabletės buvo kaitinamos iki 1200 °C (temperatūros kėlimo greitis 1 °C/min.). Susintetintų HAP miltelių fazinis grynumas buvo tiriamas rentgeno difrakcinės analizės (XRD, Rigaku, MiniFlex II, Cu-K α spindulių, $\lambda = 0,1542$ nm 40 kV 100 mA $2\Theta = 10-80^\circ / 10-60^\circ$) metodu. Vidutinis kristalitų dydis buvo nustatytas remiantis Halder-Wagner metodu, naudojant Rigaku PDXL programinę įrangą. Morfologinės ypatybės ir elementinė sudėtis buvo įvertinti, naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM), sujungtą su Rentgeno spindulių energijos dispersiniu (EDX) spektrometru TM3000, "Hitachi". Lauko emisijos skenuojantis elektroninis mikroskopas (FE-SEM, SU70, Hitachi buvo naudotas įvertinti nanostruktūros ypatybes. Norint ištirti suformuotų griovelių topografiją, pagamintos kompozitinio *PLA-cHAP* junginio tabletės buvo padengtos auksu (apipurškimo trukmė 30 s), naudojant Q150T ES (Quorum) dulkinuvą. Infraraudonųjų spindulių spektrai buvo registruojami, naudojant Furjė infraraudonųjų spindulių (FT-IR) spektrometrą (Frontier FT-IR, Perkin-Elmer,(ATR) plokštė (Diamond, ATR kristalų) ir skystu azotu aušinamas gyvsidabrio kadmio (MCT) infraraudonosios sr. detektorius (4000-500 cm⁻¹, 25 skanavimai).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šioje magistrinio darbo dalyje pateikti susintetintų HAP miltelių ir suformuoto cHAP-PLA kompozitinio junginio tyrimų rezultatai.

3.1. Kaitinimo temperatūros įvertinimas (TG/DTA)

Tinkamiausiai kaitinimo temperatūrai nustatyti buvo atlikta visų Ca-P-O gelių, susintetintų naudojant PEG, PEG-TEA ir PVA polimerines matricas, terminės analizės. Ca-P-O gelių, susintetintų naudojant PEG polimerą, TG/DTA ir DTG kreivės pateiktos 3 paveiksle.



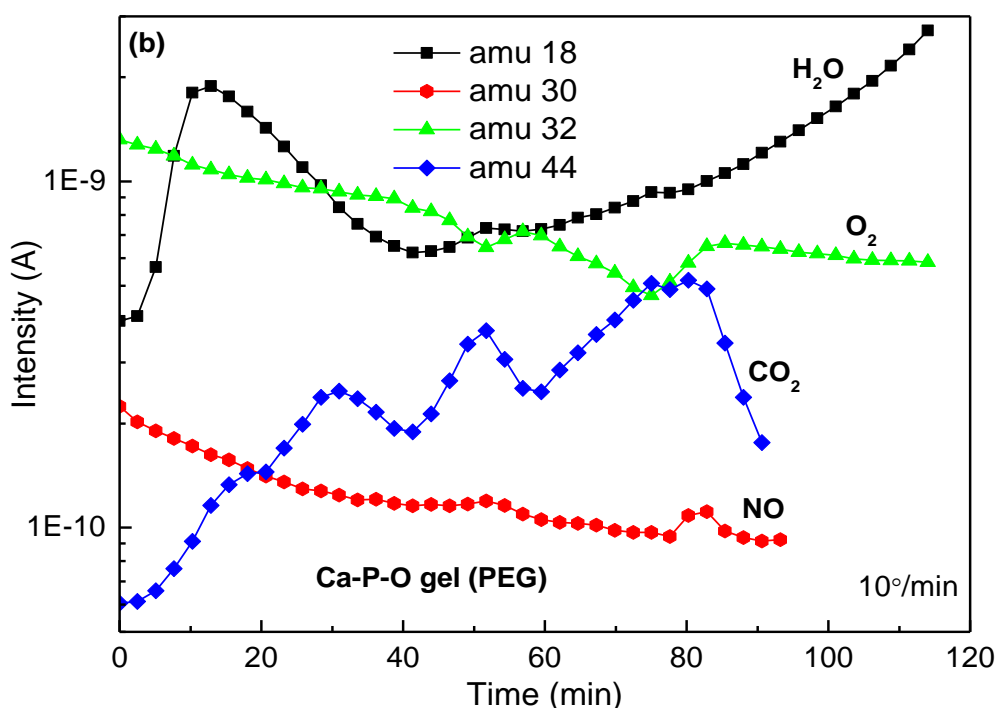
3 pav. Ca-P-O (PEG) gelio TG/DTA ir DTG kreivės.

Pirmas nedidelis svorio sumažėjimas apie 0,5% stebimas mėginius kaitinant iki 200 °C temperatūros. Šis masės sumažėjimas vyksta dėl adsorbuoto vandens pašalinimo. Antrasis 2% svorio sumažėjimas buvo aptiktas esant 400 °C temperatūrai. Šiame temperatūros intervale iš sistemos pašalinama absorbuotas vanduo ir vyksta organinių medžiagų skilimas. Kita dalis vandens ir CO₂ pašalinama iš mėginio 400-600 °C temperatūros intervale. Šie procesai vertinami iš DTG kreivės, kur piko maksimumas pasiekiamas ties 550 °C temperatūra (tuo metu netenkama apie 1% masės). Kitas, apie 3% svorio sumažėjimas stebimas ties 600-900 °C temperatūra, vyksta egzoterminė reakcija ties 710 °C temperatūra. Tai gali būti paaiškinama, jog toliau vyksta kristalinės gardelės dehidratacija ir dekarboksilinimas bei cHAP kristalizacija [46]. Būtina paminėti, jog cHAP kristalizacija vyksta tam tikrame temperatūrų intervale ir priklauso nuo tirpalo

sudėties bei apdorojimo sąlygų. Tyrimai parodė, jog temperatūrų intervale nuo 600 °C iki 1000 °C cHAP prarandama didžiausia karbonatinė dalis esanti junginyje [47]. Papildomas svorio sumažėjimas stebimas ties 1150-1250 °C temperatūra. Analizuojant DTA kreivės piko maksimumą ties 1180-1280 °C temperatūra, galima daryti išvadą, jog tuo metu prasideda HAP skilimas, formuojasi CaO ir kitos antrinių fazių medžiagos.

Panašūs rezultatai buvo gauti ir analizuojant Ca-P-O gelio miltelius, sintetintus naudojant PEG-TEA ir PVA polimerines matricas.

Paraleliai buvo atlikti ir MS analizė. MS jonų kreivės pavaizduotos 4 paveiksle.

