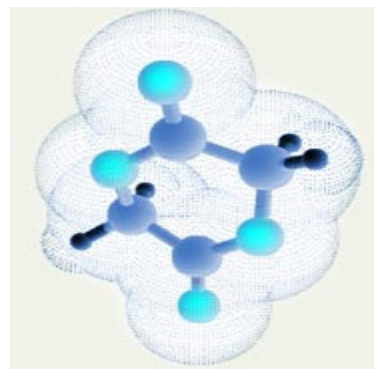
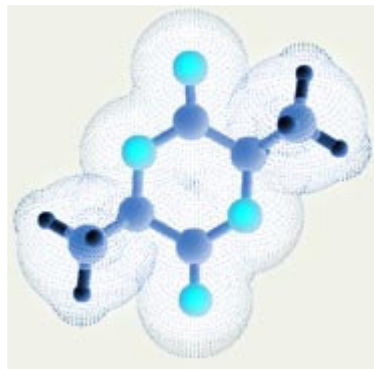


**Univerzitet u Beogradu
Fakultet za fizičku hemiju**

Magdalena Stevanović

Dobijanje, morfologija i struktura prahova poli (DL-laktid-ko-glikolida) i biokompozita poli (DL-laktid-ko-glikolid)/bifazni kalcijum fosfat

-magistarska teza-



Beograd, 2006.

Na početku, i kao prvo, zahvaljujem se suprugu Goranu na ogromnoj podršci, ljubavi, razumevanju i konkretnoj pomoći tokom izrade ove magistarske teze. Ovu magistarsku tezu posvećujem suprugu Goranu i našoj životnoj sreći sinu Sergeju.

Takodje se najiskrenije zahvaljujem mojoj i Goranovoj porodici.

U okviru ovog magistarskog rada istraživanja su ostvarena kroz niz programa iz oblasti nauke materijala koji se realizuju u Institutu tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti pod rukovodstvom prof. dr Dragana Uskokovića, mentora teze, kome dugujem iskrenu zahvalnost za podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju. Zahvaljujem se dr Nenadu Ignjatoviću iz Instituta tehničkih nauka SANU na korisnim savetima i pomoći kao i dr Nikoli Cvjetićaninu sa Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, koji je prihvatio da bude, takodje, mentor ovog magistarskog rada. Takođe sam zahvalna na pomoći dr Gordani Ćirić Marjanović sa Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

U okviru ove teze, analiza uzoraka metodom infracrvene spektroskopije je uradjena zahvaljujući pomoći mr Zorana Nedića sa Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, rendgenostruktorna analiza uzoraka je izvršena u saradnji sa dr Miodragom Mitrićem iz Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije, merenja diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom zahvaljujući Dejanu Miličeviću i mr Enisu Džunizoviću iz Instituta za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za radiohemiju i fiziku, na čemu sam im iskreno zahvalna. Takodje veliko hvala i mr Miroslavu Miljkoviću sa Medicinskog fakulteta iz Niša kao i prof. Milošu Bokorovu sa Biološkog fakulteta iz Novog Sada na karakterizaciji uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Posebnu zahvalnost dugujem i prof. Branki Jordović sa Tehničkog fakulteta iz Čačka na uradjenim stereološkim ispitivanjima uzoraka.

Zahvaljujem se kolegama iz Instituta tehničkih nauka SANU kao i kolegama sa Fakulteta za fizičku hemiju.

Teza se sastoji iz šest celina. Prvo poglavlje predstavlja teorijski deo u kome je dat pregled literature koja se odnosi na biomaterijale, polimerne biomaterijale, dobijanje čestica poli (DL-laktid-ko glikolida), dobijanje kompozitnih materijala na bazi kalcijum fosfata i poli(laktid-ko-glikolida). Drugo poglavlje objašnjava ukratko cilj rada. Treće poglavlje prikazuje eksperimentalni rad kao i uslove pod kojima je rađena karakterizacija uzoraka. Četvrto poglavlje iznosi i tumači rezultate istraživanja. Peto poglavlje daje zaključak svega urađenog dok je u šestom dat spisak referenci.

Sadržaj

Sadržaj slika	5
Sadržaj tabela	7
APSTRAKT	9
ABSTRACT	11
1 Teorijski deo	13
1.1 Biomaterijali	14
1.2 Polimerni biomaterijali	20
1.3 Biodegradabilni polimeri	22
1.3.1 Poli (glikolid) (PGA)	23
1.3.2 Poli (DL-laktid) (DLPLA)	24
1.3.3 Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA)	24
1.4 Dobijanje čestica poli (DL-laktid-ko-glikolida)	28
1.5 Dobijanje kompozitnih materijala na bazi kalcijum fosfata i poli (laktid-ko-glikolida)	38
2 Cilj istraživanja	46
3 Eksperimentalni deo	48
3.1 Eksperimentalni rad	49
3.1.1 Dobijanje praha poli (DL- laktid-ko-glikolida) (DLPLG)	49
3.1.2 Sinteza kompozita poli(DL-laktid-ko-glikolid)/bifazni kalcijum fosfat	51
3.2 Eksperimentalne metode	52
3.2.1 Metoda centrifugalnog procesiranja	52
3.2.2 Infracrvena spektroskopija	52
3.2.3 Rendgenostrukturna analiza	53
3.2.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija	53
3.2.5 Stereološka analiza	53
3.2.6 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	54
4 Rezultati i diskusija	55
4.1 Rezultati	56

4.1.1 Rezultati infracrvene spektroskopije _____	56
4.1.2 Rezultati rendgenostrukturne analize _____	58
4.1.3 Rezultati diferencijalne skenirajuće kalorimetrije _____	61
4.1.4 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije _____	63
4.1.5 Rezultati stereološke analize _____	70
4.2 Diskusija _____	84
5 Zaključak _____	91
6 Literatura _____	94

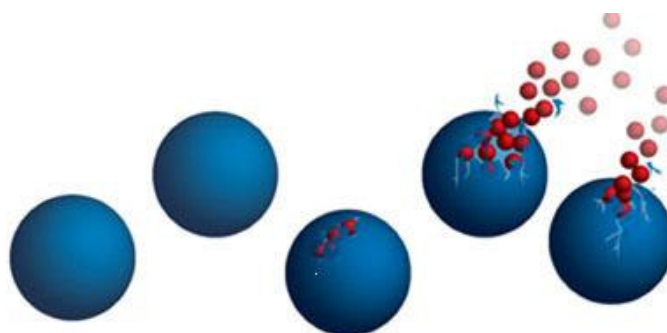
Sadržaj slika

<i>Slika 1.1.1</i> Različiti primeri biomaterijala [4].....	14
<i>Slika 1.1.2</i> Veštački kuk [13].....	15
<i>Slika 1.1.3</i> Inženjerstvo tkiva [30].....	18
<i>Slika 1.3.1. a)</i> Sintetički i <i>b)</i> prirodni polimerni biomaterijal [45].....	22
<i>Slika 1.3.2</i> Poli (glikolid)	23
<i>Slika 1.3.3</i> Poli (laktid).....	24
<i>Slika 1.3.4</i> Poli (laktid-ko-glikolid) [65].....	25
<i>Slika 1.3.5</i> Degradacija PLA i PGA homopolimera i kopolimera implantiranog u tkivo pacova [65]	25
<i>Slika 1.3.6</i> Kriva smanjenja molekulske mase, jačine i mase biodegradabilnog polimera tokom vremena [63].....	27
<i>Slika 1.4.1</i> Polimerna čestica u koju je inkapsulirana DNK [83].....	28
<i>Slika 1.4.2</i> Spontana emulzacija [97]	29
<i>Slika 1.4.3</i> SEM fotografija polimernih mikročestica dobijenih koacervacionom tehnikom [100].....	29
<i>Slika 1.5.2</i> PLGA mikročestice korišćene za pripremanje skafolda [155].....	43
<i>Slika 3.1.1</i> Šema dobijanja submikronskih čestica kopolimera DLPLG.....	50
<i>Slika 4.1.1</i> IR spektar praha kopolimera DLPLG.....	56
<i>Slika 4.1.2</i> IR spektar kompozita BCP/DLPLG 65/35 w/w	57
<i>Slika 4.1.3</i> Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP.....	58
<i>Slika 4.1.4</i> Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 65/35 w/w	59
<i>Slika 4.1.5</i> Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 10/90 w/w	59
<i>Slika 4.1.6</i> Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 5/95 w/w	60
<i>Slika 4.1.7</i> Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 2/98 w/w	60
<i>Slika 4.1.8</i> DSC krive kompozita BCP/DLPLG.....	62
<i>Slika 4.1.9</i> Sniženje temperature tačke ostakljivanja sa povećanjem udela polimera u kompozitu.....	63
<i>Slika 4.1.10</i> SEM fotografije praha DLPLG prve serije	64
<i>Slika 4.1.11</i> SEM fotografije praha DLPLG druge serije	65
<i>Slika 4.1.12</i> SEM fotografije praha DLPLG treće serije	65
<i>Slika 4.1.13</i> SEM fotografije praha DLPLG četvrte serije	66
<i>Slika 4.1.14</i> SEM fotografije praha DLPLG pete serije.....	67
<i>Slika 4.1.15</i> SEM fotografije praha DLPLG šeste serije.....	67
<i>Slika 4.1.16</i> SEM fotografije praha DLPLG sedme serije	68
<i>Slika 4.1.17</i> SEM fotografije uzorka BCP.....	68
<i>Slika 4.1.18</i> SEM fotografije kompozita a)BCP/DLPLG 65/35 w/w b)BCP/DLPLG 10/90 w/w c)BCP/DLPLG 5/95 w/w d)BCP/DLPLG 2/98 w/w.....	69
<i>Slika 4.1.19</i> Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha prve serije: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa	72
<i>Slika 4.1.20</i> Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha druge serije: a) a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa.....	75

<i>Slika 4.1.21 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha treće serije: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa</i>	77
<i>Slika 4.1.22 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha četvrte serije: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa</i>	80
<i>Slika 4.1.23 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha pete serije: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa</i>	82
<i>Slika 4.2.1 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja praha DLPLG svih pet serija: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa</i>	89
<i>Slika 4.2.2 Raspodela čestica pet serija praha DLPLG na osnovu maksimalnog dijametra čestica – Dmax</i>	90

Sadržaj tabela

<i>Tabela 3.1.1 Eksperimentalni uslovi za dobijanje praha DLPLG</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 4.1.1 Rezultati stereoloških ispitivanja praha prve serije</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 4.1.2 Rezultati stereoloških ispitivanja praha druge serije</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 4.1.3 Rezultati stereoloških ispitivanja praha treće serije</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 4.1.4 Rezultati stereoloških ispitivanja praha četvrte serije</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 4.1.5 Rezultati stereoloških ispitivanja praha pete serije.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 4.2.1 Rezultati stereološke analize praha DLPLG.....</i>	<i>86</i>



*Nema ničeg veličanstvenog u vezi sa tim.
Sve što treba da se uradi je da se pritiskaju odgovarajuće dirke
u odgovarajućem trenutku - i instrument će svirati sam od sebe!
(J. S. Bah)*

APSTRAKT

Polimerni materijali kao što je kopolimer poli(DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG) zahvaljujući svojim bioresorbilnim (biodegradabilnim) osobinama se dosta koriste u različite medicinske svrhe kao na primer za izradu sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, nosača u inženjerstvu tkiva, fiksaciju koštanih fraktura, konaca za ušivanje rana. Priprema submikronskih čestica polimera DLPLG-a predstavlja svojevrsan izazov. U ovom magistarskom radu prikazan je nov način dobijanja čestica kopolimera DLPLG-a od komercijalnih granula hemijskom metodom odnosno korišćenjem sistema rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent chemical method). Dobijeni rastvori su kasnije centrifugirani. Od sinteze zavise i krajnja morfologija i stehiometrija, osobine materijala, brzina resorpcije u organizmu. Menjanjem vremena starenja sa nerastvaračem kao i brzine i vremena centrifugalnog procesiranja pokazano je da je moguće uticati na morfologiju tj. veličinu i oblik čestica kao i uniformnost praha DLPLG-a. Prah DLPLG-a sa najkraćim vremenom starenja sa nerastvaračem i najdužim vremenom i brzinom centrifugalnog procesiranja ima čestice najmanjih dimenzija i najveću uniformnost pri čemu su veličine čestica na submikronskoj skali (150-230 nm).

Kompozitni materijali na bazi bifaznog kalcijum fosfata (BCP) i kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) se koriste za zamenu i rekonstrukciju koštanog tkiva. Do sada su u brojnim eksperimentima za dobijanje kompozitnog materijala na bazi keramike i kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) korišćeni različiti pristupi. Sintaza je rađena bilo tako što je čvrsta komponenta hidroksiapatita (HAp) dodavana u rastvor DLPLG-a u nekom od rastvarača (dioksan, hloroform), ili je prah HAp-a mešan sa prahom DLPLG-a ili je rastvor DLPLG-a infiltriran u rastvoreni apatit. Do sada nije rađena sintaza na taj način da se prah DLPLG-a homogenizuje sa gelom BCP-a pa je jedan od ciljeva istraživanja bio i da se novim pristupom sintezi BCP/DLPLG-a dobije kompozitni materijal sa određenim aplikativnim osobinama od kojih u velikoj meri i zavisi uspeh implementacije. Ovakav kompozitni materijal bi imao odgovarajuću primenu u oralnoj hirurgiji tj bilo bi ga moguće injektirati i njime popuniti kanale donje vilice, mandibule, ispuniti prostor između zuba i desni u slučaju paradentoze i paradentopatije, itd. Bifazni kalcijum fosfat je sintetizovan precipitacionom

tehnikom od kalcijum nitrata i amonijum fosfata u alkalnoj sredini a zatim je, u odredjenom odnosu, homogenizovan sa prahom polimera DLPLG-a.

Uzorci DLPLG-a, BCP-a i BCP/DLPLG-a su karakterisani infracrvenom spektroskopijom (IR), rendgenostrukturnom analizom (XRD), diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom (DSC), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) a radjena je i detaljna stereološka analiza.

ABSTRACT

Polymer materials like copolymer poly(-DL-lactide-co-glycolide) (DLPLG), due of their biodegradable nature, are widely used in various medical applications; controlled release of delivering drugs, carriers in the tissue engineering, fixation of the bone fractures, surgical strings. The preparation of DLPLG submicron spheres poses a serious challenge. This thesis presents a new method in obtaining copolymer DLPLG powder from the commercial granules, using chemical method with solvent/nonsolvent systems, where the obtained solutions were afterwards centrifuged. The final morphology and stoichiometry, the application characteristics of the material and resorption time in the organism are directly dependent of the synthesis itself. By changing the aging time with non-solvent and time and velocity of the centrifugal processing, it is possible to influence on the morphology and uniformity of the DLPLG copolymer particles. DLPLG powder of the series with short aging time, with non-solvent, and longest time and velocity of the centrifugal processing, has the smallest particles and highest uniformity, where particles sizes were between 150 do 230nm.

The composite biomaterial based on biphasic calcium phosphate (BCP) and polymer poly(DL-lactide-co-glycolide) (DLPLG) is used for the substitution and replacements of the bony tissue. Until now, various approaches were followed for obtaining composite material on ceramic basis and copolymer poly(DL-lactide-co-glycolide). Synthesis were performed either with solid component hydroxyapatite (HAp) being added into DLPLG solution of some solvent (dioxan, chloroform), or HAp powder was mixed with DLPLG powder, or DLPLG solution was infiltrated into melted apatite. Until now synthesis where DLPLG powder was homogenized with BCP gel was not performed. This is why one of the aims of this investigation is obtaining the composite material with certain application characteristics using new BCP/DLPLG synthesis approach out of which successful implementation will greatly depend. Thus obtained composite material would be applicable in the oral surgery e.g. it would be possible to inject it and fill contours of a wound, fill in gaps between teeth and dents in case of paradentopathia or paradentosa etc. Biphasic calcium phosphate was synthesised with precipitancy technique from calcium nitrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ and ammonium phosphate

$(\text{NH}_4)_3 \text{PO}_4$ in the alkali environment, which was then homogenized with polymer DLPLG powder in the appropriate ratio.

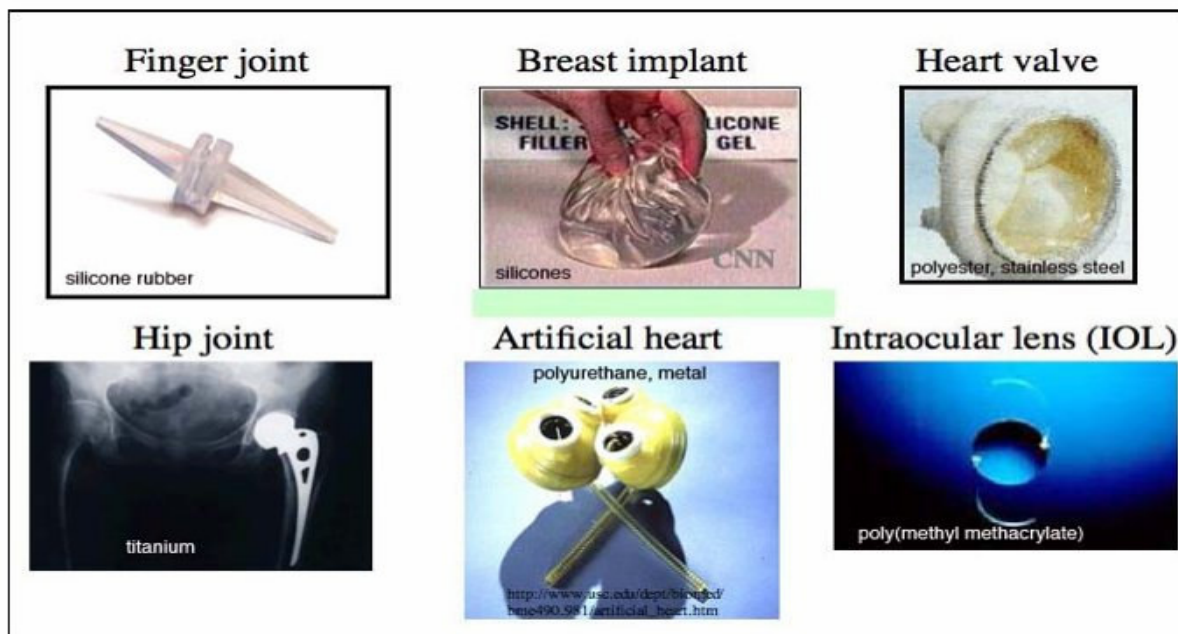
The samples of DLPLG, BCP and BCP/DLPLG were characterized by Infrared Spectroscopy (IR), X-Ray Diffraction (XRD) Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Stereological analysis.

1 Teorijski deo

1.1 Biomaterijali

Biomaterijali su materijali koji se koriste za reparaciju ili zamenu živog tkiva ili organa kako iz zdravstvenih tako i iz estetskih razloga [1,2].

Materijali koji su upotrebljavani za nadoknadu pojedinih delova tela poznati su već više stotina godina. Pravu revoluciju u israživanju i tehnologiji izazivaju današnji sintetički biomaterijali sa tačno određenim osobinama za specifičnu namenu [3]. Zajednička osobina svih biomaterijala bez obzira na njihove različitosti, je biokompatibilnost, što znači da ne smeju izazivati negativne prateće efekte u organizmu, odnosno, ne sme doći do toksičnih, alergijskih ili kancerogenih reakcija u telu [4]. Isto tako mora se smanjiti ili potpuno ukloniti svaka vrsta negativnog imunološkog odgovora organizma [5].

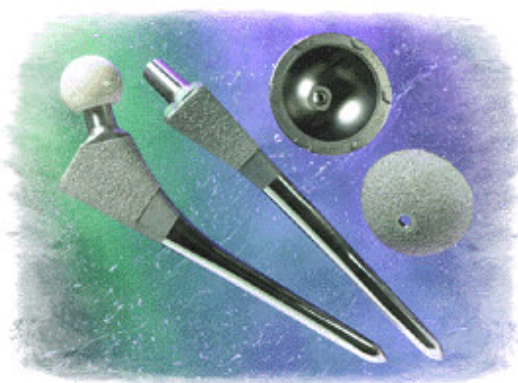


Slika 1.1.1 Različiti primeri biomaterijala [4]

Biološka inertnost i mehanička svojstva slična svojstvima tkiva koje se zamjenjuje su uslovi koje su prvi materijali morali zadovoljavati [3]. Danas se u ortopediji i protetici od inertnih biomaterijala koriste biokeramike na bazi metalnih oksida Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 , vlakna staklastog ugljenika ili kompoziti sa vlaknima staklastog ugljenika, metali ili čelici presvučeni tankim filmovima npr.: TiN , SiC , ZrO_2 , BN , B_4C , staklo-keramike [6]. Biokompatibilnost tih

materijala, posebno biokeramike, proizlazi iz njihovog sastava što se objašnjava time da su građeni od istih jona koji se nalaze i u telesnoj tečnosti (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) kao i od jona koji ne izazivaju toksične reakcije u telu (Zr^{4+} , Ti^{4+}) [7]. Inertni biomaterijali ne stvaraju vezu s okolnim tkivom već je najčešći odgovor tkiva na implantat od inertnog biomaterijala, stvaranje fibroznog tkiva (vlaknasto tkivo promenljivog gradijenta gustine) oko implanta, što ponekad može dovesti i do njegove potpune izolacije usled čega može doći do deformisanosti implanta ili njegovog pomeranja što može prouzrokovati oštećenje okolnog tkiva [3]. Fiziološko okruženje vremenom utiče na hemijsku stabilnost i mehaničku čvrstoću materijala ali je ipak milionima ljudi poboljšana kvaliteta življenja ugradnjom npr. veštačkog kuka ili kolena [8].

Kompozitni materijali su materijali koji su sastavljeni od dva ili više materijala, a osobine su im bolje od materijala komponenata [9, 10, 11]. Kompozitni materijali mogu biti tipa metal/metal, metal/polimer, metal/keramika, keramika/keramika, keramika/polimer, polimer/polimer itd. [12]. Tako se na primer jedan tip veštačkog kuka (slika 1.1.2) sastoji od metalne drške ugradjene u kost i keramičke kugle na koju je nanesen polietilen velike molekulske mase (Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE)). Sloj polietilena služi za povezivanje kugle i zgloba, ali i kao zaštita keramičke kugle [13,14].



Slika 1.1.2 Veštački kuk [13]

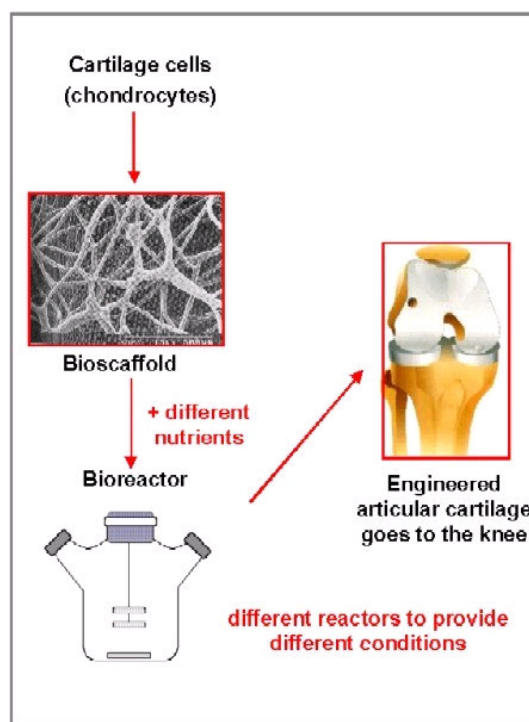
Prilikom implantacije biomaterijala u organizam potrebno je voditi računa o promenama koje nastaju pri kontaktu materijala sa biološkim okruženjem, međusobnom kontaktu samih materijala komponenata, a pošto se implant u organizmu nalazi u tečnom medijumu potrebno je poznavati i sve reakcije na medjupovršini tečno-čvrsto, uključujući topljenje, brzinu topljenja na granicama faza, otpuštanje i difuziju jona, promenu strukture površine materijala, promene drugih osobina materijala [1]. Inertni biomaterijali imaju specifična fizička svojstva, veliku mehaničku čvrstoću i tvrdoću (1000–4500 MPa), Jungov modul od 150–400 GPa, veliku otpornost na stres, lomljenje, veliku savitljivost [2]. Hemijska

i fizička svojstva inertnih biomaterijala zavise od sastava materijala, čistoće sirovina, veličine zrna kao i od temperature sinterovanja, što je posebno važno kod keramika [15]. U skladu s visokim zahtevima International Standard Organization (ISO), na primer, Al_2O_3 keramika kao jedna od najviše korišćenih biokeramika u medicini i stomatologiji mora biti visoke čistoće ($> 99,5\%$), velike gustine ($> 3,94 \text{ gcm}^{-3}$) i sa zrnima sinterovanog materijala veličine ($< 4,5 \mu\text{m}$) [16]. Malo odstupanje od ISO-standarda menja osobine materijala. Tako se pokazalo da mala količina SiO_2 , CaO ili alkalnih oksida podstiče rast zrna tokom sinterovanja do veličine $> 7 \mu\text{m}$ što dovodi do smanjenja mehaničke čvrstoće za oko 20% . Nedostaci inertnih materijala su: znatno veći Jungov modul od modula kosti ($7\text{--}25 \text{ GPa}$), moguća hemijska nestabilnost u telesnoj tečnosti, niska otpornost na lomove kod čeličnih biomaterijala, itd [15]. Sve ovo predstavlja ograničenja u primeni, ali i vremenu trajanja implantata. Uprkos tome, danas u Evropi i SAD postoji čitav niz proizvođača inertnih biomaterijala, a stalna potreba moderne medicine i tehnologije za novim bioinertnim materijalima sa posebnim svojstvima za tačno određenu upotrebu koja će zadovoljiti vrlo visoke zahteve i standarde je stalni izazov za istraživače u raznim strukama [4, 17].

Mogućnost samoobnavljanja i prilagodjavanja strukture i osobina mehaničkom opterećenju i protoku krvi su dve važne karakteristike koje živo tkivo ima, a inertni biomaterijali ih ne posjeduju [18]. Bioaktivnost se definiše kao sposobnost materijala da u kontaktu s telesnom tečnošću na svojoj površini podstakne specifični biološki odgovor organizma, što dovodi do stvaranja veze sa tkivom [18]. Takva su na primer bioaktivna stakla sastavljena od više vrsta stakala ($\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5$) a koriste se u stomatologiji, ortopediji, itd [19]. Posljednja su istraživanja pokazala da je biološka aktivnost tih stakala posledica aktivacije sedam porodica gena koji se nalaze u ćelijama kostiju. Aktivirani geni stvaraju različite proteine i služe kao faktori rasta i podstiču umnožavanje ćelija kosti (osteoblasta) [20]. Glavni uslov tog biološkog odgovora je kontrolisano topljenje površine bioaktivnog stakla koje dovodi do stvaranja specifičnog površinskog sloja koji predstavlja biološki aktivan supstrat za “sidrenje” i rast novih ćelija kosti i tkiva. Mehanizam vezivanja bioaktivnog stakla na tkivo odvija se kroz 11 reakcijskih koraka. Prvih se pet koraka odnose na hemijske reakcije na površini materijala i uključuju brzu izmenu Na^+ jona s H^+ i H_3O^+ , polikondenzaciju silanola (Si-OH) i stvaranje sloja silikagela na kome dolazi do heterogene nukleacije i kristalizacije biološki aktivnog hidroksikarbonatnog-apatitnog sloja (HCA) [21]. Nastala faza HCA hemijski i strukturno odgovara mineralnoj fazi u kostima i predstavlja

idealnu podlogu za preostale biološke reakcije [20]. Uporedo sa hemijskim reakcijama na HCA sloju dolazi do adsorpcije i desorpcije proteina, faktora rasta i kolagena što aktivira proliferaciju i diferencijaciju ćelija odnosno stvaranje osteoblasta i time podstiče rast kosti na površini stakla [22]. Veliki se naponi ulažu u istraživanja da bi se razumeli hemijski i biološki mehanizmi koji se odvijaju u telu kada se ugradi bioaktivni implantat. Međutim, ti mehanizmi još u potpunosti nisu razjašnjeni. Sredinom 80-tih godina bioaktivni materijali različitog sastava i oblika (granule, prah, vlakna različitih dimenzija) su se počeli intenzivno koristiti u ortopediji i stomatologiji. Danas postoji čitav niz komercijalnih bioaktivnih materijala koji se intenzivno upotrebljavaju u svim oblastima medicine. Sintetička hidroksiapatitna keramika (HAp) upotrebljava se kao porozni materijal, prah ili prevlaka na metalnim protezama kako bi se postiglo bioaktivno učvršćivanje [23]. Prisustvo slabo rastvorljivog sloja HAp na površini inertnog implanta omogućava biološki odgovor tkiva, tzv. osteoprovodnost, na kome kost počinje rast stvarajući čvrstu mehaničku vezu sa implantom [24]. Kompoziti gradjeni od raspršenih HAp čestica u polietilenskoj matrici su se pokazali uspešnima kao implantati kod obnove kosti srednjeg uha [24]. Osim bioaktivnih materijala, drugoj generaciji biomaterijala pripadaju i tzv. resorbilni biomaterijali koji se u telesnoj tečnosti kontrolisano degradiraju i postupno zamenjuju novoformiranim tkivom [25]. Dobar primer tih biomaterijala su polimeri poli(laktid) (PLA) i poli(glikolid) (PGA) koji se u telu hidrolitički potpuno razgrade na CO_2 i H_2O [25]. Polimerne pločice ili zavrtnji se koriste za učvršćivanje slomljenih kostiju [26]. Zanimljivo je naglasiti da je mehanička čvrstoća i elastičnost tih implantata vrlo slična prirodnoj kosti, tako da u početnoj fazi nakon ugradnje, veoma dobro učvršćuju kost [26]. Taj je period dovoljan da kost počne da raste na mestu ugradnje, a polimerni se implantat nakon toga počinje resorbovati do potpune razgradnje [27]. Na taj se način izbegava operacija uklanjanja implanta koja je nužna u slučaju npr. metalnih zavrtnja, pločica ili šipki [14]. Ipak, bioresorbilni polimeri nemaju dovoljnu mehaničku čvrstoću za povezivanje i učvršćivanje kostiju kod složenijih defekata, pa se u tom slučaju koriste kompoziti od staklenih vlakana i polimera, keramike i polimera itd [14]. Većina se navedenih biomaterijala upotrebljava kao implant za učvršćivanje i obnovu kostiju ili zuba [28]. Biomaterijali se koriste i u terapijske svrhe (npr. radioterapijske staklene čestice, itd) [29]. Uspešna klinička primena bioinertnih, bioaktivnih i resorbilnih implantata odgovor je na sve zahtevnije medicinske potrebe. Međutim, vek trajanja implantata je ograničen na 10 do 25 godina [21]. Živo tkivo daje odgovor na promene fiziološkog okruženja ili na biološki

uticaj dok sintetički biomaterijali ne daju pa prema tome, istraživanja biomaterijala treba usmeriti prema biološki orjentisanim metodama za obnovu tkiva odnosno prema biomaterijalima koji su bioaktivni i resorbilni ali i pomažu tkivu da se samoobnovi [1]. Takvi biomaterijali su dizajnirani da podstiču ćelijski odgovor na molekularnom nivou, čime se aktiviraju geni koji pomažu obnovu živog tkiva [3]. Istraživanja tih biomaterijala idu u smeru nove grane biomedicine tzv. tkivnog inženjerstva (eng. tissue engineering) (slika 1.1.3) [30, 31]. Jedan se pravac inženjerstva tkiva odnosi na rast ćelija tkiva na resorbujućoj podlozi izvan tela [31]. Podloga sa tkivom ugrađuje se u telo na bolesno ili oštećeno mesto. Nakon nekog vremena podloga se resorbuje i zamjenjuje živim tkivom koje se prilagođava fiziološkom okruženju [32]. In situ inženjerstvo tkiva uključuje biomaterijale u različitim oblicima, kao prah, mikročestice koje podstiču rast okolnog tkiva, itd [31]. Bioaktivni materijali otpuštaju kontrolisanom brzinom produkte disocijacije ili faktore rasta kao što su morfogeni proteini kosti i na taj način aktiviraju ćelije i promovišu obnovu tkiva [31].



Slika 1.1.3 Inženjerstvo tkiva [30]

Zanimljiv primer biomaterijala su polimeri na čijoj su površini ugrađeni proteini, peptidi i drugi biomolekuli koji oponašaju okolinu izvan ćelije matrice i tako podstiču višefunkcionalnu ćelijsku površinu. Kopolimeri laktida i glikolida se na primer mogu upotrebljavati za ugradnju faktora rasta nerava (eng. nerve growth factor (NGF)) koji se otpuštaju u telu kontrolisanom brzinom i tako pomažu rast nervnog tkiva [33]. Iako je danas za kliničku upotrebu odobreno inženjerstvo tkiva za svega desetak tipova tkiva godišnje se potroše ogromne sume novca za istraživanje i usavršavanje inženjerstva tkiva a takodje su i izuzetno veliki izazovi koje to područje pruža od pomaka otkrića in vitro prema tehnološkom razvoju i proizvodnji. Uspešna proizvodnja tkiva inženjeringom zahteva veliki broj izvora zdravih ćelija, razvoj tehnika za pripremanje biomaterijala s idealnim osobinama za kreiranje

idealnih bioreaktora koji će oponašati fiziološku okolinu u telu [31]. Pretpostavlja se da će u budućnosti najveći doprinos tkivnog inženjeringa biti u dizajniranju in vitro fizioloških modela za istraživanje patogeneze bolesti, kao i u iznalaženju terapije na molekulskom nivou, mada je, možda, još veća važnost u mogućnosti da se biomaterijali mogu upotrebljavati za aktiviranje gena u cilju prevencije i održavanja zdravog tkiva [3].

1.2 Polimerni biomaterijali

Polimeri su veoma raznovrsna klasa materijala i kao takvi su dosta istraživani za različite potrebe u medicini [8]. Glavni uslov za korišćenje polimera u najrazličitije medicinske svrhe je njihova biokompatibilnost, ne izazivanje prekomernog hroničnog zapaljenskog procesa nakon implantacije kao i, za one koji degradiraju, da su produkti degradacije netoksični po organizam [8]. Mogućnost modelovanja fizičkih i hemijskih osobina datog polimernog materijala dovodi do određenih osobina čineći ih posebno atraktivnim za biomedicinske primene [14]. Na svojstva polimera utiče niz faktora kao što su sastav osnovnih i bočnih grupa, struktura lanca (na koju utiče izbor rastvarača koji se koriste u sintezi polimera, dinamika sušenja itd), i molska masa (na koju utiče rekristalizacija monomera, koncentracija inicijatora, nivo vakuma u procesu sušenja polimera itd) [34]. Polimeri mogu pokazivati visokoelastične osobine slične onima kod prirodne kosti [35].

