

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ana Gudelj  
Karla Zadro

**Sinteza metalnim ionima supstituirane kalcij fosfatne biokeramike u  
polimernoj matrici kitozana za biomedicinsku primjenu**

Zagreb, 2019.

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale. Provedena istraživanja financirala je Hrvatska zaklada za znanost u sklopu istraživačkog projekta (IP-2014-09-3752) „Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva“. Rad je izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Hrvoja Ivankovića i predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.*

## POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA:

T – temperatura (°C)

*wt* – maseni udio (%)

*mol* – molarni udio (%)

$M_w$  – maseni prosjek molekulskih masa

$\theta$  – kut loma (°)

CaP – kalcijev fosfat

HAp – hidroksiapatit

ACP – amorfni kalcijev fosfat

CDHA – hidroksiapatit s manjim udjelom Ca

DCPA – dikalcijev fosfat

MCPM – kalcijev fosfat monohidrat

OCP – oktakalcijev fosfat

$\alpha$ -TCP –  $\alpha$ -trikalcijev fosfat

$\beta$ -TCP –  $\beta$ -trikalcijev fosfat

TTCP – tetrakalcijev fosfat

TCP – trikalcijev fosfat

CHA – karbonatni hidroksiapatit

GSK – glikogen sintaza kinaza

ALP – alkalna fosfataza

PLA – polilaktid

PGA – poliglikolid

PCL - poli( $\epsilon$ -kaprolakton)

CHT – kitozan

ATR – infracrvena spektroskopija: Prigušena totalna refleksija

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

XRD – rendgenska difrakcijska analiza

SEM – pretražni elektronski mikroskop

ICP–MS – masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom

TOC – ukupni organski ugljik

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Prirodno koštano tkivo .....	3
2.1.1. Inženjerstvo koštanog tkiva .....	4
2.2. Biomaterijali .....	6
2.3. Kalcij fosfatna biokeramika .....	7
2.3.1. Amorfni kalcijev fosfat .....	9
2.3.2. Oktakalcijev fosfat pentahidrat .....	10
2.3.3. Hidroksiapatit .....	12
2.3.4. Trikalcijev fosfat .....	14
2.4. Supstituiranje kalcijevih fosfata metalnim ionima .....	15
2.4.1. Supstitucije jednovalentnim ionima .....	16
2.4.1.1. Supstitucija natrijem .....	16
2.4.1.2. Supstitucija litijem .....	16
2.4.1.3. Supstitucija srebrom .....	17
2.4.2. Supstituiranje dvovalentnim ionima .....	17
2.4.2.1. Supstitucija magnezijem .....	17
2.4.2.2. Supstitucija cinkom .....	18
2.5. Supstituiranje kalcijevih fosfata stroncijevim ionima .....	19
2.6. Biopolimeri u koštanom inženjerstvu .....	20
2.6.1. Hitin .....	21
2.6.2. Kitozan .....	22
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Materijali .....	24
3.2. Sinteza .....	25
3.2.1. Preliminarna sinteza CaP iz biogenog izvora .....	25
3.2.2. Sinteza Sr-supstituiranih CaP iz biogenog izvora .....	25
3.2.3. Priprema kompozitnih materijala .....	26
3.2.4. Priprema poroznih struktura .....	26
3.3. Metode karakterizacije .....	27
3.3.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama .....	27
3.3.2. Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza .....	28
3.3.3. Pretražna elektronska mikroskopija .....	29
3.3.4. Masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom .....	29

3.3.5. Određivanje ukupnog organskog ugljika .....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	31
4.1. Preliminarno istraživanje sinteze kalcijeva fosfata iz biogenog izvora .....	31
4.1.2. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama .....	32
4.1.3. Rendgenska difrakcijska analiza .....	33
4.2. Karakterizacija Sr-supstituiranih CaP prašaka .....	35
4.2.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama .....	35
4.2.2. Rendgenska difrakcijska analiza .....	36
4.2.3. Analiza mikrostrukture sintetiziranih CaP prašaka pomoću pretražne elektronske mikroskopije .....	45
4.2.4. Analiza kemijskog sastava sintetiziranih CaP prašaka pomoću metoda ICP-MS i TOC .....	46
4.3. Karakterizacija kompozitnih poroznih 3D struktura .....	48
4.3.1. Analiza kompozitnih uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama .....	48
4.3.2. Analiza mikrostrukture kompozitnih 3D uzoraka pretražnom elektronskom mikroskopijom .....	49
5. ZAKLJUČAK .....	54
6. ZAHVALE .....	55
7. LITERATURA .....	56
8. SAŽETAK .....	65
9. SUMMARY .....	66
10. ŽIVOTOPIS .....	67

