

## Uticaj neutralizacije na svojstva poroznih hidrogelova na bazi hidroksiapatita i poli(metakrilne kiseline) sintetisanih slobodno-radikalnom polimerizacijom

VUKAŠIN Đ. UGRINOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

VESNA V. PANIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd

ĐORĐE N. VELJOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

PAVLE M. SPASOJEVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd

SANJA I. ŠEŠLIJA, Univerzitet u Beogradu,

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

ĐORĐE T. JANAČKOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Originalni naučni rad

UDC: 544.773.432

DOI: 10.5937/tehnika1805613U

*Ciljevi* - Cilj ove studije bio je razvoj biokompatibilnih kompozitnih hidrogelova, koji su slične strukture kao prirodno koštano tkivo, inkorporacijom ~60 mas % kalcijum-hidroksiapatita (HA) u matricu hidrogela. Takođe, ispitan je uticaj neutralizacije prekursora polimerne mreže na kinetiku bubrenja i ravnotežni stepen bubrenja (SDeq).

*Metode* - Kompozitni hidrogelovi, sastavljeni od HA i poli(metakrilne kiseline) (PMAA), sintetisani su slobodno-radikalnom polimerizacijom, pri različitim stepenima neutralizacije prekursora (SN). Svi sintetisani kompoziti sadrže visok maseni udeo HA (~60 mas %). Kompoziti su okarakterisani metodama skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i dinamičko-mehaničke analize (DMA). SDeq i kinetika bubrenja ispitivani su u destilovanoj vodi i simuliranoj telesnoj tečnosti (SBF).

*Rezultati* - Morfološka ispitivanja pokazala su uniformnu raspodelu i dobru povezanost sferičnih čestica apatita sa polimernom matricom. Analiza procesa bubrenja pokazala je proporcionalnu zavisnost SN i SDeq kompozita. Reološka ispitivanja ukazala su na obrnuto proporcionalnu zavisnost između SN i vrednosti modula sačuvane energije, koji su iznosili 55130 Pa u slučaju potpune neutralizacije i 77480 Pa u slučaju 0% neutralizacije.

*Značaj* - Predstavljena je jednostavna metoda za sintezu kompozitnih hidrogelova sa visokim masenim udelom nanočestica punioca. Inkorporacijom nanočestica HA postignuto je značajno poboljšanje mehaničkih svojstava hidrogelova, dok je istovremeno pokazano da je promenom SN moguće kontrolisati kinetiku bubrenja hidrogelova.

**Ključne reči:** kompozit, hidrogel, hidroksiapatit, poli(metakrilna kiselina)

### 1. UVOD

Skafoldi predstavljaju trodimenzionalne porozne nosače koji se ugrađuju u ljudski organizam u cilju pri-

vremenog ili stalnog preuzimanja funkcije oštećenog koštanog tkiva. Skafoldi pružaju potporu za rast i proliferaciju osteoblasta i formiranje koštanog vanćelijskog matriksa, što je preduslov za oporavak oštećenog tkiva. Da bi uspešno ispunili ovu funkciju, neophodno je da budu visoko porozni, biokompatibilni, netoksični, kao i da poseduju zadovoljavajuća mehanička svojstva kako bi izdržali statička i dinamička naprezanja i fiziološka opterećenja in vivo [1].

Hidrogelovi, trodimenzionalni, hidrofilni, umreženi polimeri, privlače veliku pažnju istraživača u

---

Adresa autora: Vukašin Ugrinović, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Karne-  
gijeva 4

e-mail: vukasin.ugrinovic@yandex.com

Rad primljen: 24.04.2018.

Rad prihvaćen: 23.07.2018.

oblasti biomedicine zbog mogućnosti bubrenja i do nekoliko puta veće zapremine od početne, pri tome zadržavajući početni oblik [2]. Pored toga, mogu se sintetisati pod relativno blagim uslovima i implantirati na minimalno invazivan način [3].

Hidrofilne polimerne mreže na bazi poli (meta-krilne kiseline) (PMAA) istražuju se za proizvodnju hidrogelova za biomedicinske svrhe zbog pH osetljivosti, tj. mogućnosti nagle promene svojstava kao odgovor na promenu pH sredine [4]. Moć bubrenja PMAA hidrogelova u velikoj meri zavisi od pH sredine zbog jonizacije/dejonizacije karboksilnih grupa prisutnih u strukturi polimera. Naime, pri visokim vrednostima pH,  $-COOH$  grupe su u obliku negativno naelektrisanih karboksilatnih anjona,  $-COO^-$ , koji se međusobno odbijaju, dovodeći do širenja polimerne mreže i obimnog bubrenja. Pri vrednostima pH nižim od 5.5, dominantan je protonovan oblik karboksilnih grupa, tako da je međusobno odbijanje, a time i bubrenje mreže hidrogelova mnogo manje [4].

