

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Füüsika instituut

Märt-Erik Martens

Fiibrilise želatiin-hüdroksüapatiit komposiitmaterjali arendamine

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja:

Martin Järvekülg, PhD

Tartu 2019

Infoleht

Fiibrilise želatiin-hüdroksüapatiit komposiitmaterjali arendamine

Käesolevas magistritöös on antud ülevaade luukoe taastamiseks mõeldud materjalide klassidest, nende valmistamise tehnoloogiast ning valmistamisel kasutatavatest komponentidest. Tutvustati kasvumaatriksiks mõeldud biomaterjalide olulisemaid omadusi ja strateegiaid nende omaduste määramiseks. Eksperimentaalses osas valmistati fiibriline želatiini-hüdroksüapatiit komposiitmaterjal, mis võiks sobilik olla luukoe taastamiseks. Analüüsiti materjali struktuuri, viidi läbi elementanalüüs ning bioaktiivsuse hindamise katse.

Märksõnad: želatiin, hüdroksüapatiit, fiiber, nanofiiber, bioaktiivsus, elementanalüüs, SEM, EDS

CERCS: T150 – materjalitehnoloogia

Development on fibrous gelatin-hydroxyapatite composite scaffold

An overview of scaffolds, their processing methods and materials that enhance bone tissue regeneration was given in the thesis. Properties of growth matrix and their evaluation techniques were introduced. In the experimental part, novel gelatin-hydroxyapatite composite scaffold was prepared with the aim to enhance bone tissue regeneration. Scaffolds structure was analyzed, chemical characterization was carried out and bioactivity was evaluated.

Keywords: gelatin, hydroxyapatite, fiber, nanofiber, bioactivity, chemical characterization, SEM, EDS

CERCS: T150 – Materials Technology

Sisukord

Infoleht.....	2
Sissejuhatus.....	4
Töö eesmärgid:.....	5
Töös kasutatavad lühendid.....	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Luukoest inspireeritud biomaterjalid	7
1.2. Polümeerseks maatriksiks kasutatavad biopolümeerid	9
1.3. Lisandmaterjalid.....	11
1.4. Biomimeetilised nanokomposiidid.....	11
1.5. Poorse tehisliku rakuvälise maatriksi valmistamise tehnoloogiad	14
1.6. Nanokomposiitide ja rakkude omavaheline interaktsioon	16
1.7. Fiibriline kolmemõõtmeline kasvumaatriks.....	17
2. Eksperimentaalne osa	20
2.1. Kasutatavad seadmed	20
2.2. Ketruslahuste valmistamine	20
2.3. Komposiitmaterjali analüüs.....	25
2.4. SBF ja PBS katsed	31
3. Järeldused ja arutelu	33
Kokkuvõte.....	35
Summary	36
Kasutatud kirjandus	37
Tänuavaldused	39
Lisa 1.....	40
Lisa 2.....	41

Sissejuhatus

Taastavas meditsiinis kasutatakse passiivsete lahenduste asemel järjest rohkem aktiivseid materjale, mis toetavad ja suunavad rakkude kasvu ja kudede taastumist. Koetehnoloogias on häid tulemusi andnud loodusest inspireeritud tehiskud materjalid. Rakukultuuride kasvumaatriksiks on oma omaduste poolest kõige sobilikumad biopolümeerid.[1]

Hambaravitööstuses kasutatakse mitmeid sünteetilisi materjale, mis siirdatakse patsiendi organismi. Samas on selles sektoris jätkuvalt probleemiks bioaktiivse funktsionaalsusega materjalide puudumine, mis oleks samal ajal kuluefektiivsed.[2]

Näiteks hambaimplantaadi kruvi paigaldamiseks on vaja, et hamba ekstraktsioonijärgne tüümik oleks korralikult luustunud. Selleks kasutatakse materjale, mis toetavad luukoe teket, samal ajal takistades tekkinud tüümikku pehme koe kasvamist (Vt joonis 1). [18] Käesolev töö on esimene samm arendustöös, mille eesmärgiks on luua kuluefektiivne luukoe teket toetav komposiitmaterjal. Esmased tulemused võiksid anda aimu, kas materjal toetab rakkude adhesiooni, migratsiooni ja elulevust. Loodav materjal ning selle laguproduktid ei tohi olla tsütotoksilised, vajalikud on materjali bioaktiivsus ja bioühilduvus.[1]

Gelatex meetodil on võimalik valmistada vildilaadse struktuuriga fiibrilisi želatiinmaterjale, mis võiks olla väga sobivad koetehnoloogia rakendusteks. Käesolevas töös valmistatakse selle materjali põhjal komposiit, mis võiks olla sobiv kasutamiseks teatud hambaravirakendustes. Gelatex meetodil valmistatud polümeeri fiibrid on kirjeldatud autori bakalaureusetöös.[3]

Komposiitmaterjali lisandiks valiti hüdroksiapatiit. Hüdroksiapatiit (HAp) on anorgaaniline kõrge kristallilisusega kaltsiumfosfaadi vorm. Toatemperatuuril ning pH vahemikus 4 -12 on HAp kõige stabiilsem kaltsiumfosfaat. Seda mineraali leidub inimkehas kõigis kõvades kudedes nagu näiteks hammastes, küüntes ja luudes.[4]

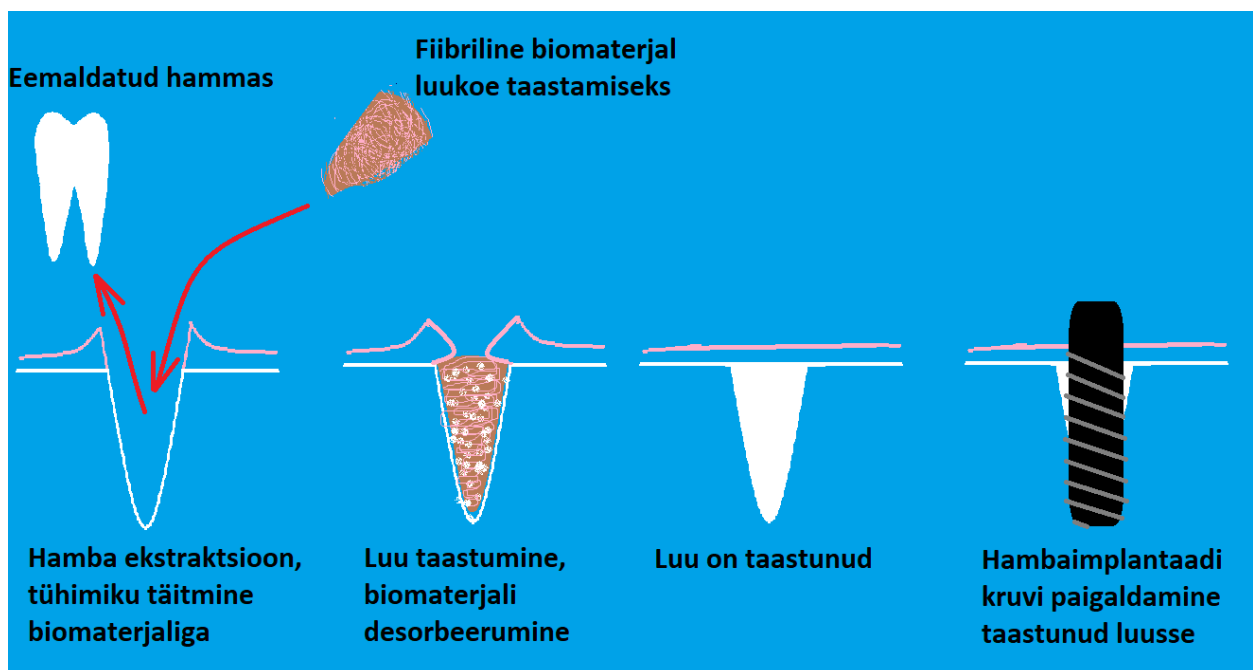
Kirjanduse põhjal valiti välja kõige paljulubavamad meetodid HAp osakeste sünteesiks. Materjalide valmistamiseks valiti tehnoloogiad, mida oleks võimalik hõlpsasti tööstuslikul skaalal rakendada. Kõrvale jäid selle tõttu HAp sünteesi meetodid, mis vajavad palju energiat või kalleid lähteaineid. Maatriksi valmistamise tehnoloogia valikul said määravateks faktoriteks kuluefektiivsus, tehnoloogia keerukus ning materjali valmistamise kiirus ajaühikus.

Komposiitmaterjali maatriksiks valiti želatiin. Želatiin on luukoes leiduva kollageeni hüdroliüsitud vorm, mis on vees lahustuv, erinevate morfoloogiatega struktuurideks vormitav ja kuluefektiivne. Želatiin rakendatakse meditsiinisektoris laialdaselt tänu selle bioafiinsusele, antigeenide puudumisele ja võimele moodustada hüdrogeele, seda kasutatakse kommertsiaalsetes haavakatetes, liimides ja ravimites.[5]

Töö autor valis materjalide valmistamise meetodid, viis läbi näidiste eksperimentaalse valmistamise ja katsekehade inkubeerimise kehasisesest keskkonda simuleerivas lahuses, et anda esmane hinnang bioaktiivsusele. Tekkinud materjali struktuuri analüüsiti SEMiga ning lisaks teostati EDS analüüs.

Töö eesmärgid:

- Anda ülevaade luukoe taastamiseks loodud materjalidest, nende omadustest ja valmistamise tehnoloogiatest
- Välja valida sobilik HAp sünteesi meetod, et saadud kristalle oleks lihtne kasutada fiibri sees lisandina.
- Valmistada želatiin-hüdroksüapatiit komposiitmaterjalid hambaravis luukoe taastamise rakenduseks.
- Analüüsida tekkinud materjali struktuuri, bioaktiivsust ning raku elutegevuseks olulisi omadusi.



Joonis 1 Komposiitmaterjali kasutamise skeem hamba ekstraktsioonil

Töös kasutatavad lühendid

CaP – kaltsiumfosfaat

EDC – 1-etüül-3-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiid

EDS – energiadispersiivne röntgenspektroskoopia

HAp – hüdroksiapatiit

NHS – N-hüdroksüsuksiinimiid

PBS – fosfaat-puhverdatud soola lahus (*Phosphate buffered saline*)

PCL – polükaprolaktoon

SBF – simuleeritud kehavedelik (*simulated body fluid*)

SEM – skaneeriv elektronmikroskoop

SF – siidi fibroiin

TCP – trikaltsiumfosfaat

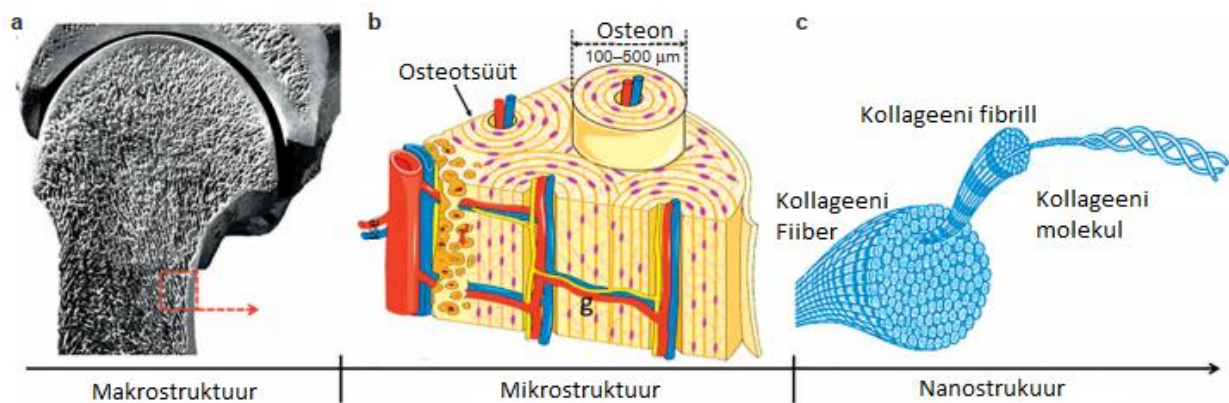
1. Kirjanduse ülevaade

Kuna luul on hea taastumisvõime, on luukoe regeneratsiooniprotsessid praeguseks kõige põhjalikumalt uuritud ja paremini kirjeldatud. Ideaalne luukoe kasvumaatriks on osteokonduktiivne, ostoinduktiivne ja osteogeenne. Osteokonduktiivsus tähendab, et luurakud saavad pinnale kinnituda, seal migreeruda ning ka ellu jääda. Osteoinduktiivsus suunab tüvirakke diferentseeruma osteoblastideks keemiliste ja füüsikaliste stiimulite abil. Osteogeenne kasvumaatriks tähendab, et sellesl on kasvufaktorid, mis soodustavad luukoe taastumist. Luukoe taastamiseks kasutatakse tavapäraselt looduslikku päritolu materjale. Sobivaimaks lahenduseks on kasutada luukudet, mis on pärit patsiendi organismist (*autograft*). Saab ka kasutada luud, mis on pärit teiselt sama liigi isendilt (*allograft*). Mõlemat tüüpi materjalid on osteoinduktiivsed ja osteokonduktiivsed.[1], [6]

Vaatamata biomaterjalide puudustele, on aktuaalseks tõusnud just selliste materjalide uurimine, mis imiteerivad struktuursete, mehaaniliste ja bioloogiliste omaduste poolest loomulikku kudet. Edusamme on tehtud just selliste materjalide disainis, kus arvestatakse raku töö funktsioonidega. Taastuvates protsesside on oluline arvestada raku reageerimisega ja geenide avaldumisega, mis omakorda stimuleerivad raku diferentseerumist ja ekstratsellulaarse maatriksi tootmist. See on jällegi vajalik, et tõhustada kahjustatud koe taastumist. Biomimeetilise materjali disaini puhul kasutatakse materjale, mis on luu komponentidega sarnased. Samuti imiteeritakse loodavas materjalis luu struktuuri. Levinumad komponendid on kollageen ja hüdroksiapatiit. Nende maatriksisse on võimalik lisada kasvufaktoreid ja luu kasvu parandavaid valke.[1,2]

1.1. Luukoest inspireeritud biomaterjalid

Inimkehas leiduva ekstratsellulaarse maatriksi mehaaniliste, keemiliste ja struktuursete omaduste uurimine aitab efektiivsemalt tehnilike sama funktsiooniga materjale luua. Luu on keerukas hierarhiline süsteem (Vt joonis 2).