## 1. UVOD

Posljednjih nekoliko desetljeća inženjerstvo tkiva intenzivno se razvija. Bolesti mišićno-koštanog sustava, primjerice osteoporoza, rahitis i artritis, čine sve veći udio u zdravstvenim poremećajima<sup>1</sup>. Koštana oboljenja i oštećenja znatno smanjuju kvalitetu života, te stoga potreba za koštanim tkivom i odgovarajućim implantatima raste iz dana u dan. Dosadašnji konvencionalni implantati povezani su s dodatnim zdravstvenim rizicima, primjerice rizikom od infekcija, imunoloških reakcija i prijenosa bolesti, a često je potreban i naknadan kirurški zahvat<sup>2</sup>.

Cilj inženjerstva tkiva je stvoriti implantatni materijal funkcionalno što sličniji prirodnom koštanom tkivu. Da bi se to ostvarilo, potrebno je detaljno poznavati kemijski sastav, mehanička svojstva i biološke procese koji se odvijaju u prirodnom koštanom tkivu. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da bi takav implantat trebao biti građen od biomaterijala. Biomaterijali su prirodni ili sintetski materijali na temelju metala, keramike i polimera koji ugradnjom u organizam mogu djelomično ili potpuno zamijeniti koštano tkivo ili određenu funkciju, kako bi se kvaliteta života pacijenta poboljšala<sup>3</sup>. Biomaterijali moraju biti biokompatibilni, biorazgradivi, bioaktivni te istovremeno pružati mehaničku potporu. Razvoj biomaterijala može se opisati kroz tri generacije biomaterijala. Inženjerstvo treće generacije biomaterijala karakteriziraju istraživanja koja se bave poticanjem staničnog odgovora na molekularnoj razini koje omogućuje obnavljanje i nastajanje novog koštanog tkiva<sup>2</sup>. Implantati se danas najčešće izrađuju od kompozitnih materijala načinjenih od anorganske faze; biokeramike koja omogućuje bioaktivnost i mehaničku otpornost te organske faze; polimera koji osigurava poroznost i razgradivost *in vivo*<sup>4</sup>. Među biokeramičkim materijalima, ističu se kalcijevi fosfati (CaP) koji grade mineralnu komponentu prirodnog koštanog tkiva. Najpoznatiji CaP je hidroksiapatit (HAp) koji je najzastupljenija anorganska tvar u koštanom tkivu (~60 wt%)<sup>5</sup>. Istraživanjima je dokazano da kristali HAp poboljšavaju biokompatibilnost i bioaktivnost implantata. Kemijska sličnost sintetskog HAp-a s mineralnom fazom koštanog tkiva još je jedan razlog njegovog intenzivnog istraživanja, te je HAp poželjna faza u biomaterijalima koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva<sup>4</sup>. U sastavu mineralne faze koštanog tkiva nalaze se i brojni elementi u tragovima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) koji pozitivno utječu na obnavljanje koštanog tkiva. Zbog toga je sintetski HAp podvrgnut brojnim supstitucijama s ciljem što bolje biomimetike u izradi implantata<sup>6</sup>. Jedan od elemenata u tragovima je i stroncij