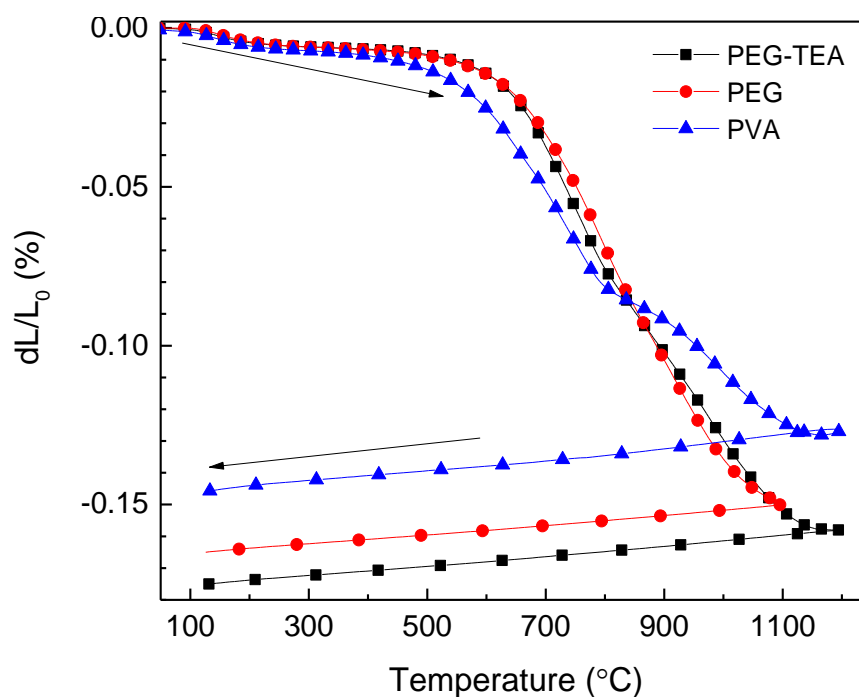


Pav. 4. Ca-P-O (PEG) gelio MS kreivės.

Pagrindinė adsorbuoto vandens kreivė stebima žemiau 200 °C temperatūros su mažiau žinomais dehidracijos produktų pikais ties 520 °C ir 780 °C temperatūromis. CO₂ pasišalina dehidracijos metu. Tyrimai parodė, jog procesai, vykstantys žemiau 850 °C temperatūros, yra negrįžtami, pasišalina CO₂ ir H₂O, susidaro CaO ir B-tipo HAP pereina į A-tipo HAP [48].

MS kreivės, kuriose pavaizduotos Ca-P-O gelio milteliai, susintetinti kartu su PEG-TEA ir PVA polimerinėmis matricomis, rezultatai gaunami panašūs. Šie rezultatai parodė, kad sintezės metu gali susidaryti karbonizuotas HAP (cHAP).

Sintezės temperatūra toliau buvo nustatoma atliekant Ca-P-O gelių dilatometrinius matavimus. Dilatometrijos kreivės pateiktos 5 paveiksle rodo, kad tūrio sumažėjimas labiau ryškus junginiui, susintetintam naudojant PVA matricą. Pirmasis tablečių susitraukimas stebimas 100-200 °C temperatūros intervale, o tai sutampa su TG ir DTA gautais rezultatais, kuomet iš mėginio pasišalina lakieji junginiai. Antrasis tablečių ilgio sumažėjimas siejamas su adsorbuoto vandens bei organinių junginių pasišalinimu bei jonų persitvarkymo ir HAP kristalizacijos. Iš kreivių matoma, jog Ca-P-O mėginys eksponentiškai mažėja nuo 500 °C iki 1100 °C temperatūros, tuo tarpu Ca-P-O (PEG-TEA) ir Ca-P-O (PVA) mėginių susitraukimai stebimi ties 500-850°C ir 480-800°C temperatūrų ribose. Trečiasis Ca-P-O (PEG-TEA) ir Ca-P-O (PVA) mėginių susitraukimas ryškus ties 900-1200°C ir 800-1200°C temperatūrose. Tai galima paaiškinti, jog skyla HAP ir formuojasi CaO. Ties 1100 °C temperatūra nevyksta mėginio sumažėjimas. Norint išvengti karbonatinės dalies praradimo, pagaminti geliai vėliau buvo kaitinami 400-800 °C temperatūros ribose.



Pav. 5. Terminės dilatometrijos kreivės cHAP miltelių (susintetinti naudojant PEG, PEG-TEA ir PVA): linijinio susitraukimo priklausomybė nuo temperatūros.

3. 2. HAP fazinio grynumo tyrimas (XRD)

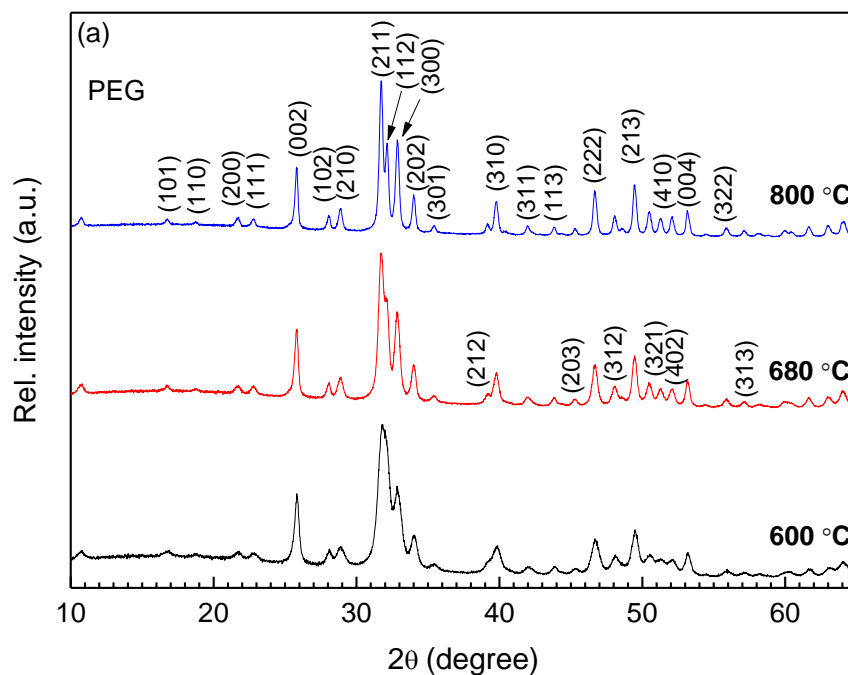
XRD difraktogramos Ca-P-O (PEG) gelio miltelių iškaitintų skirtingose temperatūrose yra pateiktos 6 (a) paveiksle. Iš pateiktų difraktogramų matyti, kad Ca-P-O milteliai,