Joonis 2 Luu hierarhiline struktuur. Tõlgitud artiklist [7]

Makroskoopilisel tasemel varieerub luu struktuur erinevates piirkondades suures ulatuses. Näitkeks esineb luude otstes poorne vahtjas luukude, kui lausosa on tihedam ja kaetud kõva kestaga. Mikroskoopilisel tasemel on luu struktuurühikuks osteon, mis koosneb kotsentriliselt paigutunud kollageeni fiibritest, mis ümbritsevad veresooni ja närve. Nanotasemel koosneb kollageeni fiiber kollageeni fibrillidest, mis omakorda koosnevad kollageeni kolmikheeliksmolekulidest. Kaltsiumfosfaadi ühendid paiknevad kollageeni fibrillide vahel ja annavad luule jäikuse.[7]

Kaasajal on levinuimaks biomaterjali valmistamise strateegiaks nanokomposiit, kus maatriksiks on biolagunev ja biopolümeerne materjal, mille sees on bioaktiivsed ja desorbeeruvad mineraalsed nanoosakesed. Need nanoosakesed muudavad oluliselt biopolümeeri mehaanilisi omadusi, mida ainult biopolümeeriga pole võimalik saavutada. Nanoosakestel on suur eripind, kui võrrelda tavapäraste makrosuuruses osakestega. Tänu suurele eripinnale on võimalik maatriksi ja osakeste ulatuslik interaktsioon, mis tagab mehaanilised omadused, kuid samal ajal annab materjalile tervikuna bioühilduvuse ja osteokonduktiivsed omadused. See tagab omakorda hea valgus adsorptsiooni, raku diferentseerumise, adhesiooni ja levimise.[1]

Biopolümeerid on keemiliselt mitmekesised ja hea bioühilduvusega ilma immunoloogilise või toksikoloogilise reaktsioonita. Mitmetel loodusliku päritolu biolagunevatel polümeeridel, näiteks polüsahhariididel (tselluloos, kitosaan, glükosaminoglükaanid) ja valgulistel biopolümeeridel (kollageen, siid, elastiin ja fibrinogeen) on ekstratsellulaarse maatriksiga sarnaseid omadusi. Bioresorbeeruvatest nanoosakestest on kaltsiumfosfaadid hea osteokonduktiivsusega ja bioühilduvusega.[1]

1.2. Polümeerseks maatriksiks kasutatavad biopolümeerid

1.2.1. Valgulised biopolümeerid

Kollageen ja želatiin on levinuimad valgulised biopolümeerid tehisliku ekstratsellulaarse maatriksi loomiseks tänu mitmele funktsionaalrühmale, mis tagavad osteoblastide adhesiooni ja migratsiooni.[1]

Kollageen on fiibriline proteiin, mida leidub erinevates kudedes nagu näiteks luu, kõhr ja veresoones. See valguline materjal on bioühilduv, biolagunev ning pole tsütotoksiline. Küll aga pole ta eraldiseisvana luukoes kasutamiseks sobivate mehaaniliste omadustega, näiteks pole kollageen piisavalt elastne. Kollageeni mehaanilisi omadusi ja hügroskoopsust saab ristsidestamise teel modifitseerida. Erinevate tehnoloogiatega on kollageenist võimalik valmistada kile, fiibreid või vahtu, sõltuvalt sellest, mis funktsiooni biomaterjalilt soovitakse saada. [1], [7]–[9]

Kollageeni/kaltsiumfosfaadi(CaP) nanokomposiit on puhtast kollageenist tugevam. Seda tänu kollageenis leiduvatele funktsionaalrühmadele, mis sidestuvad hästi kaltsiumfosfaadi nanoosakestega. Kollageen/CaP nanokomposiiti on valmitatud erinevatel meetoditel. Kõige lihtsam on nanoosakeste segamine kollageeni lahusesse või siis nanoosakeste süntees otse kollageeni lahuses. Želatiin on võrreldes kollageeniga ebakorrapärasem. Võrreldes kollageeniga on tal parem lahustuvus ja madalam hind.[1], [9]

1.2.2. Siidi fibroiin

Fibroiin on siidi fiibri struktuurne valk. Seda fiibrit toodavad putukad, ämblikud ning ussid. Fiibrit katab vees lahustuv liimilaadne seritsiini kiht. Siidi fibroiini (SF) lahus saadakse, kui lahustatakse siid liitumbromiidi vesilahuses. SF on atraktiivne tänu suurele elastsusele, mehaanilisele tugevusele, vastupidavusele, bioaktiivsusele ja kontrollitavale biolagunevuse kiirusele. Biolagunevust saab kontrollida molekuli suuruse ja kristallilisuse astme kaudu. SFist saab teha membraane, kilesid, fiibreid, vahte ja hüdrogeele. Valmistatud on ka SF/HA komposiite, millel on tõusnud poorsus ning paremad osteokonduktiivsed ja mehaanilised omadused.[1]

1.2.3. Kitosaan

Kitosaan on polüsahhariid, mida saadakse koorikloomade kestadest. Tööstuslikult toodetakse kitosaani deatsüülimise teel kitiinist, mida sisaldavad krevettide, krabide, vähkide koorikud. Kitosaan on katioonne polümeer, mis koosneb juhuslikult paigutunud N-atsetüülglükosamiinist ja D glükosamiinist. Varieerub nii monomeeride osakaal, järjekord, kui ka molekuli pikkus. Selle tõttu võimaldab kitosaan elektrostaatiliselt interaktsiooni negatiivselt laetud biomolekulidega ning ka rakumembraaniga. Kitosaanist saab valmistada fiibreid, vahtusid, hüdrogeele ning kilesid, mida on uuritud peamiselt luu ja kõhre taastamiseks mõeldud biomaterjalide kontekstis. Kitosaani headeks omadusteks on biolagunevus, bioühilduvus ja omane antibakteriaalsus. Paraku pole kitosaan osteokonduktiivne ning selle survetaluvus on piiratud. Nende omaduste korvamise eesmärgiga on loodud kitosaani/HA nanokomposiite, et parandada materjali mehaanilisi ja bioloogilisi omadusi. Sellise komposiidi kompressiooni jõud oli sarnane luu käsnja faasi kompressiooni jõuga.[1]

1.2.4. Alginaat

Alginaat on naturaalne polümeer, mida eraldatakse pruunvetikast. Alginaadi polümeer koosneb kahest monomeerist: β -D-mannuronaat (M) ja α -L-guluronaat (G). Erinevalt ekstraheeritud alginaat on erineva M ja G suhtega, mis mõjutab polümeeri omadusi. Näiteks molekulmassi ja G-bloki osakaalu kasvamisega paranevad polümeeri mehaanilised omadused. M bloki osakaalu kasvamisega muutub polümeer immunogeensemaks, ehk tekitab kehas immuunreaktsiooni, täpsemalt indutseerib rakkudes tsütokiinide tootmise kasvu. Alginaate on hakatud koetehnoloogia ja farmaatsia valdkondades aina rohkem uurima tänu heale bioühilduvusele, kontrollitavale geelistumisvõimele, madalale toksilisusele ja immunogeneesile. Peamiselt kasutatakse alginaati hüdrogeeli vormis, kuid sellest saab valmistada ka geele ja fiibreid. Headeks omadusteks võiks lugeda materjali võimet rakke immobiliseerida ja nende levikut kiirendada. Heaks näiteks võiks tuua alginaat/želatiin/HA komposiidi, kus osakaalude muutmisega oli võimalik varieerida geelistumist, biolagunemist, mehaanilisi omadusi ja bioühilduvust.[1]

1.3. Lisandmaterjalid

1.3.1. Kaltsiumfosfaadid

Kaltsiumfosfaadid (CaP) on anorgaanilised ühendid, mida leidub muuhulgas ka imetajate kõvades kudedes nagu hambad, sarved ja luud. CaP on bioühilduvad, osteokonduktiivsed, bioresorbeeruvad ning omavad võimet sidestuda luuga otse. Kõige laialdasemalt kasutatud CaP on β -TCP ja hüdroksiapatiit (HAp). HAp on kõrge kristallilisusega ja kõige stabiilsem CaP vorm, mida kasutatakse laialdaselt koetehnoloogias rakendatavate biomaterjalide arendamisel. TCP vormide stõhhiomeetria on sarnane luu amorfse vormi stõhhiomeetriaale inimkehas, kusjuures HAp stõhhiomeetria sarnaneb mineraalse luuga. Enim levinud sünteesimeetodid on lahusest sadestamine, hüdrotermaalne süntees ja ka teiste CaP hüdrolyüsimine.[1], [10]

Keemilist HAp sadestamist on läbi viidud ka polümeeri lahuses. Selleks lahustati želatiini ja CaCl_2 deioniseeritud vees. Teises anumast lahustati NaHPO_4 . Seejärel hakati fosfaat ioonidega lahust tilkhaaval lisama esimesse lahusesse, kusjuures lahuse pH'd hoiti eksperimendi vältel 9.5 juures. Tulemuseks oli HAp osakeste suspensioon želatiini vesilahuses.[8]

HAp ja β -TCP on bioresorbeerumise seisukohast vahe sees. Nimelt β -TCP resorbeerub täielikult inimese kehas, kuid HAp täielikult ei resorbeeru, vaid integreerub tekkiva luukoega. Nende materjalide peamine eelis koetehnoloogia rakendustes on tugev interaktsioon tekkiva koega, mis tagab tugeva seondumise keha koe ning biomaterjali vahel. Paraku limiteerib nende materjalide madal kandevõime nende rakendusvõimalusi. Selle tõttu kombineeritakse CaP osakesi polümeeridega, et valmistada neist paremate omadustega materjale.[1], [10]

1.4. Biomimeetilised nanokomposiidid

Biomimeetiliste nanokomposiitide valmistamisel on seni domineerivaks strateegiaks kontrollitud geomeetriaga bioaktiivsete struktuuride loomine, mis jäljendaks rakuvälist maatriksit inimkehas. Oluline aspekt on ka materjali võime indutseerida rakk-maatriks ja rakk-rakk interaktsioone. Taolised nanokomposiidid koosnevad polümeeri maatriksist ning CaP nanoosakestest, mille erinev kombineerimine võimaldab materjali lagunemise ja resorptsiooni kineetika kontrollimist. CaP osakesed parandavad tekkiva koe ja biomaterjali interaktsiooni, rakkude adhesiooni materjali pinnale ja ka rakkude diferentseerumise võimet.[1], [5]

Poorsed biomaterjalid toestavad ümbritsevaid kudesid, samal ajal imiteerides ekstratsellulaarset maatriksit. Eelisteks võiks tuua poorse struktuuri, mis soodustab rakk-biomaterjal interaktsiooni, raku kasvu ja migratsiooni. Läbivad poorid võimaldavad regulatoorsete faktorite, toitainete ja valkude transporti ja soodustavad sellega rakkude elutegevust, levimist ja diferentseerumist. Piisav mehaaniline tugevus, elastsus, kontrollitud lagunemine, madal toksilisus ja ühtlane jaotumine on veel mõned eelised, miks poorsed biomaterjalid on osutunud populaarseks. Kommertsiaalselt kättesaadavad biomaterjalid on komposiitmaterjalid, kus maatriksiks on kollageen ja lisandiks on HAp või β -TCP nanoosakesed. Kuna kollageen on luukoes levinuim polümeer, siis on see ka luuga seonduvate biomaterjalide valmistamisel kõige loogilisem valik. Taolisi nanokomposiite on valmistatud erineva poorsuse, poori suuruse, eripinna ja kristallilisusega. Levinumateks vormimistehnoloogiateks on vahtstruktuuride kopeerimine jäljendite abil, kile valamine, külmuivatamine, faasialdus ja elektroketrus. Väljakutse on piisava poorsuse saavutamine ilma, et polümeer ja osakesed eraldi faase ei moodustaks. Eelistatud on olukord, kus mineraalsed osakesed ei moodusta aglomeraate, homogeensus tagab enamasti ka materjali paremad mehaanilised omadused. Et tagada osakeste ühtlane jaotumine maatriksis, viiakse läbi osakeste süntees *in situ* polümeeri lahuses või kasutatakse dispergeeriva ainaena naatriumtsitraati.[1], [5]