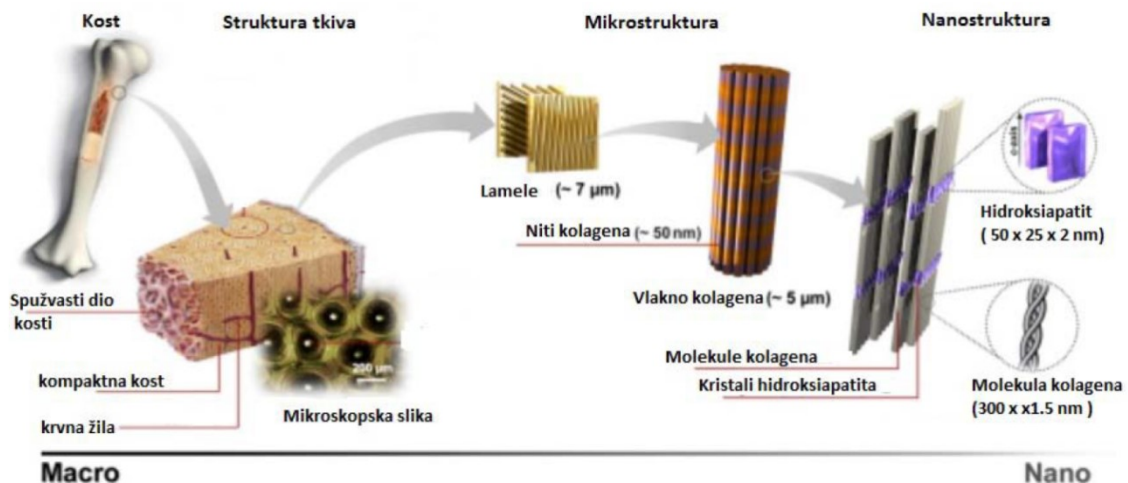
(Sr) koji ima ključnu ulogu u razvoju koštanog tkiva i koristi se za tretiranje bolesti mišićno-koštanog sustava<sup>7</sup>. U većini istraživanja korišten je HAp dobiven pomoću sintetskih prekursora, premda je pogodnije koristiti HAp dobiven iz biogenih izvora, primjerice koralja, sipine kosti, školjaka i ljuske jaja, jer se u njihovom sastavu već nalaze elementi u tragovima pa se postižu bolja fizikalno-kemijska svojstva implantata.

U inženjerstvu koštanog tkiva često se kao organska faza koristi biopolimer kitozan. Kitozan, osim što služi kao organska matrica za kristalne čestice HAp-a, formira i visokoporoznu 3D strukturu koja omogućava odvijanje svih biokemijskih i bioloških procesa u koštanom tkivu<sup>9</sup>.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Prirodno koštano tkivo

Kost je organizirano vezivno tkivo koje se sastoji od ~70% anorganske tvari, ~20% organske tvari, dok ostatak čini voda. Najzastupljenija anorganska tvar je hidroksiapatit (HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), dok protein kolagen čini ~90% organske tvari<sup>5</sup>. Kostur odraslog čovjeka sadrži 200 do 250 kostiju koje imaju važnu ulogu u ljudskoj fiziologiji. Služe kao strukturna potpora tijelu, osnova su ljudskog kretanja, štite unutarnje organe, skladište su minerala te sadrže hematopoetsko tkivo koje proizvodi krvne stanice. Na slici 1 prikazana je struktura kosti, od makrometarske do nanometarske razine. Vanjski dio kosti je gust sloj glatke i čvrste koštane tvari, koja se naziva kompaktna kost (*engl.*Cortical). Unutrašnji dio koštanog tkiva je porozan i posjeduje niža mehanička svojstva u odnosu na kompaktni dio koštanog tkiva, a naziva se spužvasta kost (*engl.*Trabecular). Osteoni su cilindrične strukture, promjera od 200-250  $\mu\text{m}$ , koje snažno priljubljene čine čvrstu i gustu kost. Šuplje središnje kanale osteona ispunjavaju krvne žile i živci. Gradivne jedinice osteona su lamele, pločice sastavljene od niti kolagena, između kojih se nalaze nanokristali HAp-a<sup>10</sup>.