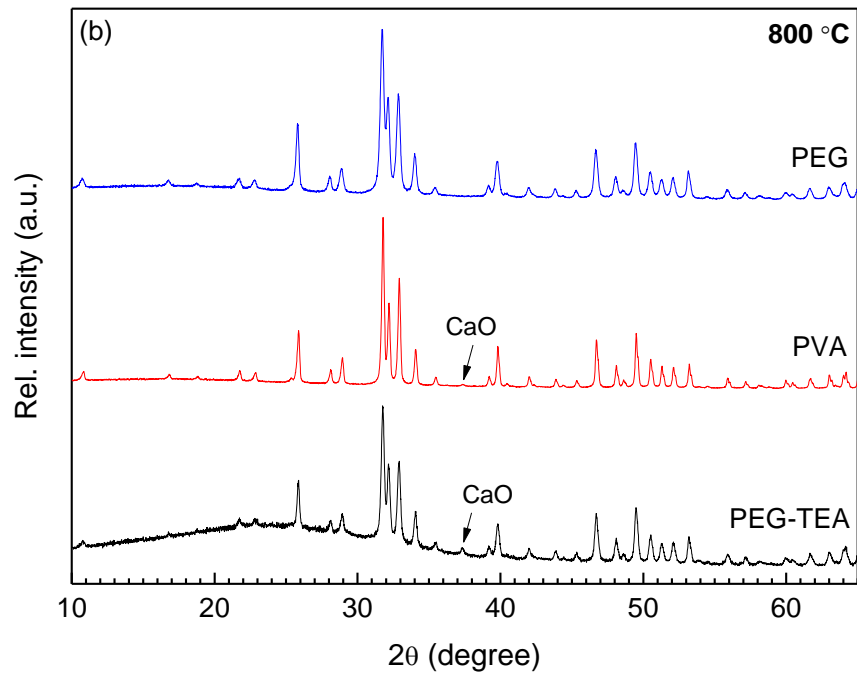
iškaitinti 600 °C, jau yra kristaliniai. Difraktogramose iš Bragg difrakcijos sąlygų matomi pikai buvo priskirti kristaliniam HAP (JCPDS Nr. 09-0432, šešiakampės kristalų sistemos, erdvė grupės iš P63/m) [13]. HAP miltelių, iškaitintų 600, 680 ir 800 °C temperatūroje, kristalitų dydžiai buvo apskaičiuoti 17, 22 ir 26 ± 1 nm, atitinkamai, o HAP (PEG) kristalinės gardelės parametrai $a = b$ ir c buvo apskaičiuoti 9,439 ir 6,898 Å, atitinkamai.

Difrakcinės analizės kreivės Ca-P-O (PEG-TEA) ir Ca-P-O (PVA) gelio miltelių, kaitintų 800 °C temperatūroje (pav. 6 (b)). Stebimos difrakcijos smailės ties $2\theta = 37,4^\circ$, tai pat buvo pastebėtos difrakcijos kreivės miltelių, kaitintų 680 °C ir 800 °C temperatūroje. Tai priskiriama CaO priemaišų susidarymui. HAP (PEG-TEA) difraktogramoje nuo 15 iki 30 θ laipsnių esamas fono padidėjimas atsiranda dėl amorfinio stiklo laikiklio. Vidutinis kristalitų dydis HAP miltelių, susintetinti naudojant PEG-TEA ir PVA, buvo apskaičiuota 43 ir 39 ± 1 nm, atitinkamai. Nustatyta, jog susintetinti nestecheometriniai apatitai.

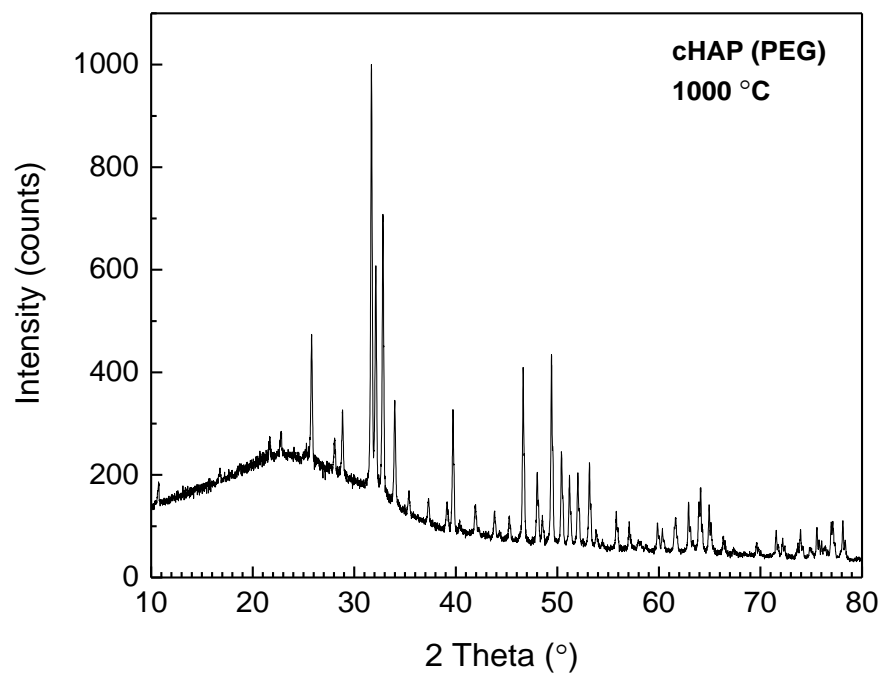
Yra žinoma, jog nestecheometrinė apatitų struktūra nėra stabili ir suyra esant 900-1100 °C. Norint susintetinti stochiometrinį HAP, reikia papildomai naudoti kalcio oksidą (CaO) ir trikalcio fosfatą (TCP). Buvo pastebėta, kad Ca/P santykis yra didesnis nei 1,67 (stechiometrinis HAP), jei kaitinamas mėginys, sudarytas iš gryno HAP ir CaO. Todėl, siekiant papildomai įvertinti Ca/P santykį susintetintose apatituose, medžiagos buvo kaitinamos 1000 °C temperatūroje (7 pav.).

Iš gautų rezultatų matyti, kad sintezės procese naudojami polimerai, jų pradinė koncentracija, tirpalo pH ir tirpalo maišymo laikas turi įtakos fazinei sudėčiai ir kristalitų dydžiui.





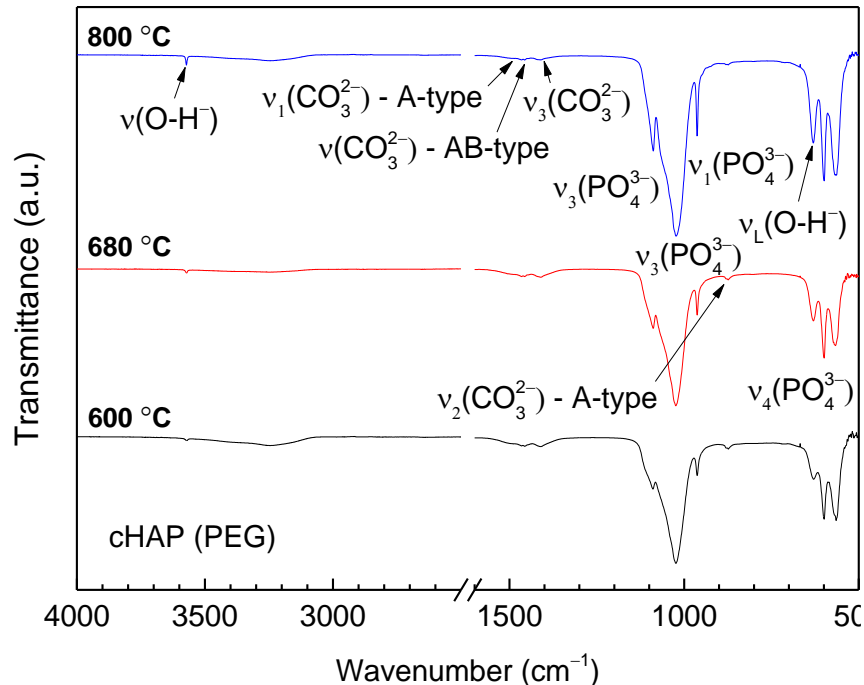
Pav. 6. XRD analizė: (a) cHAP miltelių susintetintų naudojant *PEG* ir kaitinti 600, 680 ir 800 °C, (b) susintetinti naudojant *PEG-TEA*, *PVA* ir *PEG* (kaitinti 800 °C) (bendras iškilimas HAP (*PEG-TEA*) difraktogramoje yra dėl stiklo laikiklio).