1.4.1. Fiibrilised nanokomposiitsed materjalid

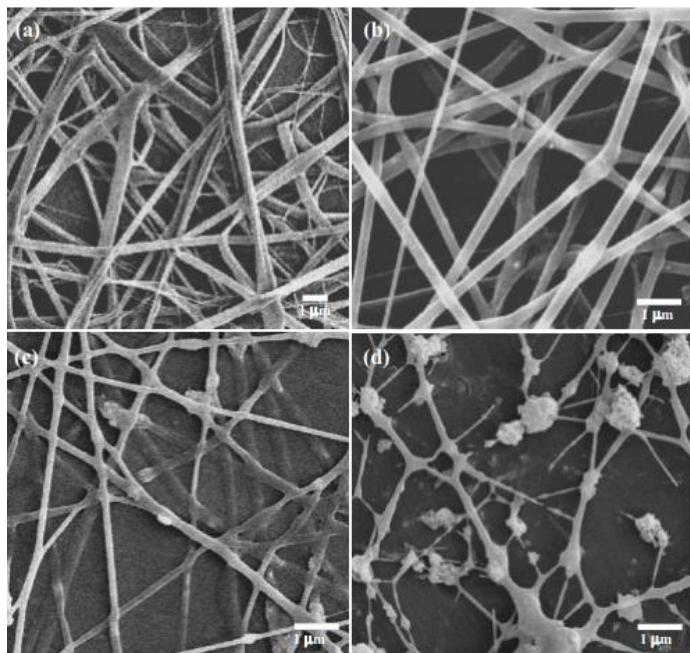
Nanofiibrilisi materjale on võimalik valmistada sellise morfoloogia, isotroopsuse ja poorsusega mis on sarnased inimkehas leiduva ekstratsellulaarse maatriksiga. Nimelt on kudedes oleva kollageeni võrgustiku elemendid sarnase diameetriga (50-500 nm). Kuna rakud kinnituvad hästi elementide külge, mis on nende enda mõõtmetest väiksemad, tagab nanofiibriline võrgustik hea keskkonna rakkude adhesiooniks ja levikuks. Taoliste süsteemide mehaanilised omadused sõltuvad kasutatavast polümeerist, fiibrite diameetrist ning orientatsioonist.[5]

Nanofiibrilisi materjale on kasutatud luukoe, närvikoe, nahkkoe, lihaskoe ja kõhrkoe kasvusubstraadina. Samuti on uuritud nende materjalide kasutust valkude, DNA ja ravimite kontrollitud väljastamise rakenduses.[1], [5]

Taolisi materjale saadakse molekulaarse isesõlmumise, faasialduse või elektroketruse teel. Isesõlmumise teel on võimalik saada kõrgelt orienteeritud fiibreid, kuid see meetod on limiteeritud teatud lähteainetega. Faasialdusmeetodiga on võimalik saada mikromeetri suurusjärgus fiibreid, mis on ebakorrapäraselt paigutunud, kuid hästi on võimalik kontrollida

pooride suurust. Elektroketruse meetodil saadud fiibrid on nano- ja mikromeetri suurusjärgus, kontrollitud poorsuse ja fiibri diameetriga. Samuti saab selle meetodiga kontrollida materjali jäikust. Nende omaduste tõttu on elektroketruse meetod kõige laialdasemalt uuritud meetod nanofiibriliste materjalide arendamisel. Bioaktiivsete ainete lisamisel elektroketruse lahusele on võimalik parandada rakk-substraat interaktsioone. Näiteks võimendada rakkude adheerumist, levikut ning diferentseerumist.[1]

Želatiini/HAp fiibrilist komposiiti on valmistatud enamjaolt elektroketruse meetodiga. Katses sünteesiti HAp nanoosakesed erinevas koguses želatiini vesilahuses, mille järel tekkinud suspensioon külm-kuivatati. HAp osakaal želatiini suhtes oli 20%, 40% ja 60%. Seejärel lahustati komposiitne pulber 1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanoolis, mille järel toimus lahuste elektroketrus. Järgnevalt viidi läbi želatiini ristsidestamine EDC/NHS kemikaalide abil.[5]



Joonis 3 a) puhas želatiin, b) 20% HAp, c) 40% HAp, d) 60% HAp [5][8]

Märgati, et HAp osakaalu tõustes, halvenes ka fiibrilise mati kvaliteet (Vt joonis 3). Rakkude kasvatamise katses substraatidel märgati, et nanokomposiitsel materjalil kasvades on paranenud rakkude osteoblastne rakutalitus võrreldes puhtal želatiinil kasvatatud rakkudega.[5]

1.5. Poorse tehniliku rakuvälise maatriksi valmistamise tehnoloogiad

1.5.1. Vahu kopeerimise meetod (*Foam replica method*)

Makropoorsete materjalide loomiseks kasutatakse vahu kopeerimise meetodit. Selleks immutatakse läbivate pooridega vahtu (nt polüuretaanvaht) suspensiooniga, et pooride sisepind katta. Seejärel rullitakse või tsentrifuugitakse saadud materjali, et tagada suspensiooni ühtlane jaotumine poorides. Peale järgnevat kuivamist kuumutatakse vahtu temperatuurini 300-800 °C kiirusega kuni 1 °C/min, et tagada algse vahtmaterjali aeglane lagunemine ja jääkainete difusioon. Vajadusel paagutatakse saadud materjali 1100 °C kuni 1700 °C, et muuta materjal tihedamaks. Selle meetodiga saab luua läbivate pooridega materjali, kus pooride suurus varieerub 200 µm kuni 3 mm.[1]

1.5.2. Lahuse valu ja osakeste väljalahustamine (*Solvent casting and particulate-leaching*)

3D poorsete struktuuride loomisel on kasutatud ka lahuse valu kombinatsioonis osakeste väljalahustamisega. Selleks dispergeeritakse sool (naatriumkloriid, ammoniumbikarbonaat) või glükoosiosakesed polümeeri lahuses. Seejärel lastakse polümeeril dispergeeritud faasi ümber taheneda. Saadud materjalist lahustatakse dispergeeritud faas vee abil välja. Tulemuseks on poorne materjal, kus poori suurus on ligikaudu 500 µm, sõltuvalt soola või muu dispergeeritud osakese suuruselt. Paraku pole selle meetodiga võimalik eriti hästi kontrollida selliseid kriitilisi parameetreid nagu pooride kuju ja poorsuse pidevust.[1]

1.5.3. Külmu-kuivatamine (*Freeze-drying*)

Küllaltki laialt on teaduskirjanduses levinud külmu-kuivatamise meetod, kus polümeeri lahus külmutatakse. Jääkristallide teke külmutamisel põhjustab polümeerimolekulide ümberpaigutumist. Selle tulemusel tekib süsteem, kus jääkristallide vahel on polümeeri võrgustik. Peale külmutamist kuivatatakse materjali madalal temperatuuril vaakumis kuni jää on sublimeerunud. Tulemuseks võib olla mikro- või makro-poorne võrgustik sõltuvalt külmutamise ja kuivatamise kiirusest. Meetodi puuduseks võib lugeda materjali struktuurset ebastabiilsust, poorsuse piiratud kontrollitavust ja täieliku kontrolli puudumist poori suuruse üle.[1]

1.5.4. Gaas-vahustamine (*Gas foaming*)

Polümeermatriksis on võimalik poore luua gaas-vahustamise tehnoloogia abil. Selleks küllastatakse polümeeri lahus CO₂-ga. Seejärel alandatakse rõhku, et lahustunud CO₂ hakkaks lahuse sees intensiivselt aurustuma ja gaasimulle tekitama ning seeläbi materjali poorsemaks muutma. Peale vahustamisprotsessi kuivatatakse saadud materjal normaalarõhul või kriitilise punkti kuivatis. Poorse materjali morfoloogia sõltub protsessi tingimustest nagu näiteks rõhk, temperatuur ja protsessi kiirus.[11] Seda meetodit saab kasutada ka koos soola väljalahustamisega, sellisel juhul segatakse alglahusesse pooride tekitamiseks sisse ka sool, mis lõpuks välja lahustatakse.[1]

1.5.5. Faasi eraldus (*Phase separation*)

Poorsete filtermaterjalide valmistamiseks kasutatakse faasieralduse meetodit. Selleks luuakse olukord, kus minimaalse vabaenergia saavutamiseks tekib süsteemis rohkem kui üks faas. Polümeeri lahus jaotub polümeeririkkaks ja polümeerivaeseks faasiks. Polümeeririkas faas moodustab karkassi ning polümeerivaene faas moodustab poorid. Kaks lahustit peavad olema valitud nii, et ühes lahustub polümeer hästi, teises mitte. Kontrollitud faaside eraldamisel on võimalik valmistada ka rakusubstraadiks sobilikke materjale. Faaside eraldumist saab ka termiliselt juhtida. Kaks faasi tuleb valida selliselt, et nende omavaheline segunemine oleks temperatuurist sõltuv.[12] Peale eraldumist eemaldatakse lahusti kas aurustamise, ekstraktiooni või külmkuivtamismeetodiga.[1]

1.5.6. 3D formeerimine/printimine (*Rapid prototyping*)

See grupp uudseid tehnoloogiaid kasutab arvuti poolt genereeritud andmeid, et toota keerukaid kolmemõõtmelisi struktuure. Kõikide tehnoloogiate esimene etapp on materjali virtuaalse 3D-mudeli disainimine. Seejärel ehitatakse materjal kihthaaval üles. Selle tõttu on kontroll pooride suuruse, geomeetria ja pooride ühendatuse üle väga hea. Enamus taolisi tehnoloogiaid kasutab aktuaatorit, mille küljes on ekstruuder. Kolloidsuspensioon pressitakse ekstruuderist välja sobilikku keskkonda ning selle suspensiooni väljutamise punkti kolmemõõtmelises süsteemis ettemääratult muutes ehitatakse üles kontrollitud arhitektuuriga poorne võrgustik.[1]

Viimasel ajal on arendatud seadmeid, millega oleks võimalik printida veelgi väiksemaid struktuure. Samuti püüeldakse pehmemate struktuuride printimise poole, mis võimaldaks

kasvatada näiteks südamelihase kudet. Arendatakse ka materjale, millel on jäikuse gradient. Seda on võimalik saavutada erinevate suurustega polüeedriliste pooride loomisega struktuuris.[13]

1.5.7. Elektroketrus (*Electrospinning*)

Elektroketruse teel on võimalik valmistada suure eripinna ja heade mehaaniliste omadustega materjale. Saadud materjal koosneb fiibrist, mille diameeter on enamasti mikromeetri suurusjärgus. Seda protsessi juhitakse kõrge elektrivälja abil, mis rakendatakse polümeeri lahuse ning kollektori vahele. Polümeeri lahus pumbatakse läbi nõela, mille otsa tekib polümeeri lahuse tilk, mis püsib seal tänu pindpinevusele. Rakendatud elektrostaatiline jõud peab ületama pindpinevuse jõu, et formeerida fiiber, mis ulatub tilgast kollektorini. Formeeritud fiibrist eraldub lennu ajal lahusti, kuivanud polümeerfiiber koguneb kollektorile. Erinevate lahuse ja protsessi parameetritega on võimalik fiibri omadusi muuta. See protsess võimaldab valmistada läbivate pooridega fiibrilist materjali, olles seejuures lihtsam ja kuluefektiivsem, kui näiteks faasieralduse tehnoloogia.[1]

1.5.8. Molekulaarne iseformeerumine (*Molecular self-assembly*)

Molekulaarne iseformeerumine on kasulik meetod supramolekulaarsete struktuuride loomiseks. Selle meetodi eelduseks on valitud molekulide spontaanne ümberpaigutumine stabiilseteks struktuurideks. Need stabiilsed struktuurid peavad olema termodünaamilises tasakaalus. Taolised molekulaarsed vastastikmõjud pole kovalentsed. Molekulid püsivad koos muude vastastikmõjude tõttu nagu näieks vesinikside, ioonside, van der Waalsi jõud, koordinatsioonjõud ja elektromagneetilised interaktsioonid. Iseformeerumine võib toimuda spontaanselt ka looduses nagu näiteks lipiidse kaksikkihi tekkimine rakumembraanis. Selliseid süsteeme, kus struktuuride tekkimine toimub läbi sisemise korrastumise, nimetatakse alt üles tehnoloogiateks.[1]

1.6. Nanokomposiitide ja rakkude omavaheline interaktsioon

Koetehnoloogia tarbeks loodud materjale katsetatakse mitmel eri meetodil. Üks primitiivsemaid katseid on biomineralisatsiooni katse, kus uuritakse materjalile adsorbeerunud mineraalide hulka. Katsekeha viiakse kehavedelikku simuleerivasse lahusesse (*Simulated body*

fluid, SBF), kus vaadeldakse kindla perioodi möödudes materjalile sadenenud mineraalide kristalle. Selle katsega on võimalik hinnata biomaterjali bioaktiivsust kehaväliselt.[1]