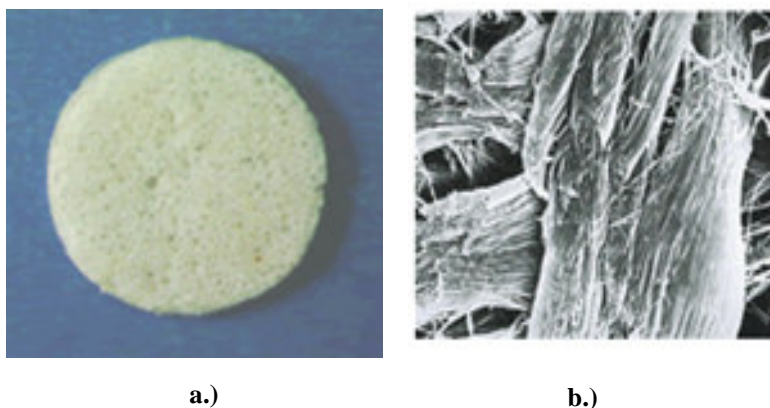
Mnogobrojni polimeri su ispitivani za brojne medicinske primene. Poliakrilati, poli (akrilonitril-ko-vinil hlorid) (PANVC) i polianjon poli(lizin) su ispitivani za ćelijsku inkapsulaciju i imunoizolaciju [14]. Poliortoestri i polikaprolaktoni su istraživani za kontrolisano otpuštanje lekova. Poli(tetra fluoro etileni) (PTFE) se koriste za zamenu vaskularnog tkiva [36]. Poliuretani se koriste kao omotači pejsmejke i dovode do njegove izolovanosti a ispitivani su i za rekonstrukcije meniskusa [37, 38]. Polimeri razmatrani za ortopedske potrebe uključuju polianhidride, koji su takodje korišćeni i kao nosači lekova zahvaljujući njihovoj brznoj i dobro definisanoj površinskoj razgradnji, za koštani rast ili zamenu koštanog tkiva s obzirom da mogu biti fotopolimerizovani *in situ* [8]. Kako bi se poboljšale njihove mehaničke osobine oni mogu biti kopolimerizovani sa imidima [14]. Kod nekih polimera, osobine kao što su brzina degradacije se mogu lako modifikovati menjanjem prirode bočnih grupa, čime se pokazuje da podržavaju adheziju osteoblasta što ih čini kandidatima za regeneraciju skeletnog tkiva [39]. Poli (propilen-ko-fumarat) (PPF) se pojavljuje kao dobar materijal za zamenu koštanog tkiva jer ima dobre mehaničke osobine uporedive sa osobinama trabekularne kosti, poseduje mogućnost da se poprečno vezuje *in vivo* kroz C=C vezu, a takodje je i podložan hidrolitičkoj degradaciji. Takodje je ispitivan i kao materijal za prenos lekova u organizmu [40]. Polikarbonati se koriste kao skafoldi pri zameni koštanog tkiva, a modifikovani sa tirozin amino kiselinama postaju biodegradabilni [40]. Poli (metil-metakrilat) (PMMA) je dosta korišćen na polju ortopedije kao koštani

cement za fiksacije implanata kao i za reparaciju izvesnih fraktura i koštanih defekata na primer osteoporotičnih pršljenova. Međutim, pri polimerizaciji PMMA ostaje značajna količina monomera što takodje uključuje i značajnu količinu toplote koja dovodi do oštećenja tkiva. PMMA nije degradabilan ili bioaktivan, ne vezuje se hemijskim vezama za kost, i može stvoriti ostatke koji dovode do inflamacije [41]. Mnogi nedegradabilni polimeri se koriste u ortopediji. Polimeri velike molekulske mase poli (etileni) (UHMWPE), poli (etilen tereftalat) (PET), poli (propilen) (PP), i poli (tetra fluoro etilen) (PTFE) se koriste za reparaciju ligamenata kolena, izradu facijalnih proteza dok se UHMWPE koristi i za izradu veštačkih zglobova, izradu čašica kuka i kolena [8].

Veoma popularni sintetički polimeri koji se mnogo koriste u medicini su poli (α -hidroksi estri) kao što je poli (laktid) (PLA), poli (glikolid) (PGA) kao i kopolimer poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) [42]. Ovi polimeri su intenzivno proučavani za kliničku upotrebu. Odlikuju se biokompatibilnošću, uglavnom ne dovode do inflamatornog odgovora, a hidrolizom kao i mogućim enzimskim reakcijama degradiraju *in vivo* u produkte koji se odstranjuju iz tela regularnim metaboličkim putevima [43]. Ovi polimeri se ispituju i koriste kao nosači u inženjerstvu tkiva, za kontrolisano otpuštanje lekova ili proteina, izradu membrana, filmova, konaca za ušivanje rana, fiksaciju koštanih fraktura [14]. Praktično, brzina degradacije PLGA se može menjati promenom odnosa dve monomerne komponente što se u ortopediji može iskoristiti kako bi se kreirao materijal čija bi degradacija bila u skladu sa rastom kosti. PLGA, takodje, utiče na povećanje broja osteoblasta kao i njihove migracije, neophodnih za regeneraciju koštanog tkiva [39]. Ipak, mnogi polimeri se zbog svojih slabih mehaničkih osobina ne koriste kao implantati na mestima koja trpe opterećenja i preporučuju se samo u odredjenim situacijama kao što su fiksacije zgloba lakta ili kolena [44].

1.3 Biodegradabilni polimeri

Biodegradabilni polimeri mogu biti prirodni ili veštački (sintetički) (slika 1.3.1) [45,46,47]. U osnovi sintetički polimeri imaju prednost nad prirodnim jer ih je moguće modelovati i dobiti širi opseg određenih, željenih, predvidljivih i ponovljivih osobina. Postoji mnogo razloga zbog kojih je važno da materijal degradira ali jedan od glavnih je postojanje težnje da se napravi implant koji nakon ugradnje ne zahteva još jedan hiruški zahvat radi njegovog uklanjanja [48,49].



Slika 1.3.1. a) Sintetički i b) prirodni polimerni biomaterijal [45]

Biodegradabilni materijali imaju i drugih prednosti. Na primer, kost koja je fiksirana nesavrtljivim otpornim nedegradabilnim implantom ima sklonost ka ponovnom prelomu nakon uklanjanja implanta. Naprezanje tj. pritisak je prenet na implant od npr. nerdjajućeg metala i nakon njegovog uklanjanja kost nije sposobna da izdrži opterećenje tokom procesa zarastanja. Implant od biodegradabilnog polimera se može napraviti tako da se isplanira stepen degradacije tj. razgradnje i time omogući lagan prenos opterećenja na kost. Jedna od takodje vrlo dobrih strana biodegradabilnih polimernih biomaterijala je i ta što se mogu koristiti kao sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova [50,51].

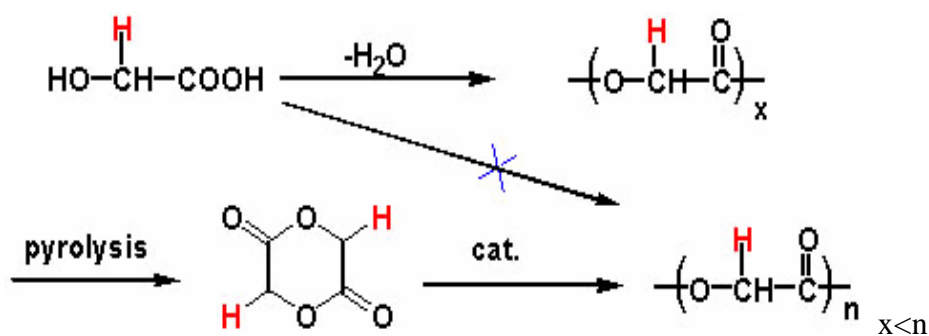
Osnovni kriterijum odabira biodegradabilnog polimera korišćenog u svojstvu biomaterijala su njegove mehaničke osobine, vreme degradacije, aplikativna svojstva, itd. [52]. Idealan polimerni implant je onaj koji ima mehaničke osobine takve da nakon aplikacije ostaje dovoljno jak sve dok okolno tkivo ne zaceli, ne dovodi do zapaljenskih ili toksičnih procesa u organizmu, uključuje se u metabolizam ne ostavljajući tragove u telu, lak je za obradu, ima odgovarajući rok upotrebe i lako se sterilizuje [53]. Faktori koji utiču na mehaničke osobine biodegradabilnog polimera su uslovi sinteze, izbor monomera i inicijatora, prisustvo aditiva. Ovi faktori utiču na hidrofilitnost polimera, kristaliničnost, tačku topljenja i

ostakljivanja, reaktivnost bočnih grupa, itd. [54]. Mnoga istraživanja se bave ispitivanjem uticaja ovih faktora na biodegradaciju polimera.

Biodegradacija je postignuta sintezom polimera koji u osnovi imaju hidrolitički nestabilne veze. Hemijska jedinjenja sa ovakvim karakteristikama su estri, anhidridi, ortoestri i amidi. Najčešće korišćeni biodegradabilni biomaterijali su poliestri koji mogu biti homopolimeri sastavljeni od jedne vrste monomera ili kopolimeri sastavljeni od raznovrsnih monomera npr. od laktida i glikolida [55- 57]. Dosta su prisutni i kopolimeri trimetil karbonata i ϵ -kaprolaktona, kao i poli(dioxana) [58].

1.3.1 Poli (glikolid) (PGA)

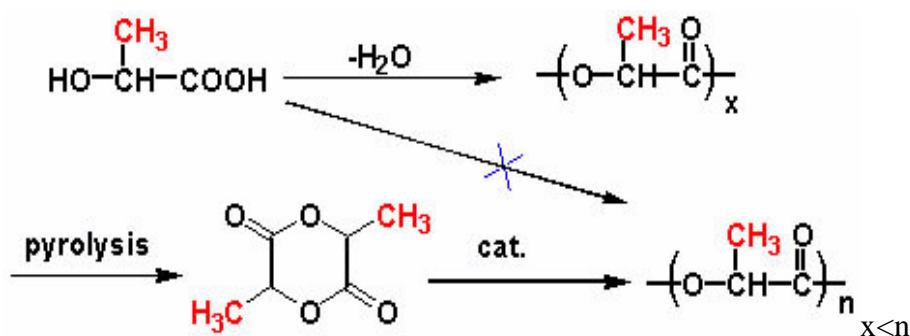
Poli (glikolid) (PGA) je najjednostavniji linearni alifatični poliestar (slika 1.3.2). PGA je prvi korišćeni, sintetički, potpuno resorbilni, konac za ušivanje rana [59]. Monomer glikolida je sintetisan dimerizacijom glikolne kiseline a polimerizacija dovodi do materijala velike molekulske mase sa približno 1—3% neizreagovanog monomernog ostatka. PGA je visoko kristaliničan (45—55%), sa tačkom topljenja na 220—225°C i tačkom ostakljivanja na 35—40°C [59]. Zbog visokog stepena kristaliničnosti nije rastvorljiv u većini organskih rastvarača. Izuzetak je hexafluoroizopropanol. Konci PGA pokazuju veliku čvrstoću i krutost da bi bili upotrebljeni za ušivanje rana ali se ipak mogu iskoristiti kopolimerizovani sa drugim monomerima [59]. Šavovi načinjeni od PGA gube oko 50% čvrstoće nakon dve nedelje i 100% nakon četiri a kompletno se resorbuju u periodu od četiri do šest meseci [60].



Slika 1.3.2 Poli (glikolid)

1.3.2 Poli (DL-laktid) (DLPLA)

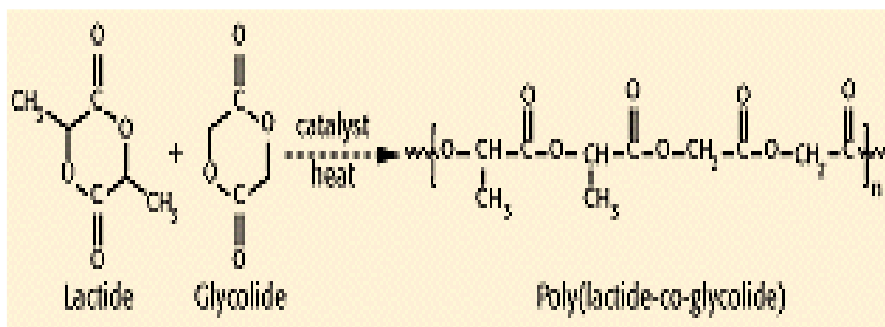
Laktid je ciklični dimer mlečne kiseline i u prirodi postoji u obliku dva optička izomera i to kao d- i l-laktid, dok je dl-laktid sintetički spoj d-laktida i l-laktida. Homopolimer l-laktid je semikristalan i kao takav pokazuje veliku otpornost na savijanje i nisku na istezanje pa je zbog toga podesan za pravljenje proteza u ortopediji, fiksacije kosti itd [61]. **Poli (dl-laktid) (DLPLA)** (slika 1.3.3) je amorfan polimer i ima manju otpornost na savijanje i veću na istezanje kao i kraće vreme degradacije što ga čini atraktivnijim za izradu sistema za kontrolisano otpuštanje lekova [61]. Poli(l-laktid) (LPLA) je oko 37% kristalan, sa tačkom topljenja na 175—178°C i tačkom ostakljivanja na 60—65°C. Za degradaciju i resorbovanje u organizmu LPLA je potrebno oko dve godine što je mnogo sporije nego u slučaju DLPLA [61].



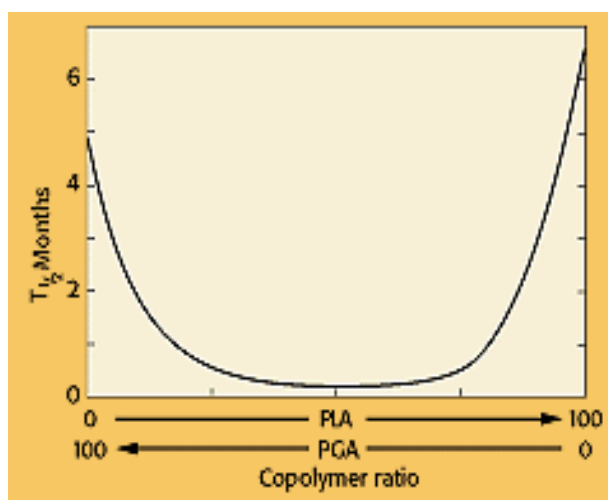
Slika 1.3.3 Poli (laktid)

1.3.3 Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA)

Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) (slika 1.3.4). Kopolimer glikolida sa l-laktidom ili dl-laktidom je razvijen u svrhe izrade sistema za kontrolisano otpuštanje lekova u organizmu ali ima i mnogo drugih primena [62]. Važno je napomenuti da ne postoji linearna zavisnost izmedju sastava kopolimera i njegovih mehaničkih i degradacionih osobina. Na primer, kopolimer sa 50% glikolida i 50% dl-laktida degradira brže nego oba homopolimera (slika 1.3.5) [63]. Kopolimer l-laktida sa 25—75% glikolida je amorfan zbog poremećaja pravilnosti polimernog lanca drugim monomerom [64,65].



Slika 1.3.4 Poli (laktid-ko-glikolid) [65]



Slika 1.3.5 Degradacija PLA i PGA homopolimera i kopolimera implantiranog u tkivo pacova [65]

Kopolimer glikolida sa trimetilen karbonatom (TMC), poliglikonat, se koristi i kao konac za ušivanje rana ali i u vidu zavrtnja i ekserčića za fiksiranje implanata. On se pravi kao A-B-A blok kopolimer u odnosu 2:1 glikolid:TMC, sa glikolid-TMC centralnim blokom (B) i čistim glikolid blokom (A). Ovaj materijal je fleksibilniji nego čisti PGA i resorbuje se u periodu od, približno, sedam meseci [65].

Trenutno su jedino materijali napravljeni od homopolimera i kopolimera glikolida, laktida, ϵ -kaprolaktona, p-dioxanona i trimetilen karbonata dozvoljeni za proizvodnju od strane Food and Drug Administration (FDA) [66]. Međutim, brojni drugi polimeri se koriste u istraživanjima kako bi se dobili odgovarajući biodegradabilni materijali. Biodegradabilni polimeri se primenjuju u medicini i farmaciji ali i u poljoprivredi, industriji, itd..

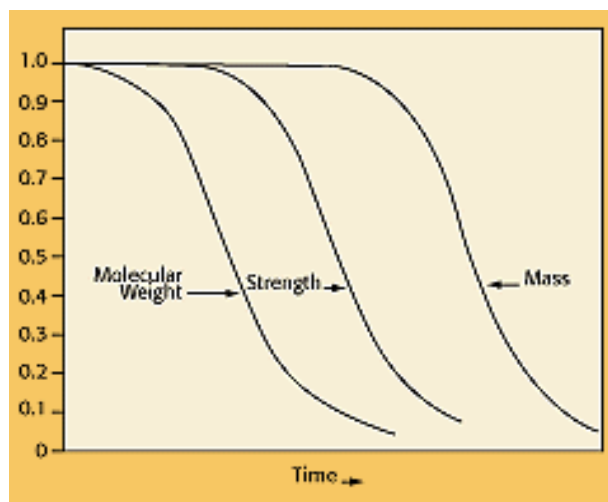
U dostavi lekova u organizmu istraživanja nisu koncentrisana samo na iznalaženje nosača koji neće uticati na lek i njegovu stabilnost već i na stabilnost nakon implantacije jer lek može ostati u implantu i od jednog do šest meseci ili više. Za lekove koji su hidrolitički nestabilni polimer koji absorbuje vodu može biti nepogodan (kontraindikovano) pa se neka istraživanja bave i razvojem hidrofobnih polimera koji se površinski razgrađuju. Dve klase takvih materijala su polianhidridi i poliortoestri [50,51].

Biodegradabilni polimeri koji su hidrolitički nestabilni mogu se razgraditi zbog prisustva vlage u skladištu, tokom obrade ili nakon proizvodnje materijala [67]. Kako bi se minimizovao efekat do koga bi došlo zbog prisustva vlage, polimeri se obično skladište u zamrzivaču. Biodegradabilni polimeri se mogu sterilisati gama zracima [68] ili elektronskim snopom ili mogu biti izloženi gasu etilen oksidu (EtO). Sterilizacija elektronskim snopom iznad 2 Mrd može indukovati značajnu razgradnju polimernog lanca, što dovodi i do smanjenja molekulske mase, a isto tako utiče i na krajnje mehaničke osobine i vreme degradacije polimera [49]. Mora se voditi računa i o temperaturi i vlažnosti pre sterilizacije. Temperatura mora biti niža od tačke ostakljivanja kako ne bi došlo do promene u konfiguraciji polimera tokom sterilizacije.

Faktori koji podstiču degradaciju polimera su hidrofilnost osnovnog lanca polimera, hidrofilnost bočnih grupa, reaktivnije hidrofilne grupe u osnovnom lancu, manja kristaliničnost, veća poroznost, manje dimenzije čestica.

Hidroliza je osnovni način degradacije glikolida, laktida i ϵ -kaprolaktona kao i njihovih kopolimera. Degradacija počinje tako što, najpre, molekuli vode difunduju u materijal (najpre u amorfne zone), pri čemu dolazi do hidrolize i fragmentacije materijala, zatim do intenzivnije hidrolize udružene sa fagocitozom, difuzije i metabolizma. Na hidrolizu utiču veličina, poroznost, hidrofilnost određenog polimernog implanta, kristaliničnost, pH i temperatura okruženja u kome se polimerni materijal nalazi [69]. Uopšteno rečeno, vreme degradacije će biti kraće za polimere manje molekulske mase, hidrofilnije, amorfnije i kopolimere sa većim udelom glikolida. Pod identičnim uslovima, kopolimer manje molekulske mase na primer poli(DL-laktid-ko-glikolid) sa odnosom laktid/ glikolid 50/50 w/w će degradirati relativno brzo u odnosu na homopolimere PLA i PGA velike molekulske mase koji degradiraju mnogo sporije. Kopolimerizacijom, menjanjem bočnih grupa i

molekulskih masa polimera moguće je uticati na brzinu degradacije polimernog implanta (slika 1.3.6) [48,63]. Produkti degradacije polimera se iz organizma odstranjuju regularnim metaboličkim putevima. Mlečna kiselina nastala hidrolitičkom degradacijom PLA biva inkorporirana u proces trikarbonskih kiselina i izlučena iz organizma u obliku ugljen dioksida i vode [70]. PGA je takodje razgradjen enzimskom hidrolizom do glikolne kiseline koja biva uključena u procese metabolizma [62].



Slika 1.3.6 Kriva smanjenja molekulske mase, jačine i mase biodegradabilnog polimera tokom vremena [63]

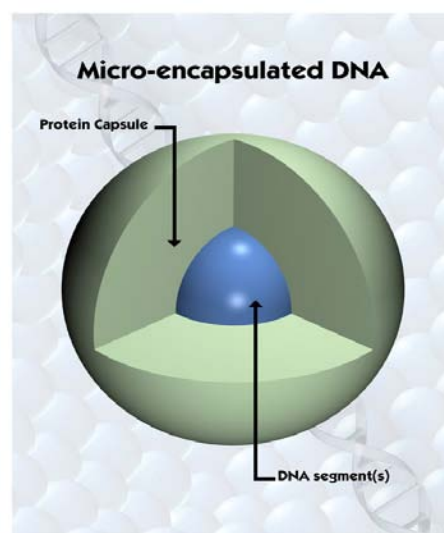
Ispitivanje faktora koji utiču na razgradnju polimera kao što su hemijska stabilnost polimernog lanca, prisustvo katalizatora, aditiva, plasticizera i drugih primesa, struktura materijala, kako bi se dobile odgovarajuće osobine implanta, odnosno, određena, potrebna brzina degradiranja, odgovarajuća dinamika prenosa opterećenja sa implanta na okolno tkivo tokom procesa zarastanja, odgovarajuća dinamika prenosa lekova u organizmu, jedan je od glavnih izazova danas [71].

1.4 Dobijanje čestica poli (DL-laktid-ko-glikolida)

Poli(-DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG), je važan kopolimer jer se, pored ostalog, koristi i za kontrolisano otpuštanje lekova unutar organizma, odnosno ponaša se kao skafold¹ i omogućava inkapsulaciju leka unutar polimerne matrice [33]. Dinamika otpuštanja lekova (brzina i količina) zavisi od morfologije, odnosno strukture kopolimera [41]. Hemijska struktura, molekulska masa, sastav kao i uslovi dobijanja su parametri koji utiču na krajnju morfologiju polimera. Direktna veza između ovih parametara i morfologije je nedovoljno ispitana pa se shodno tome mnoga istraživanja upravo time bave [72-75].

Mikro- i nanočestice PLGA predstavljaju potencijalno sredstvo za prenos nekoliko klasa lekova kao što su antikancerogeni agensi, antihipertenzivni agensi, imunomodulatori, hormoni i makromolekuli kao što je nukleinska kiselina, proteini, peptidi i antitela [76-83].

Metode za dobijanje polimernih čestica se generalno mogu podeliti u zavisnosti od prirode i matrice izabranog materijala na metode disperzijom polimernog rastvora, polimerizacijom monomera i koacervacijom [83-89].

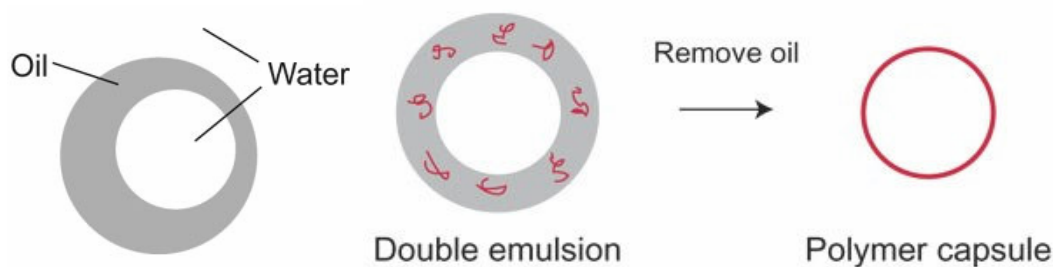


Slika 1.4.1 Polimerna čestica u koju je inkapsulirana DNK [83]

Metoda uparavanja je metoda u kojoj se polimer rastvara u nekom od rastvarača npr. dihlormetanu, hloroformu, etilacetatu itd. a smeša se zatim dodaje u vodeni rastvor da bi se dobila oil-in-water (O/W) emulzija korišćenjem surfaktanta ili emulzifikacionog agensa. Nakon formiranja stabilne emulzije organski rastvarač isparava bilo podizanjem temperature pod redukovanim pritiskom bilo konstantnim mešanjem [90-93].

Spontana emulzacija je modifikovana verzija metode uparavanja u kojoj je u vodi rastvorljiv rastvarač (water-soluble solvent) sa u vodi nerastvorljivim rastvaračem (water insoluble organic solvent) iskorišćen kao uljna faza [94-98].

¹ nosač

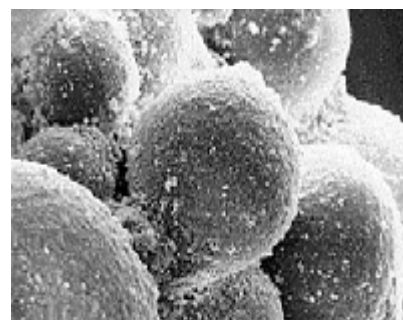


Slika 1.4.2 Spontana emulzacija [97]

Čestice se formiraju zahvaljujući spontanoj difuziji i medjupovršinskoj turbulenciji nastaloj između dve faze. Smanjenje veličine čestica se dobija povećanjem koncentracije u vodi rastvorljivog rastvarača [98-100].

Superkritična fluidna tehnika Konvencionalne metode kao što je metoda uparavanja, koacervacija i polimerizacija često zahtevaju korišćenje toksičnih rastvarača i surfaktanata pa se mnoga istraživanja bave razvojem bezbednijih metoda za inkapsulaciju leka u česticu [101]. Superkritičnom fluidnom tehnikom se mogu dobiti čestice velike čistoće bez tragova organskog rastvarača. Polimer je rastvoren u superkritičnoj tečnosti i smešten u raspršivač. Sa smanjivanjem rastvorne snage superkritične tečnosti rastvorak precipitira. Većina polimera se međjutim malo ili uopšte ne rastvara u superkritičnim fluidima čineći tehniku manje interesantnom. Ona pokazuje dobre rezultate kod polimera manje molekulske mase [101].

Koacervacija ili jonsko struktuiranje je metoda koja se, uglavnom, koristi za dobijanje nanočestica biodegradabilnih hidrofilnih polimera kao npr citozina (CS) [100]. Sistem se sastoji od dve vodene faze, pri čemu je jedna sa polimerom CS, etilen oksidom i propilen oksidom, a druga sa polianjon natrijum tripolifosfatom (TPP).



Slika 1.4.3 SEM fotografija polimernih mikročestica dobijenih koacervacionom tehnikom [100]

Pozitivno naelektrisanu amino grupu u citozinu interaguje sa negativno naelektrisanim TPP i formira čestice sa veličinama od 0.2 do jedan μm a vrednost "zeta" potencijala je između +20 mV i +60 mV. Korišćenjem sličnog pristupa, tj. složene koacervacione tehnike moguće je dobiti nanočestice hidrofilnih polimera kao što je PLGA. Proces spontane fazne separacije se

dešava između molekula različitog naelektrisanja prilikom mešanja kao rezultat elektrostatičkih interakcija [100].

Emulzionim procesom su dobijene PLGA sfere u opsegu od 150-200 μ m [32], 45 μ m [75], 30 μ m [103]. Modifikovanom emulzionom metodom se dimenzije dobijenih čestica smanjuju i iznose do 10 μ m [104]. Daljim modifikacijama procesa sinteze čestica tj. Metodom emulzije i uparavanja dobijaju se čestice sa veličinama na nanometarskoj skali 570-970nm [105], 244-260nm [94, 98, 106].

Dobijanje i karakterizaciju katjonski modifikovanih čestica PLGA određenih dimenzija i oblika takvih da mogu uspešno vezivati DNK su u svom radu ispitivali M. N. V. Ravi Kumar i saradnici [94]. PLGA čestice su dobijene emulziono-difuziono-evaporacionom tehnikom. Veličina i oblik čestica zavise od korišćenog stabilizatora i rastvarača [107]. Katjonski modifikovane čestice mogu vezivati DNK putem elektrostatičkih interakcija. Kao stabilizator čestica je korišćen PVA-citozin jer PVA sam ne može stvoriti potrebno pozitivno naelektrisanje čestica a sam citozin ne može stabilizovati čestice. Rezultati M.N.V. Ravi Kumara i saradnika pokazuju da korišćenjem kao stabilizatora jedinjenja PVA sa citozinom ne samo da se čestice PLGA katjonski modifikuju već i da su one sfernog i unifomnog oblika. Takođe, reproducibilnost tehnike ne zavisi od količine upotrebljenog polimera.

Upoređivanjem dobijanja čestica PLGA dvema metodama su se bavili P. O' Hara i saradnici [108]. Mikrosfere PLGA u koje je inkapsuliran rifampicin (lek za tuberkulozu) su dobijene metodom uparavanja i suvim raspršivanjem. Čestice PLGA sa rifampicinom dobijene tehnikom suvog raspršivanja su nepravilnog oblika za razliku od sfernih čestica dobijenih evaporacionom tehnikom dok je sadžaj leka u česticama PLGA dobijenim evaporacionom tehnikom bio manji nego kod čestica dobijenih suvim raspršivanjem i iznosio je 20% i 30% respektivno.

Ispitivanje čestica PLGA za kontrolisano otpuštanje leka rifampicina (R-PLGA) pri čemu je za dobijanje čestica R-PLGA korišćena metoda uparavanja, su opisali V.V. Sethuraman i saradnici [51]. U eksperimentu je korišćen polimer sa odnosom laktida :glikolida 75:25 a kao rastvarač je upotrebljen metil hlorid. Svrha eksperimenta je bilo da se odredi da li je moguće predvideti dinamiku disperzije čestica sa lekom, unutar organizma, poznavajući određene površinske osobine čestica (specifična površina, površinska energija,

kohezivna energija). Kao nosači R-PLGA su upotrebljeni laktoza i maltodextrin približne veličine 40 μ m. Veličina čestica R-PLGA i samog rifampicina su određivane elektronskom mikroskopijom i iznose 3.02 μ m i 2.83 μ m, respektivno, dok je zapremina čestica dobijena laserskom difrakcijom i iznosi 13 \pm 1 i 2 \pm 1 μ m. Površinska energija je dobijena metodom inverzne gasne hromatografije i iznosi za R-PLGA 35 \pm 1 mJ/m² i za sam rifampicin 19 \pm 6 mJ/m².

Ispitivanje uticaja koncentracije PVA korišćenog kao stabilizatora na veličinu i zeta potencijal² čestica PLGA, dobijenih metodom uparavanja pri čemu je merenje radjeno pre i nakon sušenja zamrzavanjem, su u svom radu opisali J. Vandervoort i saradnici [107]. Čestice manjih dimenzija se dobijaju kod većine polimera kada se koristi PVA kao stabilizator dok izostavljanje PVA dovodi do porasta veličine čestica za oko 1 μ m. Postoje dva izuzetka i to je kada se umesto PVA koriste poloksamer (2-methyloxirane) ili karbopol (prop-2-enoic acid). Takodje je primećeno da su negativne vrednosti zeta potencijala prilikom korišćenja PVA kao stabilizatora znatno niže nego prilikom korišćenja poloksamer-a ili karbopol-a. Jedini stabilizator koji stvara pozitivan zeta potencijal čestica je želatin tipa A.

Dobijanjem sfera biodegradabilnog polimera za kontrolisani transport i otpuštanje terapijskih sredstava, posebno nukleinske kiseline, u organizmu se u svom istraživanju bave S. Hirose i saradnici [109]. Oni su za dobijanje čestica PLGA koristili precipitacionu metodu jer ova metoda dozvoljava inkapsulaciju molekula leka, naročito DNK, bez izlaganja molekula velikim mehaničkim pritiscima ili preteranoj hemijskoj obradi. Najpre je polimer PLGA rastvoren u 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE) u prisustvu kondenzacionog agensa, lipida. Kao precipitator je korišćen etanol a odnos rastvarač:nerastvaraču je iznosio od 1:1 do 1:2.5. DNK je bila u koncentraciji od 0.1 do 1 mg/ml, pri čemu se najbolji rezultati dobijaju sa koncentracijom od 0.68 mg/ml. Nanočestice su dobijene pod uslovom da je odnos pozitivnog naelektrisanja lipida prema negativnom nukleinske kiseline iznosio 1 prema 1000. Dobijene čestice su bile različitih veličina pri čemu je bilo i onih sa veličinama na nanometarskoj skali.

²Zeta potencijal (ζ) je potencijal preko granice faza svih čvrstih tela i tečnosti, naročito, potencijal preko difuznog sloja jona koji okružuju naelektrisanu koloidnu česticu, i koji je velikim delom odgovoran za stabilnost koloida. Takođe se naziva i elektrokinetičkim potencijalom. Vrednost zeta potencijala je izuzetno važna karakteristika čestice i veoma utiče na stabilnost čestice. Teoretski, veliki zeta potencijal teži da stabilizuje suspenziju čestica bilo da je njegova vrednost pozitivna ili negativna.

Površinski modifikovane čestice PLGA citozinom u cilju dobijanja sistema za kontrolisanu dostavu peptida, elkatonina, u organizmu i njihovo dobijanje emulziono rastvarač difuzionom metodom su u svom radu opisali H. Yamamoto i saradnici [110]. Modifikovane čestice PLGA citozinom se sporije eliminišu iz organizma od nemodifikovanih, smanjuju nivo kalcijuma u krvi na 80% od inicijalne vrednosti a takodje i prolongiraju farmakološko dejstvo leka na 24h. U eksperimentu je korišćen PLGA molekulske mase ≈ 20000 a odnos laktida i glikolida je bio 75:25. Piren je korišćen kao fluorescentni marker čestica a polivinilalkohol kao disperzioni agens. Najpre su PLGA i piren rastvoreni u acetonu a zatim je rastvor dodat u 1% PVA i mešan na sobnoj temperaturi. Rezultujuća disperzija je centrifugirana radi odvajanja čestica a zatim je ceo proces ponovljen. Dobijene čestice su tretirane "freeze drying" procesom. Srednja veličina mikročestica PLGA dobijena korišćenjem različitih uslova centrifugiranja je iznosila 12.5 μm , 7.07 μm i 0.66 μm .

Dobijanjem čestica PLGA modifikovanim rastvarač ekstrakciono uparivačkim procesom su se u svojim istraživanjima bavili S.Freitas i saradnici [111]. Polimer PLGA je rastvoren u dihlormetanu a zatim je pomoću specijalno konstruisanog uređaja sa ultrasoničnom ćelijom dispergovan u 0.5 % PVA. Inicijalno formirane nanokapljice PLGA tokom prolaska kroz cev uređaja očvršćavaju da bi definitivno očvrstle u rastvoru PVA. Veličina čestica dobijenih ovom metodom je varirala od 175 do 755nm. Kada se umesto 2% PLGA rastvora koristi 5% rastvor, veličina čestica se povećava, i pri tome one postaju nepravilnijeg oblika a dolazi i do njihove aglomeracije.