Pav. 7. cHAP (*PEG*) iškaitinto 1000 °C 5 val. XRD difraktograma.

3.3. HAP spektroskopinis tyrimas (FT-IR)

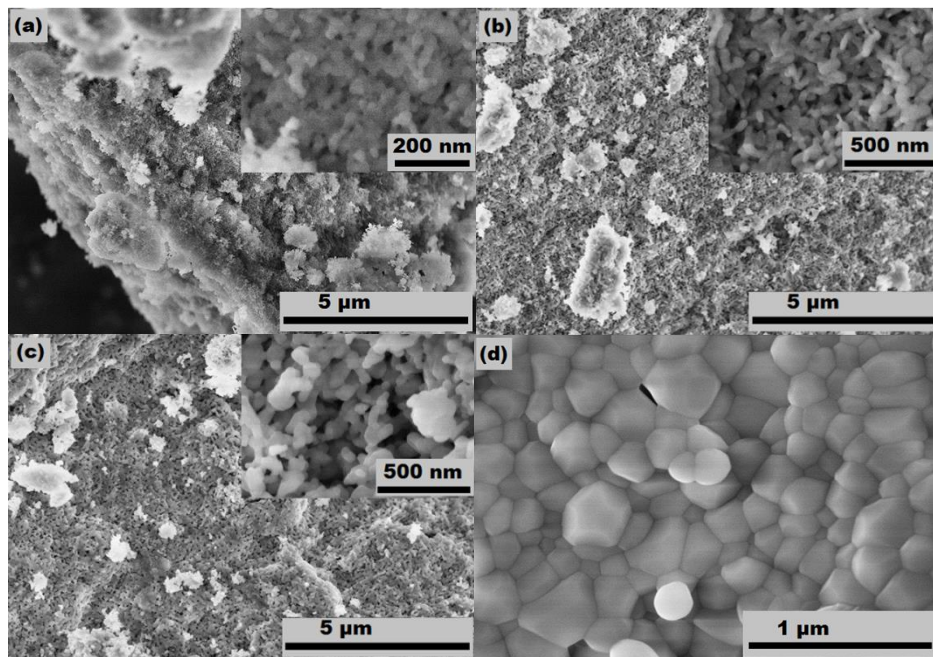
cHAP apatitų, susintetintų naudojant *PEG* polimerinę matricą, FT-IR spektruose buvo aptiktos charakteringos smailės būdingos fosfato (PO_4^{3-}) ir karbonato (CO_3^{2-}) grupių virpesiams (8 pav.) [13, 49]. Absorbcijos juostos ties $1190\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ atsiranda dėl trigubo asimetrinio tempimo režimo ν_3 ir dėl simetrinio P-O ryšio tempimo režimo ν_1 , o juostos matomos ties $630\text{-}530\text{ cm}^{-1}$ išryškėja dėl trigubo O-P-O ryšio iš apatito PO_4^{3-} grupės lenkimo režimo ν_4 . Juostos ties $1550\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ sritimi yra būdingos CO_3^{2-} grupei. Juostelė ties 1466 cm^{-1} priskiriama tempimo režimui, ν_1 , iš CO_3^{2-} grupės A tipo HAP. Būdingi lenkimo režimai, ν_4 ir ν_3 , C-O smailės (CO_3^{2-} grupė) A ir B tipo HAP pasirodo ties 1456 ir 1445 cm^{-1} . Grupė ties 1420 cm^{-1} buvo priskirta tempimo režimui, ν_3 , iš CO_3^{2-} grupės cHAP. Be to, silpna juosta atsiranda nuo lenkimo, ν_2 , C-O smailės (CO_3^{2-} grupės) buvo stebimas $\sim 875\text{-}80\text{ cm}^{-1}$. Ties $530\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ sritimi juostos, esančios ties $\sim 599, 565\text{ cm}^{-1}$ buvo priskiriamos trigubo lenkimo režimui, ν_{4a} ir ν_{4c} , O-P-O fosfato grupės. Be to, dvi skirtingos viršūnės pastebėtos ties 3573 ir 630 cm^{-1} ir priskiriamos tempimo režimui ν_s ir vibraciniam režimui, ν_L , tai atitinka struktūrinio hidroksilo anijoną (OH^-). Plati absorbcijos juosta ties $\sim 3500 - 3060\text{ cm}^{-1}$ atsiranda dėl adsorbuotų vandens molekulių.



Pav. 8. FT-IR spektrai cHAP mėginių, susintetintų naudojant *PEG* ir kaitinta 600, 680 ir 800 °C temperatūroje.

3.4. HAP morfologijos tyrimas (FE-SEM)

FE-SEM nuotraukos iš cHAP miltelių, pagamintų naudojant *PEG*, *PEG-TEA* ir *PVA* polimerus, pateikiamos 9 paveiksle. Susintetinti cHAP (*PEG* matrica) milteliai, kaitinti 680 °C temperatūroje, sudaro aglomeratus, kurie yra sudaryti iš smulkesnių dalelių, jų dydis apie $20-30 \pm 5$ nm (9 pav. (a)). cHAP mėginiai iškaitinti 800 °C temperatūroje buvo sudaryti iš didesnių pradinių dalelių. Taip pat svarbu pažymėti, kad HAP (*PEG*) pirminės dalelės yra ovalo formos. Apskaičiuotas cHAP (*PEG*) dalelių dydis atitinka kristalitų dydį, naudojant gautus XRD duomenis. Tai rodo, jog susintetintos dalelės yra pavieniai kristalitai. Dalelės, gautos naudojant *PEG-TEA* matricą, pasižymi panašia morfologija (9 pav. (c)). Tačiau cHAP milteliai, susintetinti naudojant *PVA* matricą, turėjo skirtingas morfologines ypatybes (9 pav. (d)). Matyti, kad pirminės dalelės didesnės nei 100 nm, pasižymi briaunuota morfologija ir yra kompaktiškai suaugusios/sukepusios.