SBF kujutab endast erinevate soolade lahust, mis imiteerib ionide kontsentratsiooni poolest inimese vereplasmat. Sellest lahusest sadeneb välja HAp, mis on keemilise koostise ja struktuuri poolest sarnane luukoes leiduva mineraaliga. Selline katse on esmaseks bioaktiivsuse hindamiseks parim lahendus, sest katses ei kahjustada elavate organismide kudesid.[14]

Rakke on võimalik külvata ka otse biomaterjalile kehaväliselt, et hinnata rakkude levikut, paljunemist ja võimet siseneda materjali sügavamatesse kihtidesse. Keerukam viis sarnast katset läbi viia on kasutada bioreaktorit, kus on võimalik väga täpselt kontrollida toitainete hulka ja massi liikumist. Bioreaktor on mõeldud rakukultuuri toetamiseks ja rakkude leviku kiirendamiseks.[1]

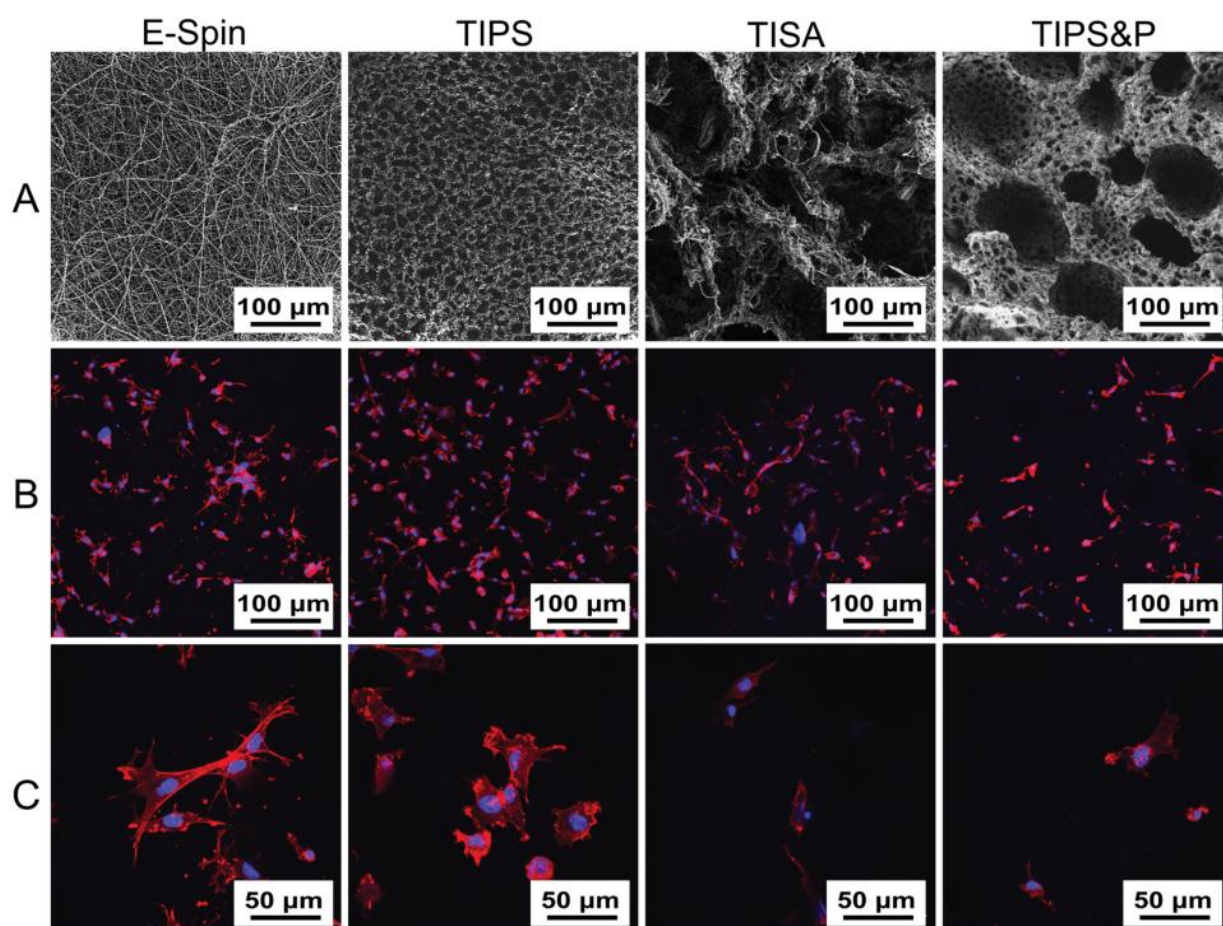
1.7. Fiibriline kolmemõõtmeline kasvumaatriks

Elektroketrase meetod on atraktiivne viis valmistamiseks fiibreid, mis on naturaalselt kollageenifiibritega sarnase diameetriga. Seda meetodit saab kasutada paljude erinevate polümeeride töötlemiseks. Saadav materjal on poorne ja suure eripinnaga ning toetab seeläbi rakkude adhesiooni, levikut, migratsiooni ja diferentseerumist. Samuti on võimalik polümeeri lahusesse lisada bioaktiivseid aineid, mis veelgi enam toetavad rakkude elutegevust. Elektroketrasmeetodi tulemuseks on tihe materjal, kus pooride suurus on mikromeetri suurusjärgus. Paraku on sellised poorid rakkude sisenemiseks liiga väikesed. Seega on vaja saavutada olukord, kus elektrokedratud materjali sisse on loodud struktuure kogu selles ulatuses läbivad makropoorid.[15]

Üks meetod selliste struktuuride loomiseks on elektrokedratud materjali lõhkumine väiksemateks n-ö ehituskivideks, millest on võimalik üles ehitada kolmemõõtmeline maatriks. 2015. aastal ka selline eksperiment läbi viidi. Polükaprolaktoon (PCL) nanofiibrid valmistati elektroketrase teel ja purustati pärast vedelas lämmastikus külmutamist. Saadud nanofiibri jupid pandi vesilahusesse, kus nad iseeneslikult aglomereerusid 55 °C juures. Katsekehale anti nimetus TISA. Antud katse puhul ei kasutatud ristsidestamiseks mõeldud aineid, vaid struktuur püsis koos vaid mehaanilise põimumise tulemusena. Järgmiseks külm-kuivatati saadud materjal. Teises katses kasutati termiliselt indutseeritud faasi eraldamist (TIPS), et

nanofiibrite vahele makropoore tekitada. Kolmas katsekeha loodi nagi teinegi, kuid seal kasutati lisaks veel pooride tekitamiseks porogeeni, mis hiljem välja lahustati (TIPS&P). 3D PCL proovid saadi silindrikujulistena ning need meenutasid pigem käsna.[15]

Töörühm analüüsis erinevate meetoditega valmistatud kolmemõõtmelisi PCL struktuure elektronmikroskoobi abil ning külvas kõigile näidistele ka luuüdist pärinevaid tüvirakke (Vt joonis 4). Struktuuriselt sarnanes TISA proov kõige rohkem kehas leiduvale loomulikule rakuvälisele maatriksile. Uuriti rakkude migreerumist, levikut ning elujõulisust. Selgus, et 2D materjalidel (elektroketrus ja TIPS) oli pinnal rohkem rakke, kui 3D materjalidel (TISA ja TIPS&P). Samas olid rakud sisenenud 24 h möödudes täielikult 3D materjalidesse ning seal ühtlaselt jaotunud.[15]



Joonis 4. A: Elektronmikroskoobi pildid erinevatest loodud struktuuridest. B: Rakkudest tehtud mikroskoobi pildid 20x suurendusega. C: Rakkudest tehtud mikroskoobi pildid 60x suurendusega [15]

1.7.1. Glükoosiga ristsidestatud fiibriline želatiinmaterjal

Katsetega on kindlaks tehtud, et elektrokedratud želatiini termiline ristsidestamine glükoosi abil muudab materjali vees lahustumatuks. Glükoosi osakaalu želatiini suhtes varieerides on võimalik muuta materjali mehaanilisi omadusi.[16] Lisaks sellele, on tekkinud materjal bioühilduv ning biodegradeeruv, kui glükoosi osakaal želatiini suhtes on alla 15%. Siimoni avaldatud töös külvati fibroblaste elektrokedratud želatiinist nanofiibritele, mis olid eelnevalt glükoosiga ristsidestatud. Märgati, et suuremate ja lõdvemalt paiknevate fiibrite peal toimus rakkude orienteerumine paralleelselt fiibri kimpudega. See näitab, et rakkudel ilmnes substraadi fiibrilisusest tulenev spetsiifiline reaktsioon.[17]

1.7.2. Rakkude diferentseerumine

Tüvirakkude diferentseerumine sõltub paljudest parameetritest. Ümbritsevate rakkude, ekstratsellulaarse matriksi, kasvufaktorite ja ka näiteks mikrokeskkonna muutmisega on võimalik suunata, milliseks keha rakuks tüvirakk diferentseerub. On ka mitmeid füüsikalisi parameetreid, mis seda protsessi mõjutavad. Biomaterjalide arendamisel tuleb neid kõiki faktoreid arvestada. Viimase paarikümne aasta jooksul on tehtud suuri edasiminekuid biomaterjalide arendamise valdkonnas. Nüüdseks on teada, et raku kasvusubstraadi jäikus, pinna morfoloogia ja hüdrofiilsus on rakkude diferentseerumise suunamise seisukohast olulise tähtsusega.[18]

On ka näidatud, et erinevate kasvufaktoritega saab tüvirakke suunata diferentseeruma osteoblastideks. Levinuimad neist on BMP-2 ja DEX. Loomkatsed näitasid, et kasvufaktoritega dopeeritud biomaterjal taastas luukude paremini, kui ilma kasvufaktoriteta materjal.[7]

2. Eksperimentaalne osa

Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli valmistada želatiin-hüdroksüapatiit komposiitmaterjal, mis oleks orgaanilise ja anorgaanilise faasi vahelise suhte poolest võimalikult sarnane inimese kehas leiduvale luuga. Orgaaniline fiibriline faas koosnes želatiini ja glükoosi segust, mille omadused on varasemalt uuritud.[3], [16] Kõik želatiin/glükoosi lahustamised ja edasised segamised tehti 50 °C juures.

2.1. Kasutatavad seadmed

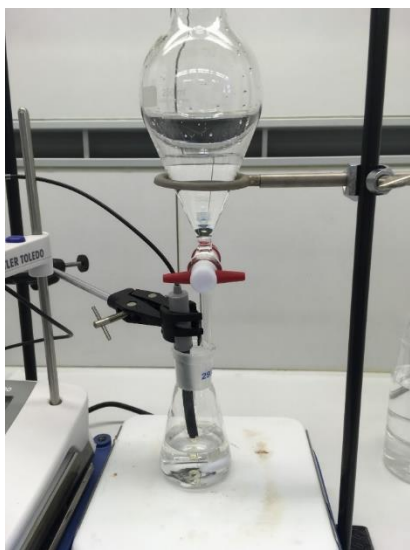
Seade	Mudeli nimetus	Tootja
SEM + EDS	Helios NanoLab 600	FEI
SEM	Vega II	Tescan
Homogenisaator	Ultraturrax	IKA
Optiline mikroskoop	Eclipse E200	Nikon
Rotaatorauruti	Rotavapor R-210	Buchi
Ioontolmusti	SC7640	Polaron
Poleerimiseseade	Vector	Buehler
Tsentrifuug	Multifuge X1R	Thermo

Tab 1. Kasutatud seadmete loetelu

2.2. Ketruslahuste valmistamine

HAp sünteesi lähteained ning esmased parameetrid valiti kirjanduse põhjal. [4], [5] Käesolevas töös kasutati HAp sünteesiks läbivalt samu lähteaineid, kuid varieeriti töötlemisprotsesse ja -parameetreid. Lahusesse viidud Ca^{2+} ioonid reageerivad toatemperatuuril ja normaalarõhul PO_4^{3-} ioonidega. Oluliseks parameetriks on pH, mida hoiti reaktsiooni vältel 9,5 juures. Lähteaineteks olid CaCl_2 ja NaH_2PO_4 , mis on mõlemad vees lahustuvad soolad. PH korrigeerimiseks kasutati 1M NaOH-i. Vastavalt HAp valemile, mis on $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, arvutati ka lähteainete kogused. Esimeses katses sünteesiti HAp osakesi želatiini vesilahuses. Selleks lahustati 50 °C juures 1 g želatiini 50 ml destilleeritud vees. Teises anumask lahustati 1,11 g CaCl_2 50 ml destilleeritud vees. Eraldi anumask lahustati 0,72 g NaH_2PO_4 50 ml destilleeritud vees. Esimesed kaks lahust kallati kokku ning jätkati segamist 50 °C juures kuni tekkis

homogeenne lahus. Seejärel hakati NaH_2PO_4 lahust tilkhaaval lisama (Vt joonis 5). Reaktsiooni vältel mõõdeti lahuse pH-d ning hoiti seda 9,5 juures.