Nažalost, nezadovoljavajuća mehanička svojstva sužavaju oblast primene hidrogelova u inženjerstvu tkiva, ali se mogu unaprediti inkorporacijom nanočestičnih punilaca. Kompozitni hidrogelovi kombinuju fleksibilnost polimerne mreže i mehaničku čvrstoću keramičkih punilaca. Postoji veliki broj različitih kompozita na bazi polimera i keramičkih punilaca objavljenih u literaturi; punioci koji se najčešće koriste su čestice hidroksiapatita, trikalcijum-fosfata, biostakala i karbonskih nanocevi [2]. Slobodno-radikalna polimerizacija je jedan od uobičajenih postupaka sinteze kompozitnih hidrogelova koji omogućava jednostavnu inkorporaciju čestica punilaca i in situ polimerizaciju hidrogelova [5-8].

S obzirom da hidroksiapatit (HA) čini oko 60 mas % koštanog tkiva čoveka široko se istražuje kao osnovna komponenta skafolda za primenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Hemijska i strukturna sličnost sa koštanim mineralima osnovni su razlog odlične biokompatibilnosti HA. Takođe, poseduje osteokonduktivna svojstva i promovise adheziju, proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta i mezenhimalnih ćelija [9].

Nekoliko istraživača kombinovale je hidrogelove sa nanočestičnim HA u cilju integracije poželjnih svojstava pojedinačnih faza u rezultujućim kompozitnim materijalima.

Kumar i saradnici [10] sintetisali su injektibilne hitin/poli(kaprolakton) hidrogelove ojačane nanočesticama HA i pokazali da su se vrednosti modula elastičnosti čistih hidrogelova ( $7.2 \pm 0.3$  kPa) dvostruko povećale nakon dodavanja 25 mas % HA ( $14.2 \pm 0.5$  kPa), dok je u istraživanju Hu-a i saradnika [11] inkorporacija čestica HA osim značajnog poboljšanja pritisne čvrstoće (400 MPa za kompozite sa 30 mas %

HA) i modula elastičnosti (1104 MPa za kompozite sa 35 mas % HA) uticala i na poboljšanje diferencijacije MG63 ćelija nalik osteoblastima u odnosu na čiste agarozne hidrogelove.

Li i saradnici [12] su u svom radu dodatkom 15 mas % nano-HA u poliakrilamidne hidrogelove postigli povećanje vrednosti zatezne čvrstoće za 185% i kompresivne čvrstoće za 63%, dok je Čang razvio HA/hitin hidrogelove koji su imali poroznu strukturu, visoku pritisnu čvrstoću i odličnu biokompatibilnost [13]. Dodatak 20 mas % HA značajno je povećao vrednosti pritisne čvrstoće u odnosu na čiste hidrogelove. Modul elastičnosti kompozitnih hidrogelova je iznosio približno 320 kPa, dok je u slučaju monofaznih hidrogelova iznosio približno 23 kPa.

Cilj ove studije bio je razvoj biokompatibilnih kompozitnih hidrogelova, koji su slične strukture kao prirodno koštano tkivo, inkorporacijom ~60 mas % kalcijum-hidroksiapatita (HA) u matricu hidrogela. Takođe, ispitana je mogućnost kontrole kinetike bubrenja hidrogelova, ravnotežnog stepena bubrenja i dinamičko-mehaničkih parametara, promenom samo jednog reakcionog parametra – stepena neutralizacije MAA. Time bi se omogućila i kontrola kinetike otpuštanja eventualno enkapsuliranih lekova i bioaktivnih faktora.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

### 2.1. Sinteza kompozitnih hidrogelova

Nanočestični prah HA sintetisan je hidrotermalnom metodom prema već opisanom postupku [14-16]. Molski odnos Ca/P u prekursorom rastvoru bio je 1.67, što odgovara stehiometrijskom odnosu kalcijuma i fosfora u hidroksiapatitu.

PMAA/HA kompozitni hidrogelovi, sa različitim stepenima neutralizacije prekursora (metakrilne kiseline), sintetisani su slobodno-radikalskom polimerizacijom, modifikacijom ranije opisanog postupka. U prvom koraku 1.25 ml metakrilne kiseline (MAA) (99.5 %) (proizvođač Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) rastvoreno je u određenoj količini destilovane vode (tabela 1), nakon čega je dodata određena količina natrijum-hidroksida (proizvođač Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) da bi se postigao željeni stepen neutralizacije MAA. U sledećem koraku se dodaje 0.895 ml 1% rastvora umreživača N,N'-metilenbiskrilamida (MBA) (proizvođač Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) i 2.3817 g prethodno sintetisanog praha HA. Na kraju postupka 0.2825 ml 1% rastvora inicijatora reakcije polimerizacije 2,2'-azobis-[2-(2-imidazolin-2-il)propan] dihidrohlorida (VA-044) (99.8 %) (proizvođač Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) se dodaje u reakcionu smešu. Nakon 20 minuta mešanja pomoću magnetne mešalice,

smeša se izliva u staklene kalupe koji se ostavljaju u sušnicu na 70°C tokom 3 h. Na ovaj način sintetisani su PMAA/HA kompoziti sa različitim stepenima neutralizacije (0 i 100 %). Sastav reakcione smeše dobijenih kompozita prikazan je u tabeli 1. Dobijeni uzorci hidrogelova su isečeni na diskove prečnika 10 mm i debljine 2 mm, i ostavljeni u eksikator do upotrebe. Teorijski udeo HA u kompozitima je bio 60 mas %.