Dobijanje biodegradabilnih mikročestica PLGA za kontrolisanu dostavu proteina u organizmu su u svom radu ispitivali A. Coombes i saradnici [112]. Korišćena je metoda koja se sastojala od homogenizacije vodenog rastvora proteina sa rastvorom PLGA u dihlometanu usled čega je oformljena primarna emulzija koja je kasnije dodavana u rastvor sa stabilizatorom.

Nanočestice biodegradabilnog polimera PLGA predstavljaju idealno rešenje za kontrolisanu i ciljanu dostavu lekova u organizmu i to bez sporednih neželjenih pratećih pojava. Veličina čestica igra ključnu ulogu u njihovoj adheziji i interakciji sa ćelijom. S. S. Feng i saradnici su opisali dobijanje čestica PLGA modifikovanom solvent ekstrakciono evaporacionom tehnikom pri čemu su za sakupljanje čestica formiranih u procesu koristili dve

tehnike i to sušenje zamrzavanjem i raspršivanjem [105]. U eksperimentu su, pored PVA, korišćeni i prirodni emulzifikatori (fosfolipidi, holesterol, vitamin E TPGS) kako bi se postigla bolja inkapsulacija i željena kinetika otpuštanja leka. PLGA je najpre rastvoren u dihlormetanu i dodat u vodeni rastvor PVA, ili fosfolipida, ili holesterola, ili TPGS a zatim je rastvor mešan na magnetnoj mešalici. Rastvor je centrifugiran i ispiran destilovanom vodom kako bi se uklonio višak emulzifikatora a potom sušen zamrzavanjem. U drugom slučaju, polimer i aditivi su takodje rastvoreni u dihlormetanu a zatim su nakon mešanja na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi sušeni raspršivanjem. Dobljene vrednosti za veličine čestica PLGA u koje je inkapsuliran lek (paclitaxel) ukazuju da je uticaj prirode i koncentracije emulzifikatora značajan i da se bolji rezultati dobijaju kada se umesto PVA (veličina čestica PLGA sa paclitaxelom iznosi $974\pm 41\text{nm}$) koristi fosfolipid ($571\pm 89\text{nm}$) ili vitamin E ($685\pm 39\text{nm}$).

Uticaj različitih parametara tokom eksperimenta na veličinu PLGA mikrosfera su ispitivali J.B. Oldham i saradnici [113]. Za formiranje PLGA čestica korišćen je dvostruki emulzioni proces. PLGA je rastvoren u dihlormetanu a nakon toga je uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici dodata voda pri čemu se stvara primarna emulzija u kojoj je diskontinualna vodena faza dispergovana unutar kontinualne organske faze. Rastvor je dodat u 0.2% PVA i mešan tokom jednog minuta čime se stvara sekundarna emulzija. Nakon toga je dodat izopropanol i rastvor je mešan sve do isparavanja dihlormetana. Tokom eksperimenta su menjane brzine na magnetnoj mešalici (800 rpm i 1200 rpm) kao i odnos laktida i glikolida u PLGA (50:50; 65:35; 75:25; 85:15;). Utvrđeno je da na veličinu čestica utiče brzina mešanja dok promene u odnosu laktida i glikolida nemaju uticaja. Pri većim brzinama čestice su manje.

Odredjivanje stabilnosti DNK-kalcijum fosfata inkapsuliranog u mikročestice PLGA pod različitim uslovima mikroinkapsulacije kao i odredjivanje fizičko-hemijskih karakteristika PLGA-CaPi-DNK dato je u radu Y. Li i saradnika [114]. Dobri rezultati se dobijaju pri pH rastvora od 6.5 pri kome je količina CaPi-DNK oko 60 % ali već pri pH=8 iznosi 40%. PLGA čestice sa CaPi-DNK su dobijene "water-oil-water" emulziono rastvarač evaporacionom metodom. Rastvorene su u dihlormetanu, mešane na 7500 rpm pa dodate u PVA (1-5%). Korišćeni PLGA je bio sa različitim odnosom laktida i glikolida i to 50:50, 65:35 i 75:25. Sa porastom koncentracije od 0.5 do 4.0% (w/v) PLGA (50:50) čestice pokazuju promenu "zeta"

potencijala od -8.0 do -16mV. PLGA-CaPi-DNK čestice su sfernog oblika i dimenzija od 2.0 do 5.0 μ m.

Sinteza i karakterizacija PLGA mikrosfera za kontrolisanu dostavu hormona rasta opisana je u radu Y. Capan i saradnika [115]. Hormon rasta (rHGH) je najpre rastvoren u 0.1M fosfatnom puferu (PBS) a zatim dodat u poli(akrilo hidroksietil) skrob (acHES). Rastvor PLGA u metil hloridu je dodat u acHES kako bi se formirala disperzija (protein u hidrogelu/polimer u rastvoru). Primarna disperzija je dodata u 6% PVA i mešana na 2500 rpm tokom 1 minuta. Sekundarna suspenzija je dodata u 1l destilovane vode a zatim mešana na sobnoj temperaturi kako bi se uklonio organski rastvarač a čestice očvrsle. Mikročestice su filtrirane a zatim sušene zamrzavanjem. Hormon rasta (rHGH) je uspešno inkorporiran u PLGA mikrosfere a uspešnost inkorporiranja raste sa porastom koncentracije PLGA u disperzionoj fazi i PVA u kontinualnoj fazi. Srednja veličina čestica PLGA-acHES je iznosila oko 44.6 μ m.

Mikročestice biodegradabilnog polimera PLGA radi kontrolisanog prenosa cyclosporina A u organizmu sintetizovali su A. Sanchez i saradnici [116]. Za dobijanje mikročestica su koristili metodu uparavanja a dobijene čestice su bile različitih dimenzija od 2 do 30 μ m.

Uticaj različitih rastvarača na veličinu čestica PLGA dobijenih dijalizacionom metodom bez prisustva surfaktanta su ispitali Y-II. Jeong i saradnici [117-119]. Kao rastvarači su korišćeni dimetil acetamid (DMAc), dimetil formamid (DMF), dimetil sulfoksid (DMSO) i aceton. Dobijene čestice su bile sličnih dimenzija prilikom korišćenja DMAc, DMF i DMSO kao rastvarača i iznosile su oko 400nm dok su prilikom korišćenja acetona bile od 500 do 1000nm . Povećanje veličine čestica se objašnjava različitom rastvorljivošću polimera u rastvaraču, viskoznošću između polimera i rastvarača, mešljivošću rastvarača i vode, itd.

Procenu uticaja nekoliko kombinacija organskih rastvarača i surfaktanata korišćenih prilikom sinteze čestica PLGA dali su D. T. Birnbaum i saradnici [120]. Najmanje čestice se dobijaju korišćenjem kombinacije natrijum dodecil sulfata kao surfaktanta i etil acetata kao rastvarača a najveće korišćenjem poli(vinil alkohola) i dihlormetana (466nm). Najoptimalniji

rezultati se dobijaju korišćenjem acetona ili etil acetata kao rastvarača i poli(vinil alkohola) ili albumina kao surfaktanta.

U svojim istraživanjima M.J.Tsung i saradnici su ispitivali mikročestice PLGA za kontrolisano otpuštanje deksametazona udruženog sa fibronektinom (lek za kardiovaskularne bolesti, artritis...) [121]. U eksperimentu su optimizovani uslovi sinteze i karakterisane, želatinom tipa B, površinski modifikovane čestice PLGA. Sinteza je radjena o/w emulziono rastvarač evaporacionom metodom. Vodena faza je sadržala 1% PVA a uljna različite koncentracije hloroforma i metanola. Deksametazon je inkorporiran u PLGA u organskoj fazi a zatim su dobijene mikrosfere dispergovane u želatin. Površinski modifikovane PLGA mikrosfere su dobijene adsorpcionom metodom (želatin se vezuje jonski za negativno naelektrisanu površinu PLGA), konjugacijom (konjugacija karboksilnih grupa PLGA i amino grupa želatina) i korišćenjem raspršivača (spray coating). Veličina dobijenih mikrosfera je bila od 0.5 do 500 μm .

Površinski modifikovane PLGA mikrosfere i uticaj poli(L-lizin)-g-poli(etilenglikola) (PLL-g-PEG) na površinu čestica PLGA su u prvom delu eksperimenta ispitivali i potvrdili M. Muller i saradnici [122]. U drugom delu je pokazano značajno smanjenje adsorpcije proteina od strane ovako modifikovanih mikrosfera.

Dobijanje čestica PLGA modifikovanom spontano emulzionom rastvarač difuzionom metodom (SESD) su u svom radu opisali H. Murakami i saradnici [98]. U eksperimentu su korišćeni etanol i aceton i PVA sa niskim stepenom hidrolize. Dilataciono-kondenzacioni proces je ponovljen najmanje tri puta kako bi se odstranio preostali PVA i rastvarač. Nakon disperzije rastvora PLGA radjena je ultrafiltracija a zatim sušenje zamrzavanjem. Veličina čestica PLGA je bila oko 300nm.

Mogućnost inkapsuliranja indometacina i 5-fluorouracila (5-FU) u čestice PLGA dobijene modifikovanom spontano emulzaciono rastvarač difuzionom metodom su ispitali T. Niwa i saradnici [123]. Primetno smanjenje medjufaznog pritiska izmedju organske i vodene faze i spontano mešanje uslovljeno difundovanjem acetona iz organske u vodenu fazu rezultuje formiranjem mikrosfera PLGA (srednji dijametar 400-600nm).

Dobijanje čestica PLGA metodom superkritične tečne ekstrakcije su ispitali U. B. Kompella i saradnici [101]. Male promene u temperaturi i pritisku u kritičnom regionu indukuju dramatične promene u gustini i rastvorljivosti superkritičnih fluida.

Svrha istraživanja H. Seong i saradnika je bila razvijanje metode za dobijanje polimernog materijala, PLGA za prenos 1,3-bis(2-hloroetil)-l-nitrouree (BCNU) [124]. BCNU je inkorporiran u PLGA metodom suvog raspršivanja. Dobijene mikročestice su bile sfernog oblika a direktnom kompresionom metodom su dobijeni blokovi polimera ravnih i glatkih površina.

Termalne osobine mikrosfera PLGA dobijenih w/o/w emulzacionom metodom kao i mikrosfera PLGA u koje je inkapsuliran cyclosporin A, su u svom istraživanju proučavali N. Passerini i saradnici [125]. Karakterizacija je radjena MTDSC (modulated temp. differential scanning calorimetry) metodom i za mikročestice PLGA je uočen pik ostakljivanja na 43°C. Takođe su koristili metodu MTDSC kako bi ispitali uticaj preostale vode u mikrosferama PLGA, nakon njihovog sušenja zamrzavanjem, na tačku ostakljivanja [126]. Mikrosfere su sadržale veoma malo rastvarača dihlormetana ali je sadržaj vode iznosio oko 3 % i bio je viši za kopolimer PLGA koji ima veći udeo glikolida. Podaci ukazuju da mikročestice pripremljene standardnim metodama mogu sadržati značajan nivo vode koja može dovesti do sniženja tačke ostakljivanja čestica PLGA.

Za potrebe ispitivanja bioadhezivne interakcije između polimernih mikrosfera za kontrolisano otpuštanje lekova i živog tkiva B. Hertzog i saradnici su razvili metodu koja uključuje pretvarač elektromagnetne snage (Electromagnetic Force Transducer EMFT) [127]. EMFT je podešen tako da adhezivna sila između mikrosfera i živog tkiva odgovara struji elektromagneta. Različite tehnike dobijanja mikrosfera (metoda uparavanja, modifikovana metoda uparavanja...) su upotrebljene kako bi se dobile fero- i feromagnetne mikrosfere. Prah gvoždje oksida se može inkorporirati u polimer PLGA

Dobijanje mikrosfera PLGA w/o/w duplom emulzionom tehnikom, pri čemu je ispitivana i mogućnost korišćenja PharmASep tehnologije Vibro-Filter sušilice za sterilno odvajanje mikročestica ($\approx 25 \mu\text{m}$) iz rastvora i njihovo sušenje, je opisano u radu Y.W. Jo i saradnika [128].

Mogućnost kontrolisanja otpuštanja inkapsuliranog proteina iz mikročestica polimera PLGA korišćenjem različitih stabilizatora prilikom sinteze mikročestica PLGA ispitali su A. G. A. Coombes i saradnici [129]. Kao stabilizatori su upotrebljeni poli (vinil alkohol) (PVA) i poli (vinil pirolidin) (PVP). Korišćenjem PVP-a kao stabilizatora čestica postiže se bolja inkapsulacija odnosno veći procenat proteina unutar mikrosfera PLGA.

Metodu za dobijanje poroznih biodegradabilnih skafolda PLGA metodom mešanja u vodi rastvornih čestica soli i rastvora polimera su u svom radu opisali C. J. Liao i saradnici [130]. PLGA i natrijum hlorid su pomešani i stavljeni u specijalan kalup u kome zahvaljujući razlici u pritiscima prolazi tečnost. Organski rastvarač je sipan u kalup kako bi rastvorio PLGA i spojio sa natrijum hloridom. Nerastvarač je dodat kako bi očvrsnuo i precipitirao kompozit PLGA i soli. Rastvarač je uklonjen vakum uparavanjem a čestice soli su rastvorene vodom kako bi se uklonile i ostavile poroznu strukturu. Veličina pora se može kontrolisati količinom kao i veličinom čestica soli.

Upoređivanje dveju metoda za dobijanje skafolda PLGA veličine od 10 do 200 μ m su u svojim istraživanjima radili G. Vozzi i saradnici [131]. Oni su primenili tehniku mikrošprica pod konstantnim pritiskom od 10-300mmHg i "soft lithographic" tehniku u kojoj se koristi kalup od poli (dimetilsiloksana). Obe tehnike omogućavaju izgradjivanje trodimenzionalne strukture koja dozvoljava ispitivanje ćelijskog ponašanja u okruženju sličnom onom u *in vivo* uslovima.

Svrha istraživanja S. De i saradnika je bila ipitivanje uticaja temperature i vremena skladištenja mikrosfera PLGA na fizičku stabilnost i morfologiju PLGA [81]. Mikročestice PLGA su dobijene emulzacionom metodom a zatim su skladištene tokom šest dana pri temperaturama od 4°C, 25°C, 37°C i 50°C. Veličina najmanjih čestica je iznosila 266.9nm a najvećih 1865.9nm. Stepem aglomeracije opada sa povećanjem veličine čestica i raste sa povećanjem temperature skladištenja. Najveći stepen aglomeracije je uočen kod najmanjih čestica. Takodje je pokazano da bi PLGA čestice trebalo skladištiti na temperaturi od 4°C kako bi se izbeglo njihovo aglomerisanje.

1.5 Dobijanje kompozitnih materijala na bazi kalcijum fosfata i poli (laktid-ko-glikolida)

Kompozitni materijali se sastoje iz dve ili više konstitutivnih faza i imaju bolja svojstva od materijala komponenata [9]. Kompozitni materijali na bazi bifaznog kalcijum fosfata (BCP) i polimera poli(laktida) (PLLA) kao i kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) se koriste za zamenu i rekonstrukciju koštanog tkiva [132-135]. Nakon implementacije u koštani defekt polimerna komponenta se bioresorbuje ustupajući mesto novoformiranom tkivu [136]. Do sada su u brojnim eksperimentima za dobijanje kompozitnog materijala na bazi keramike i kopolimera poli(laktid-ko-glikolida) korišćeni različiti pristupi [137-139]. Dva osnovna načina sinteze HAp-a u sebi sadrže vlažne metode (precipitacija, hidrotermalna obrada i hidroliza kalcijum fosfata) i reakcije u čvrstom stanju [140,141]. Sinteza kompozita je rađena bilo tako što je čvrsta komponenta hidroksiapatita (HAp) dodavana u rastvor DLPLG u nekom od rastvarača (dioksan, hloroform), ili je prah HAp mešan sa prahom DLPLG ili je rastvor DLPLG infiltriran u rastvoreni apatit. Do sada nije rađena sinteza na taj način da se prah DLPLG homogenizuje sa gelom BCP-a.

Mikrostrukturalne i mehaničke osobine kompozitnih jedinjenja na bazi kalcijum deficijntnog hidroksiapatita (CDHAp) i poli (laktid-ko-glikolida) su u svom radu opisali C. Durucan i saradnici [142]. Kompozit je formiran hidrolizom α -trikalcijum fosfata (α -TCP) do CDHAp i presovanjem do α -TCP-PLGA-NaCl. Razlike u hidrolizi kompozita α -TCP-PLGA-NaCl 80/10/10 wt % i α -TCP-PLGA-NaCl 60/20/20wt % su praćene izotermalnom kalorimetrijom i X-ray difrakcijom. Mikrostrukturalni razvoj i razlike dobijenog krajnjeg kompozita posle hidrolize na 37 °C, 45°C, i 56°C su ispitivane skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Korišćeni biodegradabilni polimer PLGA je imao odnos laktida i glikolida 85/15. TCP je pripremljen "solid state" reakcijom na 1150°C, tokom 1h sa reagensom CaCO₃. Prosečna veličina čestica TCP-a je iznosila 3,3 μ m. NaCl je filtriran kroz filter sa prosečnom veličinom pore 70 μ m. Prekompozitna smeša je pravljena tako što je prah TCP + NaCl dodat u rasvor PLGA u hloroformu. Konstituenti su dodati u rastvor polimera da bi se dobio TCP-PLGA-NaCl sa odnosom 80/10/10wt i 60/20/20wt. Smeša je mehanički mešana da bi hloroform ispario, a posle sušenja u vakumu agregati TCP-PLGA-NaCl su samleveni u prah korišćenjem tučka i avana. Prekompozitna smeša je presovan u cilindričnom kalupu na pritisku od 17 MPa i na temperaturi od 70° \pm 10°C tokom 0,5h i tako su dobijeni kompakti

oblika novčića. Od prekompozitne smeše su takođe napravljene i pravougaone pločice za ispitivanje otpornosti prema savijanju. Presovani uzorci su skladišteni u bočice napunjene istom masom destilovane vode koje su zatvorene i ostavljene u vodenom kupatilu zbog prelaza TCP→HAp. Hidroliza je izvedena na 37°C, 45°C, i 56°C tokom 24h i duže.

Toplim i hladnim presovanjem N. Ignjatović i saradnici sintetisali su 3D blokove kompozitnog biomaterijala BCP/DLPLG [143]. Od istog materijala načinjene su sferične granule kojima je izvršena rekonstrukcija infrakoštanih džepova vilica pacijenata. Dobijeni rezultati ukazali su na potpunu uspešnost primene i završetak reparacije defekata nakon 12 meseci (slika 1.5.1)



1.5.1 X-ray snimak rekonstruisanog infrakoštanog defekta nakon 12 meseci [143]

Određivanje biokompatibilnosti kompozita sastavljenog od kalcijum fosfatnog cementa (CPC) i poli(laktid-ko-glikolida) (PLGA) mikrosfera (prečnika od 0,18 do 0,36 μm) korišćenjem tehnike ćelijske kulture su radili C. G Simon i saradnici [144]. PLGA mikrosfere iz kompozita CPC-PLGA inicijalno stabilizuju kalem a kasnije se degradiraju ostavljajući makropore za stvaranje osteoblasta. CPC matriks tada može da se resorbuje i zameni sa novom kosti. Osteblasti kao ćelije (MC3T3-E1 ćelije) su prosejani na površinu kalema i ispitivani fluorescentnom mikroskopijom, SEM-om, Wst-1 analizom (enzimskom analizom za mitohondrijalnu dehidrogenazu). Ćelije su održale morfološke osobine i sposobnost deobe bilo na kompozitnom kalemu (CPC-PLGA) bilo na kontrolnom kalemu (CPC) čime je pokazano da je kompozit od CPC i PLGA mikrosfera biokompatibilan.

Kompozite PLGA i kalcijum dihidrogenfosfata (CDHP), kalcijum hidrogenfosfata (CHP), kalcijum fosfata (CP) ili kalcijum karbonata (CC), kako bi ispitao uticaj kiselosti ili baznosti ovih jedinjenja na degradaciju poli(DL-laktid-ko glikolida) je istraživao M. Ara sa saradnicima [145]. Degradacioni proces PLGA je kompleksan i zavisi od mnogo faktora kao što su hemijska struktura jedinjenja, molska masa, uslovi dobijanja, morfološke karakteristike, itd. Kompozit je pravljen tako što je prah neorganske komponente dodat u desetoprocentni rastvor PLGA u dioksanu. Rastvor je razliven u teflonski aluminijumski sud i zamrznut odmah nakon razlivanja. Uzorci su zamrznuti i sušeni da bi se odvojili od rastvarača. Porozni kompozitni film je konsolidovan na 60°C sa 50 kg/cm² da bi se dobio film debljine 0,5mm.

Pripremljeno je pet tipova filmova i to: čist PLGA (100%wt); i PLGA(70%wt) sa (30%wt) CDHP ili CHP ili CP ili CC. Filmovi su ostavljeni u fosfatnom puferu (PBS) (pH 7,4) na 37°C. Uzorci su uzimani nakon jedne, dve, tri, četiri, 6 i 8 nedelja i vršena su merenja absorpcije vode, gubitka mase, promene debljine i molske mase. Uzorci su se međusobno razlikovali a naročito se razlikovao kompozit PLGA-CC od ostala četiri. Degradacija PLGA opada sa porastom baznosti kalcijumovog jedinjenja. CC je najviše usporavao degradaciju PLGA a CDHP najmanje ali i CDHP osetno utiče na njeno usporavanje. M. Ara i saradnici su zaključili da degradacija PLGA varira u zavisnosti od spoja sa neorganskim jedinjenjem različite baznosti.

Visoko porozan HAp/PLGA kompozit, korišćenjem tehnike čvrsto-tečno fazne separacije, napravili su R. Zhang i saradnici i pri tom su i ispitivali biodegradabilne osobine kompozitnog materijala [146]. Odlične osteokonduktivne osobine materijala su pokazane putem eksperimenata ćelijskog zasejavanja i inženjerstva tkiva. U eksperimentu su korišćeni PLGA (85/15w/w), dioksan i hidroksiapatit. Čvrsto-tečno fazna separacije polimer/HAp/rastvor smeše je vršena na unapred određenoj temperaturi a odvojene faze smeše su stavljene u "freeze-drying" sudove da bi se odstranio rastvarač sublimacijom. Morfološke osobine pene kontrolisane su koncentracijom polimera, sadržajem HAp-a, temperaturom odvajanja faza i upotrebom rastvarača. U eksperimentima je korišćeno najmanje 30 uzoraka pene dimenzija 16mm x 5mm (prečnik x debljina). Uzorci su podeljeni u šest setova u zavisnosti od inkubacionog vremena. Svaki uzorak je meren i zatim potapan u pufer (PBS) (pH 7.2 na 37°C). Dva puta nedeljno je meren pH. Kompresivne mehaničke osobine pene su ispitivane na MTS Synergie 200 (MTS Systems Co., Eden Prairie, MN). Kompresivni modul je definisan kao inicijalni linearni modul. Uzorak koji sadrži kompozitnu penu ima niži pH na početku inkubacije nego čist PLGA, dok je na kraju inkubacije on viši što se može pripisati uticaju pufera na HAp. U kasnijem periodu inkubacije nema značajnih razlika u gubitku mase kod kompozitne pene i čistog PLGA ali je u početku ona veća kod kompozita. Porozna struktura kod kompozitne pene dovodi do olakšane difuzije nisko molekulskih frakcija što dovodi do gubitka mase u ranom periodu inkubacije. Smanjenje težine kod PLGA (85/15w/w) pene je znatno veće nego kod PLGA/HAp kompozita za isto inkubaciono vreme. Kompresioni moduli kod PLGA/HAp opadaju tokom inkubacije a kod čiste PLGA pene rastu.

Poroznost kompozita sa opadanjem koncentracije polimera i sadržaja HAp-a su u svom radu ispitivali R. Zhang i saradnici [147]. Dobijena pena je bila sa poroznošću i do 95% dok je veličina pora iznosila od nekoliko mikrona do nekoliko stotina mikrona. Pokazano je da kompozitna pena ima znatno poboljšane mehaničke osobine u odnosu na čistu polimernu penu.

Pravljenjem kompozitnih materijala od biodegradabilnog poli(DL-laktid-ko-glikolida) i hidroksiapatita su se, takođe, bavili T. Ushida i saradnici [148]. Najpre su napravljene porozne granule HAp-a od kalcijum fosfata u tečnom azotu a zatim je radjeno sušenje zamrzavanjem i sinterovanje. Ispitivanja HAp-a SEM-om su pokazala da su granule porozne i skoro sferičnih oblika. PLGA-HAp hibridni sunder je pripremljen ekstrakcionom metodom. PLGA polimer je održao integritet hibridnog sundera. Poroznost hibrida zavisi od poroznosti HAp granula ali i porast koncentracije NaCl dovodi do povećanja poroznosti.

Diferencijaciju i promenu broja ćelija osteoblasta u *in vivo* uslovima na površini granula HAp i kompozita HAp/ PLGA su u svojim istraživanjima ispitali H. Elgandy i saradnici [149]. Sam HAp indukuje stvaranje manjeg broja osteoblasta nego HAp/ PLGA pa je broj ćelija veći na površini kompozita HAp/PLGA nego na površini HAp ali manji nego na površini PLGA. Aktivnost alkalne fosfataze je jedan od odlučujućih faktora od kojih zavisi diferencijacija osteoblasta i ekspresija gena. Aktivnost alkalne fosfataze je veća na površini HAp/PLGA kompozita nego samog PLGA.

Kompozitni materijal HAp/PLGA kod koga se HAp komponenta nalazi u obliku vlakana su sintetisali L. Lu i A. Mikos [150]. Kratka vlakna HAp prosečne dužine 45 μ m i prečnika 15 μ m pomešana su sa PLGA i želatinom a zatim je smeša podvrgnuta vakuum uparavanju i nakon toga, presovana. Dobijeni krajni proizvod je vrlo porozan pa se može koristiti u inženjerstvu tkiva i kao nosač različitim ćelijskim kulturama. Kompresiona čvrstoća ovog materijala je iznosila od 1-3,0MPa što je nisko u odnosu na kompresionu čvrstoću prirodnih kostiju pa se ova vrsta kompozita ne može uspešno primeniti u reparaciji tvrdog koštanog tkiva. Veličina pora se može formirati dodatkom soli ili želatina i ona se nalazi u intervalu 300-500 μ m. NaCl se nakon "solvent casting" postupka ekstrahuje iz sistema, a na njegovom mestu ostaju pore. U zavisnosti od masenog odnosa komponenti, polimera (PLGA) i keramike (HAp), kopozitni materijal poseduje različite vrednosti kompresione čvrstoće i

njena najviša vrednost je ovde dobijena za udeo PLGA od 30% i HAp od 35 % a ostalo je želatin ili NaCl od koga se stvara poroznost sistema.

Dobijanje kompozitnog biomaterijala sastavljenog od porogena (želatina ili soli) i kratkih vlakana HAp smeštenih u matricu PLGA su u svojim istraživanjima opisali R. C. Thomson i saradnici [151]. Nakon što se porogen ekstrahuje, kompozitna pena ima pore čija su veličina i morfologija definisane porogernom. Menjanjem frakcije ekstrahovane komponente dobijena je kompozitna pena sa kontrolisanom poroznošću od $0,47 \pm 0,02 \mu\text{m}$ do $0,85 \pm 0,01 \mu\text{m}$. Iznad polimer/vlakno odnosa od 7/6, kratka hidroksiapatitna vlakna pojačavaju nisko poroznu PLGA penu. Pena sa kompresivnom čvrstoćom iznad $2,82 \pm 0,63 \text{ MPa}$ i poroznošću od $0,47 \pm 0,02 \mu\text{m}$ je dobijena korišćenjem polimer/vlakno odnosa 7/6. Nasuprot tome, visoko porozna kompozitna pena (iznad $0,81 \pm 0,02 \mu\text{m}$), pogodna za ćelijsko zasejavanje, nije pojačana sa povećanjem udela HAp vlakana. Dakle moguće je dobiti visoko poroznu penu sa minimalnom kompresivnom čvrstoćom ili nisko poroznu penu sa povećanom osteokonduktivnošću i kompresivnom čvrstoćom. Eksperiment je radjen tako što je polimer rastvoren u metilen hloridu a zatim su u rastvor dodata i kratka vlakna hidroksiapatita i jedan od dva porogena, ili želatin ili NaCl. HAp je korišćen u 0, 10, 20, 30 i 40 % odnosu sa želatinom i od 0 do 18,5% sa NaCl. Želatin je korišćen od 35 do 45% (0,245-0,315 g) a so od 60, 70, 80 i 90%. Odnos je baziran na ukupnoj masi polimera, HAp i porogena. Rastvor je stavljen u petri sud i ostavljen da ispari tokom 24 h. Preostali rastvarač je uklonjen vakuum uparavanjem za još 24 h. Dobijeni kompozitni diskovi (2mm debljina i 60mm prečnik) su isečeni u kaiševe prosečne širine 4 mm koji su zatim stavljeni u cilindrični teflonski kalup ($h=30\text{mm}$, $d=6\text{mm}$) i presovani na 80° tokom 45min sa kompresivnom silom od 1GPa. Cilindrični kompozit je stavljen u destilovanu vodu 28h tokom kog perioda je voda menjana na svakih 6h. Ekstracioni proces je rađen na temperaturi od 37°C u slučaju želatina i 25°C u slučaju NaCl. Na kraju je vršeno vakuum sušenje.

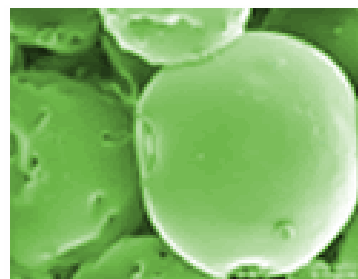
Na važnost poroznosti kompozita i mogućnost projektovanja ukupne poroznosti kompozita HAp/PLGA, uz ostvarenu relativno uniformnu raspodelu komponenata, su u svojim istraživanjima ukazali C. Laurencin i saradnici [152]. Za sintezu su korišćene čestice HAp veličina od $74\text{-}104 \mu\text{m}$ i PLGA molske mase 50000g/mol . Kompozit je formiran sinterovanjem smeše HAp, PLGA, NaCl. Nakon sinteze blokova NaCl je uklonjen a na njegovom mestu ostale su pore. Dobijene su dve vrste blokova i to sa poroznošću od 33% i

22%, a veličina dijametra pora nalazi se u intervalu od 50-450 μ m. Dobijeni modul elastičnosti je iznosio 1,5GPa što je dosta niže od modula elastičnosti prirodnih kostiju.

Kompozit kalcijum fosfatnog cementa sa PLGA za prenos rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) su napravili P. Quinten Ruhe i saradnici [153]. RhBMP-2 je obeležen 125 I i inkorporiran u PLGA/HAp. PLGA/HAp je napravljen u odnosu 30/70w/w.

Kompozit oseina (biološkog, prirodnog hidroksiapatita) i polimera poli(kaprolaktona) (PCL), poli(L-laktida) (PLLA) i poli(laktid-ko-glikolida) (PLGA) su istraživali I. Calandrelli i saradnici [154]. Korišćene granule oseina su bile sferične i dimenzija manjih od 1 μ m do više od 70 μ m. Polimer u obliku praha je mešan sa oseinom oko 10 min u ekstruderu na temperaturi od 100°C za PCL i 190°C za PLLA i PLGA. Smeša je hlađena azotom. Osobine kompozita napravljenog od biodegradabilnih poliestara i HAp zavise od veličine čestica.

Istraživanjem kompozita sastavljenog od biokompatibilnog kopolimera (PLGA, PCL) i hidroksiapatita, pri čemu su korišćena tri različita načina pripremanja polimernih skafolda i to: livenjem, hladnim presovanjem i toplim presovanjem, su se bavili K. G. Marra i saradnici [155].



Slika 1.5.2 PLGA mikročestice korišćene za pripremanje skafolda [155]

Napravljeni su diskovi sa poroznošću od 40-90% i kontrolisanom debljinom od 0,6 do 40mm. Spojevi PLGA i PCL, sa i bez HAp, su poređeni sa homopolimerom. Polimer je rastvoren u hloroformu (CHCl) na sobnoj temperaturi a zatim su NaCl (veličina čestice 150-250 μ m) i hidroksiapatit (veličina čestice 10 μ m) dodati u rastvor. Nakon isparavanja hloroforma, skafoldi su mereni i potopljeni u destilovanu vodu a zatim sušeni i masa im je zabeležena. Dobijeni polimerni skafoldi, korišćenjem "solvent-casting" tehnike, su bili debljine od tri do šest milimetara. Skafoldi su isečeni u diskove a oni su zatim presovani pod pritiskom od 42-70MPa korišćenjem Carvel hidraulične prese, Model 100.

Generalna procedura pripremanja kompozita hladnim presovanjem uključuje uzimanje polimernih skafolda, pripremljenih korišćenjem solvent-casting tehnike, sa prethodnom ekstrakcijom NaCl, isečenih u diskove određenog dijametra i njihovo presovanje pomoću hidraulične prese. Procedura toplog presovanja se sastoji u tome da se hladno presovani polimerni skafold ostavi u peći na određenoj temperaturi a zatim se ugrijani kalup koji sadrži polimerni skafold presuje hidrauličnom presom.

Jedinstven, heterogeni, osteohondrijalni skafold pomoću "TheriForm™ three-dimensional printing process", uz korišćenje NaCl su u svom istraživanju razvili J. K. Sherwood i saradnici [156]. Prah polimera PLGA je mleven u ultra-centrifugalnom mlinu sa tečnim azotom a zatim vakum sušen i sečen. Trikalcijum fosfat (TCP) i polimer su mešani u kugličnom mlinu.

Sintezu igličastog apatita na titanijumskoj ploči hidrotermalnom elektrohemijomskom metodom su u svom istraživanju opisali T. Watanabe i saradnici [157]. Rastvor PLGA u dihlormetanu je infiltriran u rastvoreni apatit i sušen na vazduhu. Nakon očvršćavanja filma kompozitna membrana je pripremljena delaminacijom sa titanijumske ploče.

Ispitivanjem biokompatibilnosti kompozitnog koštanog kalema sastavljenog od kalcijum fosfatnog cementa (CPC) i poli(laktid-ko-glikolida) (PLGA) mikrosfera primenom tehnike ćelijske kulture bavili su se C. G. Simon i saradnici [144]. Prah CPC je pomešan sa PLGA i vodom kako bi se dobila pasta koja je zatim očvršćavana u matricu koja sadrži čestice PLGA.