**Slika 1.** Struktura (morfologija) kosti pri različitim uvećanjima<sup>10</sup>.

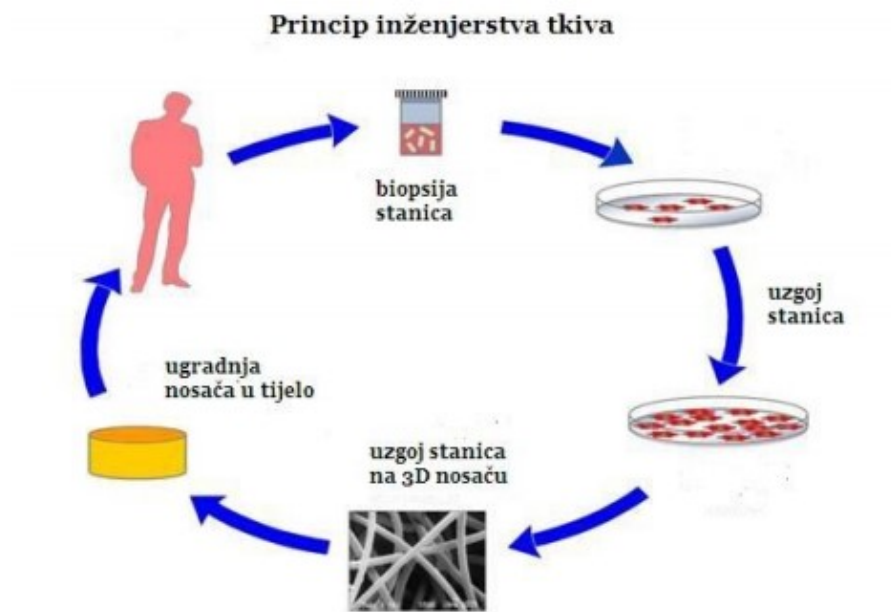


Za biološki apatit karakteristična je niska kristalnost i male dimenzije kristala ( $50 \times 25 \times 2$  nm), koje uz unutarnji kristalni nered, nestehiometrijski sastav i prisutnost supstitucija u kristalnoj rešetci, utječu na fizikalna, kemijska i biološka svojstva prirodnog koštanog tkiva. Prirodno koštano tkivo se tokom života mijenja, a za to su odgovorne koštane stanice; osteoblasti, osteoklasti i osteociti. Uloga osteoblasta je stvaranje novog koštanog tkiva (stvaranje kolagenske matrice), dok osteoklasti razgrađuju koštano tkivo kiselim djelovanjem enzima. Najbrojnija vrsta koštanih stanica su osteociti, koji reguliraju djelovanje osteoblasta i osteoklasta, kako ne bi došlo do narušavanja homeostaze<sup>10,11</sup>. U suprotnom, može doći do razvoja bolesti kao što je osteoporoza i gubitka koštane mase<sup>12</sup>.

### 2.1.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje koje koristi znanja kemije, fizike, biologije i medicine u svrhu razvoja koštanih implantata koji će zamijeniti ili čak poboljšati funkciju koštanog tkiva, te na taj način poboljšati zdravlje i kvalitetu života<sup>13</sup>.

Veliki problem medicine su koštana oštećenja, koja mogu biti posljedica prijeloma, artritisa te koštano-mišićnih bolesti. Istraživanja u području inženjerstva koštanog tkiva pokazala su da primjenom prirodnih ili sintetskih koštanih implantata dolazi do bržeg obnavljanja koštanog tkiva<sup>14</sup>. Kako bi se ono ostvarilo, potrebno je izolirati stanice biopsijom. Nadalje, stanice (tkivo) se uzgajaju *in vitro* na nosaču, a potom ugrađuje u tijelo pacijenta (*in vivo*). Princip inženjerstva tkiva prikazan je na slici 2.



**Slika 2.** Princip rada inženjerstva tkiva<sup>15</sup>.

Temelj inženjerstva koštanog tkiva je razvoj i upotreba biomaterijala čija je uloga poticanje obnavljanja kosti, odnosno stvaranje novih koštanih stanica (osteogeneza). Biomaterijali moraju biti porozni i biokompatibilni kako bi se mogli koristiti kao nosač za stanice i novo tkivo<sup>16</sup>. Primjer takvih materijala su biorazgrađivi polimeri i bioaktivna keramika, a među njima se ističe HAp biokeramika. Oni oponašaju površinu i kemijske karakteristike koštanog tkiva, što omogućuje izradu proteza i koštanih nosača<sup>17</sup>. Nosač je trodimenzionalna matrica koja služi kao strukturna i mehanička potpora te na taj način omogućuje migraciju, vezanje, proliferaciju i integraciju stanica kako bi one mogle tvoriti novo koštano tkivo<sup>18</sup>. Zahtjevi koje nosač mora zadovoljiti su: mikrostruktura koja oponaša strukturu prirodnog koštanog tkiva, biokompatibilnost, velika specifična površina i zadovoljavajuća mehanička svojstva. Visokoporozna struktura omogućuje protok kisika, hranjivih tvari, faktora rasta i metaboličkog otpada, te integraciju i vaskularizaciju tkiva. Postoje različiti oblici nosača koji oponašaju sastav i mikrostrukturu izvanstanične matrice. Međutim, sve veću pozornost privlače organsko/anorganski kompozitni materijali koji oponašaju prirodno koštano tkivo, a njihova prednost je mogućnost biorazgradnje koju metalni i neki konvencionalni keramički implantati ne posjeduju. Nosač se ugrađuje na oštećeno područje, s vremenom se razgrađuje i zamjenjuje novonastalim koštanim tkivom. Brzina razgradnje nosača mora biti jednaka brzini nastajanja novog koštanog tkiva kako ne bi došlo do naprezanja i pucanja materijala/tkiva.