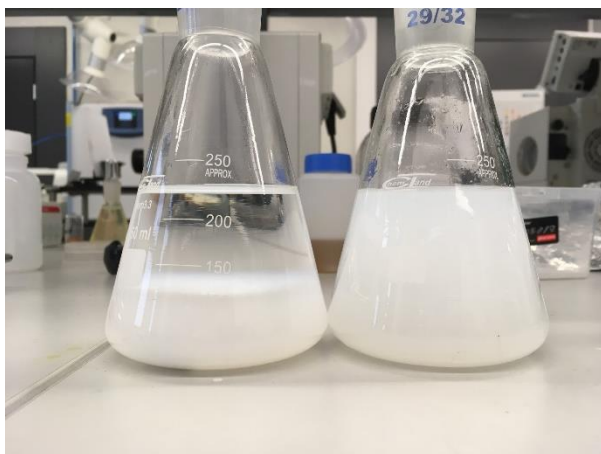
Joonis 5. HAp sünteesi installatsioon



Joonis 6. Rotaatorauruti

Saadud lahus sisaldas visuaalsel vaatlusel HAp osakesi, kuid oli fiibri ketramiseks paraku liiga madala kontsentratsiooniga (kasutatud fiibri valmistamise meetod nõuab, et tahke massi osakaal lahuses oleks vahemikus 28-40%). Lahust õnnestus rotaatoraurutil 50 °C juures piisavalt kontsentreerida (Vt joonis 6). Paraku võttis see protsess aega viis tundi, seetõttu välditi järgnevates eksperimentides želatiiniga lahuste kontsentreerimist.

Järgnevalt otsustati sünteesida esmalt eraldi suurem kogus HAp osakesi ja lisada želatiin osakeste suspensioonile. Teises katses sünteesiti samadest lähteainetest HAp osakesed vesilahuses, mille järel tsentrifuugiti ja pesti suspensioon viis korda (Vt joonis 7). Seejärel viidi osakesed koonilisse kolbi ning lisati vett nii kaua, et suspensiooni ruumala oleks 1 l. Et osakesed oleksid võimalikult hästi dispergeeritud, homogeniseeriti suspensioon viie minutit vältel kiirusel 25 000 pööret minutis tabelis 1 toodud seadmega (Vt joonis 8).



Joonis 7. Sünteesitud HAp suspensioonid



Joonis 8. Suspensiooni homogeniseerimine

Tunni aja möödudes oli osakestest anuma põhja moodustunud sade, mille ruumala oli ~400 ml. HAp suspensiooni kontsentratsiooni ja saagise määramiseks segati mahutit hoolikalt. Seejärel eraldati 10ml suspensiooni, mis Petri alusel kuivatati. Peale kuivamist saadi valge pulber. Sellist sadestamist korrati 3 korda, sünteesi saagised olid vahemikus 96-97%.

Peale HAp suspensioonide kontsentratsioonide leidmist oli võimalik välja arvutada erinevate ainete kogused ketruslahuses. Edaspidi nimetatakse töös ketruslahuseid ja neist valmistatud materjali näidiseid nende HAp kontsentratsioonide järgi.

HAp osakaal želatiini suhtes (%)	10	20	30	40	50
Lahuse kogumass (g)	15	15	15	15	15
Kogu tahke massi osakaal lahuse suhtes (%)	32	34	36	38	40
Želatiini/Glükoosi osakaal lahuse suhtes (%)	28,8	27,2	25,2	22,8	20
Želatiini/Glükoosi kogus (g)	4,32	4,08	3,78	3,42	3,00

HAp osakeste osakaal lahuse suhtes (%)	3,2	6,8	10,8	15,2	20
HAp osakeste mass (g)	0,48	1,02	1,62	2,28	3
HAp suspensiooni kontsentratsioon (g/L)	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55
Vajaliku HAp suspensiooni kogus (ml)	61,9	131,6	209,0	294,2	387,1
Vajaliku vee kogus ketruslahuses (g)	10,2	9,9	9,6	9,3	9

Tabel 2. Erinevate proovide parameetrid

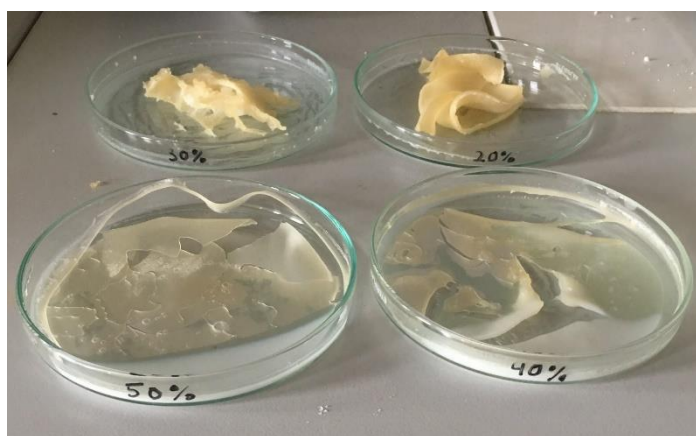
Nagu tabelist nr 2 ilmneb, ületab HAp osakeste suspensiooni vee kogus mitmekordselt ketruslahuse vee hulga. Lahuste kontsentreerimiseks, kasutati tsentrifuugimist. Esimese sammuna optimeeriti tsentrifuugimise aeg ja kiirus, mis tulid valida selliselt, et HAp osakesed oleksid kontsentreeritud nii, et neid oleks võimalik taas vees dispergeerida. Kõige sobilikumaks osutus 5 minutit kiirusel 3000 pööret minutis. Selliste parameetritega oli võimalik saada viskoosne, hüdrogeelilaadne pasta, kus HAp osakeste kontsentratsioon oli 63 g/L.

Hap osakeste mass (g)	0,48	1,02	1,62	2,28	3
Hap suspensiooni kontsentratsioon (g/L)	63	63	63	63	63
Vajaliku Hap suspensiooni kogus (ml)	7,6	16,2	25,7	36,2	47,6
Vajaliku vee kogus ketruslahuses (g)	10,2	9,9	9,6	9,3	9

Tabel 3. Muudetud parameetritega proovide tabel

Uue kontsentratsiooni tabelisse kandmisel (Tabel 3) järeldub, et taolise tehnoloogiaga on võimalik valmistada ainult 10% želatiin/HAp komposiitmaterjal, mille ketruslahus on piisava viskoossusega. Teooria tõestamiseks valmistati 10% lahusest edukalt fiibriline materjal. Kuna aga kõrgemate HAp kontsentratsioonidega polnud võimalik katsekehasid valmistada, otsustati muuta ketrussegude valmistamise viisi.

Erinevad eelnevad katsetused näitasid, et želatiin ja HAp moodustavad vesilahuses stabiilse homogeense süsteemi. Kui tahke massi osakaal on suurem, kui 20%, ei täheldatud ka 1 h möödudes faaside eraldumist. Lisaks aitab süsteemi stabiliseerumisele kaasa želatiini lahuse geelistumine toatemperatuuril. Neid aspekte ära kasutades otsustati valmistada želatiini/HAp kiled, millest omakorda saaks valmistada uuesti lahused (Vt joonis 9). Idee seisneb HAp osakeste ja vee vahelise interaktsiooni vähendamises. Nagu eespool mainitud, moodustab HAp osakesed vesilahuses stabiilse pasta. Kui aga osakesed oleksid teatud määral aglomereerunud, saaks tulenevalt HAp-vesi piirpinna kogupindala vähenemisest valmistada ka pastast kõrgema HAp kontsentratsiooniga lahuseid. Seda teooriat testimiseks valmistati želatiin-glükoos-HAp kiled, kus HAp osakaal oli 10%, 20%, 30%, 40% ja 50%.



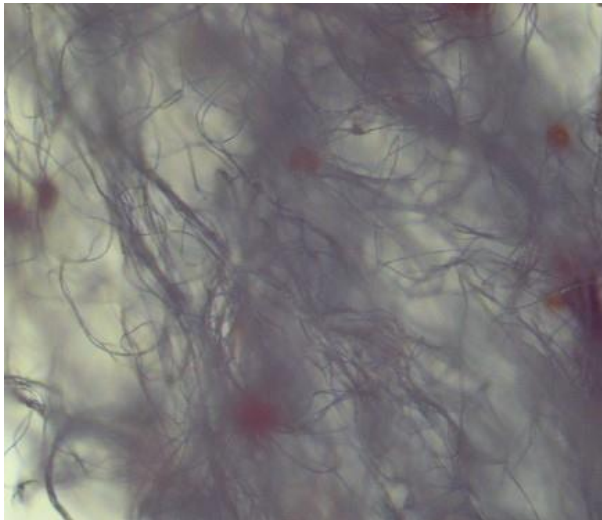
Joonis 9. Želatiin-glükoos-HAp kiled peale kuivamist.

Saadud kiled kuivatati 48 h tõmbekapi all. Seejärel oli võimalik kilesid uuesti üles lahustada, saadi fiibermaterjali ketramiseks sobilik lahus, millest oli võimalik valmistada fiibriline komposiitmaterjal. Saadud materjal töödeldi ristsidestamiseks termiliselt 170 kraadi juures 2 h.

2.3. Komposiitmaterjali analüüs

2.3.1. Optiline mikroskoopia

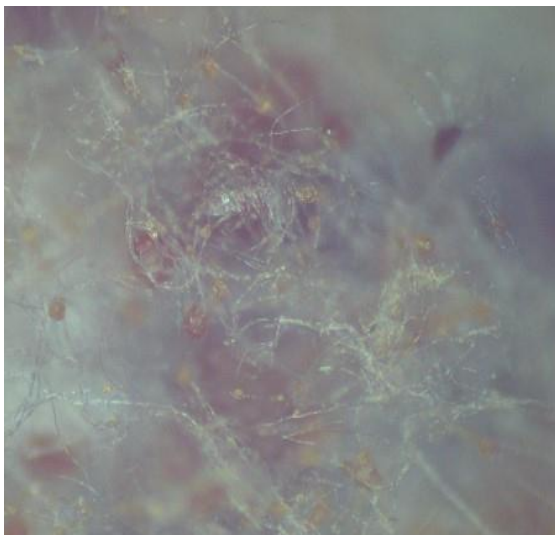
Valmistatud materjali struktuuri esmaseks hindamiseks vaadeldi proove 40x suurendusega valgusmikroskoobi all.



Joonis 10. 10% želatiin-HAp komposiitmaterjal

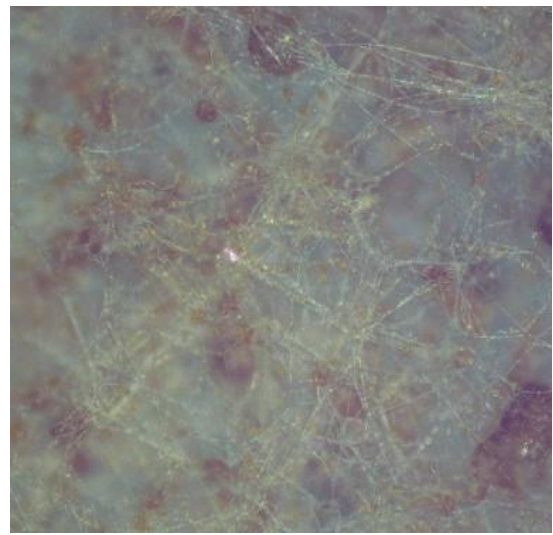


Joonis 11. 20% želatiin-HAp komposiitmaterjal



Joonis 12.

30% želatiin-HAp komposiitmaterjal



Joonis 13.

40% želatiin-HAp komposiitmaterjal

Piltidelt (Vt joonis 10-13) on selgelt näha materjali fiibriline struktuur. Esmasel hinnangul tundub, et ümarad ja ovaalsed moodustised on defektid, mille hulk suureneb HAp kontsentratsiooni kasvades. Fiibrite paiknemise tihedus on visuaalsel vaatlusel väiksem, kui elektrokedratud fiibrilise materjali puhul. Taolise õhulise struktuuri tekkimine on antud meetodi puhul tavapärane.[3]

2.3.2. Proovi ettevalmistamine SEM ja EDS mõõtmiseks

Fiibrilise komposiitmaterjali tükid liimiti spetsiaalse hõbeda pastaga alumiiniumist alusele. Alused olid eelnevalt siledaks poleeritud tabelis 1 nimetatud masinaga (Vt joonis 14-15).