Tabela 1. Sastav reakcione smeše sintetisanih kompozita

Uzorak	NaOH [g]	H <sub>2</sub> O [ml]	SN [%]
PMAA/HA0	0.0	0.26	0
PMAA/HA100	0.58	0.0	100

## 2.2. Karakterizacija kompozita

Radi ispitivanja morfologije kompozitnih hidrogelova, uzorci hidrogelova su nakon dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja, u vodi i u SBF-u, podvrgnuti liofilizaciji, napareni tankim slojem zlata na uređaju Polaron SC502 Sputter coater i okarakterisani pomoću FESEM Tescan MIRA 3 XMU skenirajućeg elektronskog mikroskopa, pri radnom naponu od 20 keV. U procesu pripreme za liofilizaciju uzorci su nakon dostizanja SDeq zamrznuti na temperaturi od -20 °C u trajanju od dva dana, a zatim liofilizovani na uređaju Martin Christ Freeze-dryer Alpha 1-2 LDplus. Proces liofilizacije je izveden na temperaturi od -32 °C, pri vakuumu od 0,310 mbar, u trajanju od 48 h.

Proces bubrenja se pratio gravimetrijski u destilovanoj vodi na sobnoj temperaturi, i u simuliranoj telesnoj tečnosti (SBF) na 37 °C. SBF je pripremljen na način prikazan u radu Kokuba i saradnika [17]. U određenim vremenskim intervalima, uzorci su se vadili iz medijuma, brisali filter papirom, merili i vraćali u isto kupatilo. Stepen bubrenja u trenutku  $t$ ,  $SD$ , određen je prema jednačini:

$$SD = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (1)$$

Gde je  $m_t$  masa nabubrela hidrogela u trenutku  $t$ , i  $m_0$  masa suvog gela, kserogela.

Merenje se nastavljalo do dostizanja konstantne mase, odnosno ravnotežnog stepena bubrenja za svaki uzorak. Ravnotežni stepen bubrenja,  $SD_{eq}$ , izračunat je pomoću jednačine:

$$SD_{eq} = \frac{m_{eq} - m_0}{m_0} \quad (2)$$

Gde je  $m_{eq}$  masa uzorka hidrogela nakon dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja. U svim merenjima su se koristila su po 3 uzorka i prikazane su srednje vrednosti.

Reološka ispitivanja su izvedena na uzorcima hidrogelova cilindričnog oblika korišćenjem Rheometrics 605 mehaničkog spektrometra, sa geometrijom

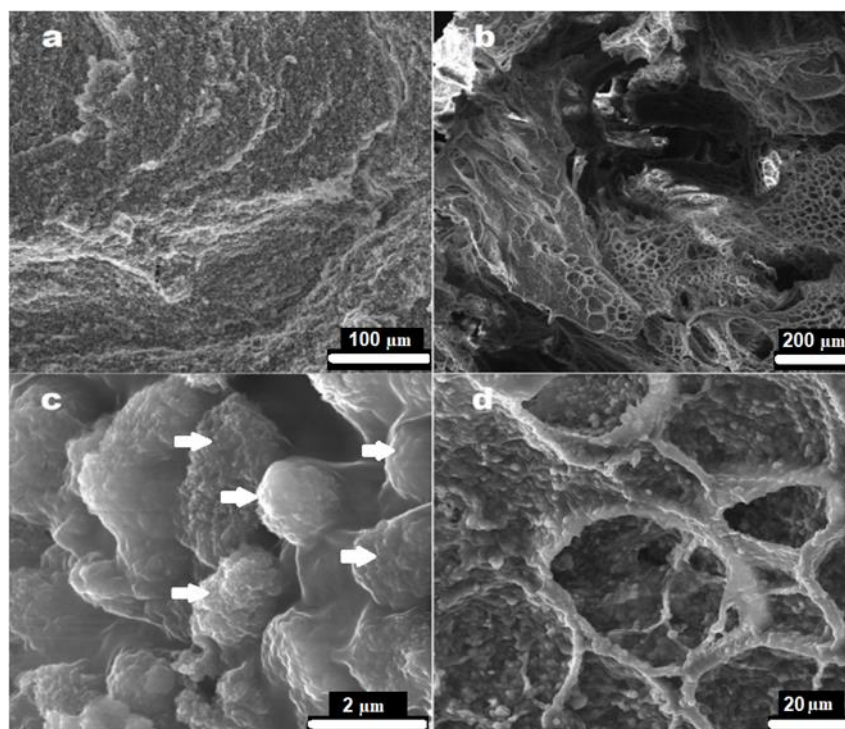
paralelnih ploča (25 mm u prečniku). Modul sačuvane energije,  $G'$ , modul izgubljene energije,  $G''$ , i tangens gubitaka, ( $\tan\delta = G''/G'$ ), u oglecima smicanja merili su se kao funkcija frekvencije,  $\omega$ , od 0,1 do 100 rad/s.