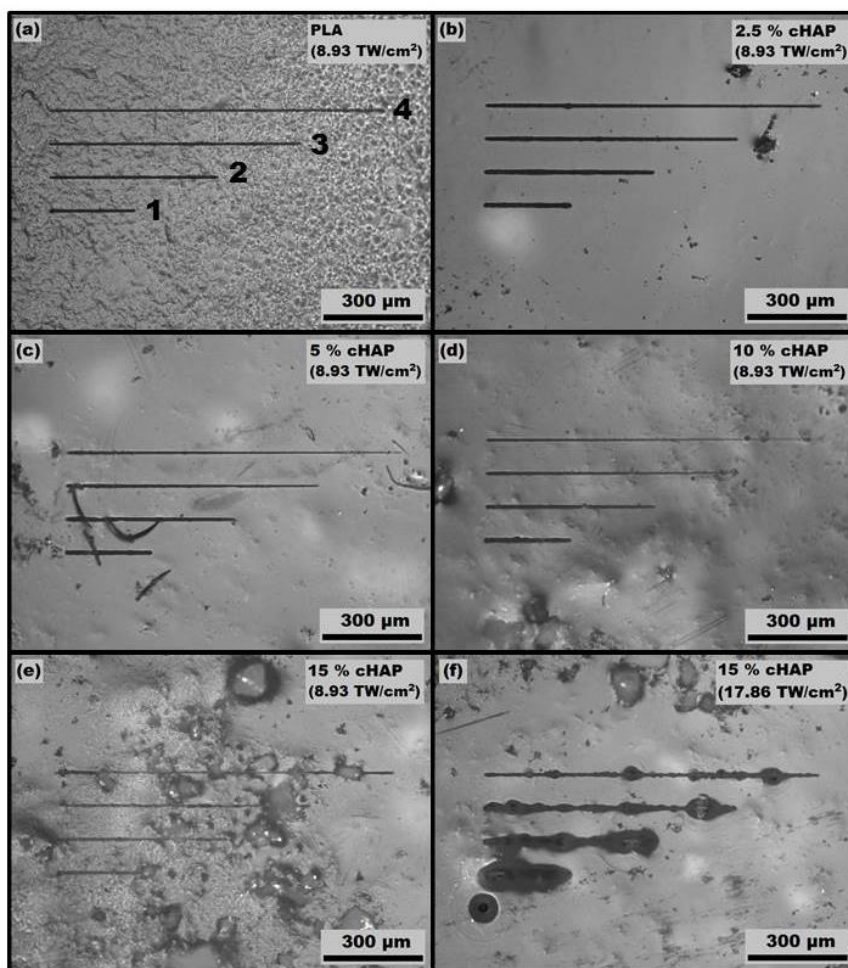


Pav. 9. FE-SEM nuotraukos cHAP miltelių, susintetintų naudojant *PEG* ir kaitintų (a) 680 °C ir (b) 800 °C temperatūroje, ir esant 800 °C temperatūrai, naudodami (c) *PEG-TEA* ir (d) *PVA*.

Sekančiame etape buvo įvertintas susintetintų cHAP mėginių grynumas EDX analizės metodu. Įvertintas EDX analizės Ca/P santykis skyrėsi su vyraujančiu, nes vertės didesnės nei 1,67. Tyrimai parodė, kad nestoichiometrinių apatitų, kai PO_4^{3-} jonai yra pakeičiami CO_3^{2-} jonais (B tipo pakeitimas), Ca/P santykis yra didesnis negu stochiometrinio HAP. Tačiau, kai OH^- jonai apatito struktūroje pakeičiami CO_3^{2-} jonais (A-tipo pakeitimas) arba HPO_4^{3-} jonai pakeisti PO_4^{3-} , Ca/P santykis yra linkęs būti mažesnis nei 1,67 [28]. EDX rezultatai patvirtina XRD ir IR išvadas, jog buvo susintetinti A- ir B- tipo pakeisti cHAP.

3.5. Kompozito *PLA*-*cHAP* topografinis struktūrinimas su DLW

SEM nuotraukose matyti lygus *PLA* ir *PLA*-*cHAP* paviršius (10 pav.). 10 (a) paveiksle matyti ryškūs lygūs *PLA* grioveliai. Tai atitinka ankstesnius tyrimus [39, 50]. Pasikeitė tik jų plotis, nes skyrėsi ir pjaustymo parametrai (vertintas pjaustymo greitis ir vidutinė lazerio galia). Kita vertus, *PLA*-*cHAP* kompozitas reaguoja į lazerio šviesą ir pradeda tirpti.



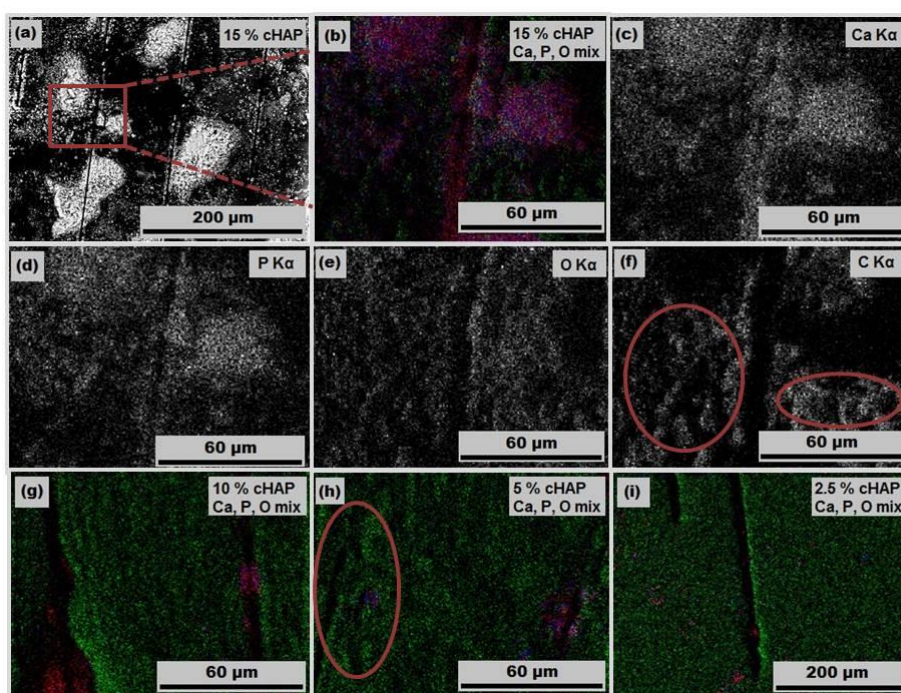
Pav. 10. Griovelių, išpjaustytų ant tablečių (a) *PLA* ir (b)-(f) *PLA*-*HAP* kompozito paviršiaus, optinio mikroskopo nuotraukos. Mėginių tabletės buvo pagamintos naudojant (b) 2,5%, (c) 5%, (d) 10% ir (e) ir (f) 15% *HAP*. Grioveliai pjaustyti, naudojant (a)-(e) 10 mW ir (f) 20 mW lazerio galią (transliacijos greičiai 250, 500, 750 ir 1000 μm/s).

Tai įrodo, jog tokia medžiaga yra nehomogeniška – nevienodai reaguoja į šviesą, ypač kai griovelių pjaustymui naudojama 15 ar 20 mW lazerio spinduliuotės galia (10 pav. (a)-(e)). Pjūviai yra lygūs, tik skiriasi jų plotis. Keliamos kelios to priežastys, kodėl *PLA*-*cHAP* kompozitas jautrus spinduliuotei. *PLA* lydymosi ir persilydymo kreivių pikai kinta, atsižvelgiant į tai, ar jis yra grynas, ar su neorganiniu užpildu. Kristalizacijos temperatūra sumažėja į kompozitą pridėjus

neorganinių užpildų [51]. Tai gali būti viena iš priežasčių, kodėl PLA-cHAP kompozitas toks jautrus šviesai.