Biokompozitni materijal bifazni kalcijum fosfat/poli(DL-laktid-ko-glikolid) sa i bez biostimulativnog sredstva (plazma bogata proteinima, fibrin) u formi pogodnoj za rekonstrukciju koštanih defekata su sintetizovali N. Ignjatović i saradnici [158]. Reparacija koštanog tkiva oštećenog osteoporozom je ispitivana *in vivo* na pacovima. Bifazni kalcijum fosfat/poli(DL-laktid-ko-glikolid) je dobijen precipitacionom metodom sa rastvarač/nerastvarač sistemom pri čemu su srednje veličine dobijenih granula kompozitnog materijala iznosile od 150 do 200µm. Histološka analiza je potvrdila oporavak alveolarne kosti, oštećene osteoporozom, korišćenjem kompozitnog biomaterijala. Dodavanjem

biostimulativnog sredstva intenzitet osteogeneze se dodatno povećava udružen sa formiranjem nove koštane strukture.

2 Cilj istraživanja

Poslednjih godina, npr. genska terapija kao metoda za pobeđivanje bolesti je dobila dosta na publicitetu ali se, do sada, u kliničkoj praksi nije pokazala naročito uspešnom. Jedan od glavnih razloga je u nedostatku odgovarajućeg sistema za transport nukleinske kiseline unutar ćelije. Kopolimer poli(DL-laktid-ko-glikolid) se koristi za izradu sistema za kontrolisanu dostavu kako nukleinske kiseline tako i drugih makromolekula, lekova itd. i zbog svojih specifičnih karakteristika je dosta istraživan pri čemu je njegova sinteza radjena na najrazličitije načine sa više ili manje uspeha. Polimerne čestice dozvoljavaju inkapsulaciju leka unutar polimerne matrice a za kontrolisano i ravnomerno otpuštanje leka unutar organizma osnovni je zahtev idealna sferičnost čestica kao i uska raspodela njihovih veličina. Kompozitni materijali na bazi bifaznog kalcijum fosfata (BCP-a) i kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG-a) se koriste za zamenu i rekonstrukciju koštanog tkiva a od morfoloških i strukturnih osobina kompozita zavisi u velikoj meri uspeh implementacije biomaterijala u organizam.

Cilj istraživanja se sastojao iz tri dela i to su:

- dobijanje čestica praha poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) što pravilnijih sfernih oblika, sa veličinama na submikronskoj skali i velike uniformnosti i to na nov jednostavan način, hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent chemical method) i tehnikom centrifugalnog procesiranja.
- dobijanje kompozitnog materijala, novim pristupom sintezi (homogenizacijom praha DLPLG-a sa gelom bifaznog kalcijum fosfata (BCP), odgovarajućih morfoloških i strukturnih karakteristika koje bi ga potencijalno činile adekvatnijim za implementaciju u organizam i primenu u određenim granama rekonstruktivne medicine.
- ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina praha DLPLG-a i kompozita BCP/DLPLG-a metodama infracrvene spektroskopije, rendgenostrukturne analize, skenirajuće elektronske mikroskopije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i stereološke analize.

3 Eksperimentalni deo

3.1 Eksperimentalni rad

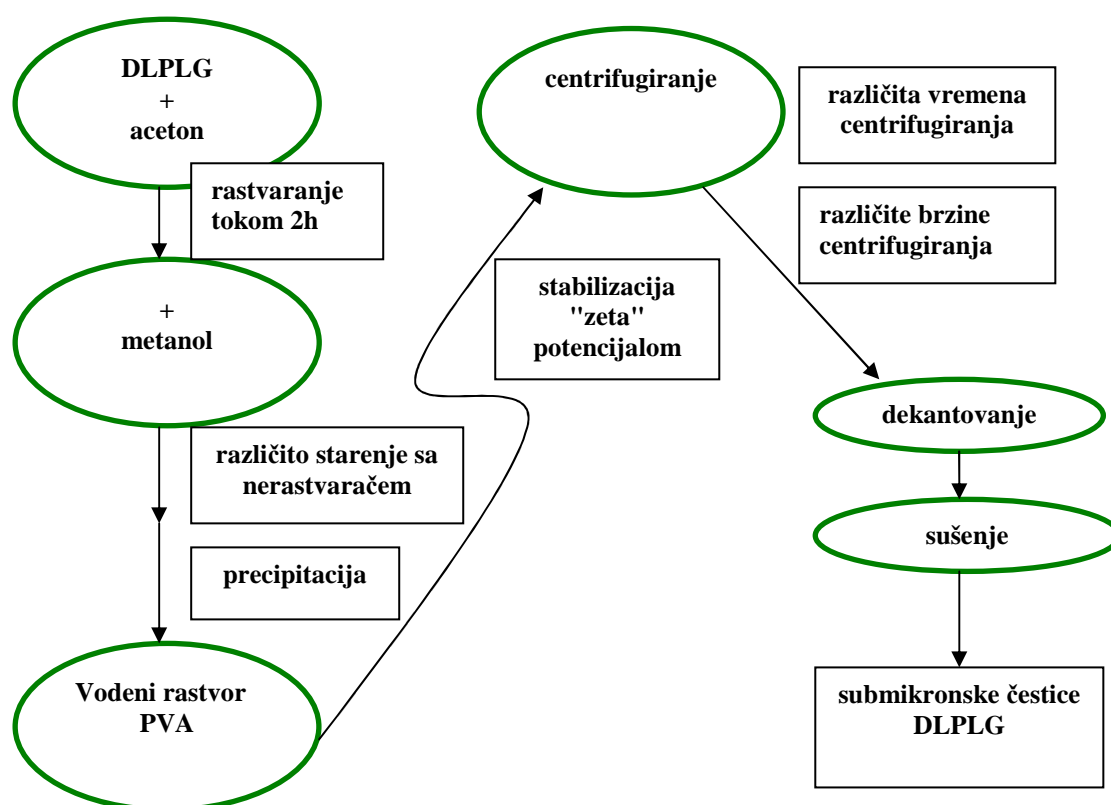
3.1.1 Dobijanje praha poli (DL- laktid-ko-glikolida) (DLPLG)

Prah kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) je dobijen hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent method) od komercijalnih granula (DLPLG, laktid:glikolid 50:50, Durect, Lactel, Adsorbable Polymers International) [159]. Molska masa korišćenog polimera je iznosila 40000-50000g/mol. Vreme potpune resorpcije ovog polimera u organizmu je od 4 do 8 nedelja. Granule (0,05g) su rastvarane u acetonu (1,5 ml) u seriji epruveta i ostavljene da stoje tokom dva sata na sobnoj temperaturi. Precipitacija DLPLG je rađena dodavanjem nerastvarača u višku, alkohola metanola (2ml), čime se rastvor bojio beličasto. Napravljene su serije rastvora kod kojih se vreme starenja sa nerastvaračem progresivno menjalo i ono je u prve tri serije iznosilo 10, 30 i 90 minuta, u četvrtoj i petoj seriji je iznosilo pet minuta dok je u šestoj i sedmoj seriji bilo dva minuta (tabela 3.1.1, slika 3.1.1). Ovako dobijeni rastvori polimera su vrlo lagano ukapavani u 0,02% rastvor polivinilalkohola (PVA) uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici brzinom od 1200 obr/min. Korišćeni PVA je bio sa 98% stepenom hidrolize. PVA se koristi kao stabilizator koji stvara negativno naelektrisanje čestica DLPLG tj stvara određeni zeta potencijal [107]. PVA stvaranjem određenog zeta potencijala dovodi do smanjenja stepena aglomeracije jer se istoimeno naelektrisane čestice međusobno ne privlače. Koncentracija PVA je optimizovana kako bi se dobile najmanje dimenzije čestica za ovu metodu kao i da bi njihova aglomeracija bila svedena na minimum [94].

Rastvori su nakon toga centrifugirani (CENTRIKA, Ependorf) i dekantovani. Brzine i vremena centrifugalnog procesiranja su se u eksperimentu, takođe, razlikovali i u prvoj seriji su iznosili 15 min na 1500 rpm, u drugoj 30 min na 3000 rpm, dok su u trećoj i četvrtoj seriji iznosili 60 min na brzini od 4000 rpm, u petoj seriji 120 min na 4000 rpm, u šestoj 60 min na 10000 rpm i sedmoj 60 min na 20000 rpm.

Tabela 3.1.1 Eksperimentalni uslovi za dobijanje praha DLPLG

Prah DLPLG (serija)	Vreme starenja sa nerastvaračem (min)	Vreme centrifugalnog procesiranja (min)	Brzina centrifugalnog procesiranja (rpm)
1	10	15	1500
2	30	30	3000
3	90	60	4000
4	5	60	4000
5	5	120	4000
6	2	60	10000
7	2	60	20000

**Slika 3.1.1 Šema dobijanja submikronskih čestica kopolimera DLPLG**

3.1.2 Sinteza kompozita poli(DL-laktid-ko-glikolid)/bifazni kalcijum fosfat

U eksperimentu je prvo sintetizovan bifazni kalcijum fosfat (BCP). Sinteza je rađena precipitacionom tehnikom od kalcijum nitrata i amonijum fosfata u alkalnoj sredini prema reakciji [158] :



Rastvori su zagrevani a zatim filtrirani u čaše određene zapremine kroz filter papir. Vodeni rastvor kalcijum nitrata (rastvor A=78 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 300 cm³ H₂O + 50,5 cm³ 25 % NH₄OH + 250 cm³ H₂O) je energično mešan na magnetnoj mešalici brzinom od 1200 obr/min dok mu je ukapavan vodeni rastvor amonijum fosfata (rastvor B=14 cm³ 85% H₃PO₄ + 236 cm³ H₂O + 330 cm³ NH₄OH + 220 cm³ H₂O) a nakon završenog ukapavanja je zagrevan do ključanja. Rastvor je ostavljen da stoji a izdvojeni talog je nakon odležavanja filtriran kroz Bihnerov levak uz slab vakum. Ovako dobijeni BCP je dalje korišćen u eksperimentu.

Prah polimera DLPLG-a je homogenizovan mešanjem sa gelom BCP-a u odnosu DLPLG/BCP 35/65 w/w kao i u odnosu 90/10 w/w, 95/5 w/w i 98/2w/w. Prilikom dodavanja praha kopolimera DLPLG-a u gel BCP-a vođeno je računa o procentu suve materije u gelu BCP-a i on iznosi približno 15% [160].

3.2 Eksperimentalne metode

3.2.1 Metoda centrifugalnog procesiranja

Centrifugalno procesiranje je metoda kojom se vrši razdvajanje i analiza ćelija, organela i bioloških makromolekula. Čestica koja se kreće u krugu poluprečnika r ugaonom brzinom ω pod uticajem je centrifugalnog polja $\omega^2 r$. Centrifugalna sila F_c , koja deluje na ovu česticu jednaka je umnošku efektivne mase čestice m i centrifugalnog polja: $F_c = m \omega^2 r = m(1 - k\rho) \omega^2 r$. Efektivna masa je manja od stvarne mase jer istisnuta tečnost stvara suprotnu silu. Faktor uzgona jednak je $(1 - k\rho)$ gde je k parcijalni volumen čestice a ρ gustina tečnosti u kojoj se čestica nalazi. Čestica se u polju kreće konstantnom brzinom v , koja je proporcionalna centrifugalnoj sili, pri čemu je f koeficijent trenja čestice: $v = F_c / f$. Brzina taloženja tj. brzina sedimentacije čestice zavisi od nekoliko faktora: a) mase čestice-teže čestice se uvek talože brže nego one lakše, istog oblika i gustine b) oblika čestice-koeficijent trenja kompaktne čestice je manji nego onaj u slučaju izdužene čestice iste mase. Izdužene čestice se talože mnogo sporije od onih sferičnih iste mase. c) gustine čestice-gušće čestice se kreću mnogo brže od onih manje gustine d) gustine rastvora u kojoj se čestica nalazi- čestica tone kada je $k\rho < 1$, pluta kada je $k\rho > 1$ i ne pomera se kada je $k\rho = 1$.

Analiziranje dobijenih uzoraka je radjeno metodama infracrvene spektroskopije (IR), rendgenostrukturne analize (XRD), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) a radjena su i stereološka ispitivanja.

3.2.2 Infracrvena spektroskopija

Infracrveni (IR) spektri sadrže informacije o vibracijama atoma u molekulu [161,162]. Svaki molekul poseduje sebi svojstven spektar u IR oblasti pa se primenom IR spektrometrije može izvršiti identifikacija jedinjenja (deo od 4000 do 600 cm^{-1} naziva se oblast otisaka prstiju za hemijska jedinjenja) [161]. Može se izvršiti i kvantitativna i kvalitativna analiza. Vibracioni spektri sadrže podatke o strukturi molekula (kristala), globalnoj geometriji i detalje o načinu vezivanja atoma u molekulu. Na osnovu vibracionih spektara mogu se dobiti podaci o mehanizmu odvijanja procesa, faznim transformacijama, dinamici protona i protonskih vrsta u različitim materijalima, termodinamičkim veličinama itd [161]. Analiziranje uzoraka radjeno je infracrvenom spektroskopijom pomoću uređjaja Perkin-Elmer 983G Infracrvenog

Spektrofotometra, korišćenjem KBr tehnike (fino sprášeni KBr i fino sprášeni uzorak), u intervalu od 250-4000 cm^{-1} .

3.2.3 Rendgenostrukturalna analiza

Rendgenostrukturnom analizom karakterisan je sastav bifaznog kalcijum fosfata BCP-a kao i kompozita BCP/DLPLG-A sa različitim udelima keramike i polimera i to u odnosu 65/35 w/w, 10/90 w/w, 5/95 w/w i 2/98 w/w. Uzorci su izloženi rendgenskim zracima koji se detektuju nakon interakcije sa fazom uzorka. Dobijeni impulsi se pojačavaju, a posle prolaska kroz analizator i filter beleže [161]. Dijagrami prikazuju intenzitet u zavisnosti od ugla (2θ), a vrednosti za međjuravska rastojanja se mogu izračunati iz Braggove jednačine ($n\lambda=2d\sin\theta$) [161]. Uzorci su ispitivani metodom praha [163, 164]. U uzorcima su prisutne faze analizirane rendgenografski Philips 1050 difraktometrom korišćenjem $\text{Cu-K}\alpha_{1,2}$ zračenja. Analiziranje je vršeno u oblasti 2θ od 9° do 67° , sa korakom 0.05° i vremenom ekspozicije od 6 s po koraku.

3.2.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop služi za dobijanje uvećane slike objekta difrakcijom visoko energetskih elektrona, a istovremeno to je metoda ispitivanja topografije površina čvrstih, neisparljivih materijala, direktnim posmatranjem ili proučavanjem fotografski snimljenih objekata [161]. Uzorci za SEM moraju biti neisparljivi, da bi se unutar mikroskopa mogao održati visoki vakum, zatim obavezno je da uzorci budu elektroprovodni. Neprovodni uzorci sa upadnim snopom elektrona statički elektrišu, zbog čega elektronski snop "beži" sa mesta koje se posmatra, što onemogućuje posmatranje [161]. Za karakterizaciju uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom korišćen je elektronski mikroskop marke JEOL-JSM-646OLV Japan, sa energijom elektrona od 10 do 50 KeV-a. Uzorci su najpre pripremljeni naparavanjem zlatom pomoću uređaja za naparavanje 3ΔL-TEC SCD005, strujom od 30mA sa udaljenosti od 50mm tokom 180s.

3.2.5 Stereološka analiza

Veličina čestica i njihova morfologija su ispitivane metodom merenja površina korišćenjem poluautomatskog analizatora slike (semi-automatic image analyzer Videoplan, Kontron), povezanog sa skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Merena je površina projekcije preseka čestice po maksimalnom prečniku. Sa SEM fotografija su analizirane

čestice i to od 200 do 300 čestica po fotografiji a zatim su određivani parametri koji karakterišu veličinu (poprečni presek-Aa, obim-Lp, maksimalni dijametar čestice-Dmax i feret x i feret y) i oblik čestica (perimetar form factor-fL). Za sve merene parametre određene su minimalna, maksimalna i srednja vrednost. [165,166]

3.2.6 Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija

Diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom (DSC) se na osnovu razlike toplotnog fluksa ka uzorku i ka etalonu prilikom njihovog istovremenog zagrevanja ispituju termijske osobine supstanci [161]. Metoda DSC je odgovarajuća za kvantitativna određivanja promene entalpije [167]. Kada u uzorku počne proces praćen promenom entalpije pojavljuje se temperaturska razlika između uzorka i etalona koja izaziva pojavu EMS između dva izvoda od hromela [161]. Zaostajanje temperature uzorka u odnosu na etalon (zbog endoternog procesa) pojačava fluks toplote ka uzorku, a prednjačenje (zbog egzoternog procesa) ga smanjuje [161]. Temperaturska razlika između uzorka i etalona prikazuje se jedinicama toplotnog fluksa dQ/dT u funkciji temperature [161]. Promene toplotnog kapaciteta u toku zagrevanja odražavaju se otklonom od bazne linije, a egzotermni i endotermni procesi kao pikovi na odgovarajuću stranu od bazne linije. Površina pika DSC krive direktno je srazmerna odgovarajućoj promeni entalpije [161]. DSC merenja izvršena su na Perkin Elmer Model DSC-2 diferencijalnom skanirajućem kalorimetru opremljenom sa sistemom za dobijanje podataka. Toplotni kapacitet je meren u mcal/s (koje su kasnije pretvorene u J/s ($1\text{mcal}=0,0041398\text{ J}$)), a temperatura je merena u K. Opseg temperature u kome je vršeno merenje je iznosio od 320K do 540K. Brzina grejanja je iznosila 20 K/min.

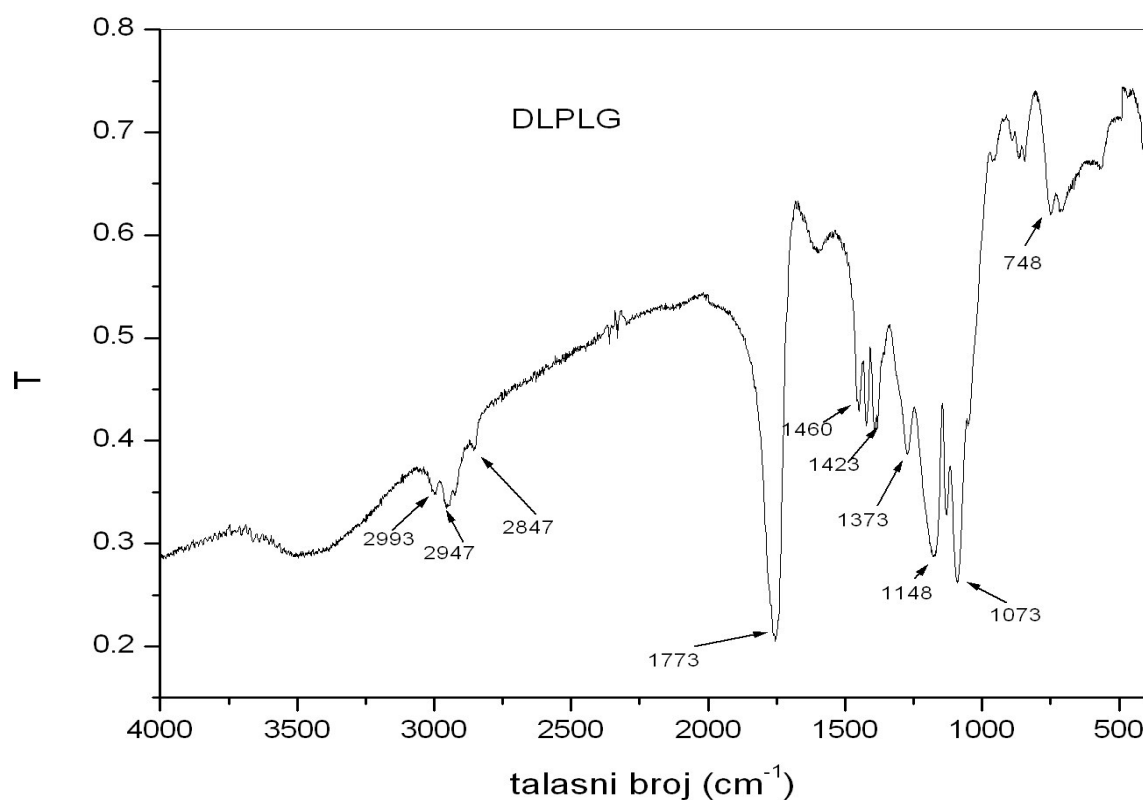
4 Rezultati i diskusija

4.1 Rezultati

4.1.1 Rezultati infracrvene spektroskopije

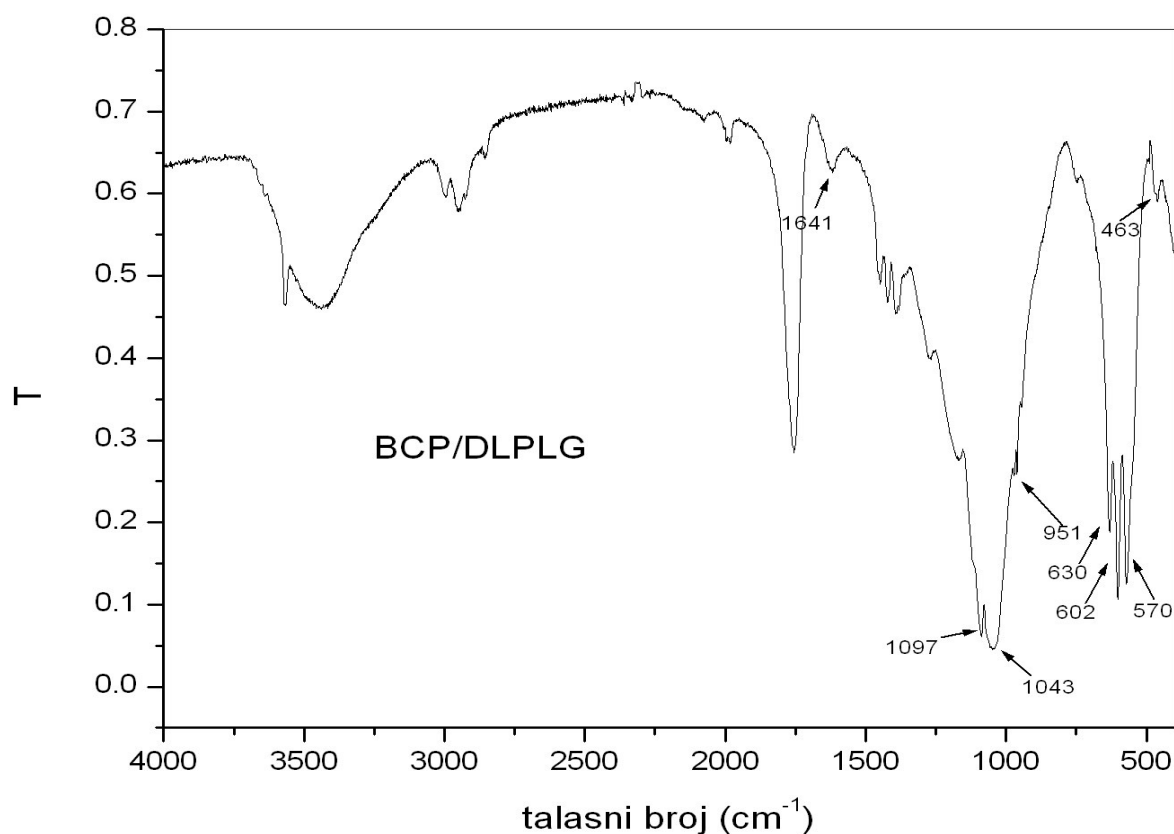
Metodom infracrvene spektroskopije (IR) analizirani su uzorci kopolimera DLPLG kao i kompozita BCP/DLPLG.

IR spektar na slici 4.1.1. sadrži sve karakteristične grupe za kopolimer poli(DL-laktid-ko-glikolid). Na IR spektru se mogu uočiti pikovi na talasnim brojevima 2993 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 2847 cm^{-1} (koji pripadaju CH vezi), 1773 cm^{-1} (C=O), 1460 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} (CH_3), 1148 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} (C-O), 748 cm^{-1} (CH) dok široki pik na $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ odgovara OH^- grupi molekula vode [69].



Slika 4.1.1 IR spektar praha kopolimera DLPLG

Pikovi submikronskih čestica praha DLPLG karakterisanih IR spektroskopijom a dobijenih na način koji je već opisan u tekstu odgovaraju karakterističnim pikovima za DLPLG [69].



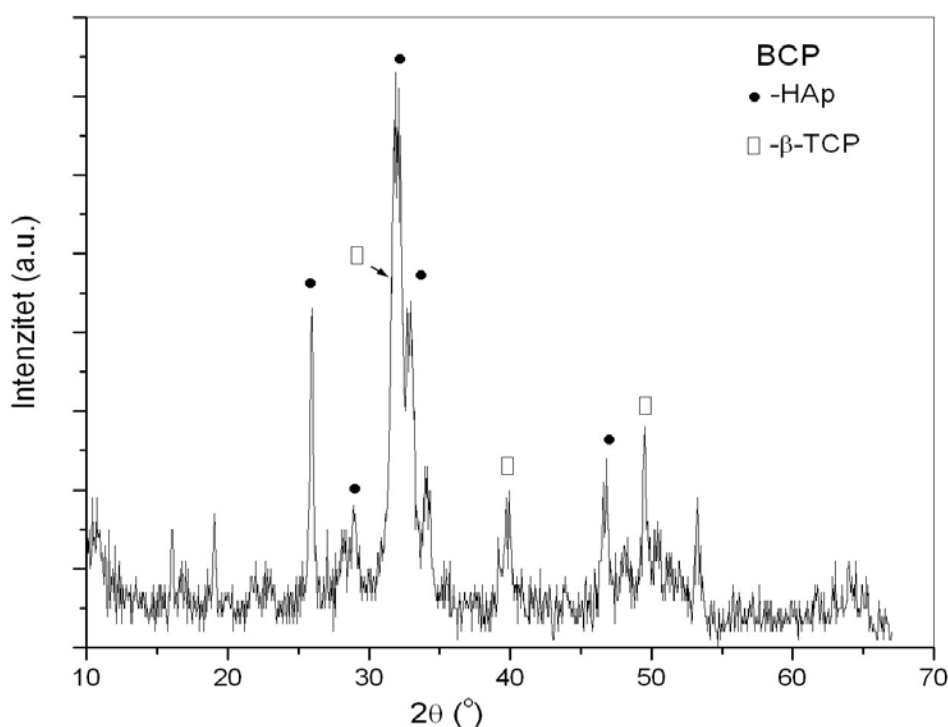
Slika 4.1.2 IR spektar kompozita BCP/DLPLG 65/35 w/w

Na slici 4.1.2 je prikazan IR spektar sintetisanog kompozita BCP/DLPLG. Pored pikova koji odgovaraju kopolimeru DLPLG na spektru se mogu uočiti pikovi koji se mogu pripisati fosfatnoj grupi u bifaznom kalcijum fosfatu a takodje se jasno vide i pikovi koji odgovaraju hidroksilnoj grupi. Dublet traka sa maksimumima na talasnim brojevima 1097 cm^{-1} i 1043 cm^{-1} , kao i na 602 cm^{-1} i 570 cm^{-1} , pripadaju ν_4 i ν_3 asimetričnim istežućim vibracijama fosfatne grupe. Simetrične istežuće vibracije ν_1 i ν_2 PO_4^{3-} jona su takodje nadjene na talasnim brojevima 951 cm^{-1} i 463 cm^{-1} . Pikovi koji odgovaraju vibracijama OH^- grupe su detektovani na talasnim brojevima 630 cm^{-1} i 1614 cm^{-1} , dok široki pik na $3400\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ pripada OH^- grupi molekula vode.

IR spektar sintetisanog kompozita BCP/DLPLG sadrži trake koje su karakteristične za jedinjenja BCP-a [168-170].

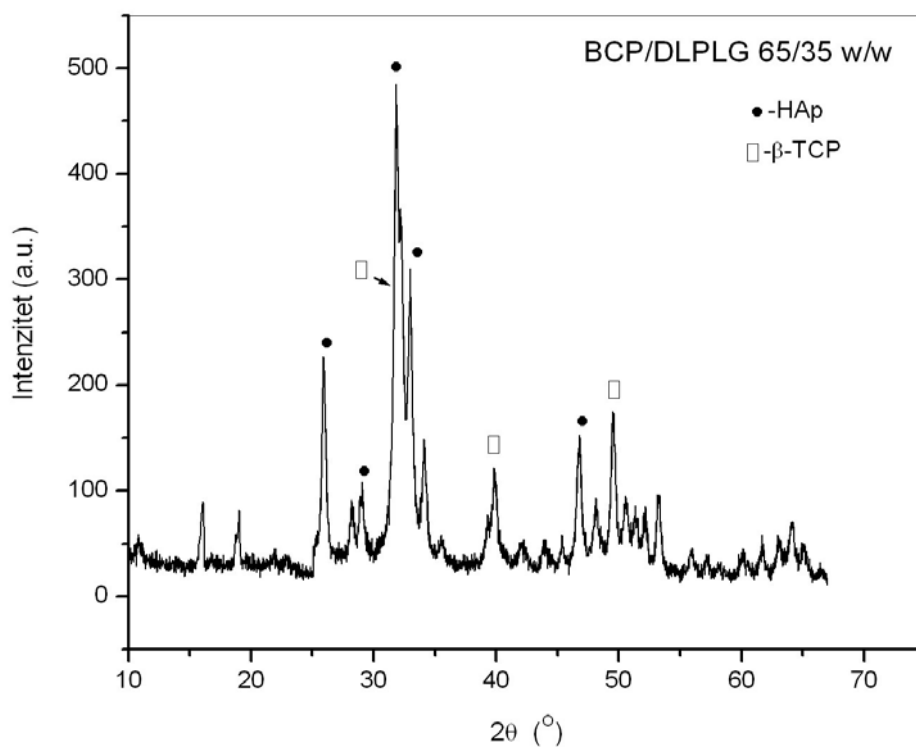
4.1.2 Rezultati rendgenostrukturne analize

Rendgenostrukturnom analizom karakterisan je sastav bifaznog kalcijum fosfata (BCP) (slika 4.1.3) kao i kompozita bifaznog kalcijum fosfata i kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) i to sa odnosom BCP/DLPLG 65/35 w/w, 10/90 w/w, 5/95 w/w, 2/98 w/w i dobijeni difraktogrami su prikazani na slikama 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, respektivno.