Zbog resorpcije i razgradnje nije potreban kirurški zahvat uklanjanja nosača, što je karakteristično za konvencionalne implantate<sup>19</sup>.

## 2.2. Biomaterijali

Uloga biomaterijala je poticanje staničnih funkcija i usmjeravanje interakcija između stanica unutar nosača. Oni moraju biti biokompatibilni te ne smiju izazivati alergijske, toksične ili kancerogene reakcije u ljudskom tijelu<sup>20</sup>.

Razlikuju se dvije vrste biomaterijala koje se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva, a to su:

- a) Materijali za tvrdo koštano tkivo (*engl.* Hard-tissue replacement) u koje se ubrajaju ortopedski i dentalni materijali
- b) Materijali za meko koštano tkivo (*engl.* Soft-tissue replacement) u koje se ubrajaju materijali za plastičnu kirurgiju i kardiovaskularni implantati<sup>21</sup>

U usporedbi s većinom tehničkih materijala, biomaterijali su vrlo skupi jer moraju osigurati dugotrajan opstanak pri fiziološkim uvjetima, to jest u okruženju korozivne slane otopine i pod promjenjivim opterećenjem. Obzirom na to da je teško pronaći materijale koji podnose takve uvjete, njihov razvoj smatra se bitnim napretkom u znanosti i inženjerstvu koštanog tkiva. Razvoj i istraživanja biomaterijala započeli su sredinom prošlog stoljeća, točnije 60-ih i 70-ih godina, kada je stvorena prva generacija biomaterijala. Biomaterijali prve generacije bili su biološki inertni, odnosno nisu tvorili vezu s okolnim tkivom. Zbog toga se oko implantata stvarala vlaknasta ovojnica, što je dovodilo do njegove potpune izolacije uzrokujući deformacije i oštećenja okolnog tkiva. Drugu generaciju biomaterijala čine bioaktivni i resorbirajući biomaterijali, primjerice polimeri građeni od poliglikolne i polimljične kiseline koje se u tijelu u potpunosti razgrađuju na ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) i vodu (H<sub>2</sub>O). Tokom razgradnje dolazi do postupne zamjene sa obnovljenim tkivom, čime se izbjegava potreba za naknadnim uklanjanjem implantata. Treća generacija biomaterijala potiče stanični odgovor na molekularnoj razini, što omogućuje aktivaciju gena koji pomažu u obnavljanju koštanog tkiva, kao što su polimeri na čijoj su površini ugrađeni proteini, peptidi i druge biomolekule koje oponašaju okolinu izvanstanične matrice i na taj način omogućuju više funkcionalnu staničnu površinu<sup>21</sup>.

Metali su najčešće korišteni materijali za implantate zbog dobrih mehaničkih svojstava. Problemi koji se javljaju pri njihovoj upotrebi su potreba za preglednom operacijom, refrakture nakon uklanjanja implantata, visoka toplinska i električna vodljivost, trošenje, odbacivanje tkiva ili loše vezanje. Druga vrsta biomaterijala su polimeri koji mogu biti prirodni i sintetski. Prirodni se mogu primijeniti samo u uskom području, skupi su i skloni varijacijama svojstava te se lako onečiste virusima i bakterijama. Nasuprot tome, sintetskim polimernim biomaterijalima lako se kontroliraju kvaliteta i fizikalno-kemijska svojstva. Njihova molekularna struktura i molekulska masa mogu se kontrolirati kako bi se prilagodili fizičkim i mehaničkim svojstvima nosača, ovisno o mjestu i zahtjevima koštanog oštećenja. Mehanička svojstva moraju odgovarati primjeni i ne smiju se mijenjati dok se tkivo u potpunosti ne obnovi. Međutim, prirodni polimeri su pogodniji za izradu nosača zbog mogućnosti razgradnje *in vivo*<sup>13</sup>. Nadalje, biokeramički materijali koriste se samostalno ili u kompozitnim materijalima s polimerima te mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Oni su biokompatibilni, tvrdi, otporni na habanje, ali relativno slabo otporni na naprezanje. Nedostaci biokeramike su mala gustoća i niska čvrstoća zbog čega ona nije pogodna za nosače izložene velikim opterećenjima. Iz tog razloga je biokeramika namijenjena koštanim oštećenjima s manjim opterećenjima, primjerice ispune oštećenih kosti u oralnoj i ortopedskoj kirurgiji, za presvlake dentalnih implantata i metalnih proteza. Biokeramika se može proizvoditi u poroznom ili neporoznom obliku (granulati, prašci, prevlake), ovisno o zahtjevima oštećenja<sup>22</sup>.