## 3. REZULTATI I DISKUSIJA

### 3.1. Morfologija/mikrostruktura čestica/kompozitnih hidrogelova

Prethodno objavljene studije su pokazale da pri interakciji ćelija i materijala na ćelijski odgovor utiču fizičko-hemijske karakteristike supstrata, posebno hemijski sastav [18, 19], kristaliničnost [20], veličina čestica [21] i struktura površine [22]. U poređenju sa česticama mikronskih dimenzija, nanočestice imaju veću specifičnu površinu zbog čega nanokompoziti ispoljavaju superiornija mehanička svojstva zbog većeg stepena interakcije nanočestica sa matricom. Takođe, nehomogena distribucija čestica unutar kompozita može da rezultuje lošim mehaničkim svojstvima [23]. U istraživanju koje su sproveli Ležaja i saradnici [24] pokazali su da nanočestice HA u obliku viskera i sfera poboljšavaju mehanička svojstva dentalnih kompozita, u kojima im je maseni udeo bio 7.3%. Štaviše, pokazalo se da je sferična morfologija HA superiornija u odnosu na viskerse. Nakon ispitivanja SEM-om, predložili su 3 mehanizma loma u slučaju viskera, dok je u slučaju sferne morfologije lom kroz centralnu šupljinu bio dominantan. Specifična morfologija primarnih čestica organizovanih u sferne aglomerate dovodi do povećanja zatezne čvrstoće kompozita zato što pri rastu, pukotina nailazi na čvrste, sferne aglomerate HA, zbog čega je potrebna veća energija za dalji rast pukotine.

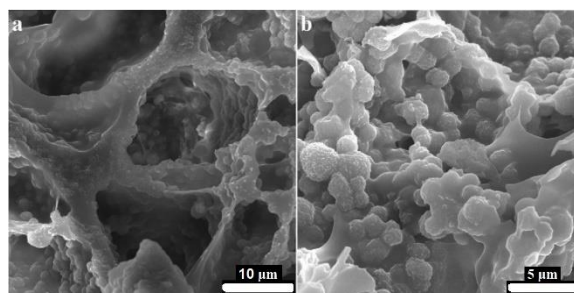
U ovom radu morfologija sintetisanih kompozita se ispitala pomoću SEM-a, posmatranjem poprečnog preseka liofilizovanih uzoraka. Na slici 1 prikazane su mikrofotografije liofilizovanih hidrogelova sa različitim SN, prethodno nabubrela do ravnotežnog stepena bubrenja u destilovanoj vodi. Poredeći uzorke PMAA/HA0 i PMAA/HA100 primećuje se razlika u poroznosti i veličini pora što je posledica različitog SN. Kod kompozita PMAA/HA0 struktura je homogena bez prisustva većih pora dok su u slučaju PMAA/HA100 prisutne pore veće od 100 μm. Osim pora reda veličine nekoliko stotina mikrona, kompoziti PMAA/HA100 sadrže i pore manje od 100 μm koje pospešuju adheziju ćelija. Kontrola veličine pora od izuzetne je važnosti za skafold jer previše male pore mogu da onemoguće proliferaciju i vaskularizaciju tkiva dok previše velike pore imaju malu specifičnu površinu, što negativno utiče na adheziju ćelija [25]. Poznato je da pore >100 μm omogućavaju osteogenezu, dok se za dobru vaskularizaciju preporučuju pore veće od 300 μm [26, 27].



Slika 1 - SEM mikrografije liofilizovanih uzoraka kompozita nakon bubrenja u vodi. (a i c) PMAA/HA0, strelicama su označene čestice HA; (b i d) PMAA/HA100

Karakteristične čestice HA prisutne u sintetisanim kompozitima, su u obliku sfernih aglomerata veličine oko 1-2  $\mu\text{m}$  koji se sastoje od igličastih nanokristala hidroksiapatita veličine od 50-100 nm [14-16]. Važno je spomenuti da se ne razlikuju, ni po formi ni po veličini, od čestica HA korišćenih u svojstvu punioca u dentalnim kompozitima Ležaje i saradnika [24], što ukazuje na mogućnost poboljšanja mehaničkih svojstava kompozita prema mehanizmu već opisanom u pomenutom istraživanju.

Jedan od glavnih problema prilikom procesiranja nanomaterijala je težnja nanočestica ka aglomerisanju zbog velike površinske energije, što može dovesti do neujednačene raspodele nanočestica i lošijih svojstava kompozita. U strukturi svih dobijenih kompozita može da se primeti uniformna raspodela čestica HA, iako je teorijski maseni udeo HA u kompozitu iznosio 60%, što inače predstavlja veoma visok maseni udeo u odnosu na podatke dostupne u literaturi [10-13]. Slike 1 i 2 ukazuju da su se čestice dobro inkorporisale unutar polimerne matrice i da je uspostavljena jaka veza između čestica i matrice. Ovo je rezultat hidrofilne prirode polimera i HA čime se omogućilo dobro kvašenje čestica HA od strane polimerne matrice. Prisustvo čestica HA na površini kompozita veoma je važno sa aspekta bioloških svojstava, s obzirom da je dokazano da HA promovise adheziju, proliferaciju fibroblastnih ćelija i diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija [28, 29], kao i da gradi direktnu vezu sa prirodnim koštanim tkivom domaćina [30, 31].