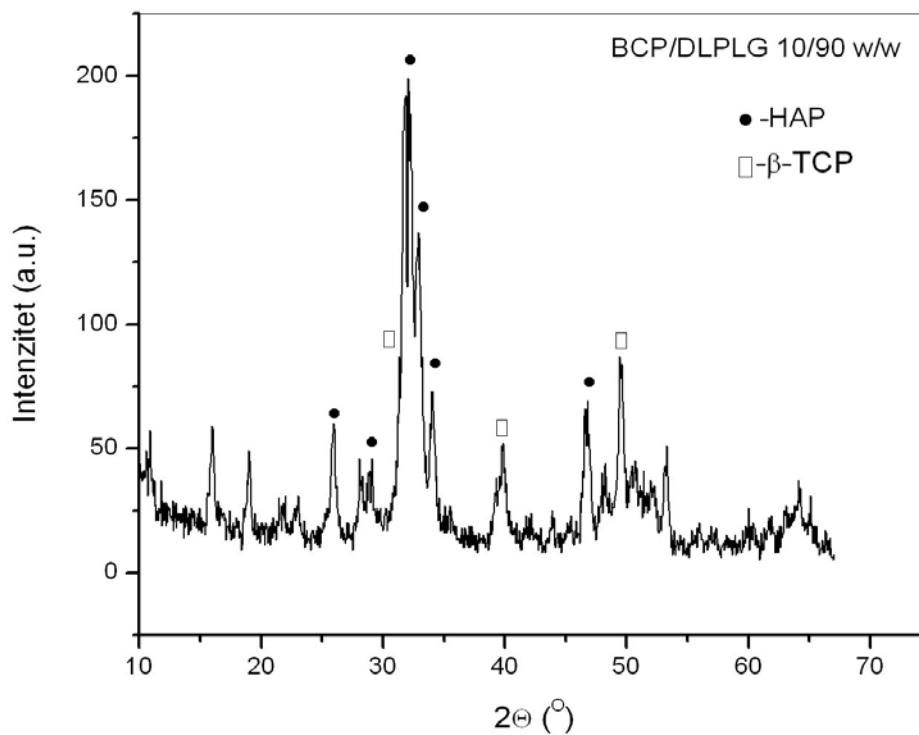


Slika 4.1.3 Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP

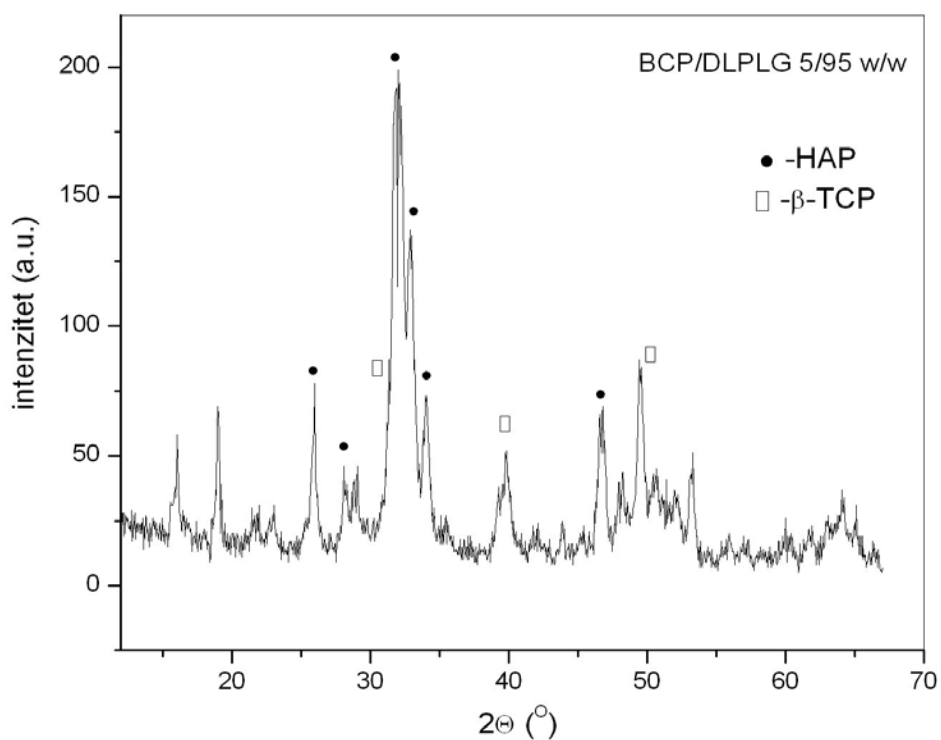
Na osnovu analize pozicije pikova [171-173] iz difraktograma se može zaključiti da je keramička komponenta bifazni kalcijum fosfat (BCP) sastavljena od kalcijum hidroksiapatita (HAp) kao i od tri-kalcijum fosfata (β -TCP). Najintenzivniji pik na difraktogramu odgovara HAp i to je pik $2\theta=31,8^\circ$ dok je za β -TCP najintenzivniji pik $2\theta=31^\circ$. Odnos HAp i β -TCP u BCP je racunat na osnovu u literaturi dobro opisane metodologije [174-177]. U ovom slucaju odnos HAp je bio 80% a β -TCP 20%. Odnos Ca/P je 1.63 ± 0.02



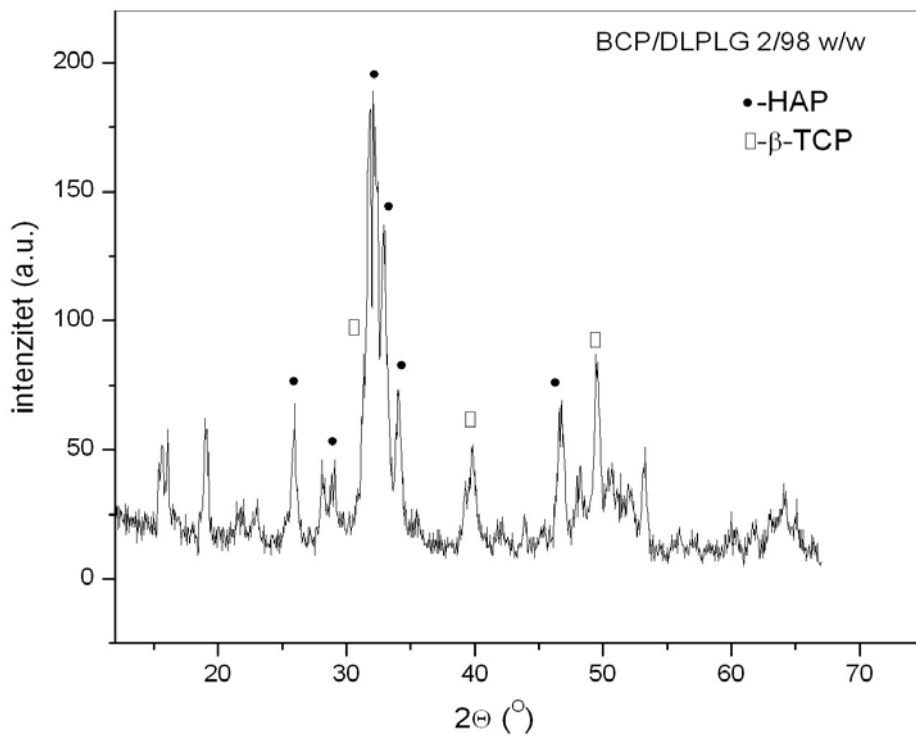
Slika 4.1.4 Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 65/35 w/w



Slika 4.1.5 Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 10/90 w/w



Slika 4.1.6 Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 5/95 w/w

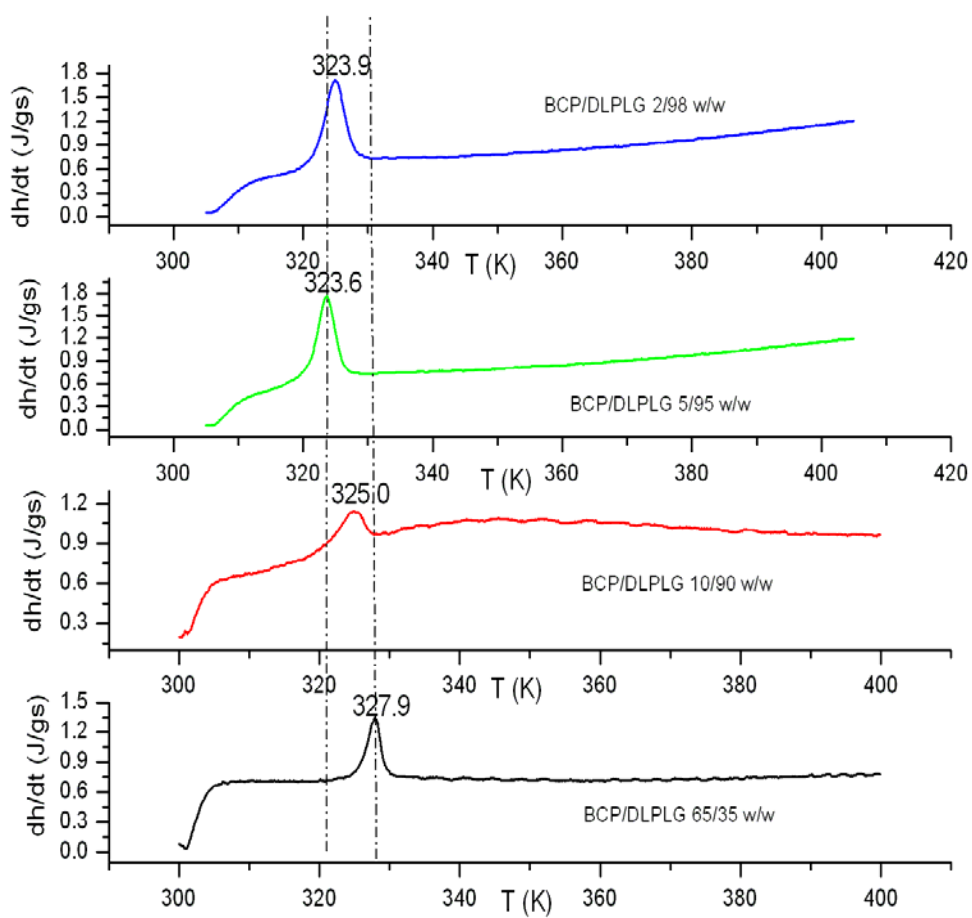


Slika 4.1.7 Difraktogram rendgenskog zračenja uzorka BCP/DLPLG 2/98 w/w

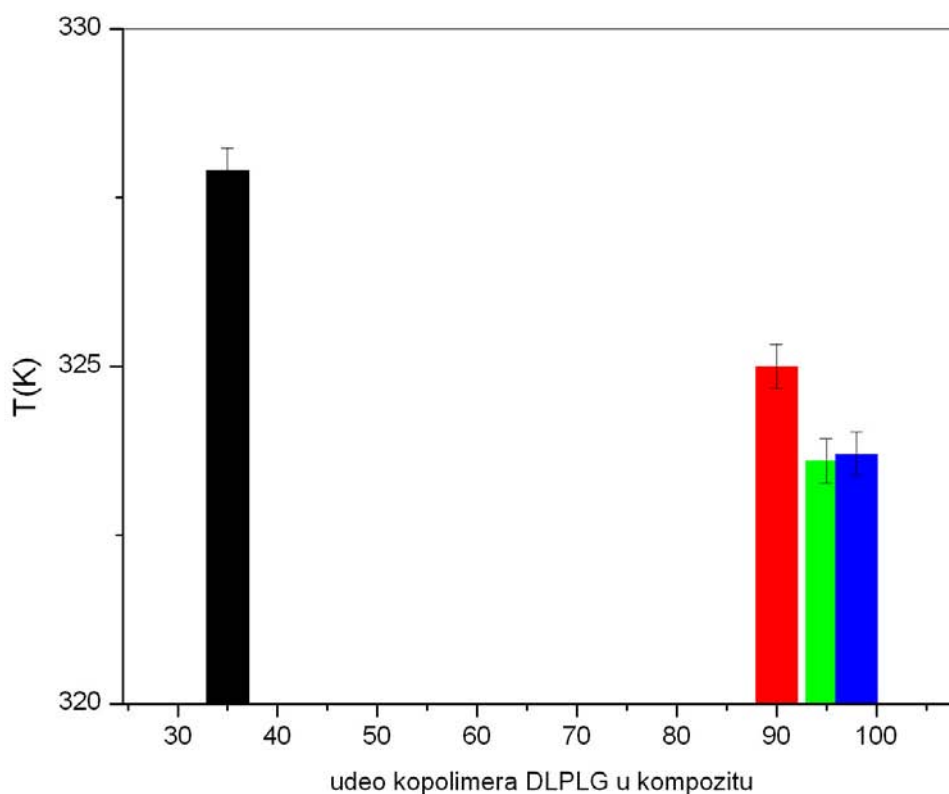
Pripremljeni kompoziti BCP/DLPLG-a sa različitim odnosima BCP-a i DLPLG-a i to od 65% prema 35%, 10% prema 90%, 5% prema 95% i 2% prema 98% su takođe karakterisani rendgenostrukturnom analizom i prikazani su na slikama 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, i 4.1.7 Na difraktogramima se mogu uočiti svi karakteristični pikovi za BCP. Neke difrakcione linije druge faze se poklapaju sa difrakcionim linijama HAp. Na difraktogramima zbog superpozicije pikova dominira pik apatita i to na $2\theta=31.8^\circ$. Na difraktogramima nema pikova koji odgovaraju DLPLG jer je DLPLG amorfan.

4.1.3 Rezultati diferencijalne skanirajuće kalorimetrije

Metodom diferencijalne skanirajuće kalorimetrije su određivane termalne osobine sintetizovanih kompozita BCP/DLPLG sa različitim masenim udelima keramičke i polimerne komponente i dobijene DSC krive su prikazane na slici 4.1.8. Merenja su radjena u opsegu temperatura od 320 do 540K. U ispitivanom temperaturnom opsegu keramička komponenta BCP je termostabilna. Na svim DSC krivama uočava se jedino pik ostakljivanja jer je kopolimer DLPLG amorfan. Sa povećanjem udela kopolimera u kompozitu može se uočiti i blago pomeranje pika ostakljivanja ka nižim temperaturama što se objašnjava promenama fleksibilnosti polimernog lanca (4.1.8., 4.1.9.) [67]. Pik ostakljivanja kompozita BCP/DLPLG 65/35w/w je na temperaturi 327.9 K, BCP/DLPLG 10/90w/w je na 325.0K, BCP/DLPLG 5/95w/w je na temperaturi 323.6K dok je pik BCP/DLPLG 2/98w/w na temperaturi 323.9 K



Slika 4.1.8 DSC krive kompozita BCP/DLPLG

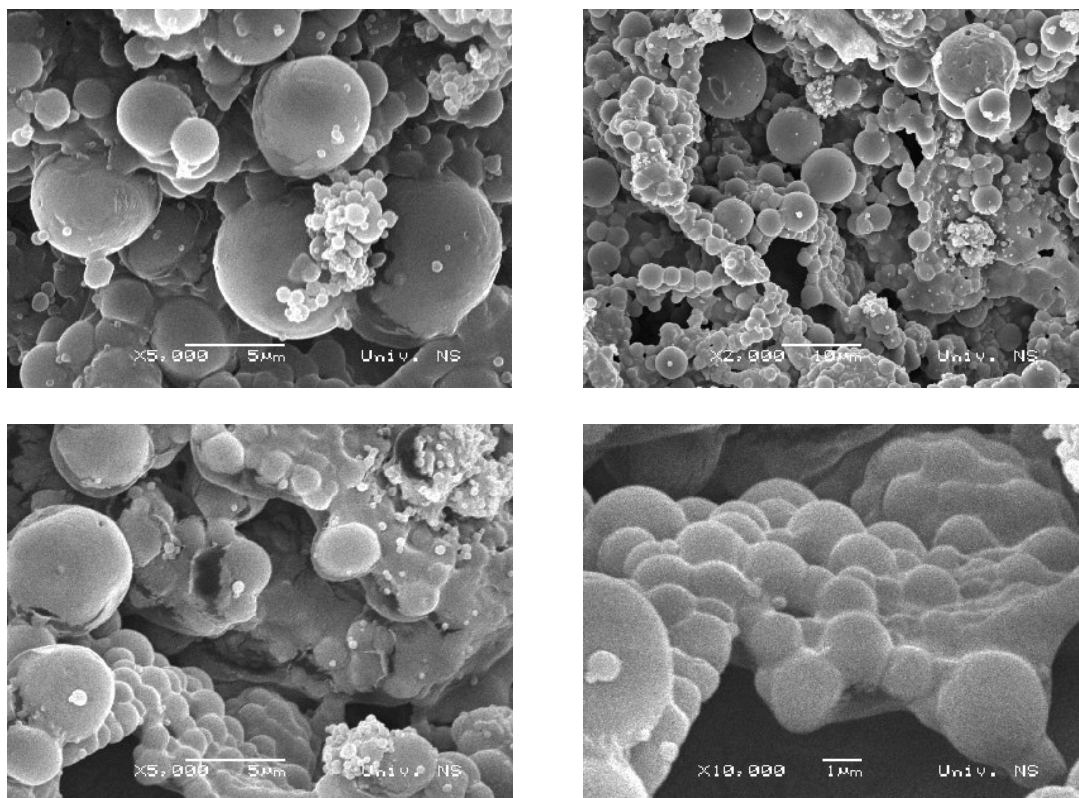


Slika 4.1.9 Sniženje temperature tačke ostakljivanja sa povećanjem udela polimera u kompozitu

4.1.4 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije

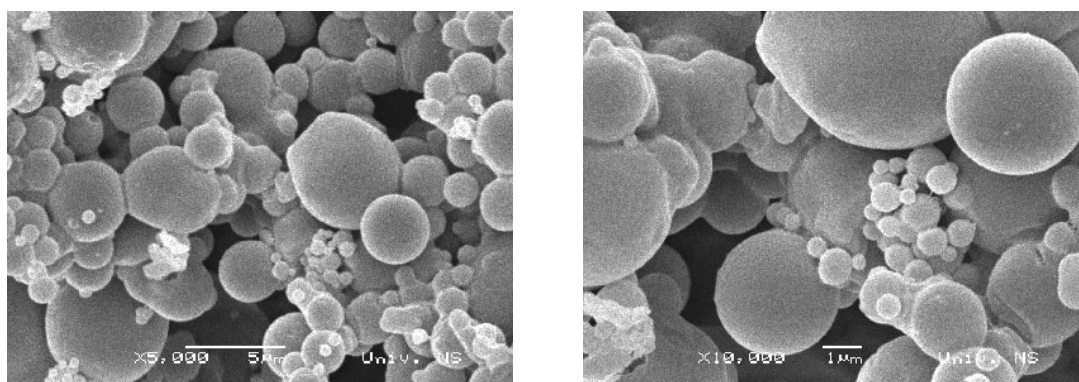
Morfološke karakteristike dobijenih prahova kopolimera DLPLG, bifaznog kalcijum fosfata kao i biokompozita BCP/DLPLG su ispitivane skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uzorci su najpre naparavani zlatom, strujom od 30 mA sa udaljenosti od 50 mm tokom 180s.

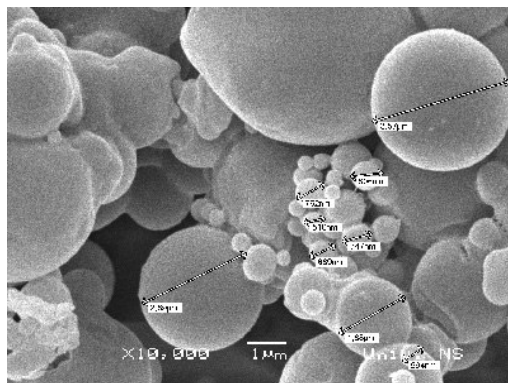
Sa SEM snimaka prve serije praha DLPLG kod koga je vreme starenja sa nerastvaračem iznosilo 10 min dok su vreme i brzina centrifugalnog procesiranja bili najkraći i iznosili 15min na 1500 rpm, a prikazanog na slici 4.1.10, može se uočiti prisustvo čestica sfernog oblika različitih veličina i to u širokom rasponu pri čemu čestice većih dimenzija dominiraju što je slučaj i kod praha druge serije prikazanog na slici 4.1.11 kod koga je vreme starenja sa nerastvaračem iznosilo 15 min dok su vreme i brzina centrifugalnog procesiranja iznosili 30min na 3000rpm.



Slika 4.1.10 SEM fotografije praha DLPLG prve serije

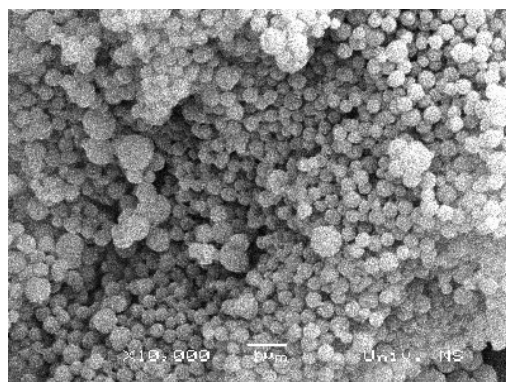
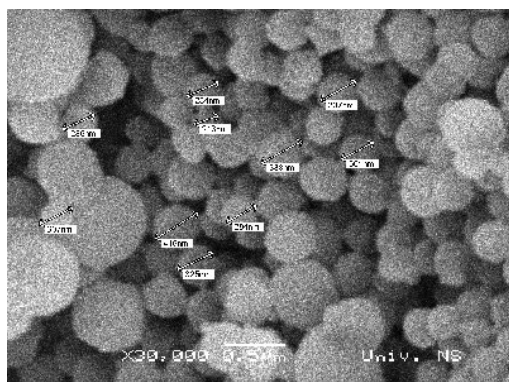
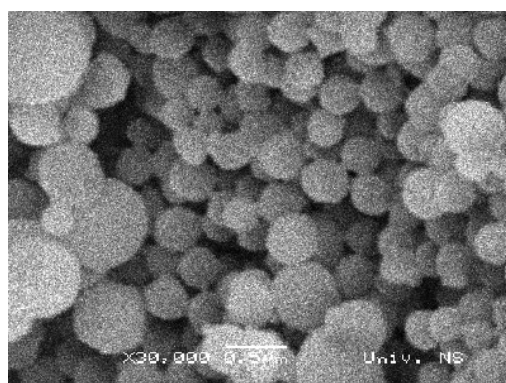
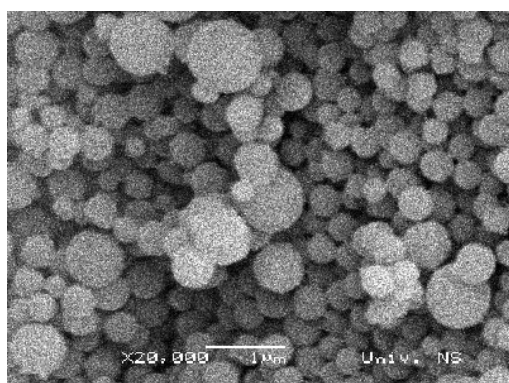
U slučaju praha prve serije vidimo i da su čestice aglomerisane.



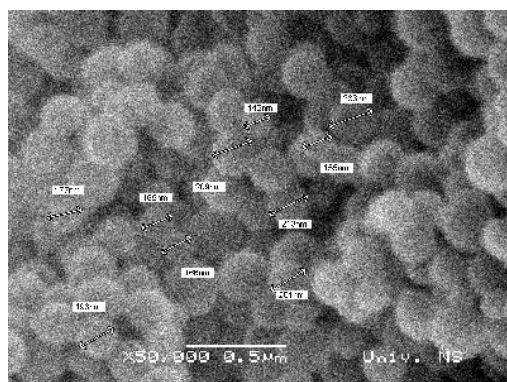


Slika 4.1.11 SEM fotografije praha DLPLG druge serije

Prah druge serije sadrži, takodje, čestice različitih veličina pri čemu su one sada u nešto užem opsegu veličina

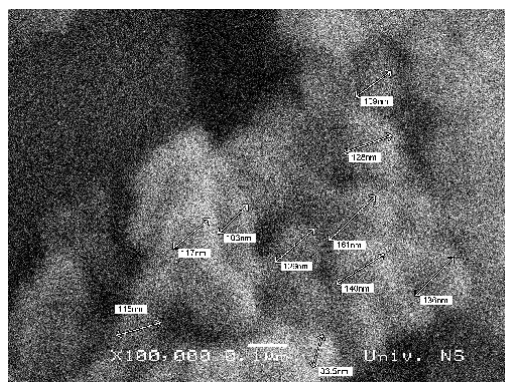
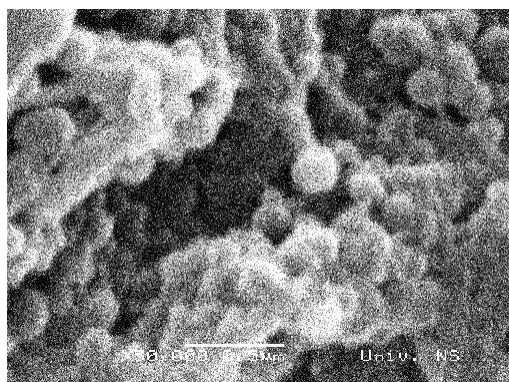


Slika 4.1.12 SEM fotografije praha DLPLG treće serije



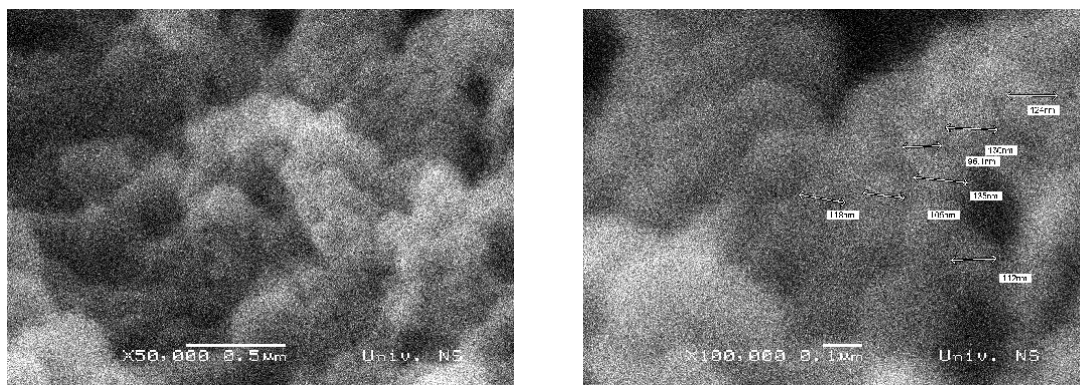
Slika 4.1.14 SEM fotografije praha DLPLG pete serije

SEM slike uzorka praha DLPLG iz pete serije (slika 4.1.14) pokazuju najveću uniformnost čestica, kao i da su čestice još manjih veličina.

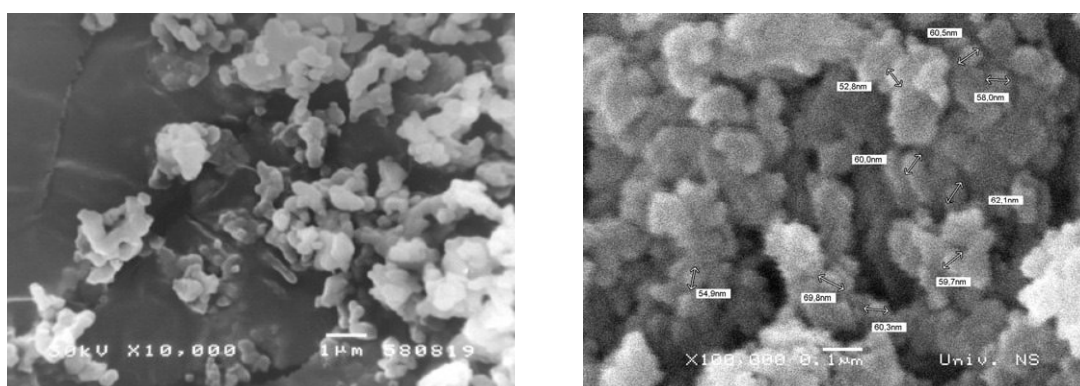


Slika 4.1.15 SEM fotografije praha DLPLG šeste serije

U slučaju praha šeste serije, slika 4.1.15, kao i sedme serije, slika 4.1.16, pretpostavljamo da je brzina centrifugiranja imala još veći uticaj na veličinu čestica i da su veličine čestica oko i ispod 100nm ali zbog nestabilnosti polimera pod elektronskim snopom pri velikim uvećanjima SEM fotografije su nejasne i u slučaju praha šeste i sedme serije nisu mogla biti radjena stereološka ispitivanja.

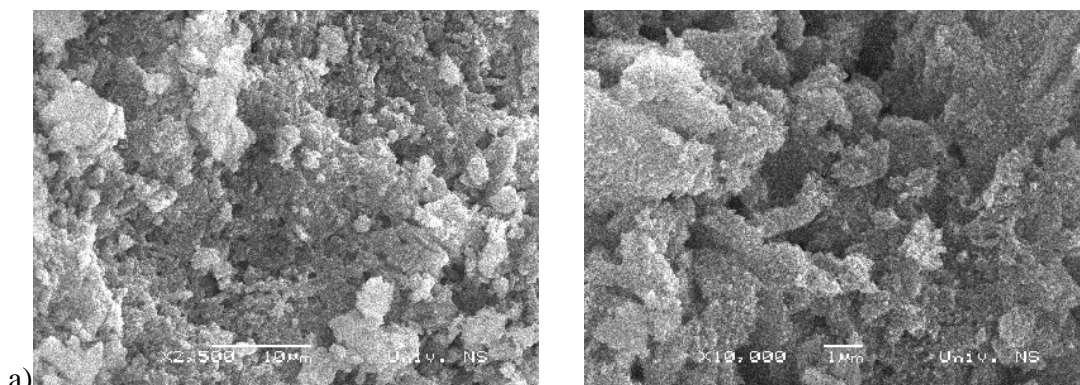


Slika 4.1.16 SEM fotografije praha DLPLG sedme serije

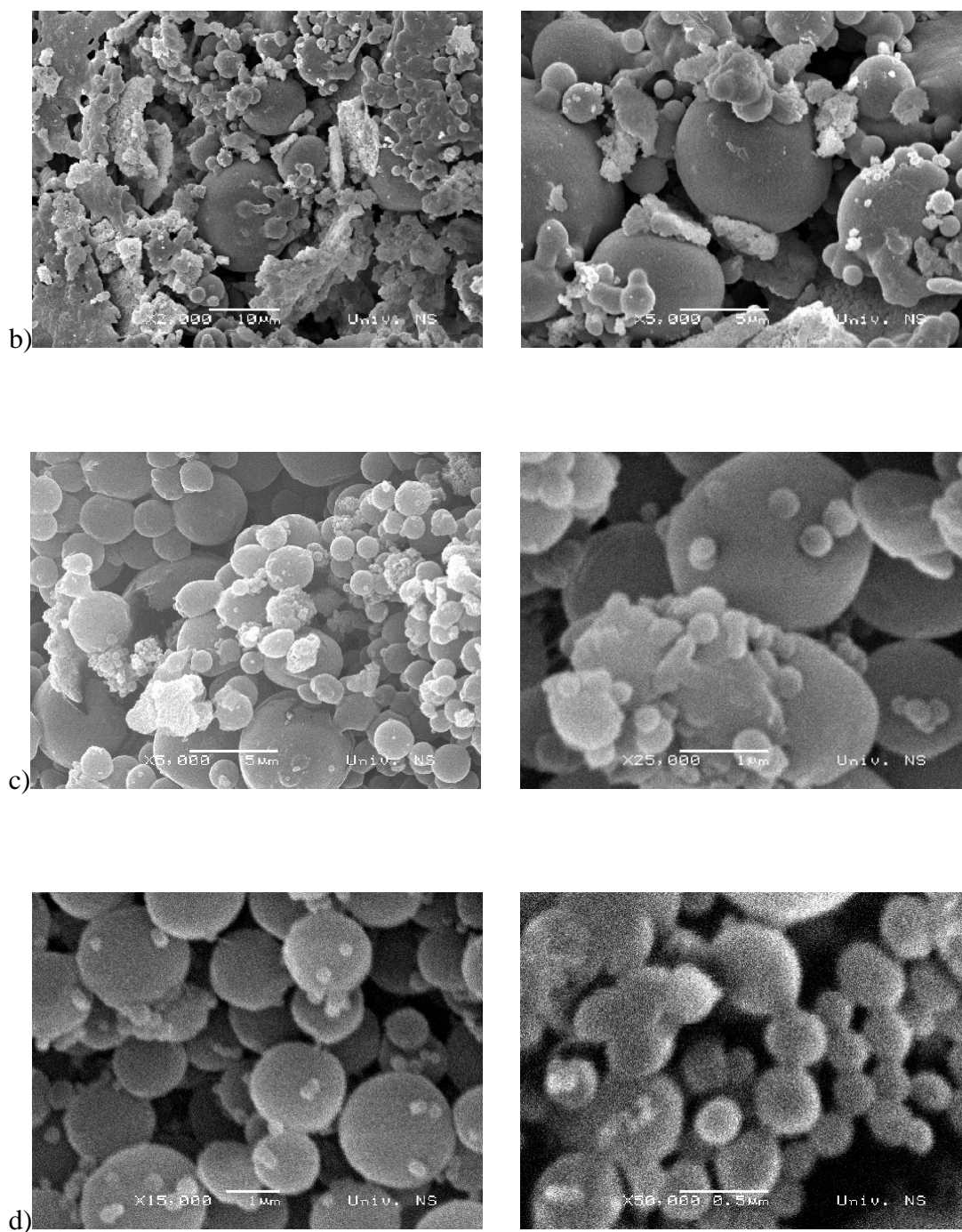


Slika 4.1.17 SEM fotografije uzorka BCP

SEM slike BCP-a (4.1.17) pokazuju da su čestice BCP-a aglomerisane i nepravilnog ali i sfernog oblika



a)



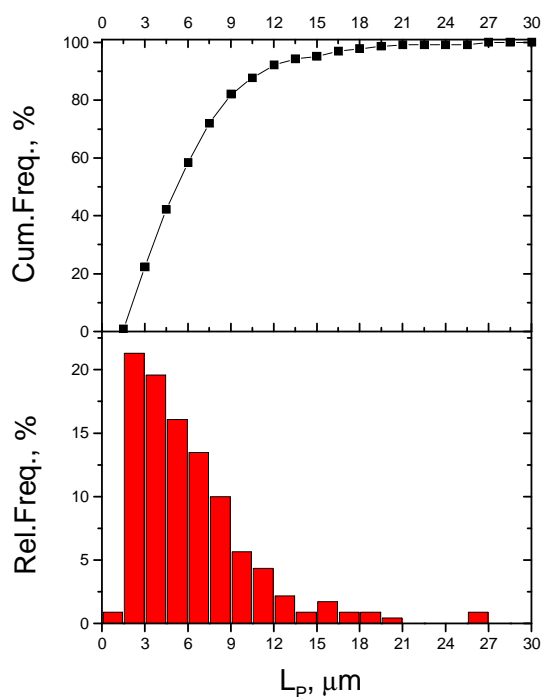
Slika 4.1.18 SEM fotografije kompozita a)BCP/DLPLG 65/35 w/w b)BCP/DLPLG 10/90 w/w c)BCP/DLPLG 5/95 w/w d)BCP/DLPLG 2/98 w/w

Kod kompozitnog materijala kod koga je procenat BCP-a prema procentu DLPLG manji čestice su manje aglomerisane i pravilnijeg su tj. sfernog oblika. Očigledna je nehomogenija raspodela čestica BCP-a i DLPLG u kompozitu sa manjim udelom DLPLG u kompozitu (slika 4.1.18).

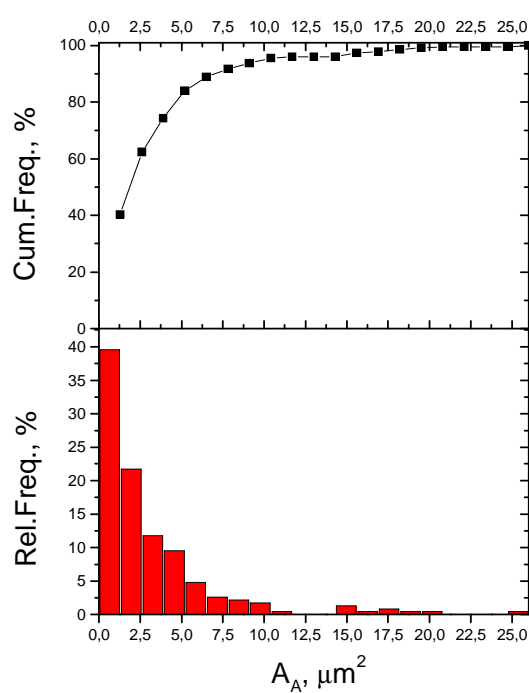
4.1.5 Rezultati stereološke analize

Kopolimer poli (DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG) se može koristiti i i za kontrolisano i ravnomerno otpuštanje lekova, jer omogućava inkapsulaciju leka unutar polimerne matrice, pri čemu je osnovni uslov idealna sferičnost čestica kao i da se njihove veličine nalaze u uskom opsegu veličina pa su u okviru naših istraživanja radjena i stereološka ispitivanja dobijenih čestica.