Nosači su najčešće kompozitni materijali izgrađeni od polimera i biokeramike. Oni se dobivaju spajanjem dvaju ili više različitih materijala s jasnom granicom faza kako bi se dobio materijal kombiniranih svojstava različitih komponenata; bioaktivnost anorganske komponente te mehanička otpornost i biorazgradivost polimera<sup>10</sup>. Među biokeramikom ističe se kalcij fosfatna biokeramika, od kojih su najvažniji i HAp, amorfni kalcijev fosfat (ACP), oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP),  $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP). Često istraživani kompozitni materijal građen je od HAp koji potiče rast stanica i stvara čvrstu vezu između tkiva i implantata, dok biopolimer osigurava fleksibilnost nosača<sup>14</sup>.

### 2.3. Kalcij fosfatna biokeramika

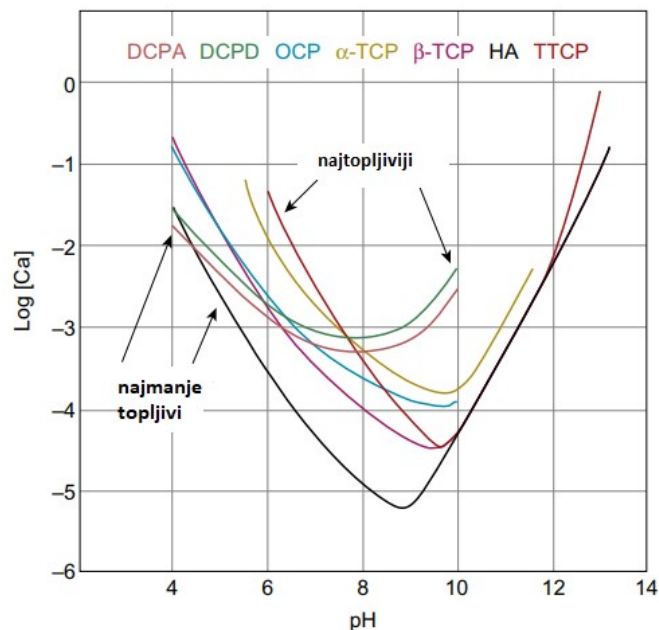
Kalcijevi fosfati (CaP) najčešći su oblik bioaktivne keramike sa širokom primjenom u biomedicini. Najpoznatiji predstavnici kalcij fosfatne biokeramike su HAp, amorfni kalcijev

fosfat (ACP), oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP) te  $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP). Svi navedeni CaP imaju omjer kalcija i fosfora (Ca/P omjer) veći od 1 i manji od 2 (Tablica 1). CaP kojima Ca/P omjer nije unutar navedenih granica nisu pogodni za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva<sup>23</sup>. Fizikalna svojstva CaP su slaba topljivost u vodi, netopljivost u bazičnim, te dobra topljivost u kiselim otopinama. Bitno je poznavati topljivost CaP pri određenim pH vrijednostima, a ponajviše pri fiziološkom uvjetima (pH ~7,4), jer topljivost značajno utječe na ponašanje CaP biokeramike *in vivo*. Dodatne prednosti CaP su mogućnost proizvodnje u velikim količinama, stabilnost i dostupnost. CaP su soli koje se sastoje od  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  ili  $\text{PO}_4^{3-}$  iona. Od te vrste iona, samo se  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  prirodno nalaze u mineralnoj fazi prirodnog koštanog tkiva. Zbog kemijske sličnosti i odličnih bioloških svojstava koriste se kao implantati u ortopedskoj i dentalnoj kirurgiji. U tablici 1. prikazani su CaP i njihove osnovne karakteristike, kao što su kemijska formula, Ca/P omjer, gustoća i topljivost<sup>24</sup>.