Slika 2 - SEM mikrografije liofilizovanih uzoraka kompozita nakon bubrenja u SBF-u. (a) PMAA/HA0 i (b) PMAA/HA100

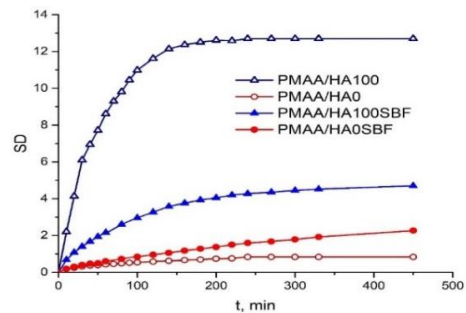
Zajednička karakteristika bioaktivnih stakala i keramike je da formira biološki aktivni sloj karbonatnog HA na površini ovih materijala, nakon implantacije. Formirani sloj karbonatnog apatita je hemijski i strukturno ekvivalentan mineralnoj fazi koštanog tkiva, što omogućava interakciju sa prirodnim koštanim tkivom. Simulacija bioaktivnosti može se izvesti potapanjem materijala u simuliranu telesnu tečnost (SBF) koja predstavlja veštački napravljenu tečnost jonskog sastava i koncentracije slične krvnoj plazmi čoveka. Slika 2 predstavlja mikrografije kompozita nakon 14 dana bubrenja u SBF-u, na temperaturi od 37°C. Značajni znakovi bioaktivnosti nakon in vitro evaluacije uzoraka nisu zabeleženi. Pored činjenice da je HA manje bioaktivan u poređenju sa ostalom bioaktivnom keramikom (kalcijum-trifosfat i bioaktivna stakla), mogući uzrok neaktivnog ponašanja sintetisanih kompozita je nedovoljna površinska izloženost čestica HA.

Na slikama 1 i 2 se može primetiti da je većina čestica HA umetnuta u polimernu matricu, ili je prekrivena tankim slojem polimera. S obzirom da je PMAA biološki nerazgradiv polimer, joni iz SBF-a moraju da difunduju kroz sloj polimera da bi nagradili vezu sa HA iz kompozita, što predstavlja vremenski dug proces. Shuchi i saradnici [32] su sintetisali slične kompozite na bazi HA i nerazgradivog polimera u fiziološkim uslovima, poli(metilmetakrilne kiseline), i postigli bioaktivnost kompozita, iako je maseni udeo HA bio samo 12 %. Glavni razlog bioaktivnosti njihovih kompozita je bila dobra izloženost čestica HA spoljašnjoj sredini.

### 3.2. Ispitivanje bubrenja

Na slici 3 prikazane su dobijene krive bubrenja sintetisanih kompozitnih hidrogelova. Očigledno je da neutralizacija prekursora hidrogelova ima veliki uticaj na sposobnost bubrenja. Povećanje SN od 0% do 100% prouzrokuje značajno povećanje ravnotežnog stepena bubrenja kompozitnih hidrogelova, usled većeg stepena jonizacije karboksilnih grupa polimera. Monofazni PMAA hidrogelovi sintetisani u radu Panić i saradnika imali su vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja od 27 i 602 u slučaju stepena neutralizacije od 0% i 100%, redom [33]. Ravnotežni stepen bubrenja odgovarajućih hidrogelova sintetisanih u ovom radu iznosio je 0.83 i 12.7. Ovako drastično smanjenje sposobnosti bubrenja kompozitnih hidrogelova u odnosu na čiste PMAA hidrogelove može se objasniti sledećim efektima. Pre svega, dodatak približno 60 mas % HA u polimernu mrežu značajno smanjuje mogućnost bubrenja polimera, s obzirom da je većina mase kompozitnog materijala HA koji uopšte ne bubri. Drugo, interakcije između HA i polimera mogu da dovedu do većeg stepena umreženja što može da utiče na smanjenje sposobnosti bubrenja. Li je prijavio formiranje

helatnih i vodoničnih veza u poliakrilamid/HA kompozitima između  $\text{Ca}^{2+}$  jona hidroksiapatita i  $\text{C}=\text{O}$  veza u poliakrilamidu, i između  $\text{PO}_4^{3-}$  jona (HA) i  $\text{NH}_2$  (poliakrilamid) [12]. Slične interakcije mogu da se jave i u sintetisanim kompozitima gde postoji prisustvo karboksilne grupe umesto amidne. Zbog mehaničko-strukturalnih karakteristika HA i mogućnosti formiranja jakih veza, bubrenje je ograničeno u okolini čestica HA [8].