3.6. PLA-cHAP kompozito griovelių paviršiaus morfologijos tyrimas

Norėdami gauti daugiau informacijos apie cHAP pasiskirstymą kompozite, atlikome SEM ir EDX analizę (11 pav.). Morfologiniai tyrimai parodė, jog didėjant homogeniniam neorganinių medžiagų pasiskirstymui cHAP, didėja ir oro griovelių tarpai PLA-cHAP kompozite.

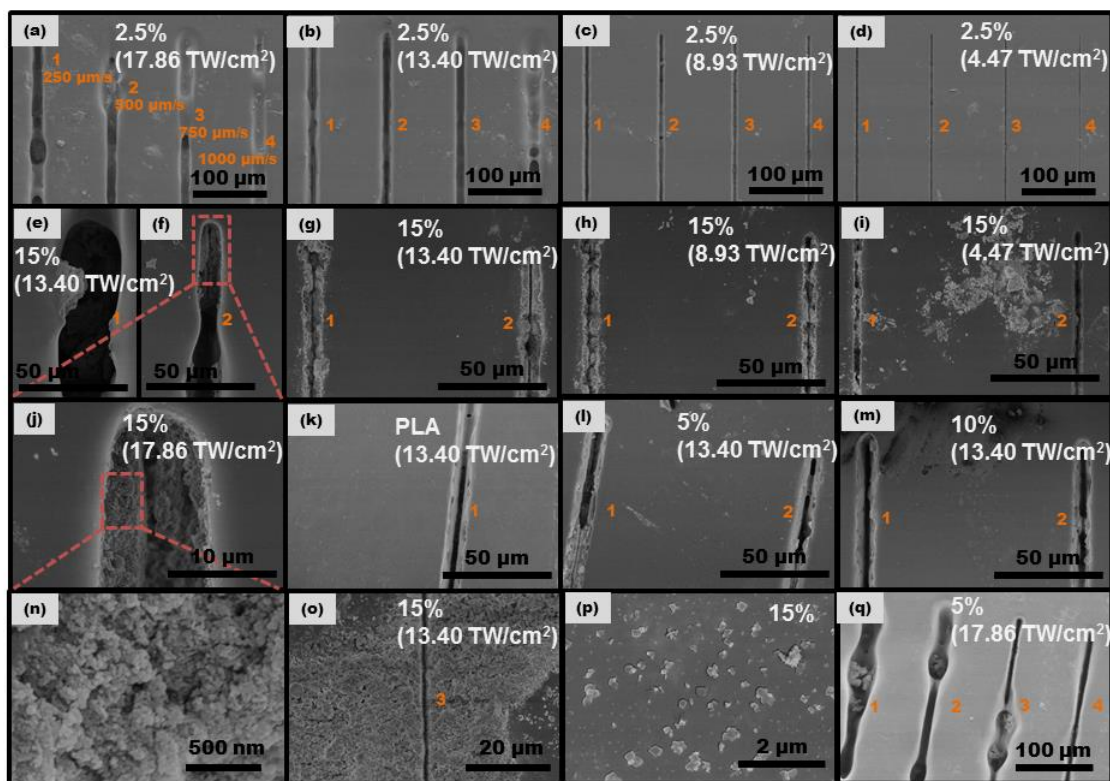


Pav. 11. (a) SEM (pažymėta vieta rodo paviršiaus ištirtą vietą) ir (b)-(i) EDX elementinės difraktogramose PLA-HAP kompozitų legiruotų (a)-(f) 15%, (g) 10%, (h) 5% ir (i) 2,5% iš HAP (EDX žemėlapių spalvos: Ca - raudona, P - mėlyna ir O - žalia). Pažymėtos vietos (f) ir (h) nuotraukose yra pažeistos PLA-cHAP sudėtinio paviršiaus vietos.

Biokompozitai, kuriuose yra didesnis cHAP kiekis, susidaro daugiau porų, kurios sudarytos iš neorganinių medžiagų ir pasiskirsto per visą sudėtinį paviršių (11 pav. (a)). EDX elementinė analizė buvo atlikta, siekiant įvertinti Ca ir P - cHAP – pasiskirstymą sudėtiniame paviršiuje ir suformuotuose grioveliuose (11 pav. (b-i)). Matome, jog cHAP kiekis skiriasi įvairiuose paviršiaus taškuose. Atsižvelgiant į nehomogenišką neorganinių medžiagų pasiskirstymą biokompozituose, galime pastebėti, jog Ca ir P tampa dominuojantys elementai suformuotų griovelių viduje. Tai rodo, kad cHAP dalelės yra padengtos polimero sluoksniu. Toks topografinis

struktūrizavimas lemia požymius, kurie yra svarbūs kalbant apie ląstelių sukibimą ir karkasų inžineriją. SEM analize buvo išnagrinėtas *PLA*-*cHAP* paviršius pagal spindulio poveikį (pažymėtas apskritimu pav. 11 (f) ir (h)), paliekant šiurkščias (vienkartines) dėmes, kuriose buvo ištirpus *PLA*. Analizė skirtingose vietose atitiko labai panašius rezultatus.

Suformuotų griovelių FE-SEM nuotraukos pateiktos 12 paveiksle (prieš tyrimą paruoštos tabletės buvo metalizuotos Au).



Pav. 12. *PLA*-*cHAP* kompozito paviršiuje suformuotų griovelių FE-SEM nuotraukos: (a)-(d) 2,5%, (e)-(i), (j), (n),(o),(p) 15%, (k) gryna *PLA*, (l), (q) 5% ir (m) 10 % su *cHAP* kiekiu.

Matyti, jog paviršiaus topografinis struktūrizavimas, naudojant lazerio galią 5 ir 10 mW, suformuoja siauresnius ir tvarkingesnius griovelius (1, 2, 3 ir 4 eilutės suformuotos, naudojant 250, 500, 750 ir 1000 µm/s, galią atitinkamai), palyginti su suformuotais, naudojant galią 15 ir 20 mW (12 pav. (a)-(d)). Griovelių plotis buvo apskaičiuotas, kad ~ 20, 15, 10 ir 5 µm ir sutampa su lazerio galios mažėjimu. Tvarkingi įpjovų *PLA* paviršiuje rodo panašias morfologines savybes kaip tų, kuriuose buvo 2,5% *cHAP*. Didelės koncentracijos *cHAP*, kuris buvo aptartas anksčiau, bendras medžiagos paviršius tampa šiurkštesnis (~ 50-150 µm) (pav. 12 (i), (o)). *cHAP* kiekis ir dalelių skersmuo didėja, didėjant legiruojančios priemaišos koncentracijai. Bandinių nuotraukos suformuotų kompozitų griovelių, kurie turi didesnę dalį legiruojančios priemaišos, rodo, jog grioveliai suformuoti *cHAP* nanodalelių paviršiuje, o šiek tiek didesni *cHAP* kristalai buvo gauti grioveliuose (12 pav. ((e)-(m), (p))). Be to, analizė parodė, kad buvo gauti 15 ir 20 µm pločio

grioveliai palyginti su tais, kurie buvo 5 ir 10 μm pločio ir gilesni bei su lydytu kraštu (12 pav. (a), (e), (f), (q)). Be to, buvo pastebėta, kad paviršiaus medžiaga lydosi pagal lazerio spinduliuotę, atsiranda vienalyčiai plotai kur yra cHAP (12 pav. (a), (e), (f), (q)). Tas pats buvo pastebima visuose mėginiuose.