Joonis 14. Poleerimisseade



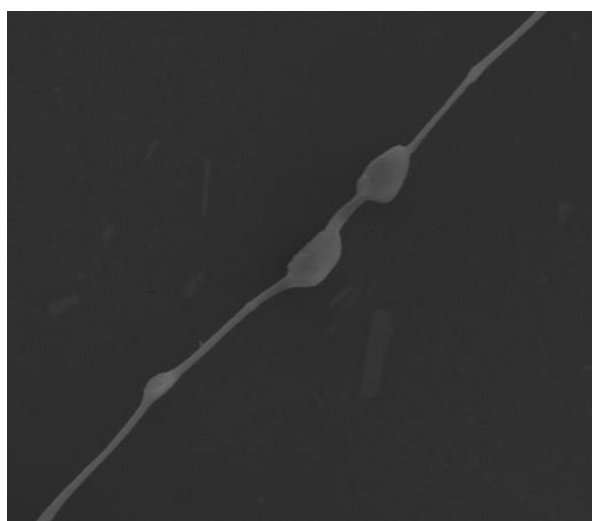
Joonis 15. Poleeritud proovi alused

Ette valmistati ka proov HAp osakeste mõõtmiseks. Selleks võeti eespool kirjeldatud HAp suspensioonist 1 ml proov, mis lahjendati 20x. Seejärel tilgutati tilk eelnevalt kuumutatud poleeritud alusele. Kuumutamine oli vajalik selleks, et vesi võimalikult kiiresti auruks, ning HAp kristallid jääksid alusele võimalikult üksteisest eraldi. Poleerimine oli vajalik selleks, et alumiiniumi pinnakaredus ei segaks osakeste mõõtmist.

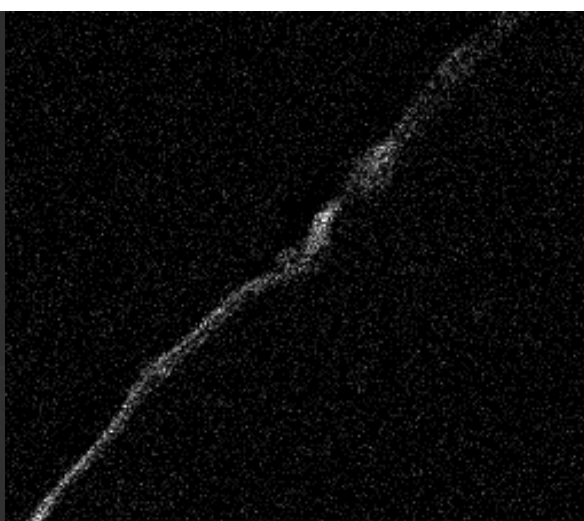
Fiibrite alusele kinnitamise järel viidi läbi proovi katmine Au/Pt kihiga ioontolmustamise meetodil. HAp osakesi juhtiva kihiga ei kaetud, kuna eeldatavasti on kristallid piisavalt eraldi, et laadumist ei toimuks.

2.3.3. Elementanalüüs (EDS)

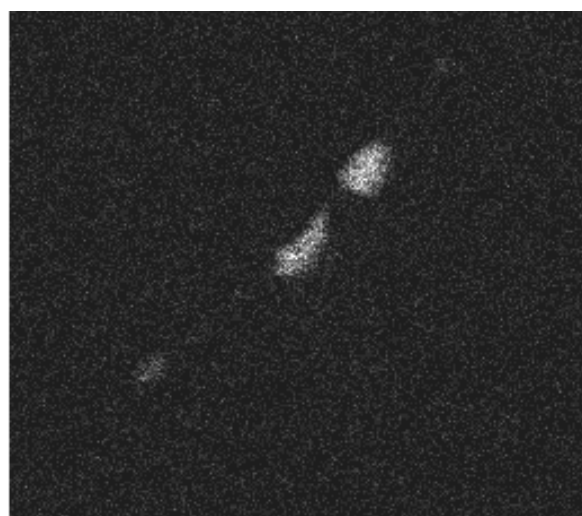
Selleks, et veenduda HAp osakeste olemasolus fiibrites, viidi läbi energia dispersiivne röntgenspektroskoopia Helios NanoLab 600 skaneeriva elektronmikroskoobiga. Proovialuselt otsiti üksik fiiber, mida oleks hea analüüsida. Mõõtmised tehti 10 kV juures vooluga 1,4 nA. Katse viis läbi Maidu Merisalu käesoleva töö autori juuresolekul. Mõõdeti Ca, O ja C kiirgust, mis kaardistati (Vt joonis 16-19). Piltidelt on selgelt näha HAp koosseisu kuuluva Ca paiknemist fiibri paksenenud osas. Sellest järeldub, et materjalis on selged regioonid, kus HAp osakaal on suurem, kui mujal.



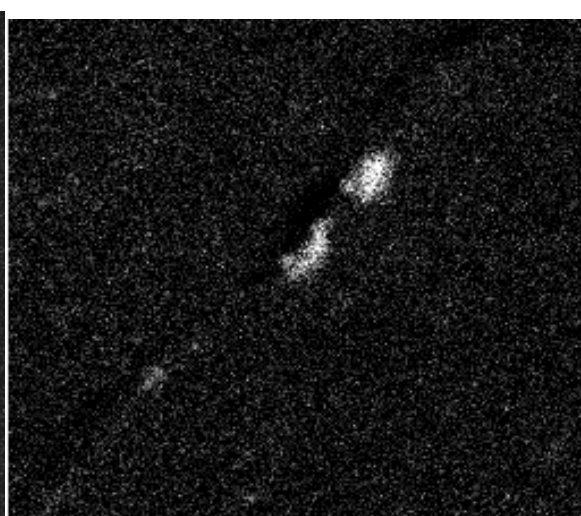
Joonis 16. SEM pilt 50% fiibrist



Joonis 17. Kaardistatud C Ka1&2 kiirgus



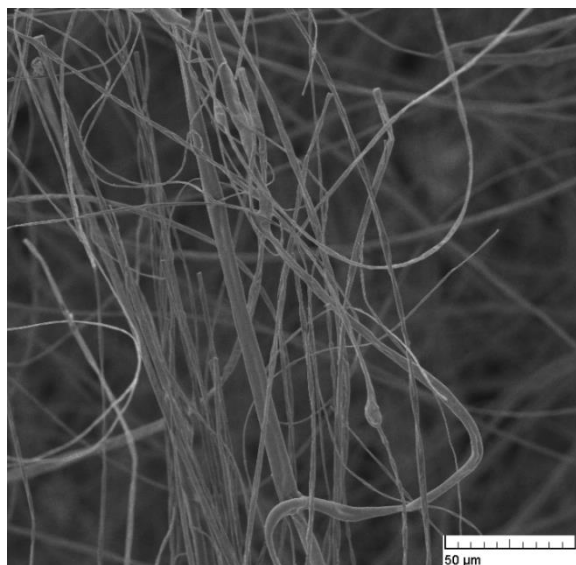
Joonis 18. Kaardistatud Ca Ka1 kiirgus



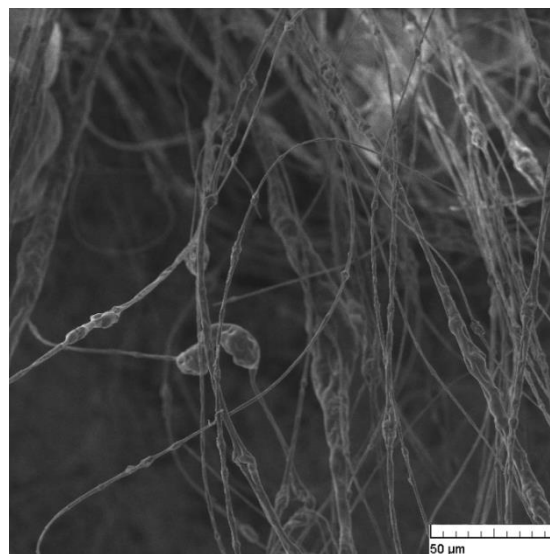
Joonis 19. Kaardistatud O Ka1 kiirgus

2.3.4. SEM piltide analüüs

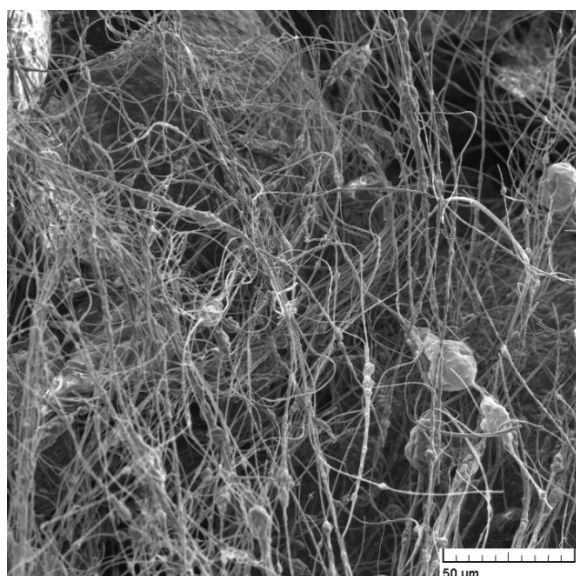
Saadud materjali edasisteks analüüsideks vaadeldi proove skaneeriva elektronmikroskoobiga. Elektronide kiirendamiseks kasutati pinget 5 kV. Et võrrelda HAp osakaalu suurenemisest maatriksi suhtes tulenevaid muutusi, tehti kõik pildid sama suurenduse juures. SEM mõõtmised fiibrilisest materjalist teostas käesoleva töö autor. Piltidelt on näha hõredat fiibrilist struktuuri ning HAp rikaste regioonide hulga suurenemist HAp osakaalu suurenemisel (Vt joonis 20-24).