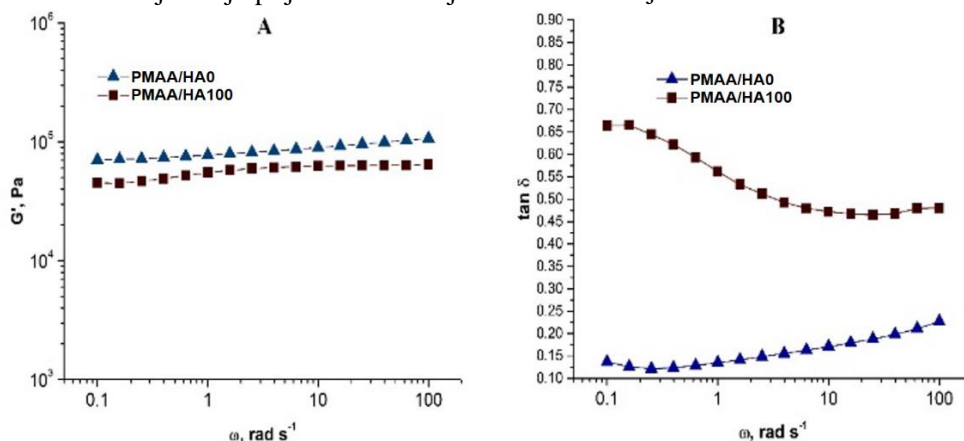


Slika 3 - Krive bubrenja hidrogelova u vodi i SBF-u

Upoređivanjem stepena bubrenja kompozita u vodi, i u SBF-u, primećuje se da PMAA/HA100 hidrogelovi značajno manje bubre u SBF-u u odnosu na vodu. Pretpostavlja se da se između kompozita i jona rastvorenih u SBF-u ostvaruju interakcije koje ometaju odbijanje  $-\text{COO}^-$  grupa, što smanjuje sposobnost bubrenja. Ovaj efekat je zanemarljiv u slučaju  $-\text{COOH}$  grupa, pa kod PMAA/HA0 kompozita imamo čak i suprotan trend; bubrenje je veće u SBF-u nego u vodi.

### 3.3. Reološka ispitivanja.

Rezultati DMA analize sintetisanih kompozita, nakon dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja u vodi prikazani su na slici 4, gde su predstavljeni grafici zavisnosti modula sačuvane energije i faktora gubitaka od frekvencije.



Slika 4 - Grafici zavisnosti (a) modula sačuvane energije i (b) tangensa gubitaka od frekvencije

Vrednosti  $G'$  su uglavnom konstantne duž celog opsega frekvencija od 0.1 do 100  $\text{rad s}^{-1}$  u slučaju oba uzorka. Kompozit PMAA/HA100 ima vrednost  $G' = 55130$  Pa, dok se vrednost modula sačuvane energije

PMAA/HA0 povećala na  $G' = 77480$  Pa, sa smanjenjem stepena neutralizacije od 100 % do 0%. Objasnjenje ovakvog ponašanja kompozita može da leži u činjenici da sa porastom SN, zbog veće mogućnosti

bubrenja kompozita, disperzione sile (sile koje deluju na hidratizane lance i teže da ih odvoje od ostatka mreže) u većoj meri slabe unutrašnju strukturu kompozita i prouzrokuju smanjenje vrednosti modula sačuvane energije. Međutim, ako uporedimo kompozite dobijene u ovom radu sa čistim PMAA hidrogelovima sintetisanim u radu Panić i saradnika [8], čak i najniža vrednost  $G'$  sintetisanih kompozita ( $G'_{\text{PMAA/HA100}}=55130$  Pa) je 80 puta veća od vrednosti  $G'$  čistih hidrogelova ( $G'_{\text{PMAA}}=692.7$  Pa). Takođe najveća vrednost  $G'$  nano-silika/PMAA kompozita iz istog rada, koji sadrži 22.6 mas % silikatnih nanočestica ( $G' = 6462$  Pa), 8.5 puta je niža od najniže vrednosti  $G'$  sintetisanih PMAA/HA kompozita. Sa druge strane, najviša vrednost  $G'$  sintetisanih PMAA/HA kompozitnih hidrogelova (77480 Pa) veća je za dva reda veličine od vrednosti  $G'$  monofaznog hidrogela, i za red veličine od najveće vrednosti  $G'$  PMAA/silika kompozitnih hidrogelova. Pretpostavljamo da je najveći uticaj na ovako drastično poboljšanje mehaničkih svojstava kompozitnih hidrogelova u odnosu na monofazne, imala inkorporacija nanočestica HA, ujednačena distribucija sferno aglomerisanih nanočestica unutar matrice i formiranje jake vodonične veze između HA i matrice polimera.

U datom opsegu frekvencija, faktor gubitaka koji predstavlja meru disipacije energije povezanu sa viskoelastičnim efektima, u slučaju oba kompozita ima vrednost manju od 1 ( $\tan \delta < 1$ ). Ovaj rezultat ukazuje da su vrednosti  $G'$  veće od  $G''$ , što znači da je elastični odgovor materijala izraženiji od viskoznog, odnosno da se ovi materijali ponašaju sličnije elastičnim čvrstim telima, nego viskoznim tečnostima. Na slici 4 (b) vidi se da je viša vrednost tangensa gubitaka karakteristika kompozita sa većim SN, što znači da ovaj materijal ima izraženiji viskozni odgovor. Kompozit sa većim SN ima i veću vrednost  $SD_{eq}$ . S obzirom da  $\tan \delta$  zavisi od stepena pokretljivosti molekula polimera [34], uzrok ovakvog ponašanja kompozita je veća pokretljivost molekula usled velikih  $SD_{eq}$ .