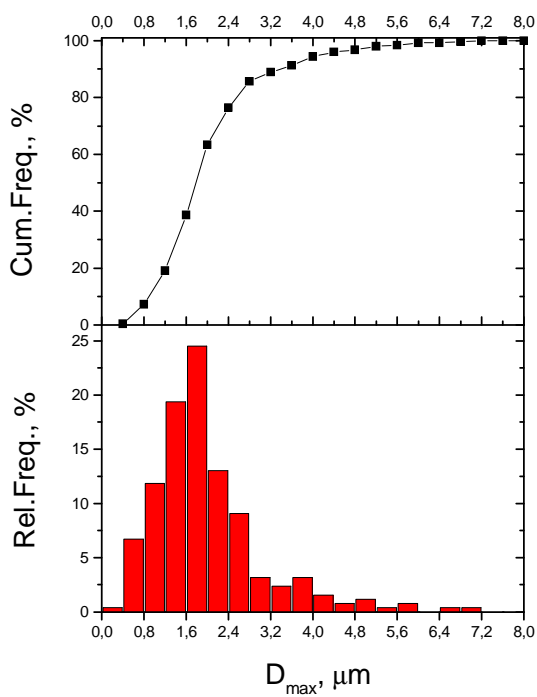
Na osnovu stereološke analize su određeni parametri koji karakterišu veličinu čestica (poprečni presek $-A_A$, obim $-L_p$, maksimalni dijametar čestice- D_{max} , feret X i feret Y) i parametri koji karakterišu oblik čestica (perimeter form faktor $-f_L$). Za sve parametre određene su minimalna, maksimalna i srednja vrednost. Na osnovu dobijenih rezultata stereološke analize za slučaj praha prve serije, prikazanih na slici 4.1.19 i u tabeli 4.1.1, može se videti da čestice prve serije nisu uniformne a da njihova prosečna veličina varira od 1.45 do 2.08 μm u zavisnosti od toga koji se stereološki parametar uzima u obzir (D_{max} , feret X ili feret Y). Vrednosti za D_{max} u slučaju čestica prve serije su iznosile od 0.4 μm do 10.6 μm pri čemu je srednja vrednost D_{max} 2.08 μm (slika 4.1.19 (c)) Perimeter form faktor karakteriše oblik čestice i njegova srednja vrednost u slučaju čestica praha prve serije iznosi 0.89 (slika 4.1.19 (f)). Prah druge serije takodje nije uniforman ali se na osnovu dobijenih rezultata može videti da se veličina čestica znatno smanjuje i da sada vrednosti za D_{max} iznose od 0.36 μm do 6.62 μm pri čemu je srednja vrednost D_{max} 1.53 μm (slika 4.1.20 (c)) . Srednja vrednost perimeter form faktor čestica praha druge serije je 0.80 (slika 4.1.20 (f)). U slučaju praha treće serije veličine čestica su znatno manjih dimenzija što se može videti na osnovu vrednosti D_{max} koje iznose od 0.23 μm do 1 μm sa srednjom vrednošću od 0.44 μm (slika 4.1.21 (c)). Srednja vrednost perimeter form faktor kod treće serije je 0.85 (slika 4.1.21 (f)). U slučaju četvrte serije minimalna vrednost za D_{max} je 0.19 μm a maksimalna 0.48 μm dok je srednja 0.33 μm (slika 4.1.22 (c)). Čestice su sfernog oblika a njihov srednji perimeter form faktor iznosi 0.81 (slika 4.1.22 (f)). Najuniformnije čestice sa najmanjim dimenzijama, sfernih oblika su prisutne u slučaju praha pete serije. Dobijene čestice imaju vrednost za minimalni D_{max} od 0.09 μm i maksimalni D_{max} od 0.34 μm dok je njegova srednja vrednost 0.23 μm (slika 4.1.23 (c)). Srednja vrednost za perimeter form faktor iznosi 0.82 (slika 4.1.23 (f))



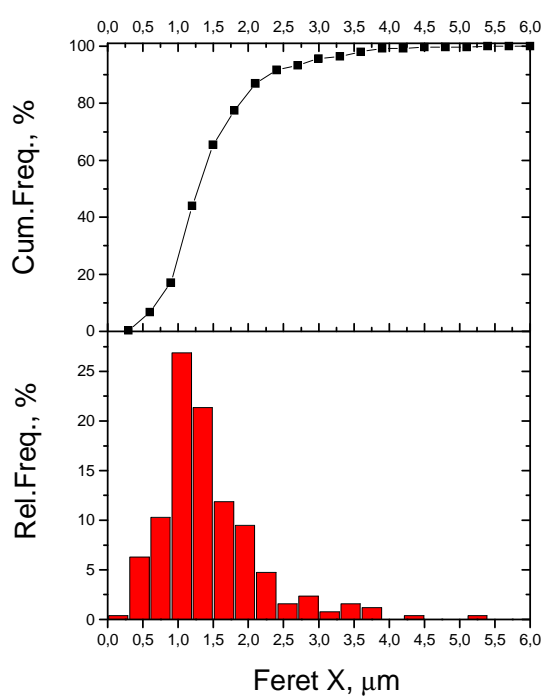
a)



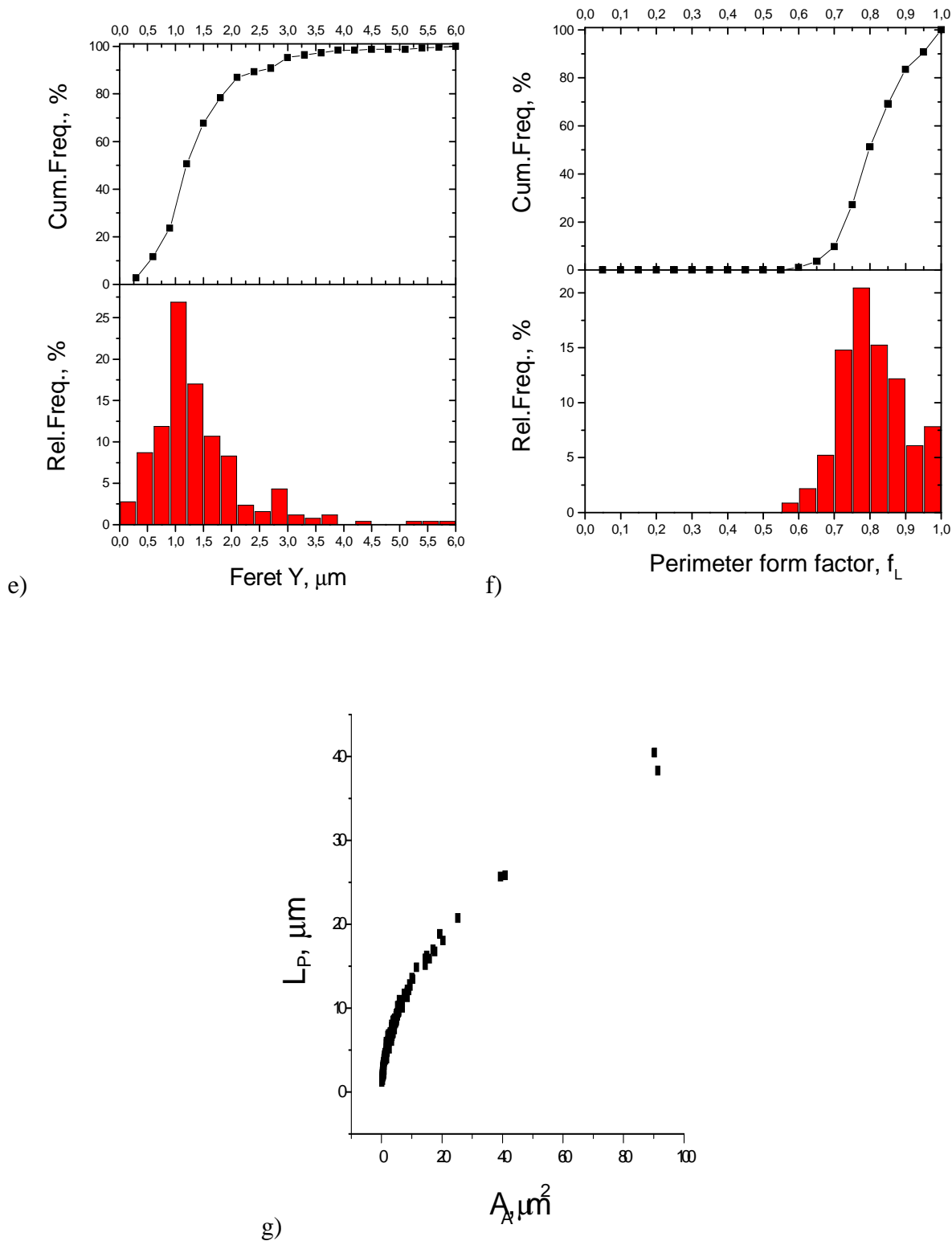
b)



c)



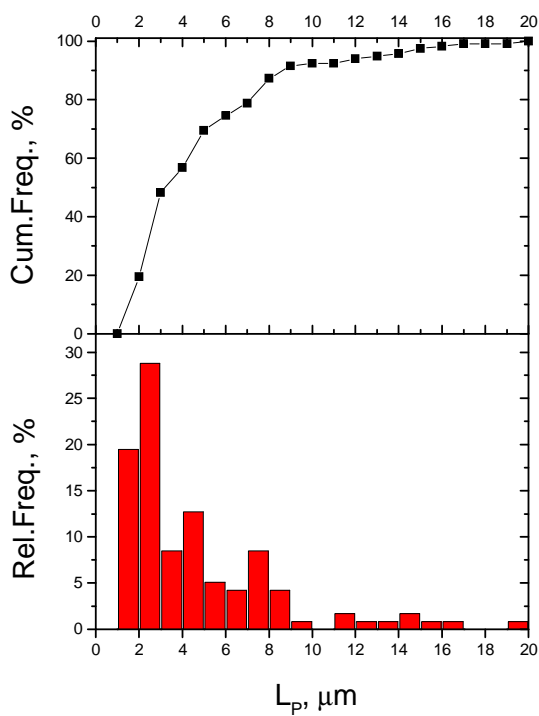
d)



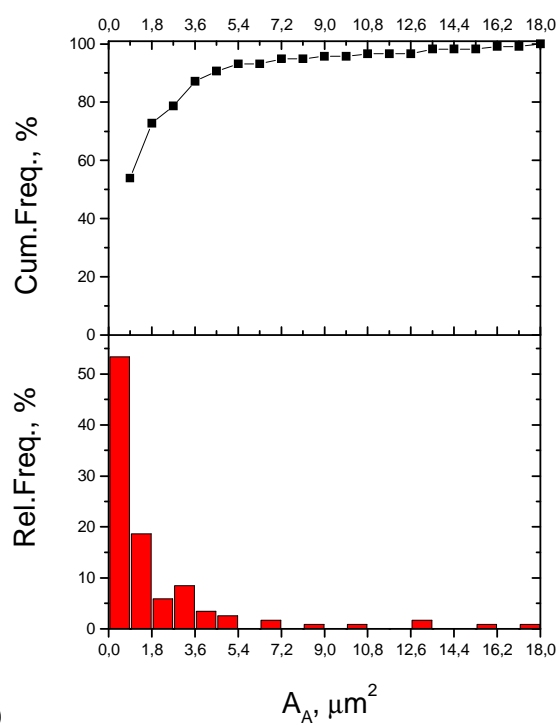
Slika 4.1.19 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha prve serije: a) obim- L_p , b) poprečni presek- A_a , c) maksimalni dijametar čestice- D_{max} , d) feret X, e) feret Y, f) perimetar form factor- f_L , g) odnos L_p/A_a

Tabela 4.1.1 Rezultati stereoloških ispitivanja praha prve serije

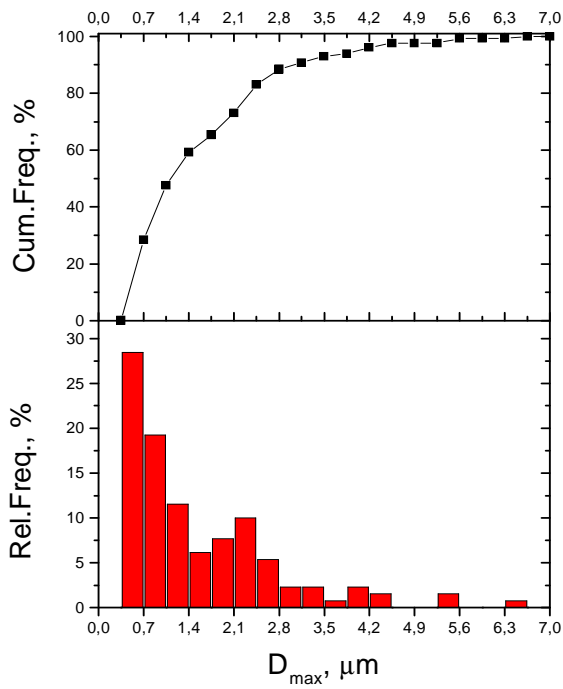
	MIN.	MAX.	MEAN
$L_P, \mu\text{m}$	1.18	40.45	6.48
$A_A, \mu\text{m}^2$	0.15	91.33	4.17
$D_{\text{max}}, \mu\text{m}$	0.4	10.6	2.08
Feret X, μm	0.28	7.98	1.46
Feret Y, μm	0.18	8.44	1.45
Primer form factor, f_L	0.57	1	0.89



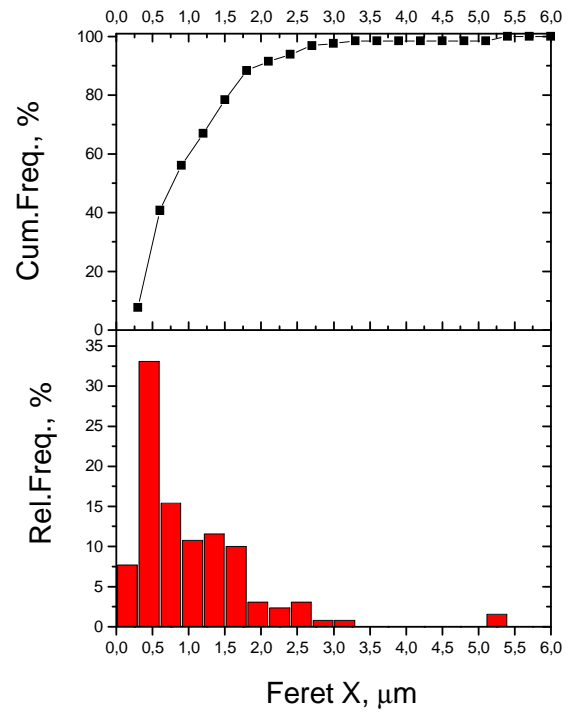
a)



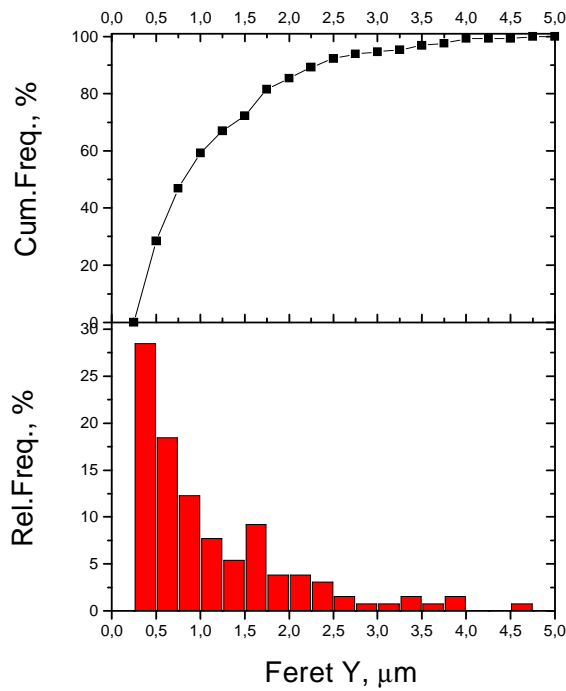
b)



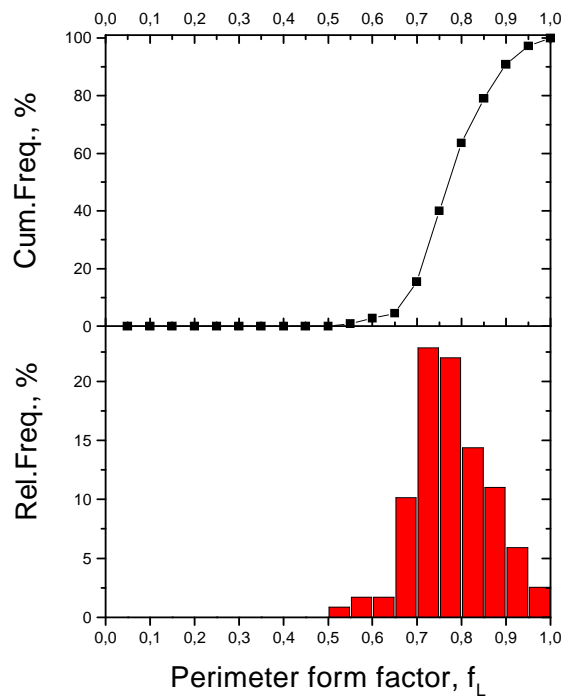
c)



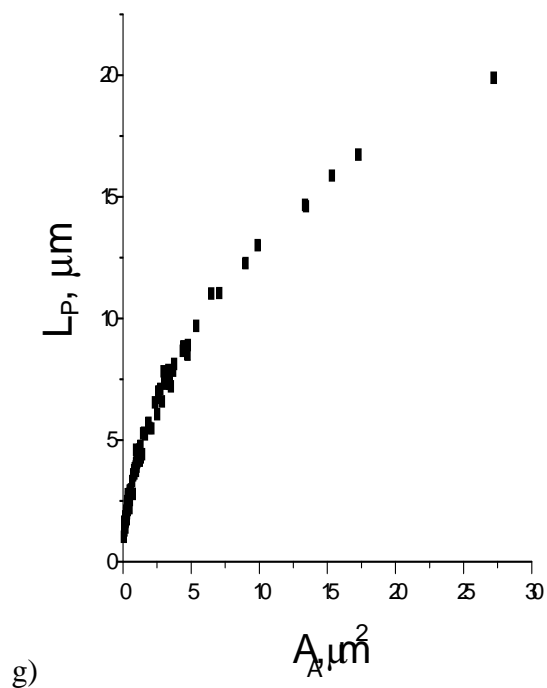
d)



e)



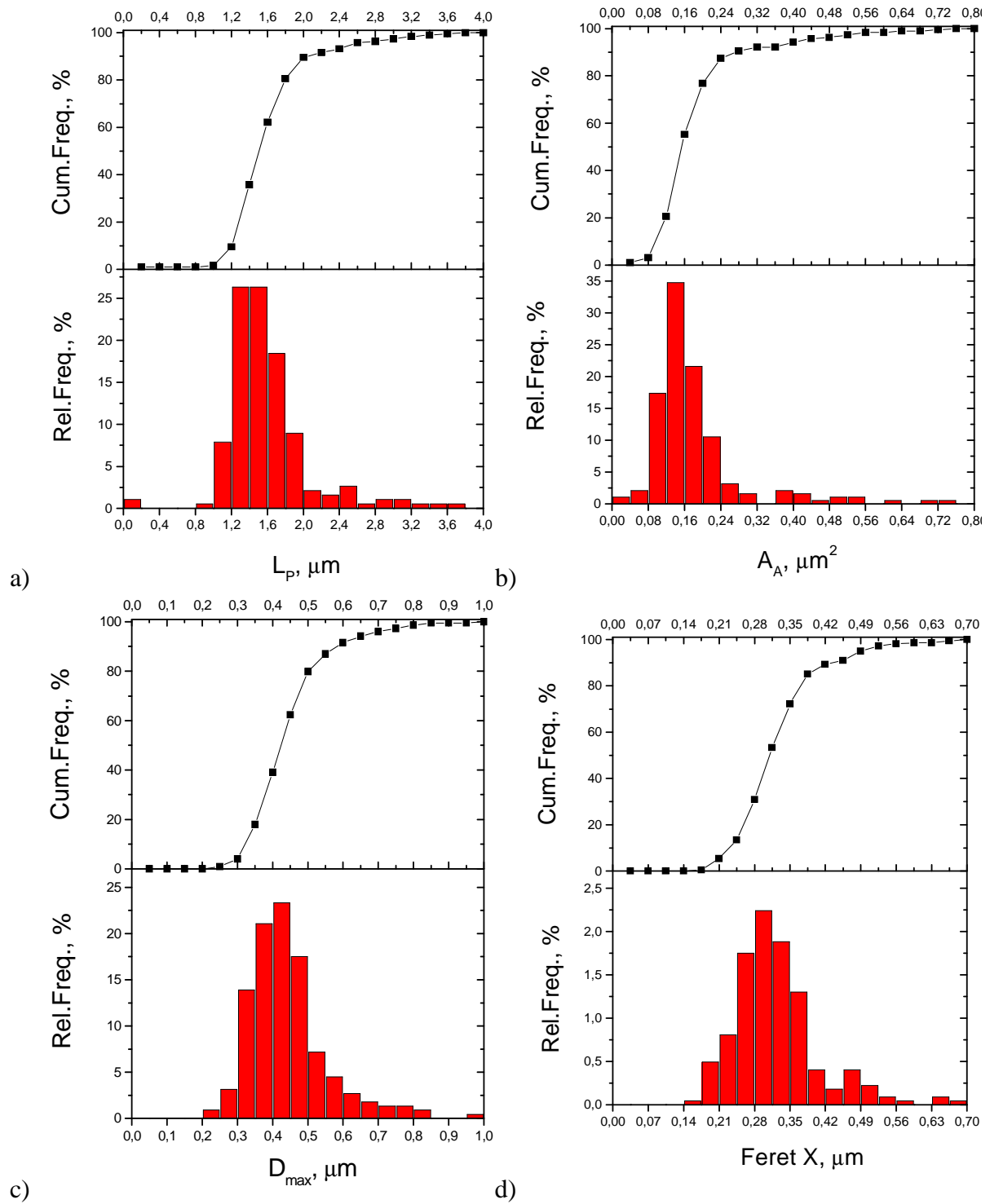
f)

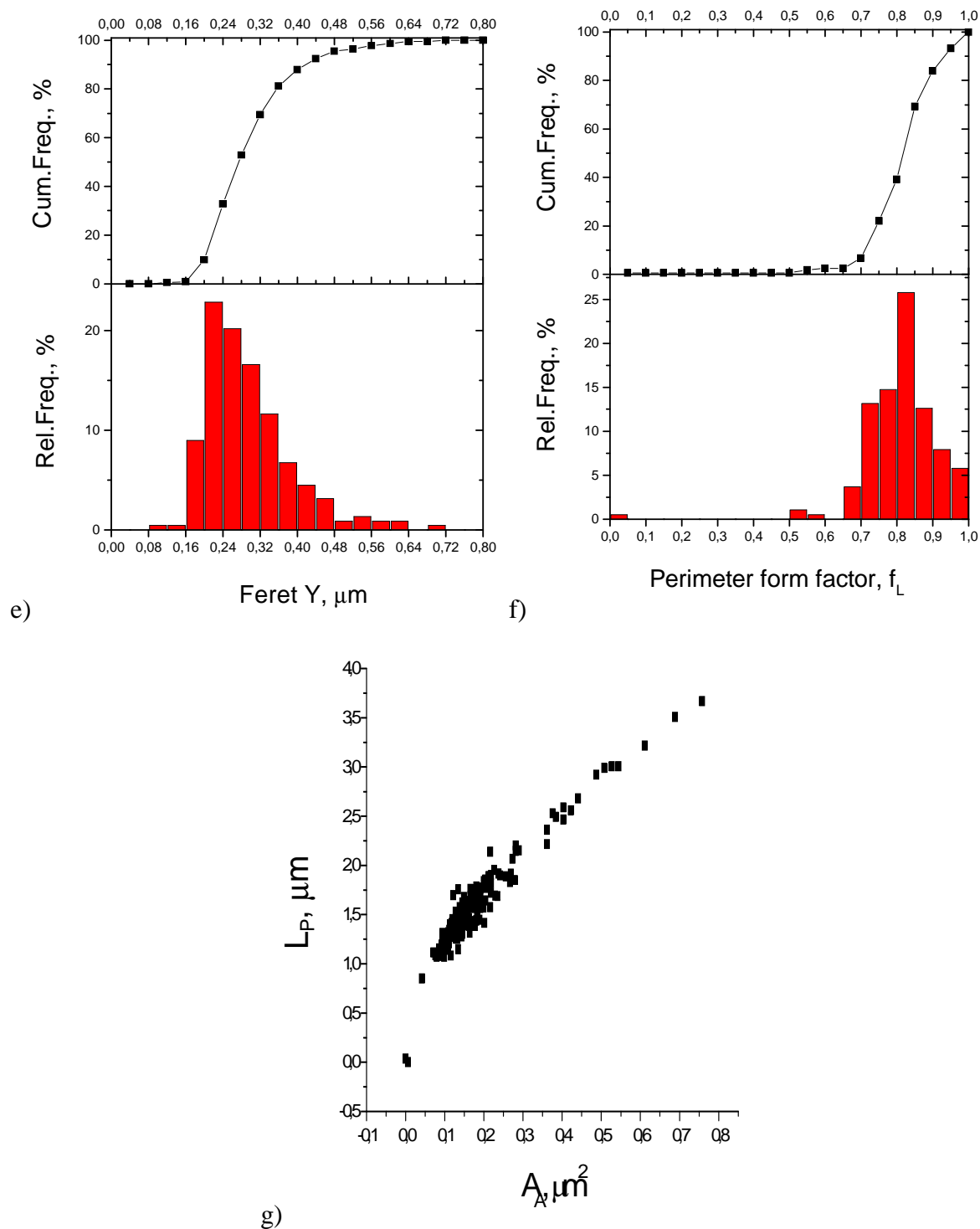


Slika 4.1.20 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha druge serije: a) obim- L_p , b) poprečni presek- A_a , c) maksimalni dijametar čestice- D_{max} , d) feret X, e) feret Y, f) perimenter form factor- f_L , g) odnos L_p/A_a

Tabela 4.1.2 Rezultati stereoloških ispitivanja praha druge serije

	MIN.	MAX.	MEAN
$L_p, \mu\text{m}$	1.02	19.9	4.65
$A_a, \mu\text{m}^2$	0.08	27.22	2.1
$D_{max}, \mu\text{m}$	0.36	6.62	1.53
Feret X, μm	0.22	5.39	1.02
Feret Y, μm	0.25	4.58	1.12
Perimeter form factor, f_L	0.53	1	0.80

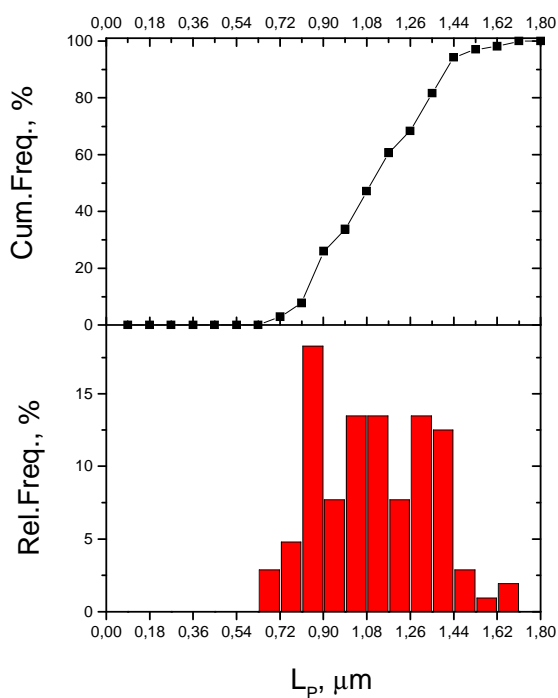




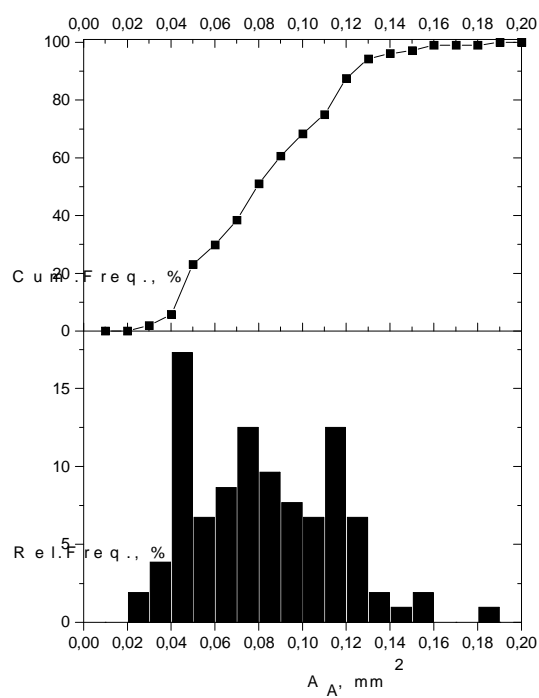
Slika 4.1.21 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha treće serije: a) obim- L_p , b) poprečni presek- A_a , c) maksimalni dijametar čestice- D_{max} , d) feret X, e) feret Y, f) perimetar form factor- f_L , g) odnos L_p/A_a

Tabela 4.1.3 Rezultati stereoloških ispitivanja praha treće serije

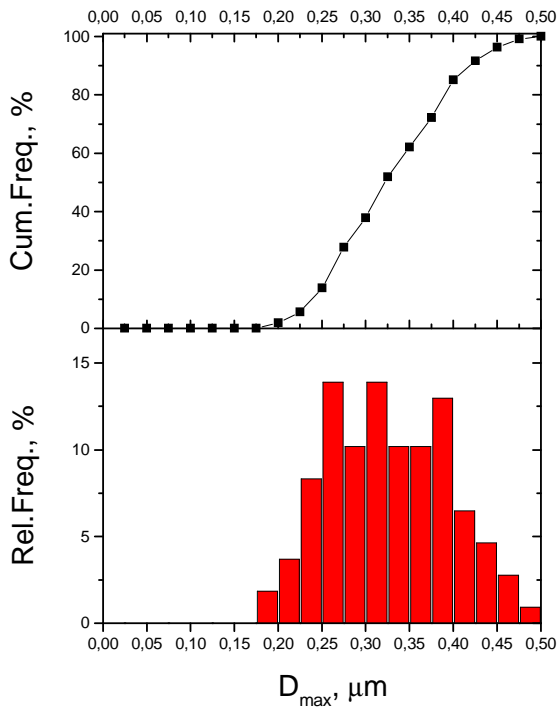
	MIN.	MAX.	MEAN
$L_P, \mu\text{m}$	0.1	3.67	1.59
$A_A, \mu\text{m}^2$	0.1	0.76	0.18
$D_{\text{max}}, \mu\text{m}$	0.23	1	0.44
Feret X, μm	0.16	0.69	0.32
Feret Y, μm	0.11	0.71	0.29
Perimeter form factor, f_L	0	1	0.85



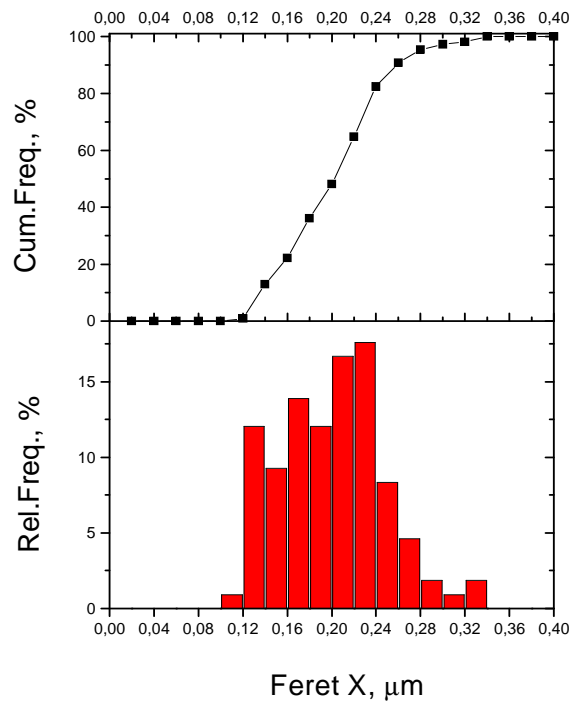
a)



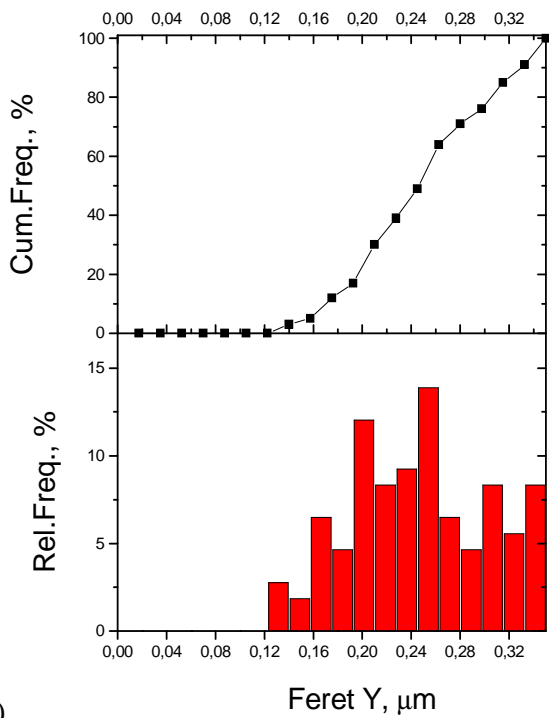
b)



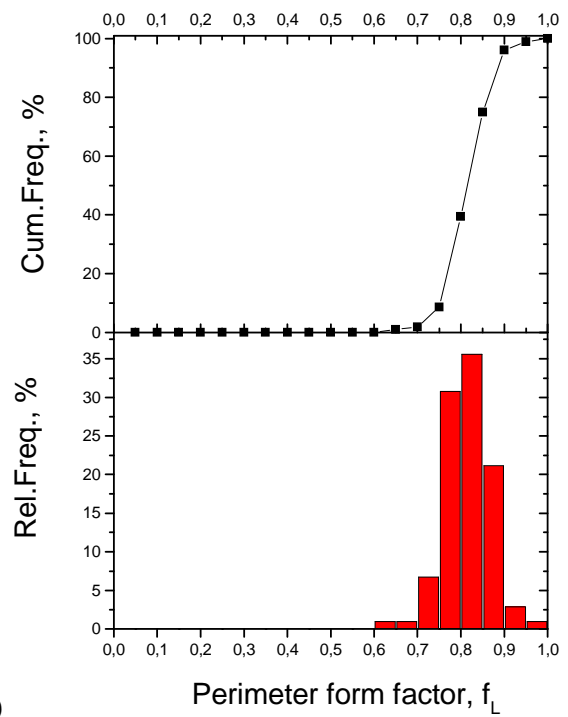
c)



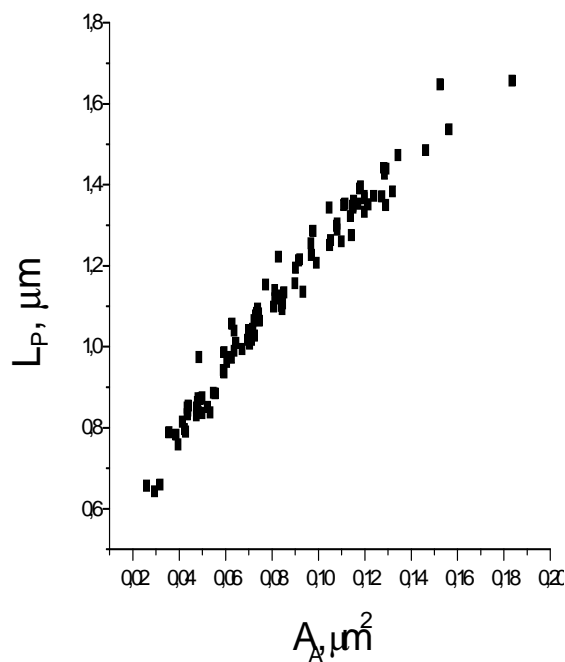
d)



e)



f)