Rezultatai rodo, kad medžiaga paviršiuje lydosi dėl to, kad į kompozito vidų pateko oro ir susiformavo ertmės įvairiose srityse. Dėl šių ertmių medžiagos vidinės sienos storis svyruoja ir dėl to gali skirtingai reaguoti į lazerio šviesą. Kita vertus, yra ir privalumų – susidaro tuštumos, kurios sukelia poringumą, o tai svarbi savybė medžiagoms, iš kurių gaminami karkasai.

cHAP paviršius buvo formuojamas, naudojant 10 ir 5 mW galią bei 10 ir 15% cHAP koncentraciją, tačiau tiesioginis poveikis paviršiaus topografijos ir ląstelių elgesys *invitro* ir *invivo* dar bus atliekamas.

IŠVADOS

1. Sintezės procese naudoti polimerai stipriai įtakoja galutinio produkto dalelių morfologiją ir struktūrą: naudojant *PVA* susidaro tankiai suaugę HAP kristalai, kurių dydis didesnis už 100 nm, o kai naudojami *PEG* ar *PEG-TEA* – susidaro nanokristalinis (kristalitų dydis 17-22 nm) HAP.
2. Iš XRD analizės nustatyta, kad susintetinto HAP fazinis grynumas priklauso nuo sintezės procese naudojamo polimero prigimties: naudojant *PVA* ir *PEG-TEA*, esamomis sintezės sąlygomis, susidaro šalutinė CaO fazė.
3. EDX ir XRD analizės patvirtino, kad susidaro nestechiometrinis HAP.
4. FT-IR analizė parodė, kad susidaro A- ir B-tipo karbonato jonais pakeistas HAP.
5. FE-SEM analizė parodė, kad homogeniškiausi lazeriu pjaustomi grioveliai buvo suformuoti ant *PLA-cHAP* kompozito tablečių paviršiaus, turinčiose 10 ir 15% cHAP bei naudojant 750 $\mu\text{m/s}$ ir 1000 $\mu\text{m/s}$ lazerio transliavimo greitį ir 4.47 TW/cm^2 and 8.93 TW/cm^2 spinduliuotės intensyvumą.
6. FE-SEM analizė parodė, kad didėjant cHAP kiekiui *PLA* matricioje, didėja porų kiekis bei atsiranda didesni plotai gryno cHAP.
7. SEM-EDX analizė parodė, kad suformuotos kompozitinės cHAP-*PLA* medžiagos paviršius veikiamas elektronų spindulių (elektronų įgreitinimo įtampa 5 kV-15 kV) degraduoja.

KONFERENCIJOS

Šiame darbe pateikti rezultatai buvo pristatytas trijose konferencijose:

- **Giedrė Lubienė**, Justina Vaičekauskaitė, Edita Garškaitė „*Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles Prepared via Co-Precipitation and Polymer Matrix Mediated Synthesis*“, Chemistry and Chemical Technology 2015, Vilnius, VU Chemijos fakultetas.
- **Giedrė Lubienė**, Justina Vaičekauskaitė, Sima Rekštytė, Mangirdas Malinauskas, Edita Garškaitė, „*Bone Scaffolds Produced From Composite nHAp-PLA/PEG Materials by Direct Laser Writing (DLW)*“, 58-oji fizikos ir gamtos mokslų studentų mokslinė konferencija OpenReadings 2015, Vilnius, VU Fizikos fakultetas.
- **Giedrė Lubienė**, Justina Vaičekauskaitė, Sima Rekštytė, Mangirdas Malinauskas, Edita Garškaitė, „*Kaulinių karkasų gamyba, naudojant tiesioginį lazerio rašymą (DLW) ant nHAP-polimero hibridinės medžiagos*“, 50-ųjų Chemikų dienų konferencija 2015, Vilnius, VU Chemijos fakultetas.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo vadovei doc.dr. Editai Garškaitei už neįkainojamą pagalbą. Taip pat, nuoširdus ačiū doc. dr. Mangirdui Malinauskui, Simui Butkui ir Linui Jonušauskui už vertingas konsultacijas bei pagalbą atliekant kompozitinių junginių HAP-SZ2080 ir cHAP-PLA paviršiaus struktūrinimo darbus.

**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF APPLIED CHEMISTRY**

Giedre Lubiene

Nanocrystalline hydroxyapatite (HAP) synthesis, formation of polylactic acid (PLA)-HAP composite and investigation.

Graduated Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Edita Garskaite

SUMMARY

The carbonated hydroxyapatite (cHAP) nanocrystalline powder synthesis via wet chemistry approach from calcium acetate and ammoniumhydrogenphosphate precursors together with crosslinking agent of polyethyleneglycol, poly(vinylalcohol) and triethanolamine. Thermal decomposition of gels and formation of nanocrystalline cHAP was evaluated by thermal analysis mass spectrometry and dilatometry measurements. The effect of organic additives on the phase purity and particle sizes of cHAP was examined and is addressed. Phase purity, crystallinity and carbonate ion content of the apatite powders were evaluated by X-ray diffraction and FT-IR spectroscopy. Further we present the preparation of polylactic acid (PLA)-cHAP composite material from synthesised phase pure cHAP and melted PLA by mechanical mixing at 220-235 °C. Topographical structuring of PLA-cHAP composite surfaces was performed by direct laser writing (DLW). Microstructured surfaces and the apatite distribution within the composite and formed grooves were evaluated using optical and electron microscopy techniques.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Rosen, E., et al., *Implant-associated Vertical Root Fracture in Adjacent Endodontically Treated Teeth: A Case Series and Systematic Review*. Journal of Endodontics.
2. Xiaohua Liu, P.X.M., *Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. The Journal of the Biomedical Engineering Society, March 2004. **32**(3): p. 477-486.
3. Fujimoto, M., et al., *Poly(ethylene glycol) hydrogels cross-linked by hydrolyzable polyrotaxane containing hydroxyapatite particles as scaffolds for bone regeneration*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2005. **16**(12): p. 1611-1621.
4. M.P.Ferraz, F.J.M., C.M.Manuel. , *Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 2004. **2**: p. 74-80.
5. Hench, L.L., *Bioceramics: From Concept to Clinic*. Journal of the American Ceramic Society 1991. **74**(7): p. 1487-1510.
6. Rezwani K, C.Q., Blaker JJ, Boccaccini AR., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 3413-31.
7. Lafon, J.P., E. Champion, and D. Bernache-Assollant, *Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $Ca_{10-x}(PO_4)_6-x(CO_3)_x(OH)_2-x-2y(CO_3)_y$ ceramics with controlled composition*. Journal of the European Ceramic Society, 2008. **28**(1): p. 139-147.
8. Gunatillake, P.A. and R. Adhikari, *2 - Nondegradable synthetic polymers for medical devices and implants*, in *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*. 2016, Woodhead Publishing. p. 33-62.
9. Kellomäki, M., et al., *Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2495-2505.
10. Gruselle, M., *Apatites: A new family of catalysts in organic synthesis*. Journal of Organometallic Chemistry, 2015. **793**: p. 93-101.
11. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.
12. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate bioceramics*. Ceramics International, 2015. **41**(10, Part B): p. 13913-13966.
13. Garskaite, E., et al., *Effect of processing conditions on the crystallinity and structure of carbonated calcium hydroxyapatite (CHAP)*. CrystEngComm, 2014. **16**(19): p. 3950-3959.