#### 4. ZAKLJUČAK

U ovom radu predstavljena je jednostavna metoda za sintezu kompozitnih hidrogelova sa visokim masenim udelom inkorporiranih HA nanočestica. Iako udeo čestica HA u sintetisanim kompozitnim hidrogelovima značajno prevazilazi udeo u do sada sintetisanim kompozitnim hidrogelovima, prema podacima dostupnim u literaturi, čestice su bile uniformno raspodeljene u matrici, bez vidljivih znakova aglomeracije. Veza formirana između čestica HA i polimerne matrice je jaka, uz dobro kvašenje čestica HA od strane polimera. Ispitivanja procesa bubrenja pokazala su da SN ima značajan uticaj na  $SD_{eq}$ . Reološka ispitivanja pokazala su da su uzorci sa većim SN imali

niže vrednosti modula sačuvane energije, i više vrednosti tangensa gubitaka, zbog većeg  $SD_{eq}$ , ukazujući na izraženiji viskozni odgovor u odnosu na kompozite sa nižim stepenom neutralizacije. Međutim, čak i najniže vrednosti modula sačuvane energije sintetisanih kompozita značajno su veće od vrednosti monofaznih PMAA hidrogelova, kao i kompozitnih hidrogelova sintetisanih u drugim radovima. Ovo ukazuje na važan uticaj sferno-aglomerisanih nanočestica HA na mehanička svojstva kompozitnih hidrogelova. Takođe, prikazani rezultati otvaraju mogućnosti za dalja istraživanja i razvoj ovih materijala, sa posebnim akcentom na poboljšanje bioaktivnosti.

#### 5. ZAHVALNICA

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, za finansiranje istraživanja u okviru projekata III45019 i 172062.

#### LITERATURA

- [1] Hutmacher, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, Vol. 24, No. 21, pp. 2529-2543, 2000.
- [2] Tozzi G, De Mori A, Oliveira A, Roldo M. Composite hydrogels for bone regeneration, *Materials*, Vol. 9, No. 4, pp. 267, 2016.
- [3] Drury J, Mooney J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, Vol. 24, No. 24, pp. 4337-4351, 2003.
- [4] Xue, R, Zhang, W, Sun, P, Zada, I, Guo, C, Liu, Q, Gu, J, Su, H. and Zhang, D, Angle-independent pH-sensitive composites with natural gyroid structure. *Scientific Reports*, 7, 42207, 2017.
- [5] Redaelli, F., M. Sorbona, and F. Rossi. Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*, pp. 205-228, 2017.
- [6] Haraguchi, Kazutoshi, et al. Mechanism of forming organic/inorganic network structures during in-situ free-radical polymerization in PNIPAA–clay nanocomposite hydrogels. *Macromolecules*, Vol. 38, No. 8, pp. 3482-3490, 2005.
- [7] Uygun, Mustafa, et al. Antibacterial acrylamide hydrogels containing silver nanoparticles by simultaneous photoinduced free radical polymerization and electron transfer processes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 210, No. 21, pp. 1867-1875, 2009.
- [8] V. Panic, P. Spasojevic, T. Radoman, E. Dzunuzovic, I. Popovic, S. Velickovic. Methacrylic Acid Based Polymer Networks with a High Content of

- Unfunctionalized Nanosilica: Particle Distribution, Swelling, and Rheological Properties, *The Journal of Physical Chemistry C* Vol. 119, No. 1, pp. 610- 622, 2014.
- [9] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. Boccaccini. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 27, No. 18, pp. 3413–3431, 2006.
- [10] Arun Kumar R, Sivashanmugam A, Deepthi S, Iseki S, Chennazhi K. P, Nair SV, Jayakumar R. Injectable chitin-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) /nanohydroxyapatite composite microgels prepared by simple regeneration technique for bone tissue engineering, *ACS applied materials & interfaces*. Vol. 7, No. 18, pp. 9399-409,2015.
- [11] Hu J, Zhu Y, Tong H, Shen X, Chen L, Ran J. A detailed study of homogeneous agarose/hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue. *International journal of biological macromolecules*, Vol. 82, pp. 134-43, 2016.
- [12] Li Z, Mi W, Wang H, Su Y, He C, Nano-hydroxyapatite/polyacrylamide composite hydrogels with high mechanical strengths and cell adhesion properties, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, Vol. 123, pp. 959–964, 2014.
- [13] Chang C, Peng N, He M, Teramoto Y, Nishio Y, Zhang L. Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydrate polymers*, Vol. 91, No. 1, pp. 7-13, 2013.
- [14] Đ. Janackovic, I. Petrovic-Prelevic, Lj. Kostic-Gvozdenovic, R. Petrovic, V. Jokanovic, D. Uskokovic:, Influence of synthesis parameters on the particle sizes of nanostructured calcium-hydroxyapatite, *Key Eng. Mater.* Vol. 192, pp. 203-206, 2001.
- [15] Janačković Đ, Jankovic-Castvan I, Petrović R, Kostic-Gvozdenovic L, Milonjić S. K, Uskokovic D. P. Surface properties of HAP particles obtained by hydrothermal decomposition of urea and calcium-EDTA chelates, *InKey Engineering Materials*, Vol. 240, pp. 437-440, 2003.
- [16] Veljović Đ, E. Palcevskis, A. Dindune, S. Putić, I. Balać, R. Petrović, and Dj Janačković. Microwave sintering improves the mechanical properties of biphasic calcium phosphates from hydroxyapatite microspheres produced from hydrothermal processing, *Journal of materials science*, Vol. 45, No. 12, pp. 3175-3183, 2010.
- [17] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yamamuro. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 3, No. 2, pp. 79–83, 1992.
- [18] Best S, Sim B, Kayser M, Downes S. The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 8, No. 2, pp. 97-103, 1997.
- [19] Villarreal R, A. Sogal, J. Ong. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces, *Journal of Oral Implantology*, Vol. 24, No. 2, pp. 67-73, 1998.
- [20] De Bruijn J. D, Klein C. P, De Groot K, Van Blitterswijk C. A. Influence of crystal structure on the establishment of the bone-calcium phosphate interface in vitro. *Cells and materials*, Vol. 3, No. 4, pp. 8, 1993.
- [21] Sun J. S, Tsuang YH, Chang WH, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts, *Biomaterials*, Vol. 18, No. 9, pp. 683-690, 1997.
- [22] Shin Y, Akao M. Tissue reactions to various percutaneous materials with different surface properties and structures, *Artificial organs*, Vol. 21, No. 9, pp. 995-1001, 1997.
- [23] Kothapalli C. R, Shaw M. T, Wei M, Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties, *Acta biomaterialia*, Vol. 1, No. 6, pp. 653-62, 2005.
- [24] Lezaja M, Veljovic D. N, Jokic B. M, Cvijovic-Alagic I, Zrilic M. M, and Miletic V, Effect of hydroxyapatite spheres, whiskers, and nanoparticles on mechanical properties of a model BisGMA/TEGDMA composite initially and after storage, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 101, No. 8, pp. 1469-1476, 2013.
- [25] D. Salamon, S. Teixeira, S. M. Dutczak, D. F, Stamatialis. Facile method of building hydroxyapatite 3D scaffolds assembled from porous hollow fibers enabling nutrient delivery, *Ceramics International*, Vol. 40, No. 9, pp. 14793–14799, 2014.
- [26] Jones A. C, Arns C. H, Sheppard A. P, Hutmacher D. W, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using M-CRO-CT, *Biomaterials*, Vol. 28, No. 15, pp. 2491-2504, 2007.
- [27] Karageorgiou V, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, Vol. 26, No. 27, pp. 5474-5491, 2005.