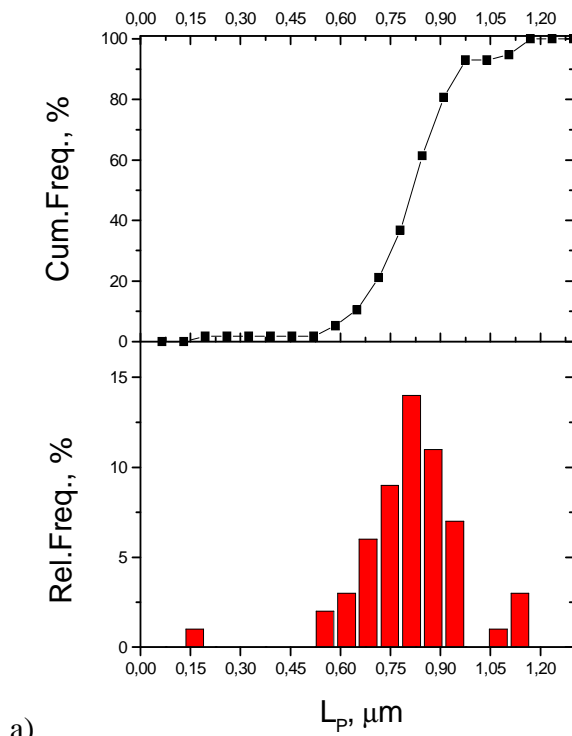


g)

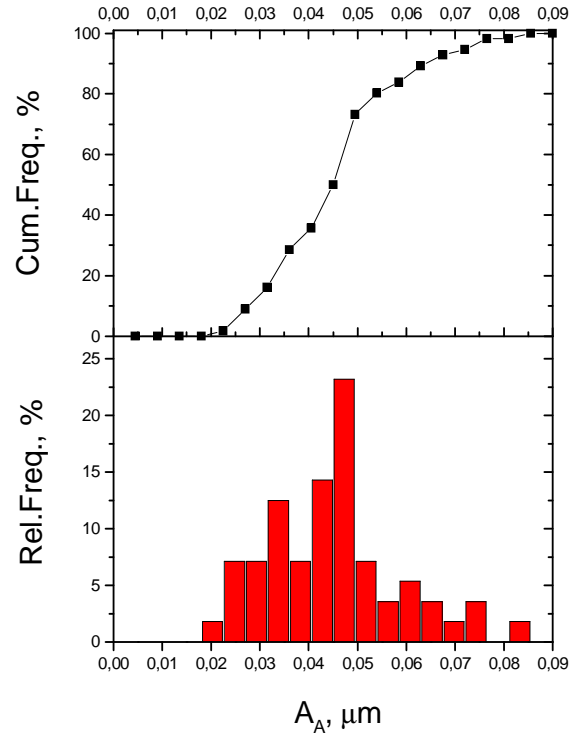
Slika 4.1.22 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha četvrte serije: a) obim- L_p , b) poprečni presek- A_a , c) maksimalni dijametar čestice- D_{max} , d) feret X, e) feret Y, f) perimenter form factor- f_L , g) odnos L_p/A_a

Tabela 4.1.4 Rezultati stereoloških ispitivanja praha četvrte serije

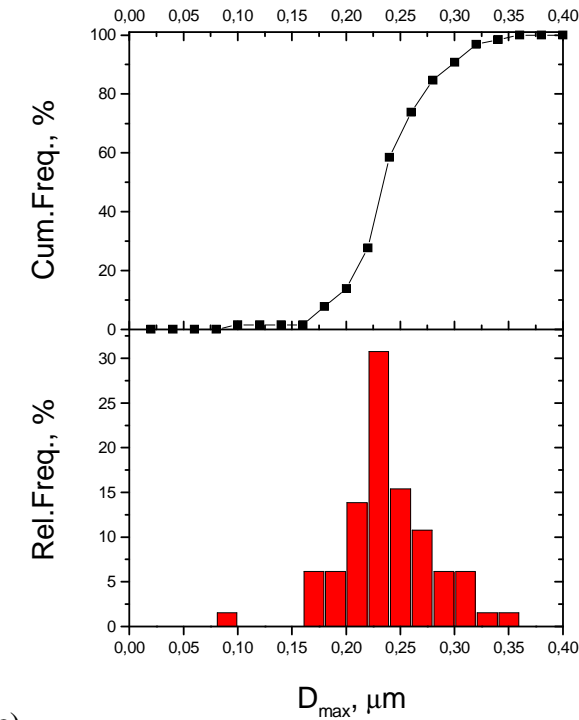
	MIN.	MAX.	MEAN
$L_p, \mu\text{m}$	0.64	1.66	1.11
$A_a, \mu\text{m}^2$	0.03	0.18	0.08
$D_{max}, \mu\text{m}$	0.19	0.48	0.32
Feret X, μm	0.12	0.33	0.2
Feret Y, μm	0.15	0.4	0.25
Perimeter form factor, f_L	0.64	0.95	0.81



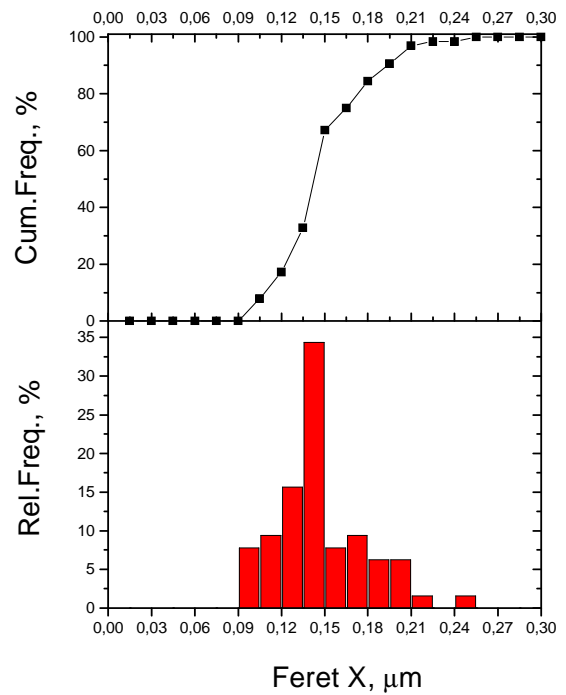
a)



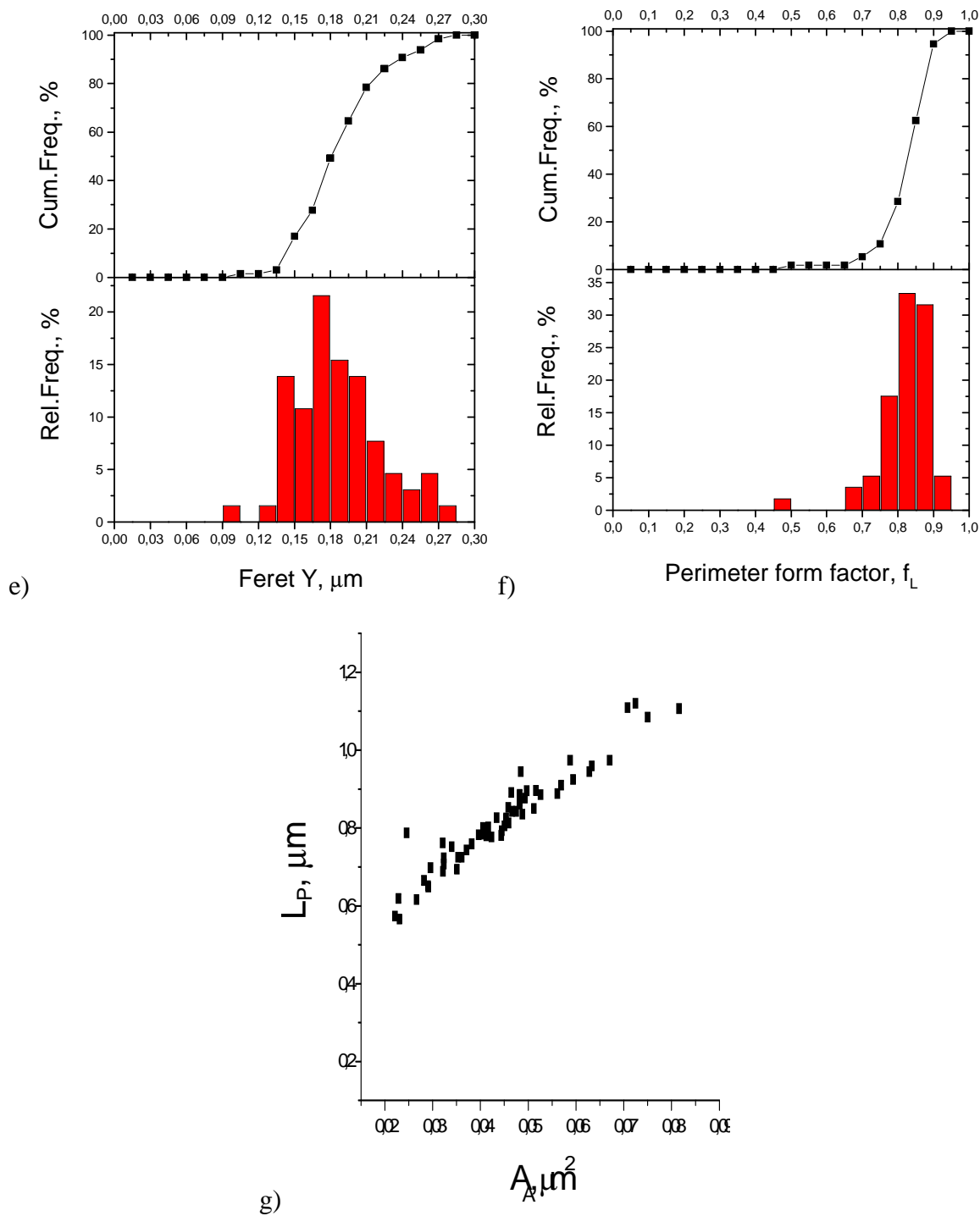
b)



c)



d)



Slika 4.1.23 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG praha pete serije: a) obim- L_p , b) poprečni presek- A_a , c) maksimalni dijametar čestice- D_{max} , d) feret X, e) feret Y, f) perimenter form factor- f_L , g) odnos L_p/A_a

Tabela 4.1.5 Rezultati stereoloških ispitivanja praha pete serije

	MIN.	MAX.	MEAN
$L_P, \mu\text{m}$	0.19	1.12	0.81
$A_A, \mu\text{m}^2$	0.02	0.08	0.04
$D_{\text{max}}, \mu\text{m}$	0.09	0.34	0.23
Feret X, μm	0.09	0.25	0.15
Feret Y, μm	0.09	0.28	0.19
Perimeter form factor, f_L	0.49	0.91	0.82

4.2 Diskusija

Zbog svojih specifičnih karakteristika kopolimer poli(DL-laktid-ko-glikolid) je dosta istraživana kako za medicinske, farmakološke, industrijske i druge potrebe, pri čemu je njegova sinteza radjena na najrazličitije načine. Polimerne čestice dozvoljavaju inkapsulaciju medikamenata unutar polimerne matrice pa se DLPLG koristi u cilju dobijanja sistema za kontrolisano i ravnomerno otpuštanje medikamenata unutar organizma. Do sada su u različitim publikovanim radovima opisane metode za dobijanje čestica praha DLPLG i najčešće korišćene metode su metode dobijanja čestica emulzionim procesom pri čemu su dobijene sfere u opsegu od 150-200 μ m [31], 45 μ m [73], 30 μ m [99]; modifikovanom emulzionom metodom se dimenzije dobijenih čestica smanjuju i iznose do 10 μ m [100]; daljim modifikacijama procesa sinteze čestica tj. emulziono solvent evaporacionom metodom dobijaju se čestice sa veličinama od 570 do 970nm [101], i od 244 do 260nm [91,94,102].

U ovim istraživanjima je opisana nova, jednostavna metoda za dobijanje sfernih čestica DLPLG velike uniformnosti i sa veličinama na submikronskoj skali. Veličina kao i sferičnost čestica su izuzetno važna karakteristika čestica korišćenih za kontrolisanu dostavu lekova u organizmu. Centrifugalno procesiranje je generalno vrlo moćna metoda kojom se vrši razdvajanje i analiza ćelija, organela i bioloških makromolekula. Hemijskom metodom sa korišćenjem sistema rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent method) i uz različite uslove centrifugiranja dobijene su čestice različitih veličina i uniformnosti. Uticaj centrifugalnog procesiranja na veličinu čestica se objašnjava time da je koeficijent trenja manjih kompaktnijih čestica sfernog oblika manji nego u slučaju čestica nepravilnih oblika iste mase pa će se one pre sedimentirati.

Kontrolisanjem odredjenih uslova tokom sinteze praha DLPLG, odnosno menjanjem odgovarajućih parametara tokom eksperimenta kao što su vreme starenja sa nerastvaračem, vreme i brzina centrifugalnog procesiranja, pokazano je da je moguće uticati na morfologiju (veličinu i oblik) čestica kao i uniformnost DLPLG praha. Poređenjem rezultata dobijenih u pet serija utvrđeno je da se prah DLPLG sa najkraćim vremenom starenja sa nerastvaračem, najdužim vremenom i najvećom brzinom centrifugiranja sastoji od sfernih čestica velike uniformnosti, niskog stepena aglomeracije i sa veličinama na submikronskoj skali.

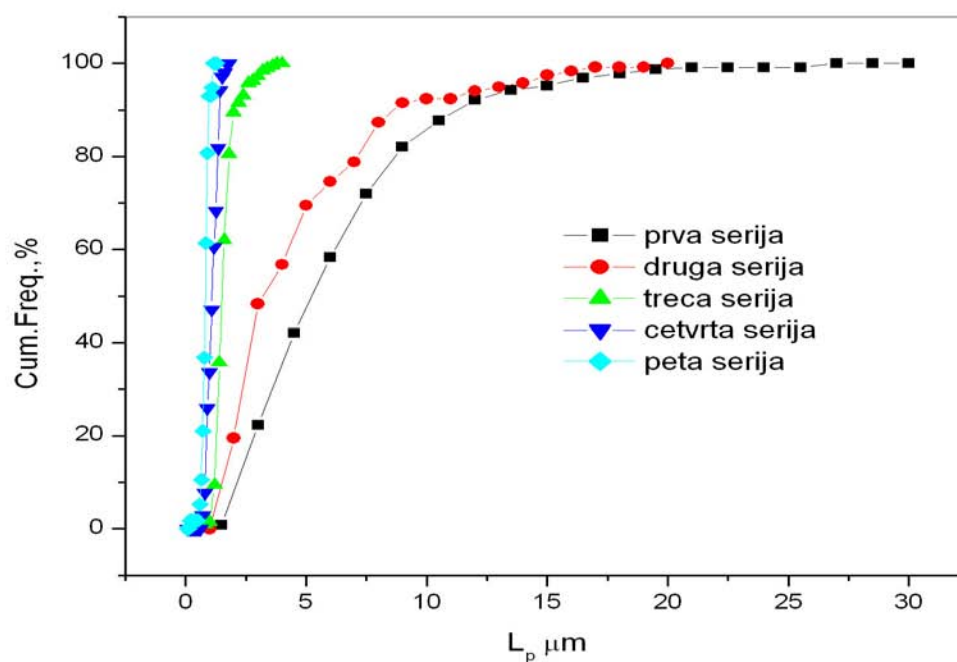
BCP/DLPLG je bidegradabilni, biokompatibilni kompozitni materijal koji se koristi za zamenu i reparaciju koštanog tkiva. U ovom radu su prikazani rezultati istraživanja novog načina sinteze kompozitnog materijala BCP/DLPLG a u cilju dobijanja materijala određenih aplikativnih svojstava koje bi ga činile pogodnim za primenu u oralnoj hirurgiji, za injektiranje i ispunjavanje praznine u kosti, kao i ispunu prostora između desni i zuba u slučaju paradentoze i paradentopatije. Kompozitni materijal je sintetizovan homogenizacijom praha DLPLG i gela BCP-a i to sa odnosom 35/65 w/w kao i u odnosu 90/10 w/w, 95/5 w/w i 98/2w/w.

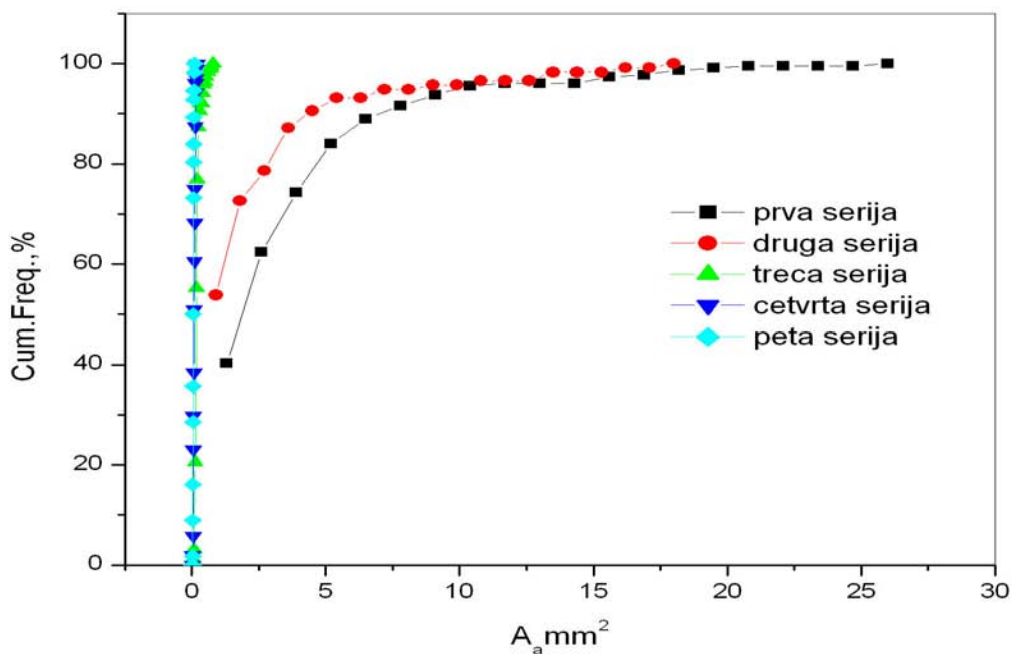
Karakterizacija praha kopolimera DLPLG kao i kompozita BCP/DLPLG sa različitim udelima keramike i polimera je radjena metodama: infracrvene spektroskopije (IR), rendgenostrukturne analize (X-ray), diferencijalne skanirajuće kalorimetrije (DSC), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i steteološke analize. Analiza IR spektara dobijenog praha DLPLG je potvrdila da se novom metodom, opisanom u tekstu, dobijaju čestice kopolimera DLPLG, odnosno, dobijeni IR spektar sadrži sve pikove karakteristične za DLPLG. Takodje, IR spektar sintetizovanog kompozita BCP/DLPLG sadrži trake koje su karakteristične za jedinjenja BCP-a. Na osnovu rendgenostrukturne analize je utvrđeno da su na difraktogramima BCP-a i BCP/DLPLG prisutne sve karakteristične difrakcione linije a najdominantniji pik je pik apatita i to na $2\theta=31.8^\circ$. Termijska analiza uzoraka kompozita BCP/DLPLG je radjena diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom. Na DSC dijagramima se uočava jedino pik ostakljivanja jer je kopolimer DLPLG amorfan a BCP termostabilan u datom opsegu temperatura. Primećeno je i izvesno snižavanje temperature ostakljivanja kod kompozita sa većim udelom polimera što se objašnjava promenama fleksibilnosti polimernog lanca. Za BCP/DLPLG 65/35w/w pik ostakljivanja je na 327.9 K, za BCP/DLPLG 10/90w/w na 325.0K, BCP/DLPLG 5/95w/w 323.6K i za BCP/DLPLG 2/98w/w na temperaturi 323.9 K. Na osnovu SEM fotografija pet serija praha DLPLG (kao i dve dopunske serije) vidi se smanjenje veličina čestica, smanjenje aglomeracije i povećanje njihove uniformnosti počev od prve serije ka petoj seriji (šestoj i sedmoj). SEM fotografije samog BCP-a ukazuju da su čestice BCP-a nepravilnih oblika, hrapavih površina kao i da su aglomerisane. Sa SEM fotografija kompozita BCP/DLPLG sa različitim odnosom keramike i polimera vidi se da su čestice u slučaju kompozita sa većim udelom polimera manje aglomerisane, homogenizovanije, sfernih i pravilnijih oblika. Rezultati stereološke analize (tabela 4.2.1) pokazuju da su u ovom istraživanju novom metodom dobijene čestice kopolimera poli(DL-

laktid-ko-glikolida) submikronskih veličina (150 do 230nm) i velike uniformnosti koje, samim tim i pored ostalog, potencijalno mogu biti korišćene u svrhe kontrolisane dostave medikamenata u organizmu. Čestice najveće uniformnosti i najmanjih dimenzija a sfernih oblika su dobijene u slučaju praha pete serije. Dobijene čestice imaju vrednost za minimalni Dmax od 0.09 μ m i maksimalni Dmax od 0.34 μ m dok je njegova srednja vrednost 0.23 μ m. Srednja vrednost za perimeter form faktor iznosi 0.82 . Na slici 4.2.1 prikazani su uporedno rezultati stereoloških ispitivanja čestica praha DLPLG svih pet serija. Sa slike 4.2.2 može se videti raspodela čestica prahova DLPLG pet serija na osnovu maksimalnog dijametra čestica- Dmax.

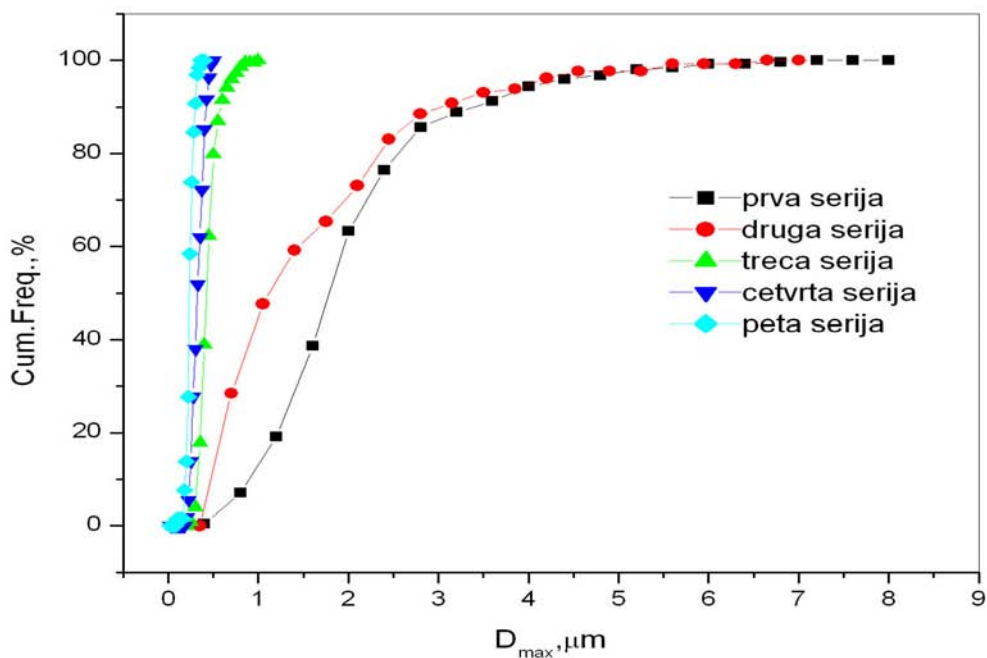
Tabela 4.2.1 Rezultati stereološke analize praha DLPLG

powder DLPLG (series)	Lp (μ m)			A _A (μ m) ²			Dmax (μ m)			Feret X (μ m)			Feret Y (μ m)			Perimeter form factor (μ m)		
	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean
1	1.18	40.5	6.48	0.15	91.3	4.17	0.4	10.6	2.08	0.28	7.98	1.46	0.18	8.44	1.45	0.57	1.00	0.89
2	1.02	19.9	4.65	0.08	27.2	2.1	0.36	6.62	1.53	0.22	5.39	1.02	0.25	4.58	1.12	0.53	1.00	0.8
3	0.1	3.67	1.59	0.1	0.76	0.18	0.23	1	0.44	0.16	0.69	0.32	0.11	0.71	0.29	0.1	1.00	0.85
4	0.64	1.66	1.11	0.03	0.18	0.08	0.19	0.48	0.32	0.12	0.33	0.2	0.15	0.4	0.25	0.64	0.95	0.81
5	0.19	1.12	0.81	0.02	0.08	0.04	0.09	0.34	0.23	0.09	0.25	0.15	0.09	0.28	0.19	0.49	0.91	0.82

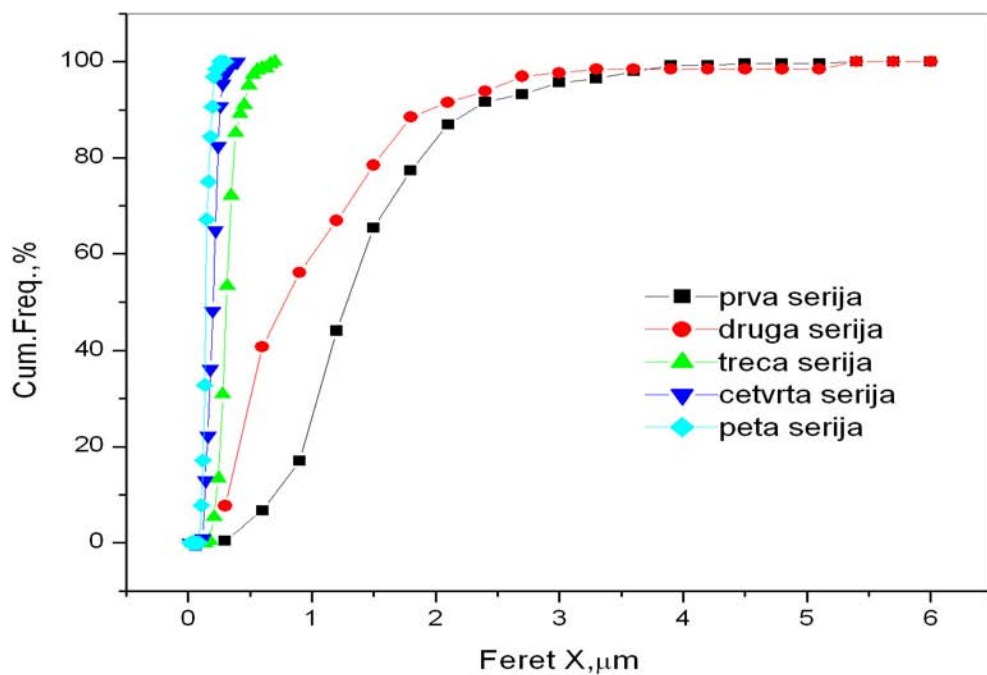




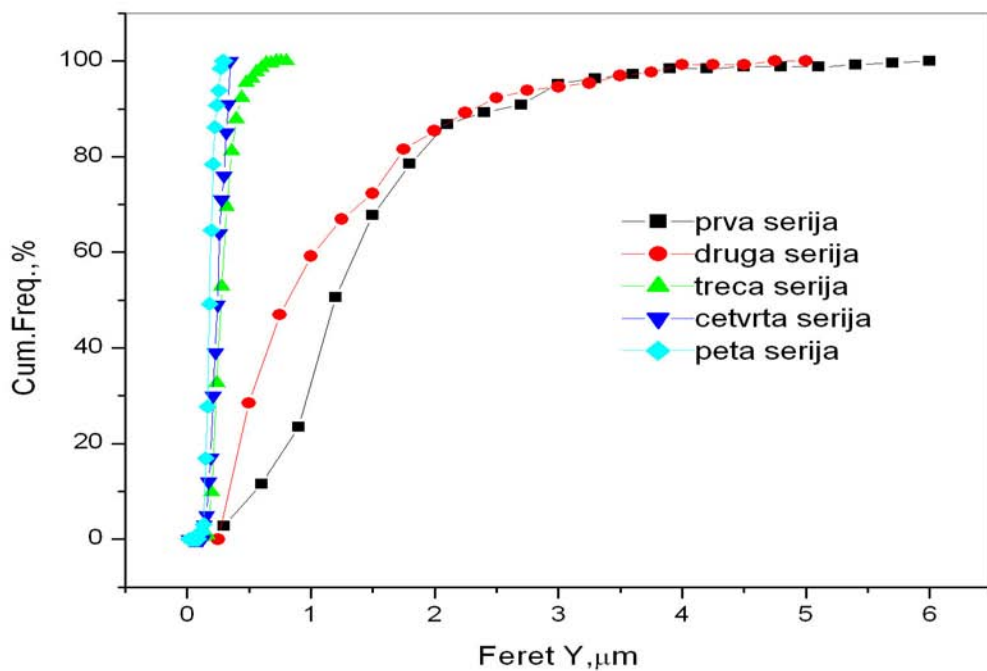
b)



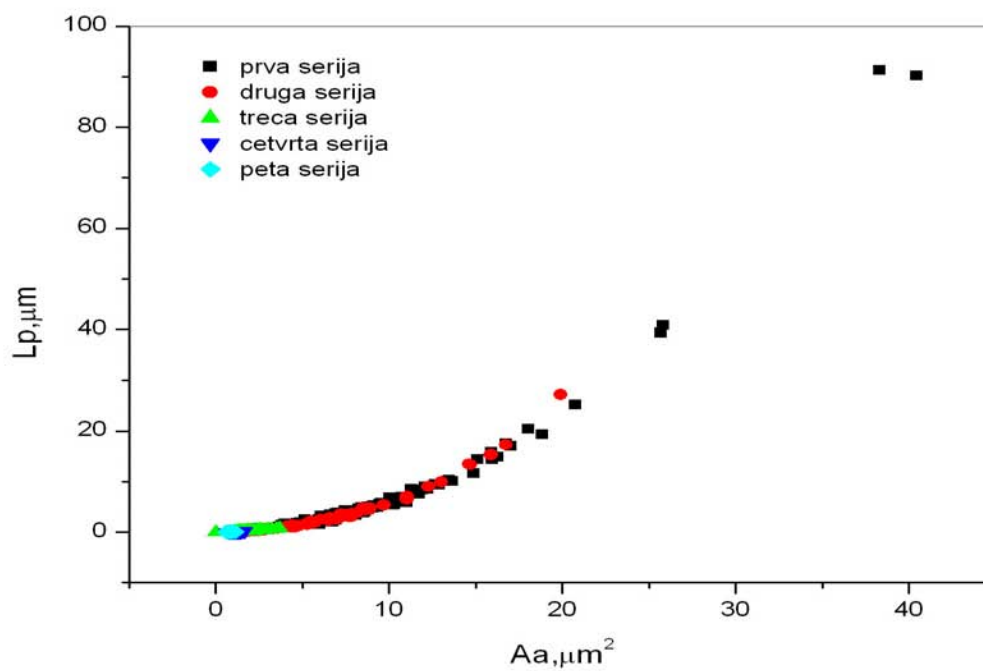
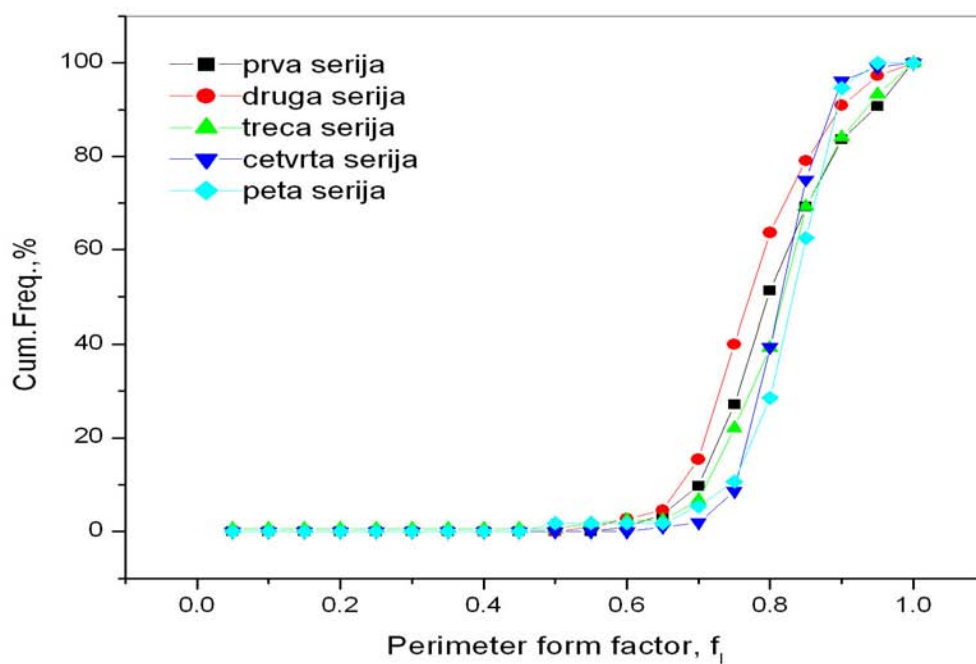
c)



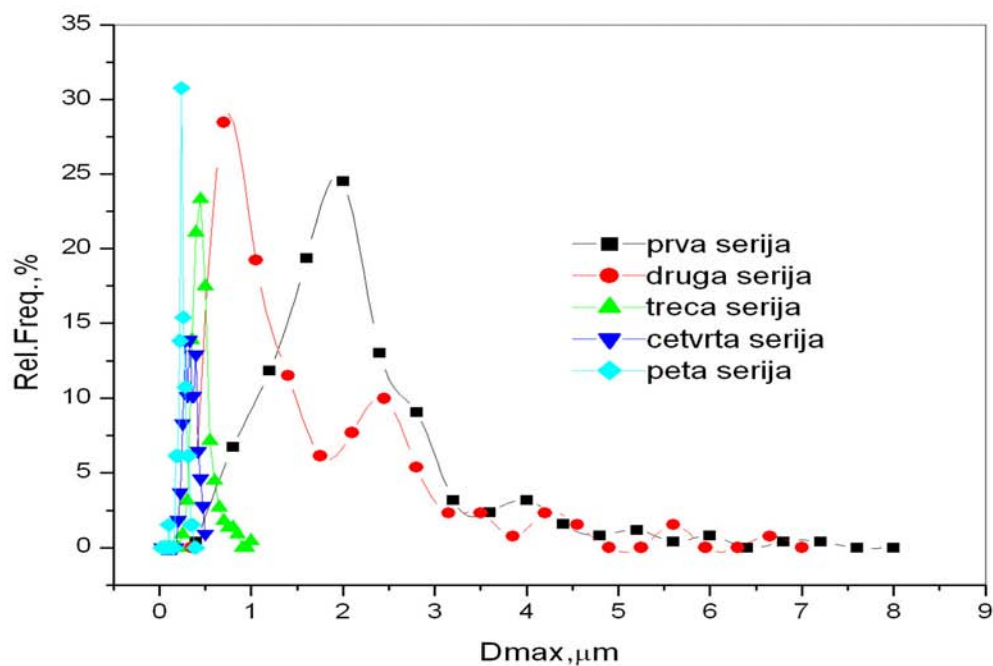
d)



e)



Slika 4.2.1 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja praha DLPLG svih pet serija: a) obim-Lp, b) poprečni presek-Aa, c) maksimalni dijametar čestice-Dmax, d) feret X, e) feret Y, f) perimeter form factor-fL, g) odnos Lp/Aa



Slika 4.2.2 Raspodela čestica pet serija praha DLPLG na osnovu maksimalnog dijametra čestica – D_{max}

Reproducibilnost metode zavisi od količine upotrebljenog polimera pa je potrebno raditi sa malim količinama polimera i u nekoliko serija pri čemu su izvesni određeni gubitci samog polimera što je nedostatak ove metode.