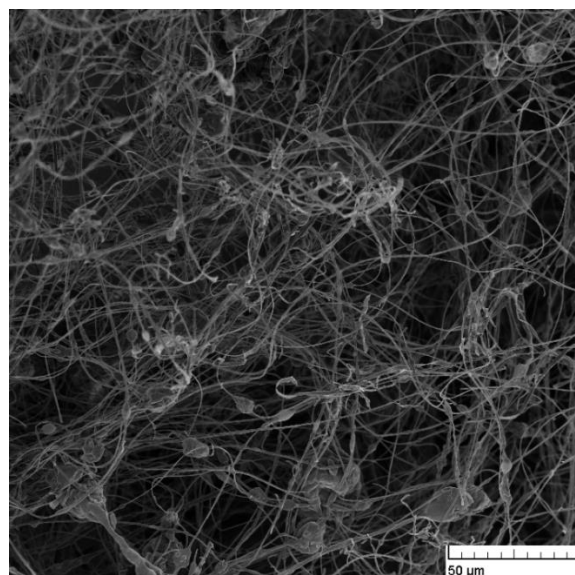
Joonis 20. 10% HAp materjal



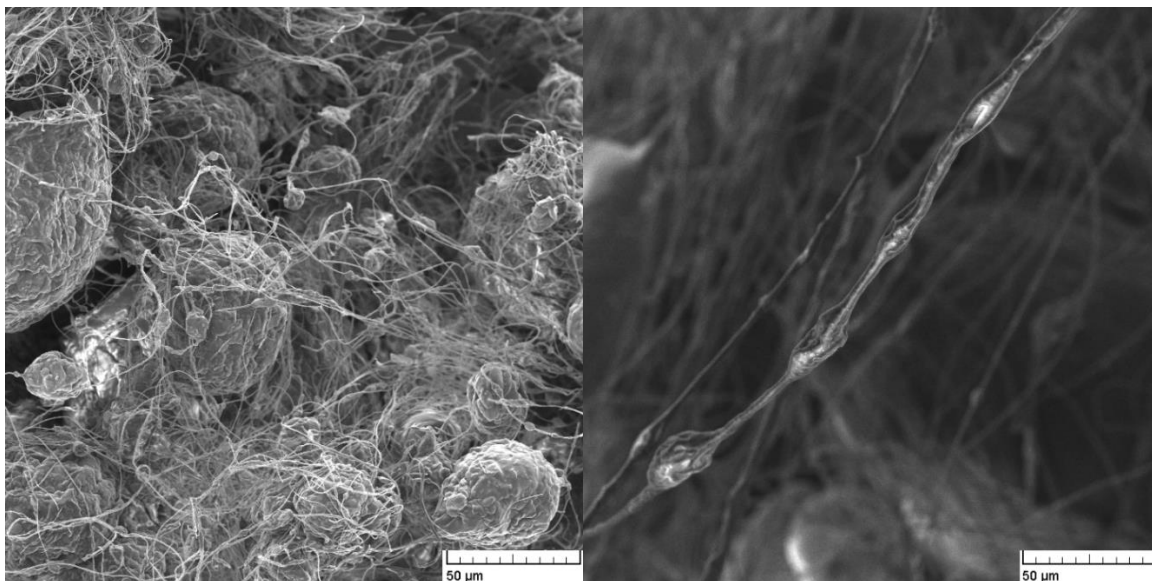
Joonis 21. 20% HAp materjal



Joonis 22. 30% HAp materjal



Joonis 23. 40% HAp materjal

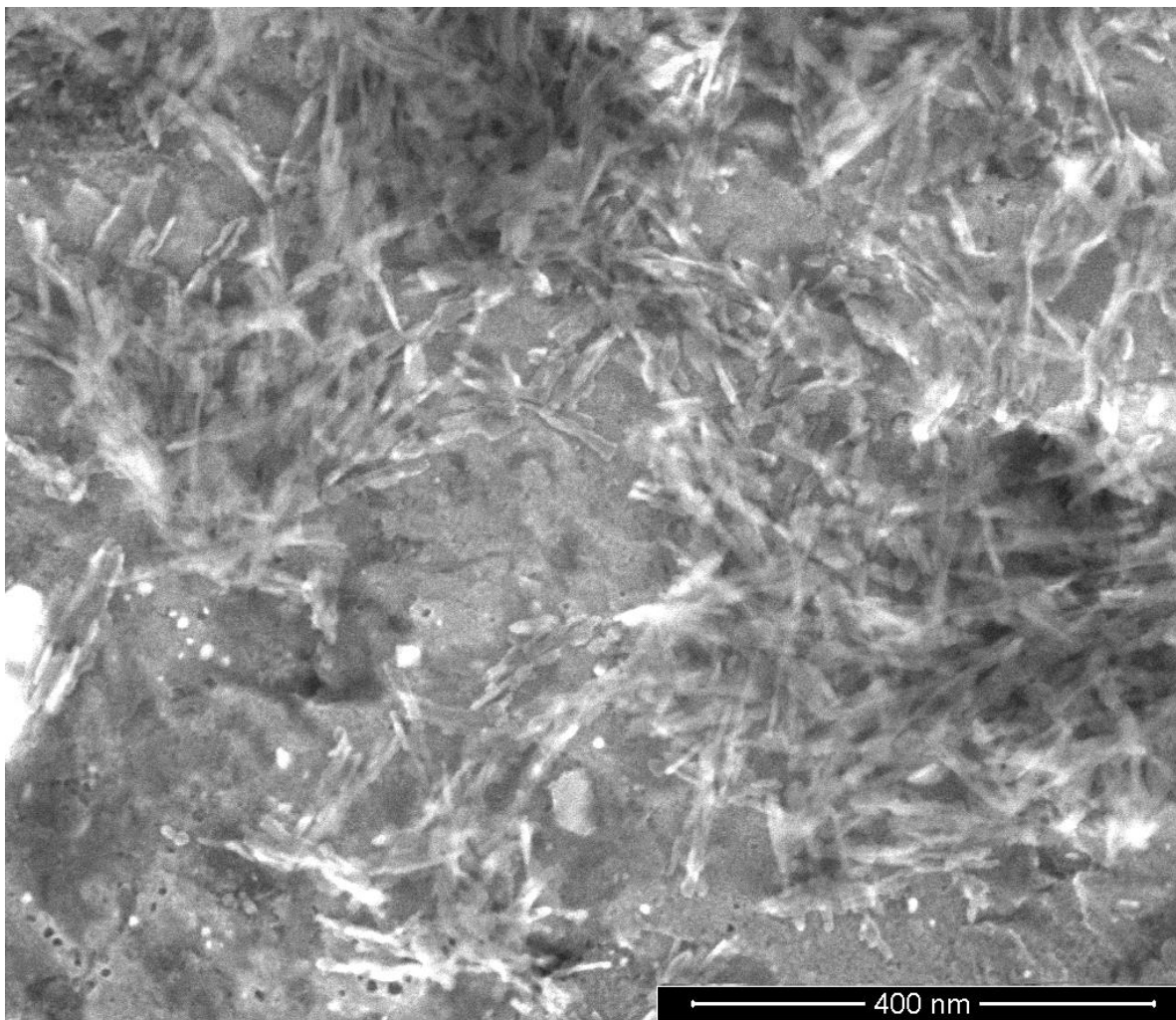


Joonis 24. 50% HAp materjal

Joonis 25. HAp rikkad regioonid fiibris

Jooniselt 25 on näha laienenud fiibrid, mida saab vaadelda, kui HAp rikkaid regioone.

Parema arusaama saamiseks sünteesitud HAp osakeste suurusest ja morfoloogiast analüüsi HAp osakesi eraldi kõrglahutusega elektronmikroskoobis. Analüüsi kõrglahutusega SEMiga viis läbi Mairo Merisalu töö autori juuresolekul. Jooniselt 26 on võimalik hinnata HAp kristallide suurust ja morfoloogiat. Märkati, et kristallid on traatjad ja küllaltki ebakorrapärase pinnaga. HAp osakeste suurus on piisavalt väike (Lisa 1), et mahtuda fiibri sisse, mille diameeter jääb mikromeetri suurusjärku. Kare pind ning väikesed mõõtmed võiks anda aimu, et želatiin/HAp interaktsioon on piisavalt tugev antud rakenduses.



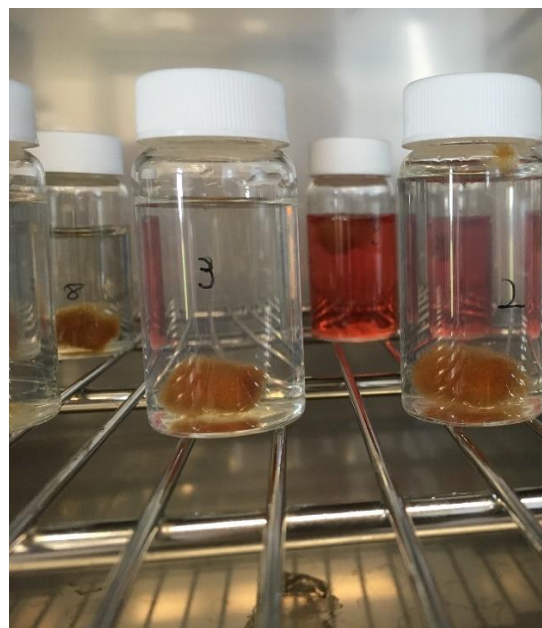
Joonis 26. HAp kristallid

2.4. SBF ja PBS katsed

Fiibrilisest želatiin/HAp komposiitmaterjalist valmistati rullimise teel silindrikujulised katsekehad (Lisa 2). Katsekehade tiheduseks hinnati 0,28 g/cm³ ning poorsuseks 77%. Materjali bioaktiivsuse hindamiseks sukeldati katsekehad SBF ja PBS lahustesse (Vt joonis 27). SBF lahuse valmistas töö autor eeskirja järgi.[19] PBS lahus valmistati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis tabelis 4 toodud retsepti järgi.

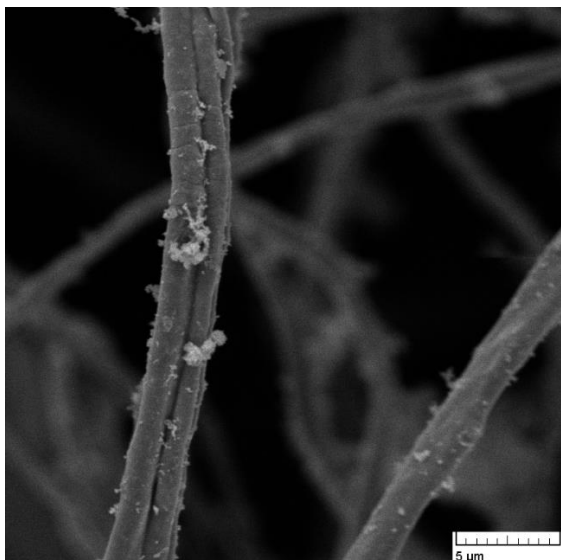
Lisatud aine	Kogus (mM)	Kogus(g)
KCl	2,7	0,2
NaCl	137	8,0
KH ₂ PO ₄	1,8	0,2
NaHPO ₄	10	1,15
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,9	0,13
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,5	0,10

Tabel 4. 1 L PBS lahuse valmistamise retsept

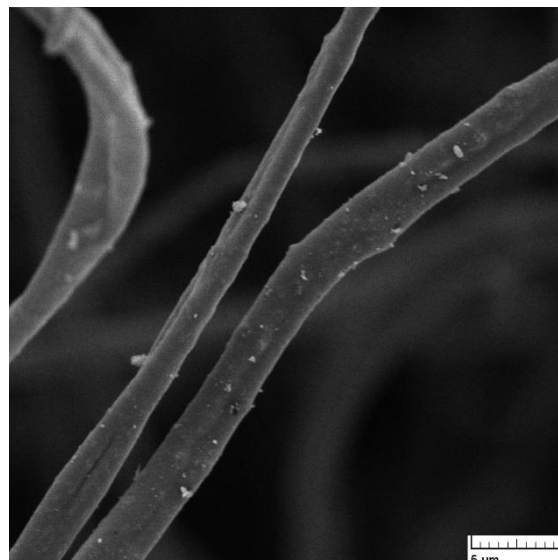


Joonis 27. Sukeldatud materjali näidised

Viaalides olevad katsekehad asetati ahju, mille temperatuur seati 36.5 °C peale, et imiteerida inimkeha temperatuuri.[19] 180 h möödudes võeti näidised välja, pesti rohke veega, seejärel veevaba etanooliga. Proovid kuivatati kriitilise punkti kuivatis, et vältida lahusti aurumisel normaaltingimustel mõjuvaid kapillaarjõude, mis fiibrilist struktuuri muudavad. Seejärel valmistati proovid ette SEM mõõtmiseks.



Joonis 28. 180h SBF lahuses olnud fiibrid



Joonis 29. 180h PBS lahuses olnud fiibrid

Piltidelt on selgelt näha, et lahusest on välja sadenenud kristalliline faas, mis on kinnitunud fiibritele (Vt joonis 28-29). Seda täheldati nii SBF kui ka PBS lahusest võetud proovide puhul. Eeldatavasti on tegu hüdroksiapatiidi kristallidega.

3. Järeldused ja arutelu

Autori eesmärk oli materjali valmistamise igas etapis kasutada odavaid ja keskkonnasõbralikke lähteaineid ja protsesse. Seetõttu kasutati materjali valmistamisel kasutati lahustina ainult vett. See aga tingis ketruslahuste valmistamisel lisaetapi tekitamise vajaduse, kuid see tundus autori arvates mõistlikum valik, kui kasutada ketruslahuse valmistamisel lahustina näiteks 1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanooli[5] või teisi kulukamaid ja ohtlikumaid solvente.

Esmane katse nägi ette HAp osakeste sünteesi želatiini lahuses. Paraku olid HAp osakeste, želatiini ja lahusti osakaalud fiibri ketramiseks ebasobivad ning raskesti muudetavad, mistõttu otsustati järgnevalt želatiin lahustada HAp suspensioonis, mille kontsentratsiooni sai vee lisamise ja tsentrifuugimisega muuta. HAp osakeste mitmekordne pesemine eemaldas ebavajalikud Cl^- ja NA^+ ioonid, mida poleks saanud lihtsasti eemaldada, kui HAp osakesed oleks sünteesitud otse želatiini lahusesse. HAp osakeste suspensiooni oli võimalik kontsentreerida kuni 63 g/l, et säiliks veel osakeste dispergeeritavus. Ka sellel kontsentratsioonil moodustasid osakesed pastalaadse hüdrogeeli tänu vesiniksidemetele. Järgnevalt otsustati indutseerida osakeste osaline aglomereerumine želatiini matriksis. Selleks valmistati želatiin/HAp kiled, mida õnnestus edukalt vees lahustada, millest omakorda oli võimalik valmistada fiibriline materjal. EDS analüüsid näitasid, et HAp osakesed paiknevad fiibrite laienenud regioonides, mis viitab osakeste aglomereerumisele. Fiibrite formeerumise seisukohast ei paistnud aglomeraadid protsessi eriti häirivat. Taolist struktuuri pole võimalik tõenäoliselt elektroketruse meetodiga saavutada, mistõttu võib pidada valmistatud materjali unikaalseks, kuna ka kirjanduses leiduvates näidetes pole sellist HAp osakeste jaotust varem kirjeldatud.

Töö eesmärgiks oli valmistada esimesed prototüüp-materjali näidised, mis oleksid kuju poolest sobilikud luukoe taastamise rakenduses. Valmistatud proovide mikrostruktuuri analüüs näitas, et fiibrilises materjalis on piisava suurusega poorid rakkude sisenemiseks. Samuti tagab fiibriline struktuur avatud pooridega süsteemi, kus on võimalik toit- ja signaalainete, vitamiinide ning mineraalide vaba liikumine. Rakkude adhesiooni seisukohast on fiibriline struktuur kinnitumiseks väga sobilik. Materjali struktuuri seisukohalt ollakse seega õigel teel, eeldatavasti toetab saavutatud morfoloogia rakkude migratsiooni, adhesiooni ja raku elutegevuseks vajalike toitainete liikumist.

Biomaterjali väga olulisteks omadusteks on bioaktiivsus ja vastavalt rakendusele piisav eluiga. SBF katsed näitasid, et fiibritele sadenevad 180 h möödudes kristallid, mis on eeldatavasti HAp. See on selge märk bioaktiivsusest. Järgnevates uuringutes oleks vajalik viia läbi sadenenud aine koostise ja kristallstruktuuri analüüs, et määrata selle täpne koostis ja faas. 180 h möödudes oli ka aimatav, et mõne katsekeha mõõtmed oli vähenenud. Paraku ei täheldatud SEM analüüsist fiibrite osalist degradeerumist ega struktuuri muutust, seega peaks tulevikus spetsiaalselt analüüsima pikaajalist mõju materjalile simuleeritud keskkonnas. Mõnedel katsekehtadel märgatud bakterite kolooniad (Lisa 1) viitavad sellele, et steriilne keskkond on vaja tagada ka rakukultuuriekspperimentidele eelnevas arendustöös.