- [28] Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan A. I, Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 24, No. 12, pp. 1563–1570, 1990.
- [29] Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K, Senpuka N, Tamai S, Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 26, no. 7, pp. 885–895, 1992.
- [30] Osborne J. F, Bonding osteogenesis induced by calcium phosphate ceramic implants, *Biomaterials* 1980, pp.111-118, 1982.
- [31] Veljović D, Čolić M, Kojić V, Bogdanović G, Kojić Z, Banjac A, Palcevskis E, Petrović R, Janačković D, The effect of grain size on the biocompatibility, cell–materials interface, and mechanical properties of microwave-sintered bioceramics, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 100, No. 11, pp. 3059-3070, 2012.
- [32] Shinzato S, Kobayashi M, Mousa WF, Kamimura M, Neo M, Kitamura Y, Kokubo T, Nakamura T. Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: Comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass–ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 51, No. 2, pp. 258–272, 2000.
- [33] Panic V, Adnadevic B, Velickovic S, Jovanovic J, The Effects of the Synthesis Parameters on the Xerogels Structures and on the Swelling Parameters of the Poly(methacrylic acid) Hydrogels, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 156, No. 1, pp. 206–214, 2010.
- [34] Joseph S, Appukuttan S. P, Kenny J. M, Puglia D, Thomas S, Joseph K, Dynamic mechanical properties of oil palm microfibril-reinforced natural rubber composites, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 117, No. 3, pp. 1298-1308, 2010.

## SUMMARY

### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NANO-HYDROXYAPATITE/POLY (METHACRYLIC ACID) COMPOSITE HYDROGELS.

*Goals.* The goal of this study was a development of biocompatible composite hydrogels, structurally similar to native bone tissue, by incorporation of ~60 wt % of calcium hydroxyapatite (HA) into a matrix of hydrogels. Also, a possibility to control swelling kinetic and equilibrium swelling degree ( $SD_{eq}$ ) of hydrogels, by altering the degree of neutralization of the precursor (DN) was examined.

*Methods.* Composite hydrogels, based on HA and poly(methacrylic acid) (PMAA), were synthesized by free-radical polymerization with different DN. Theoretical content of HA in synthesized composites was 60 wt %. Composites were synthesized by methods of dynamic mechanical analysis and scanning electron microscopy.  $SD_{eq}$  and swelling kinetic were examined in distilled water and simulated body fluid.

*Results.* Morphological observations revealed uniform distribution and strong bond of spherical HA particles within the polymer matrix. Swelling analyses demonstrated that  $SD_{eq}$  is directly proportional to DN, while rheological examinations indicated inverse proportion between DN and storage modulus, but due to the HA particles inclusion, mechanical properties of composites were significantly better compared to monophasic PMAA hydrogels.

*Significance.* Simple method of synthesis of composite hydrogels with high content of filler nanoparticles is presented. Incorporation of HA nanoparticles significantly improved mechanical properties of hydrogels, while at the same time was demonstrated a possibility to control swelling kinetic by influencing the DN.

**Key words:** composites, hydrogel, hydroxyapatite, poly (methacrylic acid)