5 Zaključak

- Pravilne sferne čestice DLPLG-a velike uniformnosti i sa veličinama na submikronskoj skali su dobijene od komercijalnih granula na nov način tj. hemijskom metodom sa korišćenjem sistema rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent chemical method) i uz određene uslove centrifugiranja.
- Morfologija (veličina i oblik) čestica kao i uniformnost DLPLG praha se mogu modelirati menjanjem odgovarajućih parametara tokom eksperimenta kao što su vreme starenja sa nerastvaračem, vreme i brzina centrifugalnog procesiranja.
- Prah DLPLG-a sa najkraćim vremenom starenja sa nerastvaračem, najdužim vremenom i najvećom brzinom centrifugiranja sastoji se od čestica sfernih oblika, ima najveću uniformnost i nizak stepen aglomeracije a veličine čestica su na submikronskoj skali i to od 150 do 230nm.
- Novim pristupom sintezi tj. homogenizacijom praha DLPLG-a i gela BCP-a sintetizovan je kompozitni materijal BCP/DLPLG i to sa odnosom 65/35 w/w, 10/90 w/w, 5/95 w/w i 2/98/w. Kompozitni materijal sa različitim udelima polimerne i neorganske faze ima različitu distribuiranost faza i različitu morfologiju. Dobijeni kompozitni materijal bi imao odgovarajuću primenu u oralnoj hirurgiji tj. bilo bi ga moguće injektirati i njime popuniti kanale donje vilice, mandibule, ispuniti prostor između zuba i desni u slučaju paradentoze i paradentopatije, itd.
- IR spektar dobijenih submikronskih čestica DLPLG sadrži sve karakteristične trake za DLPLG. IR spektar sintetisanog kompozita BCP/DLPLG sadrži trake karakteristične za jedinjenja BCP-a. Na difraktogramima BCP-a i BCP/DLPLG su prisutne sve karakteristične difrakcione linije za ova jedinjenja. Na DSC dijagramima BCP/DLPLG uočava se jedino pik ostakljivanja jer je kopolimer DLPLG amorfan a BCP termostabilan u datom opsegu temperatura. SEM fotografije pet serija praha DLPLG ukazuju na smanjenje veličina čestica, smanjenje aglomeracije i povećanje uniformnosti čestica počev od prve serije ka petoj seriji. U slučaju uzorka samog BCP-a na osnovu SEM fotografija vidi se da su čestice BCP-a nepravilnih oblika kao i da su aglomerisane. Sa SEM fotografija kompozita BCP/DLPLG sa različitim odnosom keramike i polimera vidi se da su čestice u slučaju kompozita sa većim udelom

polimera manje aglomerisane, homogenizovanije, sfernih i pravilnijih oblika. Dobijeni rezultati stereološke analize pokazuju da su u ovom istraživanju novom metodom dobijene čestice kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) submikronskih veličina (150 do 230nm) i velike uniformnosti.

- Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da ova istraživanja predstavljaju dalji doprinos u dobijanju sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata u organizmu jer su dobijene čestice kopolimera DLPLG pravilnih sfernih oblika, uske raspodele veličina i sa veličinama na submikronskoj skali što je osnovni zahtev dostave medikamenata u organizmu. Takođe, novim pristupom sintezi dobijen je kompozitni materijal BCP/DLPLG morfoloških i strukturnih karakteristika koje bi ga potencijalno činile pogodnijim za primenu u određenim granama rekonstruktivne medicine.

6 Literatura

1. J. Park, R. S. Lakes., "Biomaterials – an Introduction", Plenum Press, New York, (1992).
2. M. Agrawal, "Reconstructing the human body using biomaterials", JOM, January (1998), p. 31-35.
3. C. R. Blanchard "Biomaterials: Body Parts of the Future", Technology Today, SwRI Fall1995
4. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, (Eds.), "An Introduction to Biomaterials", Elsevier Inc, (2004)
5. J. M. Anderson, M. S. Shive, "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres", Advanced Drug Delivery Reviews, 28, (1997), p. 5-24
6. J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, L. L. Hench, "Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering", Biomaterials, 27, (2006), p. 964 - 973
7. K. Zhang, Y. Ma, L. F. Francis "Porous polymer/bioactive glass composites for soft-to-hard tissue interfaces", Journal of Biomedical Materials Research 61,4, (2002), p. 551 - 563
8. J. Katz, "Developments in Medical Polymers for Biomaterials Applications", Medical Device & Diagnostic Industry Magazine, (2001)
9. N. Ignjatović, "Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksiapatit-polilaktid kompozitnih biomaterijala", Doktorska disertacija, Tehnološko- Metalurški fakultet, Beograd, 2001
10. L. L. Hench, "Bioceramics", Journal of American Ceramic Society, 81, (1998), p. 1705-1728.
11. <http://www.biocomposites.com/>
12. N. Ignjatović, M. Plavšić, D. Uskoković, "Composite biomaterial hydroxyapatite/poly-L-lactide (collagen) with poly-L-lactide different molecular weight", Advanced Engineering Materials, 2, (2000), p. 511-514.
13. <http://www.engr.sjsu.edu/WofMate/biomaterials.htm>
14. K.Y. Wang, J.G. Horne, P. A. Devane, T. Wilson, J. H. Miller, "Chemical eluates from ultra-high molecular weight polyethylene and fibroblast proliferation", Journal of Orthopaedic Surgery, 3, (2001), p. 43-48
15. L. George, "Bioceramics, Materials and Applications III", Ceramic Transactions (USA), 110, (2000), p. 198-206

16. <http://www.ceramic-materials.com/ceramat/oxide.html>
17. <http://biomed.tamu.edu/biomaterials/default.htm>
18. <http://biomaterials.berkeley.edu/>
19. J. Blaker, J. E. Gough, V. Maquet, I. Notingher, A. R. Boccaccini "In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67A, 4, (2003) p. 1401 - 1411
20. K Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials* 21, (2000), p. 667-681.
21. J. R. Jones, L. L. Hench, "Biomedical materials", Elsevier Academic Press, (2005), p. 108 - 115
22. M. E. Gomes, V. I. Sikavitsas, E. Behraves, R. L. Reis, A. G. Mikos "Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67A, 1, (2003), p. 87 - 95
23. W. Suchanek, M. Yoshimura, "Processing and Properties of Hydroxyapatite-Based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implants", *Journal of Materials Research*, 13, (1998), p. 94-117.
24. Q. Fu, N. Zhou, W. Huang, D. Wang, L. Zhang, H. Li, "Effects of nano HAP on biological and structural properties of glass bone cement" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74, (2005), p. 156-163
25. E. Schacht "Biodegradable polymers for biomedical applications" *European Cells and Materials*, 5, 1, (2003), p. 58-61
26. S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review" *Composites Science and Technology*, 61, 9, (2001), p. 1189-1224
27. N. Ignjatović, M. Plavšić, M. Miljković, Lj. Živković, D. Uskoković, "Microstructural characteristic of Ca-hydroxyapatite/poly-L-lactide based composites", *Journal of Microscopy*, 196, (1999), p. 243-248.
28. K. C. Dee, R. Bizios, "Mini-review: Proactive biomaterials and bone tissue engineering", *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 4, (1996), p. 438-442
29. <http://www.npl.co.uk/materials/biomaterials/>

30. G. Khang, J. M. Rhee, P. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, I. Lee, "Preparation and characterization of small intestine submucosa powder impregnated poly(L-lactide) scaffolds: the application for tissue engineered bone and cartilage", *Macromolecular Research*, 10, 3, (2002), p. 158-167
31. C. M. Agrawal, R. B. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 2 ,(2003), p. 141 - 150
32. Y. Choi, S. Park, H. Suh, "Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres" *Biomaterials*, 26, (2005), p. 5855-5863.
33. G. K. Carrasquillo, H. R. Costantino, R.A.Cordero, C. C. Hsu, K. Griebenow, "On the structural preservation of recombinant human growth hormone in a dried film of a synthetic biodegradable polymer", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 2, (1999), p. 163-173
34. K. C. Dee, D. A. Puleo, R. Bizios, "An Introduction To Tissue- Biomaterial Interactions", *Wiley InterScience* (www.willeyurope.com), 2002
35. <http://www.millenum-biologix.com>
36. H. Q. Mao, I. Shipanova-Kadiyala, Z. Zhao, A. Brown, K. Leong, "Biodegradable poly(terephthalate-co-phosphate)s:synthesis, characterization and drug-release properties" *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 16, 2, (2005), p. 135–161
37. J. H de Groot, R. de Vrijer, A.J.Pennings, J. Klompmaker, R.P.H. Veth, H.W.B Jansen, "Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses", *Biomaterials*, 17, (1996), p. 163-173
38. I. Resiak, G. Rokicki, "Modified polyurethanes for biomedical applications", *Polimery*, 45, (2000), p. 592-602
39. C. M. Agrawal, R. B. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research*, 55 (2001), p. 141-150
40. X. Liu, P. X. Ma, "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering" *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 3, (2004), p. 477–486
41. M. N. V. Ravi Kumar, "Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices", *J. Pharm Pharmaceutic Sci*, 3, 2, (2000), p. 234-258
42. S. M. Li, H. Garreau, M. Vert, "Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1:

- poly(DL-lactic acid)", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1, (1990), p. 123-130
43. K. U. Lewandrowski, J. D. Gresser, D. L. Wise, R. L. White, D. J. Trantolo, "Osteoconductivity of aninjectable and bioresorbable poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone cement". *Biomaterials*, 21, (2000), p. 293-298
 44. M. L. Jones, "Injection-Molded Polyester Medical Devices: Preventing Failure through the Proper Design of Parts and Molds", *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, (1997)
 45. <http://www.btec.cmu.edu/reFramed/tutorial/biomaterials/biomaterials.html>
 46. M. A. Heidarani, "Tissue Engineering: A Biological Solution for Tissue Damage, Loss or End Stage Organ Failure" Review Article, *Iran. Biomed. J.*, 4, (2000), p. 1-5
 47. J. E. Davies, L. Guan, D. Lickorish, "Anti-Inflammatory Biodegradable Scaffolds", *European Cells and Materials* 7, 1, (2004), p. 28-36
 48. J. A. Goldstein, F. A. Quereshy, A. R. Cohen, "Early experience with biodegradable fixation for congenital pediatric craniofacial surgery" *Journal of Craniofacial Surgery*, 8, (1997), p. 110-115
 49. J. S. Lee, G. S. Chae, T. K. An, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, "Preparation of 5-fluorouracil-loaded poly(L-lactide-co-glycolide) wafer and evaluation in vitro release behavior", *Macromolecular Research*, 11, 3, (2003), p. 183-188
 50. D. L. Garrec, S. Gori, L. Luo, D. Lessard, D. C. Smith, M. A. Yessine, M. Ranger, J. C. Leroux, "Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation", *Journal of Controlled Release*, 99, (2004), p. 83-101
 51. V. V. Sethuraman, A. J. Hickey, "Powder Properties and Their Influence on Dry Powder Inhaler Delivery of an Antitubercular Drug", *AAPS PharmSciTech*, 3, 4, (2002), article 28
 52. J. Olivier, "Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles" *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2, (2005), p. 108-119.
 53. P. B. O'Donnell and J. W. McGinity, "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 28, (1997), p.25-42

54. A. R. Mollo, I. O. Corrigan, "An investigation of the mechanism of release of the amphoteric drug amoxicillin from poly(D,L-lactide-co-glycolide) matrices", *Pharmaceutical Development and Technology*, 7, 3, (2003), p. 333-343
55. A. O. Eniola, D. A. Hammer, "Characterization of biodegradable drug delivery vehicles with the adhesive properties of leukocytes II: effect of degradation on targeting activity", *Biomaterials*, 26, (2005), p. 661-670
56. J. Panyam, M. M. Dali, S. K. Sahoo, W. Ma, S. S. Chakravarthi, G. L. Amidon, R. J. Levy, V. Labhasetwar, "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles", *Journal of Controlled Release*, 92, 1, (2003), p. 173-187
57. D. Dean, N. S. Topham, S. C. Meneghetti, M. S. Wolfe, K. Jepsen, S He, J. E. K. Chen, J.P. Fisher, M. Cooke, C. Rimnac, A.G. Mikos, "Poly(propylene fumarate) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) as scaffold materials for solid and foam-coated tissue-engineered constructs for cranial reconstruction", *Tissue Engineering*, 9, 3, (2003), p. 495-504
58. H. W. Kim, J. C. Knowles, H. E. Kim, "Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery", *Biomaterials*, 25, (2004), p.1279-87
59. J. A. Hubbell, C. P. Pathak, A. Sawhney. N. Desai, S. Hossainy, J L. H. West, "Treating medical conditions by polymerizing macromers to form polymeric materials", *Pharmaceutical Patents*, USA Patent: 6,465,001, (2002)
60. J.M. Pollok, M. Lorenzen, P. A. Kölln, É. Török, P. M. Kaufmann, D. Kluth, K. H. Bohuslavizki, M. Gundlach, X. Rogiers "In vitro Function of Islets of Langerhans Encapsulated with a Membrane of Porcine Chondrocytes for Immunoisolation", *Digestive Surgery*, 18, 3, (2002), p. 204-210
61. S. Prabha, V. Labhasetwar, "Critical Determinants in PLGA/PLA Nanoparticle-Mediated Gene Expression" *Pharmaceutical Research*, 21, 2, (2004), p. 354-364
62. T. G. Park, "Perfusion culture of hepatocytes within galactose-derivatized biodegradable poly(lactide-co-glycolide) scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts ", *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 1, (2001), p. 127-135

63. R. A. Miller, J. M. Brady, D. E. Cutright, "Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios." *Journal of Biomedical Materials Research*, 11, (1977), p. 711–719
64. A. Delgado, E. C. Lavelle, M. Hartshorne, S. S. Davis, "PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems" *Vaccine*, 17, 22, (1999), p. 2927-2938
65. J. C. Middleton, A. J. Tipton, "Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices", *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, (1998)
66. Food and Drug Administration Website: www.fda.gov
67. C. Martinez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, "Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(dl-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration", *Journal of Controlled Release*, 99, (2004), p. 41-52
68. E. Suljovrujić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Gamma irradiation processing of hydroxyapatite/poly- L-lactide composite biomaterial", *Radiation Physics and Chemistry*, 67, (2003), p. 375-379
69. M. Kiremitci-Gumusderelioglu, G. Deniz, "Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly(DL-lactide)/Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Films", *Turk J. Chem*, 23(1999), p. 153-161
70. Y. Shikinami, M. Okuno, "Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics", *Biomaterials* 20 (1999), p. 859-877
71. F. Lacomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, R. Bodmeier, "Polymer blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer", *Journal of Controlled Release*, 99, 1, (2004), p. 1-13
72. A. Matshumoto, Y. Matsukawa, T. Suzuki, H. Yoshino, M. Kobayashi, "The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: principle and application to cisplatin-loaded microspheres", *Journal of Controlled Release*, 48, 1, (1997), p. 19-27
73. J. Hanes, C. E. Evora, A. Ben-Jebria, D. A. Edwards, R. Langer, "Porous dry-powder PLGA microspheres coated with lung surfactant for systematic insulin delivery via the

- lung", Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials 24, (1997), p. 57-58
74. V. A. Philip, R. C. Mehta, M. K. Mazumder, P. P. DeLuca, "Effect of surface treatment on the respirable fractions of PLGA microspheres formulated for dry powder inhalers", International Journal of Pharmaceutics, 151, 2, (1997), p. 165-174
 75. V. A. Philip, R. C. Mehta, P. P. DeLuca, "In vitro and in vivo respirable fractions of isopropanol treated PLGA microspheres using a dry powder inhaler", International Journal of Pharmaceutics, 151, 2, (1997), p. 175-182
 76. R. Kenley, L. Marden, T. Turek, L. Jin, E. Ron, J. O. Hollinger, "Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2", Journal of Biomedical Materials Research, 28, 10, (1994), p. 1139-47
 77. J. J. M. Rodrigues, L. K. de Melo, J. C. E. De Matos, M. M. G. de Aguiar, C. J. A. da Silva, "The effect of cyclodextrins on the in vitro and in vivo properties of insulin-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres", Artificial Organs 27, 5, (2003), p. 497-507
 78. J. W. Nah, D. B. Lee, C. S. Cho, Y. I. Jeong, S. Ho. Kim, S.H. Kim, "Synthesis of Poly(DL-lactide-co-glycolide) Copolymers and Its Application (I). Release Characteristics of Clonazepam Using Poly(DL-lactide-co-glycolide) (80:20) Copolymers", Journal of the Korean Chemical Society, 42, 1, (1998), p. 92-98
 79. Y. Y. Hsu, J. D. Gresser, D. J. Trantolo, C. M. Lyons, P.R. J. Gangadharam, D. L. Wise, "In vitro controlled release of isoniazid from poly(lactide-co-glycolide) matrices", Journal of Controlled Release, 31, 3, (1994), p. 223-228
 80. A. E. Hawley, L. Illum, S. S. Davis, "Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake", Pharm Research, 14, 5, (1997), p. 657-61
 81. S. De, D. H. Robinson, "Particle Size and Temperature Effect on the Physical Stability of PLGA Nanospheres and Microspheres Containing Bodipy", AAPS PharmSciTech, 5, 4, (2004), article 53
 82. A. G. A. Coombes, S. S. Davis, E. H. Schacht, "Polymer microspheres and a method of production thereof", United States Patent 5,922,357, (1996)
 83. <http://www.dnatechnologies.com/>

84. I. Bala, S. Hariharan, M. R. Kumar, "PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21, 5, (2004), p. 387-422
85. F. Qian, A. Szymanski, J. Gao, "Fabrication and characterization of controlled release poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles", *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 4, (2002), p. 512-522
86. Y. Kawashima, H. Takeuchi, H. Yamamoto, K. Mimura, "Powdered polymeric nanoparticulate system to improve pulmonary delivery of calcitonin with dry powder inhalation", *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, 27, (2000), p. 229-230
87. J. Panyam, V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue" *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, (2003), p. 329-347
88. C. Thomasin, H. P. Merkle, B. A. Gander, "Physicochemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation", *International Journal of Pharmaceutics*, 147, 2, (1997), p. 173-186
89. H. Murakami, H. Yoshino, M. Mizobe, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima "Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) latex for surface-modifying material by a double coacervation method", *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, 23,(1996), p. 361-362
90. E. G. de Jalon, M. J. Blanco-Prieto, P. Ygartua, S. Santoyo "PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery", *Int. J. Pharm.* 226 (1-2), (2001), p 181-184
91. T. Uchida, A. Yagi, Y. Oda, S. Goto "Microencapsulation of ovalbumin in poly(lactide-co-glycolide) by an oil-in-oil solvent evaporation method", *Journal of Microencapsulation*, 13, 5, (1996), p. 509-18
92. H. Takahata, E. C. Lavelle, A. G. A. Coombes, S. S. Davis, "The distribution of protein associated with poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles and its degradation in simulated body fluids", *Journal of Controlled Release*, 50, 1-3, (1998), p. 237-246
93. S. Zhou, X. Liao, X. Li, X. Deng, H. Li, "Poly (DL-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems", *Journal of Controlled Release* 86, (2003), p. 195-205

94. M. N. V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, C. M. Lehr, "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers", *Biomaterials* 25, (2004), p. 1771–1777
95. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima "Utilization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for preparation of mini-depot tablets by direct compression", *J. Control Release*, 67, 1, (2000), p. 29-36
96. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, "Design and application of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for long acting depot matrix tablets" *Pharm Tech Japan*, 16, 11, (2000), p. 1615-1620
97. <http://www.deas.harvard.edu/.../encapsulation.html>
98. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, "Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method", *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 2, (1999), p. 143-152
99. O. V. Salata, "Applications of nanoparticles in biology and medicine", *Journal of nanobiotechnology*, 2, (2004), p. 1-6
100. D. T. O'Hogan, M. Singh, R. K. Gupta, "Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, (1998), p. 225-246
101. U. B. Kompella, K. Koushik, "Preparation of drug delivery systems using supercritical fluid technology" *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, 18, (2001) p. 173-99
102. C. Martinez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro. "Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration" *J. Controll.Rel.*, 99, (2004), p. 41-52
103. A. Daugherty, J. Cleland, E. Duenas, R. Mrsny, "Pharmacological modulation of the tissue response to implanted polylactic-co-glycolic acid microspheres" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44,1 (1997), p. 89-102.
104. Y. Jeong, J. Song, S. Kang, H. Ryu, Y. Lee, C. Choi, B. Shin, K. Kim, K. Ahn, S. Jung "Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid" *International Journal of Pharmaceutics* 259 (2003), p. 79-91.
105. S. S Feng, L Mu, K. Yin Win, G. Huang, "Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel", *Current Medicinal Chemistry*, 11, (2004) p. 413-424

106. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, "Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles" *Powder Technology*, 107 (2000), p. 137-143.
107. J. Vandervoort, A. Ludvig, "Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study", *International Journal of Pharmaceutics*, 238, (2002), p. 77-92
108. P. O'Hara, A. J. Hickney, "Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for tuberculosis: manufacture and characterization" *Pharm. Res.*, 178, (2000), p. 955-961
109. S. Hirosue, B. G. Mueller, R. S. Langer, R. C. Mulligan "Sub-100nm biodegradable polymer spheres capable of transporting and releasing nucleic acids", United States Patent 6,254,890 (2001)
110. H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, "Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions" *J. Controll. Rel.*, 102 (2005), p. 373-381
111. S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle, B. Gander, "A fast and Simple Method for Producing Biodegradable Nanospheres", *European Cells and Materials*, 7, 2, (2004), p. 28-34
112. A. G. A. Coombes, M. K. Yeh, E. C. Lavelle, "The control of protein release from poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method", *Journal of Controlled Release*, 52, 3, (1998), p. 311-320
113. J. B. Oldham, D. B. Porter, T. S. Tan, H. Brisby, B. L. Currier, A.G. Mikos, M. J. Yaszemski, "Influence of changes in experimental parameters on size of PLGA microspheres", *Proceed. Bioeng. Conf.*, 42, (1999), p. 681-685
114. Y. Li, M. Ogris, J. Pelisek, W. Roedl, "Stability and release characteristics of poly(D,L-lactide-co-glycolide) encapsulated CaPi-DNA coprecipitation", *International Journal of Pharmaceutics*, 269, 1, (2004), p.61-70
115. Y. Capan, G. Jiang, S. Giovagnoli, K. H. Na, P. P. DeLuca, "Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone", *AAPS PharmSciTech*, 4, 2, (2003), article 28

116. A. Sanchez, J. Vila-Jato, M. J. Alonso, "Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporine A", *International Journal of Pharmaceutics*, 99, 2-3, (1993), p. 263-273
117. Y-II Jeong, Y. H. Shim, C. Choi, M. K. Jang, G. M. Shin, J. W. Nah, "Surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide) prepared with (poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol))", *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 4, (2003), p. 1116-1123
118. J. W. Nah, Y-II. Jeong, J. J. Koh, "Drug release from nanoparticles of Poly(DL-lactide-co-glycolide)", *Korean J. Chem. Eng.*, 17, 2, (2000), p. 230-236
119. H. J. Jeon, Y-II. Jeong, M. K. Jang, Y. H. Park, J. W. Nah, "Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics", *International Journal of Pharmaceutics*, 207, 1-2, (2002), p. 99-108
120. D. T. Birnbaum, J. D. Kosmala, L. Brannon-Peppas, "Optimization of Preparation techniques for Poly(Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles", *Journal of Nanoparticle Research*, 2, 2, (2000), p. 173-181
121. M. J. Tsung, D. J. Burgess, "Preparation and Characterization of Gelatin Surface Modified PLGA Microspheres", *AAPS PharmSci*, 3, 1, (2001), article 11
122. M. Muller, J. Voros, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H. P. Merkle, M. Spencer, "Surface modification of PLGA microspheres", *J. Biomed Mater Res A*, 66, 1, (2003), p. 55-61
123. T. Niwa, H. Takeuchi, T. Nino, N. Kunou, Y. Kawashima, "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with DL-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior", *Journal of Controlled Release*, 25, 1-2, (1993), p. 89-98
124. H. Seong, T. K. An, G. Khang, S. U. Choi, C. O. Lee, H. B. Lee, "BCNU-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) wafer and antitumor activity against XF-498 human CNS tumor cells in vitro", *International Journal of Pharmaceutics*, 251, (1-2), (2003), p. 1-12

125. N. Passerini, D. Craig, M.Q. Dip, "Characterization of cyclosporin A loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres using modulated temperature differential scanning calorimetry", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 7, (2002), p. 913-919
126. N. Passerini, D. Q. Craig, "An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC.", *Journal of Controlled Release*, 73, 1, (2001), p. 111-5
127. B. Hertzog, T. Mottl, D. Yim, E. Mathiowitz, "Microspheres for use in a novel electromagnetic bioadhesion testing system", *Proceedings of the International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (1997)*, p. 77-92
128. Y. W. Jo, B. H. Woo, A. M. Hazrati, P. P. De Luca, "Use of Pharmasept Unit for Processing Microspheres", *AAPS PharmSciTech*, 2, 1, (2001), article 5
129. A. G. A. Coombes, M. K. Yeh, E. C. Lavelle, S. S. Davis, "The control of protein release from poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method", *Journal of Controlled Release*, 52, 3, (1998), p. 311-320
130. C. J. Liao, C. F. Chen, J. H. Chen, S. F. Chiang, Y. J. Lin, K. Y. Chang, "Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method", *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 4, (2001), p. 676-681
131. G. Vozzi, C. J. Flaim, F. Bianchi, A. Ahluwalia, S. Bhatia, "Microfabricated PLGA scaffolds: a comparative study for application to tissue engineering", *Materials Science and Engineering C* 760 (2002), p. 3-7
132. S. Kannan, A. Balamurugan, S. Rajeswari, "Bio-composites: A Review of literature", *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 14, 2, (2001), p. 30-36
133. N. Ignjatović, D. Uskoković, "Synthesis and application of hydroxyapatite/polylactide composite biomaterial", *Applied Surface Science*, 238, 1-4, (2004), p. 314-319
134. A. G. Mikos, M. D. Lyman, L. E. Freed, R. Langer, "Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture", *Biomaterials*, 15, 1, (1994), p. 55-58

135. X. Zhang, U. P. Wiss, D. Pichora and M. F. Goossen, "A mechanistics study of antibiotic release from biodegradable poly(d,l-lactide) cylinders" *J. Controlled Release*, 31, (1994), p. 128-144
136. M. Radić, N. Ignjatović, Z. Nedić, M. Mitrić, D. Miličević, D. Uskoković "Synthesis and Characterization of Biphasic Calcium Phosphate/Poly-(DL-Lactide-Co-Glycolide) Biocomposite ", *Materials Science Forum*,494, (2005), p. 537-542
137. I. Soriano, C. Evora, "Formulation of calcium phosphates/poly(d,l-lactide) blends containing gentamicin for bone implantation", *Journal of Controlled Release*, 68, 1, (2000), p. 121-134
138. S. W. N. Ueng, L. J. Yuan, N. Lee, S. S. Lin, S. J. Liu, E. C. Chan, J. H. Weng, "In vivo study of hot compressing molded 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide) antibiotic beads in rabbits", *Journal of Orthopaedic Research*, 20, 4, (2002), p. 654-661
139. V. Alt, H. J. Pfefferle, J. Kreuter, J. P. Stahl, T. Pavlidis, C. Meyer, J. Mockwitz, S. Wensch, R. Schnettler, "Effect of glycerol-L-lactide coating polymer on bone ingrowth of bFGF-coated hydroxyapatite implants", *Journal of Controlled Release*,99, 1, (2004), p. 103-111
140. N. Ignjatović, S. Tomić, M. Dakić., M. Miljković, M. Plavšić, D. Uskoković, "Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials ", *Biomaterials*, 20, (1999), p. 809-816.
141. S. Lazić, "Formiranje hidroksiapatita iz visokopresičenih rastvora i sorpcione karakteristike", Doktorska disertacija, Tehnološko- Metalurški fakultet, Katedra za hemijsko inženjerstvo, Beograd, 1991.
142. C. Durucan, P. W. Brown, "Calcium-deficient hydroxyapatite-PLGA composites:Mechanical and Microstructural investigation", *Journal of Biomedical Materials Research*, 51 (4), (2000), p. 726-734
143. N. Ignjatović, P. Ninkov, Z. Ajduković, V. Konstantinović, D. Uskoković, "Biphasic calcium phosphate/poly (DL-lactide-co-glycolide) biocomposite as filler and blocks for reparation of bone tissue", *Materials Science Forum*, 494, (2005), p. 519-524
144. C. G. Simon, J. Khatri, A. Chetan, S. A. Wight, F. W. Wang,. "Preliminary raport on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly (lactide-co-glycolide) microspheres", *Journal of Ortopedic Research*, 20(3), (2002), p. 473-482

145. M. Ara, M. Watanabe, Y. Imai, "Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid)", *Biomaterials* 23 (2002), p. 2479-2483
146. R. Zhang, P. X. Ma, "Composite scaffolds for bone tissue engineering degradation", 47th Annual Meeting, Orthopaedic research Society, February 25-28, (2001), San Francisco, California
147. R. Zhang, P. X. Ma, "Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology", *Journal of Biomedical Materials Research*, 44, 4, (1999), p. 446-455
148. T. Ushida, G. Chen, T. Tamaki, Z. Umeyu, T. Tateishi, "A three-dimensional porous scaffold of biodegradable synthetic polymers and porous hydroxyapatite beads for bone tissue engineering" *Key Engineering Materials*, 192-195 (Bioceramics), (2001), p. 519-522
149. H. M. Elgendy, M. E. Norman, A. R. Keaton, C. T. Laurencin, "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material", *Biomaterials*, 14, 4, (1993), p. 263-269
150. L. Lu, A. Mikos, "The importance of new processing technique in tissue engineering", *MRS Bull.*, 21, (1996), p. 28-31
151. R. C. Thomson, M. J. Yaszemski, J. M. Powers, A. G. Mikos, "Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration" *Biomaterials* 19, (1998), p.1935-1943
152. C. Laurencin, M. Borden, M. Attawia, F. Ko, G. Morrill, "Polymer based tissue engineering of bone", *Polymer Preprints*, 39, (1998), p.122-123
153. P. Q. Ruhe, E. L. Hedberg, B. N. T. Padron, P. H. M. Spauwen, J. A. Jensen, A. G. Mikos, "rhBMP-2 release from injectable poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites", *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85, (2003), p. 75-81
154. I Calandrelli, B. Immirzi, M. Malinconico, M. G. Volpe, A. Oliva, F. Della Ragione, "Preparation and characterisation of composites based on biodegradable polymers for in vivo application", *Polymer*, 41, (2000), p. 8027-8033

155. K. G. Marra, L E Weiss, J. W. Calvert, P. N. Kumta, "Biocompatible compositions and methods of using same " United States Patent 6, 165, 486, (1998)
156. J. K. Sherwood, S. L. Riley, R. Palazzolo, S. C. Brown, D. C. Monkhouse, M. Coates, L. G. Griffith, L. K. Landeen, A. Ratcliffe, "A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair", *Biomaterials*, 23, (2002), p. 4739-4751
157. T. Watanabel, S. Ban, T. Itol, S. Tsuruta, T. Kawai, H. Nakamura, "Oriented Needle-Like Apatite and Biodegradable Copolymer Composite Membranes", *Key Engineering Materials*, 240-242, (2003), p. 191-194.
158. N. Ignjatović, Z. Ajdukovic, D. Uskokovic, "New biocomposite [biphasic calcium phosphate/ poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent] filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16, (2005), p. 621-626
159. M. Stevanović, N. Ignjatović, B. Jordović, D. Uskoković, "Stereological analysis of the poly (DL-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, (2006), article in press
160. M. Radić, N. Ignjatović, M. Mitrić, M. Miljković D. Milićević, D. Uskoković, "Uticaj masenog udela polimera u kompozitu HAp/PLLA na termička svojstva kompozita", *BILTEN Vinča*, 1-4, (2004), p. 56-62
161. S. Mentus, U. Mioč, "Odabrane metode fizičko-hemijske analize", *Fakultet za fizičku hemiju*, (1992), p 41-69, p 113-121, p. 193-208.
162. S. Milosavljević, "Strukturne instrumentalne metode", *Hemijski fakultet, Beograd* (1994), p. 39-107.
163. H. M. Rietveld, "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures", *J. Appl. Cryst.* 2, (1969), p. 65-71
164. R. W. Cheary, A. Coelho, "A fundamental parameters approach to X-ray line-profile fitting" *J. Appl. Cryst.* 25, (1992), p.109-121
165. E. E. Underwood, *Quantitative stereology* (Addison Wesley, Reading, MA. 1969) p.330
166. O. Milosevic, B. Jordovic, D. Uskokovic, "Preparation of fine spherical ZnO powders by an ultrasonic spray pyrolysis method", *Materials Letters*, 19, (1994), p. 165-170

167. P. van de Witte, A. Boorsma, H. Esselbrugge, P. J. Dijkstra, J. W. A. van den Berg and J. Feijen "Differential Scanning Calorimetry Study of Phase Transitions in Poly(lactide)-Chloroform-Methanol Systems", *Macromolecules*, 29, (1996), p. 212-219
168. N. Ignjatović, V. Savić, S. Najman, M. Plavšić, D. Uskoković, "A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy", *Biomaterials*, 22, (2001), p. 571-575
169. C. J. Ponchert, *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, Edition III, (1981)
170. Lj. Bellamy, "The IR spectra of complex molecules", London, Chapman & Hall, (1975), p. 247-258
171. JCPDS File No. 34-0010 (HAp), International Center for Diffraction Data
172. JCPDS File No. 9-0432 (β -TCP), International Center for Diffraction Data B.
173. D. Cullity, "Elements of X-Ray Diffraction", 2nd Ed., Adison Lesley, London (1978).
174. S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, J.P. Laval, "Determination of Calcium/Phosphorus Apatites Using X-ray diffractometry", *J. Am. Ceram. Soc.*, 84, (2), (2001), p. 359-66.
175. S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Tomas, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Syntheses, characterisation and thermal stability of powders", *Biomaterials*, 23, (2002), p. 1065-1072.
176. S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering", *Biomaterials*, 23, (2002), p. 1073-1080.
177. S. Raynaud, E. Champion, J.P. Lafon, D. Bernache-Assollant, " Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot presed ceramics", *Biomaterials*, 23, (2002), p. 1081-1089