14. Hara, T., et al., *Highly Efficient C–C Bond-Forming Reactions in Aqueous Media Catalyzed by Monomeric Vanadate Species in an Apatite Framework*. The Journal of Organic Chemistry, 2006. **71**(19): p. 7455-7462.
15. Church, A.H., *VI.-New analyses of certain mineral arseniates and phosphates*. Journal of the Chemical Society, 1873. **26**(0): p. 101-111.
16. D. Mizeras, A.V.V., A.Šešok, J.Griškevičius., *Implantų ir audinių regeneracijos karkasų medžiagų analizė*. Science-future for Lithuania, 2014 6: p. 654–660.
17. Shackelford, J.F., *Bioceramics*. 2003: Taylor & Francis.
18. Ratner, B.D., et al., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2012: Elsevier Science.
19. <http://www.ligos.lt/lt/terminai/hidroksiapatitas/1087/>.
20. Chacko, B.K., et al., *The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes*. Redox Biology, 2016. **8**: p. 43-50.
21. Johnston , R.B.J., *Monocytes and Macrophages*. New England Journal of Medicine, 1988. **318**(12): p. 747-752.
22. McCabe, A. and K.C. MacNamara, *Macrophages: Key Regulators of Steady State and Demand-Adapted Hematopoiesis*. Experimental Hematology.
23. Hench, L.L., *Genetic design of bioactive glass*. Journal of the European Ceramic Society, 2009. **29**(7): p. 1257-1265.
24. Bressan, E., et al., *Nanostructured Surfaces of Dental Implants*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(1): p. 1918.
25. Wang, X., Y. Sun, and K. Lin, *Facile synthesis of dental enamel-like hydroxyapatite nanorod arrays via hydrothermal transformation of hillebrandite nanobelts*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(37): p. 7334-7339.
26. Bauer, S.S., P.; von der Mark, K.; Park, J., *Engineering biocompatible implant surfaces*. Progress in Materials Science, 2013. **58**(3): p. 261-326.
27. J.M. Antonucci, D.W.L., and D. Skrtic, *Amorphous Calcium Phosphate Based Composites: Effect of Surfactants and Poly(ethylene oxide) on Filler and Composite Properties*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2007. **28**(5): p. 819–824.
28. Ishikawa, K., *Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution-Precipitation Reactions*. Materials, 2010. **3**(2): p. 1138.
29. J.Trinkūnaitė-Felsen, *Disertacija: Kalcio hidroksiapatito, sintetinto naudojant natūralias pradines medžiagas, tyrimas*. . 2014.

30. Michael, F.M., et al., *Effect of nanofillers on the physico-mechanical properties of load bearing bone implants*. Materials Science and Engineering: C.
31. I.Bogdanovičienė, *Disertacija: Biomedicininių keraminių medžiagų sintezė ir tyrimas*. 2008.
32. Bouyer E., F.G.a.M.I.B., *Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. **11**: p. 523-531.
33. Gilding, D.K. and A.M. Reed, *Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1*. Polymer, 1979. **20**(12): p. 1459-1464.
34. Osterberg B, B.B., *Effect of suture materials on bacterial survival in infected wounds. An experimental study*. Acta Chir Scand. , 1979. **145**(7): p. 431-435.
35. Gunatillake PA, A.R., *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. National Library of Medicine National Institutes of Health, 2003 May 20.
36. Hiroshi Urayama, T.K.a.K., *Properties and Biodegradability of Polymer Blends of Poly(L-lactide)s with Different Optical Purity of the Lactate Units*. Properties and Biodegradability of Polymer Blends of Poly(L-lactide)s with Different Optical Purity of the Lactate Units, 2002. **287**(2): p. 116-121.
37. Sinclair, R.G., *The Case for Polylactic Acid as a Commodity Packaging Plastic*. Journal of Macromolecular Science, Part A, 1996. **33**(5): p. 585-597.
38. Sawhney, A.S. and P.D. Drumheller, *Chapter II.4 - Polymer Synthesis A2 - Mikos, Charles W. Patrick Antonios G*, in *Frontiers in Tissue Engineering*, L.V.M.S. Langer, Editor. 1998, Pergamon: Oxford. p. 83-106.
39. Mangirdas Malinauskas, S.R., Laurynas Lukoševičius , Simas Butkus , Evaldas Balčiūnas , Milda Pečiukaitytė , Daiva Baltriukienė , Virginija Bukelskienė , Arūnas Butkevičius , Povilas Kucevičius , Vygandas Rutkūnas and Saulius Juodkazis *3D Microporous Scaffolds Manufactured via Combination of Fused Filament Fabrication and Direct Laser Writing Ablation*. Micromachines, 2014: p. 839-858.
40. Nikolic, J.D.a.M.S., *A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications*. The Royal Society of Chemistry, 2011: p. 149-196.
41. Middleton, J.C. and A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-2346.
42. María Vallet-Regi, D.A.N., *Chapter 1: Biological Apatites in Bone and Teeth, in Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications (2)*. 2015: p. 1-29.
43. L. Molienė, S.M., *Žmogaus biologija ir sveikata. Vadovėlis. "Šviesa", Kaunas*. 2000: p. 62-67.

44. <http://www.mokslasirtechnika.lt/mokslo-naujienos/lietuviski-lazeriai-verziasi-pramone.html>.
45. Catalogue, P., *Ultrafast Lasers for Industrial and Scientific Applications*. 2015.
46. Gross, K.A., V. Gross, and C.C. Berndt, *Thermal Analysis of Amorphous Phases in Hydroxyapatite Coatings*. Journal of the American Ceramic Society, 1998. **81**(1): p. 106-112.
47. Tõnsuaadu, K., M. Peld, and V. Bender, *Thermal analysis of apatite structure*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003. **72**(1): p. 363-371.
48. Tonsuaadu, K.P., M.; Bender, V *Thermal analysis of apatite structure*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003. **72**: p. 363–371.
49. Koutsopoulos, S., *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **62**(4): p. 600-612.
50. Jia, W., et al., *Effects of high-repetition-rate femtosecond laser micromachining on the physical and chemical properties of polylactide (PLA)*. Optics Express, 2015. **23**(21): p. 26932-26939.
51. Shi, N. and Q. Dou, *Crystallization behavior, morphology, and mechanical properties of poly(lactic acid)/tributyl citrate/treated calcium carbonate composites*. Polymer Composites, 2014. **35**(8): p. 1570-1582.