Töös toodud tulemused annavad julgust jätkata materjali arendust ja analüüsimist. Järgmise sammuna tuleks materjalile külvata rakukultuure, et vaadelda osteoblastide reaalsel käitumist materjalis.

Kokkuvõte

Käesolevas töös anti ülevaade luukoe taastamiseks mõeldud materjalide klassidest, nende valmistamise tehnoloogiatest ning sealjuures kasutatavatest komponentidest. Tutvuti kasvumaatriksiks mõeldud biomaterjalide olulisemate omadustega ning tutvustati strateegiaid nende omaduste määramiseks.

Eksperimentaalse osa esimeses osas jõuti läbi protseduuri pideva modifitseerimise tulemusena meetodini, mis võimaldas valmistada homogeensed želatiin/hüdroksüapatiit komposiitmaterjalkiled, kus HAp osakaal oli 10%, 20%, 30%, 40% ja 50%. Kilede lahustamisel saadi sobivad ketruslahused fiibrilise materjali valmistamiseks.

Valmistatud materjali struktuuri analüüsiti SEMiga, teostati üksiku fiibri EDS elementkaardistamine ning hinnati materjali bioaktiivsust simuleeritud keskkonnas. Samuti mõõdeti SEMiga sünteesitud HAp osakesi, mis osutusid nõelalaadseteks ning samas piisavalt väikesteks, et mahtuda želatiini fiibri sisse. Materjali struktuur oli fiibriline, vildilaadne ja läbivate pooridega. Fiibritel esinesid HAp rikkad regioonid, mida kinnitas ka EDS analüüs. Katsekehad sukeldati 180 tunniks SBF ja PBS lahustesse, mille järel oli võimalik eristada fiibritele kinnitunud kristallilist faasi, mis suure tõenäosusega oli lahusest välja sadenenud HAp osakesed. Selle katsega veenduti, et materjal on bioaktiivne. Käesolevas töös läbi viidud katsete ja analüüsida tulemused on paljutõotavad, arendustööd jätkatakse rakukultuuriekspperimentidega.

Summary

An overview of scaffolds, their processing methods and materials that enhance bone tissue regeneration was given in the thesis. Properties of growth matrix and their evaluation techniques were introduced.

In the experimental part, novel gelatin-hydroxyapatite composite film was prepared through continuous development of the method. Films were made with HAp concentrations of 10%, 20%, 30%, 40% and 50% that could later be dissolved to make solution for fiber spinning. Fibrous scaffolds with corresponding HAp concentrations were prepared.

Structure of the material was analyzed with SEM, single fiber EDS mapping was carried out and bioactivity was evaluated in simulated environment. HAp crystals were characterized with high-resolution SEM that appeared to have needle-like morphology and dimensions small enough to fit into the fiber. Scaffolds structure was fibrous and cotton-like with interconnected pores throughout material. EDS mapping showed that fibers had HAp-rich regions. Crystalline phase was detected on the surface of the fiber after samples were immersed in to SBF and PBS solutions for 180 hours which are probably HAp particles precipitated from the solution. This experiment indicated that scaffolds are bioactive. Next stage is to carry out tests with cell cultures as the results of the experiments and analysis are promising.

Kasutatud kirjandus

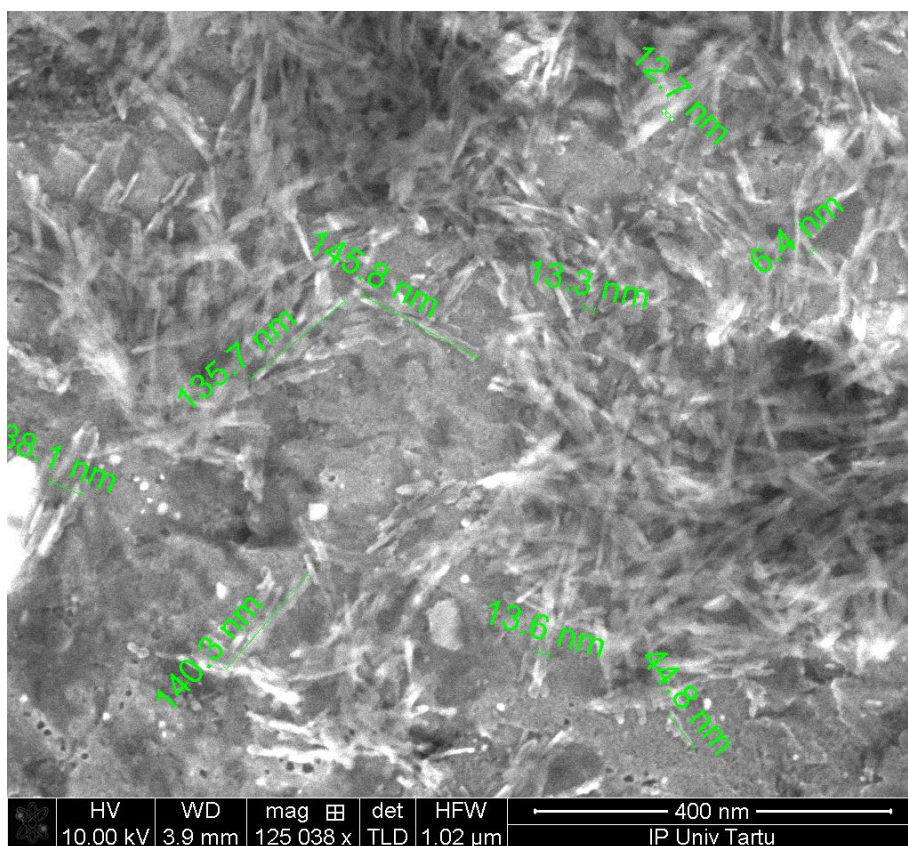
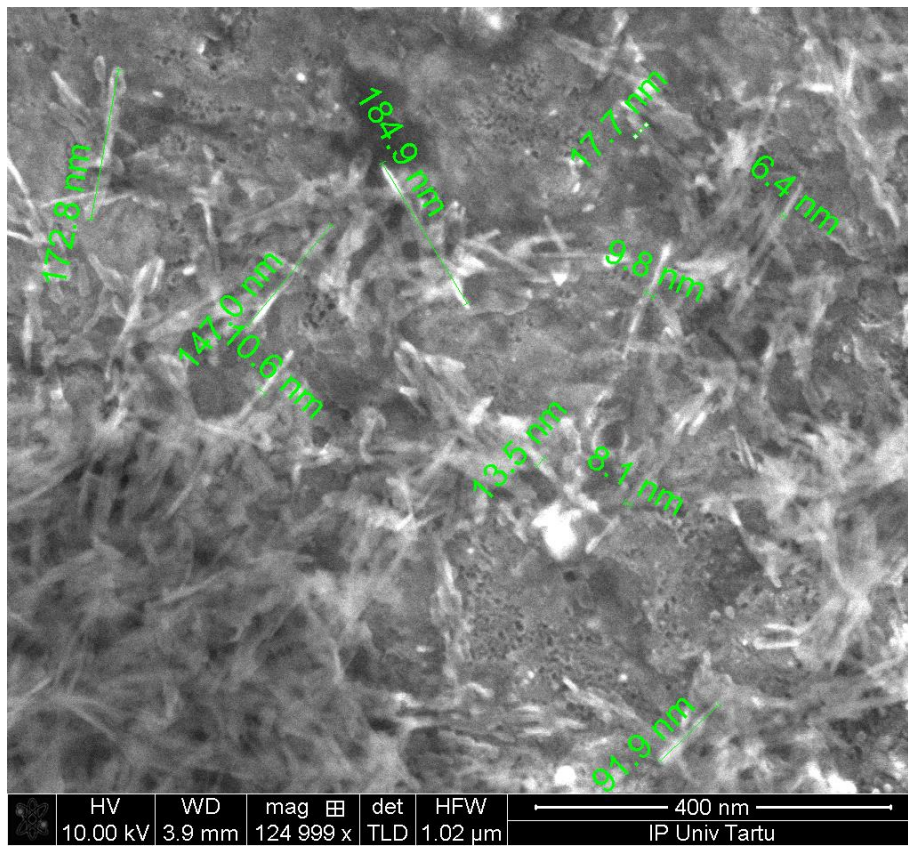
- [1] S. Pina, J. M. Oliveira, ja R. L. Reis, „Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review“, *Adv. Mater.*, kd 27, nr 7, lk 1143–1169, veebr 2015.
- [2] O. Salum, „Isiklik vestuls, Tiodent hambakliinik, Ülikooli 2A, Tartu, Eesti“, 2018.
- [3] M.-E. Martens, „Fiibrilise želatiinmaterjali karakteriseerimine“, lk 40, 2017.
- [4] S. Koutsopoulos, „Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods“, *J. Biomed. Mater. Res.*, kd 62, nr 4, lk 600–612, dets 2002.
- [5] H.-W. Kim, J.-H. Song, ja H.-E. Kim, „Nanofiber Generation of Gelatin-Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration“, *Adv. Funct. Mater.*, kd 15, nr 12, lk 1988–1994, dets 2005.
- [6] S.-H. Kim, J.-P. Ahn, H. H. Zadeh, ja E. J. W. Liou, „Osteogenic Biomaterials in Contemporary Dentistry“, *BioMed Res. Int.*, kd 2015, lk 1–2, 2015.
- [7] T. Gong, J. Xie, J. Liao, T. Zhang, S. Lin, ja Y. Lin, „Nanomaterials and bone regeneration“, *Bone Res.*, kd 3, nr 1, lk 15029, dets 2015.
- [8] J.-L. Wang *et al.*, „Enhanced bone regeneration composite scaffolds of PLLA/ β -TCP matrix grafted with gelatin and HAp“, *Mater. Sci. Eng. C*, kd 87, lk 60–69, juuni 2018.
- [9] K. J. L. Burg, S. Porter, ja J. F. Kellam, „Biomaterial developments for bone tissue engineering“, *Biomaterials*, kd 21, nr 23, lk 2347–2359, dets 2000.
- [10] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, ja E. Tsiridis, „Bone substitutes: An update“, *Injury*, kd 36, nr 3, lk S20–S27, nov 2005.
- [11] M. Floren, S. Spilimbergo, A. Motta, ja C. Migliaresi, „Porous poly(D,L-lactic acid) foams with tunable structure and mechanical anisotropy prepared by supercritical carbon dioxide“, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, kd 99B, nr 2, lk 338–349, nov 2011.

- [12] C. Mandoli *et al.*, „Thick Soft Tissue Reconstruction on Highly Perfusive Biodegradable Scaffolds“, *Macromol. Biosci.*, kd 10, nr 2, lk 127–138, veebr 2010.
- [13] H. N. Chia ja B. M. Wu, „Recent advances in 3D printing of biomaterials“, *J. Biol. Eng.*, kd 9, nr 1, lk 4, dets 2015.
- [14] H. Takadama, M. Hashimoto, M. Mizuno, ja T. Kokubo, „Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials“, *Phosphorus Res. Bull.*, kd 17, lk 119–125, jaan 2004.
- [15] T. Xu, J. M. Miszuk, Y. Zhao, H. Sun, ja H. Fong, „Electrospun Polycaprolactone 3D Nanofibrous Scaffold with Interconnected and Hierarchically Structured Pores for Bone Tissue Engineering“, *Adv. Healthc. Mater.*, kd 4, nr 15, lk 2238–2246, okt 2015.
- [16] K. Siimon, H. Siimon, ja M. Järvekülg, „Mechanical characterization of electrospun gelatin scaffolds cross-linked by glucose“, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, kd 26, nr 1, lk 37, jaan 2015.
- [17] K. Siimon *et al.*, „Effect of glucose content on thermally cross-linked fibrous gelatin scaffolds for tissue engineering“, *Mater. Sci. Eng. C*, kd 42, lk 538–545, sept 2014.
- [18] K. Ye *et al.*, „Matrix Stiffness and Nanoscale Spatial Organization of Cell-Adhesive Ligands Direct Stem Cell Fate“, *Nano Lett.*, kd 15, nr 7, lk 4720–4729, juuli 2015.
- [19] A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H.-M. Kim, T. Kokubo, ja T. Nakamura, „Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids“, *J. Biomed. Mater. Res.*, kd 64A, nr 2, lk 339–348, veebr 2003.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada kõiki, kes aitasid kaasa minu magistritöö valmimisele. Eriliselt soovin tänada juhendajat Martin Järvekülge. Lisaks soovin tänada Maido Merisalu, Frederik Pungat, Triin Kangurit, Kaidi Mölli ja Martin Timuskit nõuannete eest.

Lisa 1



Lisa 2



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Märt-Erik Martens,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose "Fiibrilise želatiin-hüdroksüapatiit komposiitmaterjali arendamine", mille juhendaja on Martin Järvekülg, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **31.05.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tartus 31.05.2019