**Tablica 1.** Kemijska formula, Ca/P omjer, gustoća i topljivost kalcijevih fosfata (ACP, HAp, CDHAp, DCPA, MCPM, OCP,  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP i TTCP)<sup>25</sup>.

IME I KRATICA	KEMIJSKA FORMULA	Ca/P OMJER	GUSTOĆA (g/cm <sup>3</sup> )	TOPLJIVOST PRI 25°C (mg/L)
Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	-	1,5	3,01	25,6-32,8
Hidroksiapatit (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	3,16	~0,3
Hidroksiapatit s manjim udjelom Ca (CDHAp)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,5-1,67	3,16	~9,4
Dikalcijev fosfat (DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	1	2,92	~48
Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	2,27	~88
Kalcijev fosfat monohidrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	2,23	~18000
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	2,61	~8,1
$\alpha$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	2,86	~2,5
$\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	3,07	~0,5
Tetrakalcijev fosfat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	3,05	~0,7

O topljivosti CaP ovisi brzina razgradnje, a samim time i brzina nastanka novih koštanih stanica. Na slici 3 prikazan je fazni dijagram topljivosti CaP iz kojeg je vidljivo da topljivost opada kako slijedi<sup>26</sup>:



**Slika 3.** Fazni dijagram topljivosti kalcijevih fosfata (DCPA, DCPD,  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP, HAp i TTCP) u ovisnosti o pH vrijednosti<sup>26</sup>.

HAp i  $\beta$ -TCP se zbog niske topljivosti komercijalno koriste u proizvodnji koštanih nosača na temelju CaP biokeramike. Poznavanje krivulja topljivosti omogućuje prilagođavanje brzine razgradnje CaP biokeramike kako bi ona odgovarala brzini nastanka novog koštanog tkiva. To se može postići stvaranjem dvofazne, trofazne ili višefazne CaP keramike, što rezultira boljim stupnjem resorpcije nego što bi pojedine komponente imale zasebno<sup>27</sup>.

Kako bi priprava takvog materijala bila moguća potrebno je temeljito poznavanje svojstava pojedine CaP biokeramike, što će omogućiti stvaranje nosača najslučnijeg prirodnom koštanom tkivu, s najboljim regeneracijskim svojstvima.

### 2.3.1. Amorfni kalcijev fosfat

Prema zakonima termodinamike, savršena kristalna struktura ne može postojati u realnom sustavu. Uvijek su prisutni određeni poremećaji strukture u obliku vakancija, nečistoća i

nepravilne površine koji narušavaju idealnu periodičnost kristalnih struktura. Nasuprot tomu, postoje i čvrste tvari koje su potpuno nepravilne strukture i nije moguće utvrditi nikakvu periodičnost pojavljivanja građevnih elemenata, te stoga nije moguće niti govoriti o kristalnoj rešetci takvih tvari. Takvi materijali nazivaju se amorfni materijali<sup>28</sup>.

ACP jedan su od najčešćih oblika CaP prisutnih u biološkim organizmima. Pronađeni su u mitohondrijima eukariotskih i prokariotskih stanica i kao prekursor nastajanja mineralne faze prirodnog koštanog tkiva<sup>29</sup>. Unatoč brojnim nastojanjima i istraživanjima ACP nije uspješno dokazan kao samostalna faza unutar koštanog tkiva, već se smatra prekursorom nastajanja drugih oblika CaP, kao što su OCP i HAp, no ta teorija je već godinama predmet rasprave<sup>30</sup>. ACP nema utvrđenu strukturu te je vrlo često u hidratiziranom obliku, što ga čini nestabilnim. Sastav ACP varira, ovisno o pH vrijednosti, što utječe na strukturalna svojstva. Pri višim vrijednostima pH kalcij se veže s  $\text{PO}_4^{3-}$ , dok se pri nižim vrijednostima pH veže sa  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupinom<sup>31</sup>.

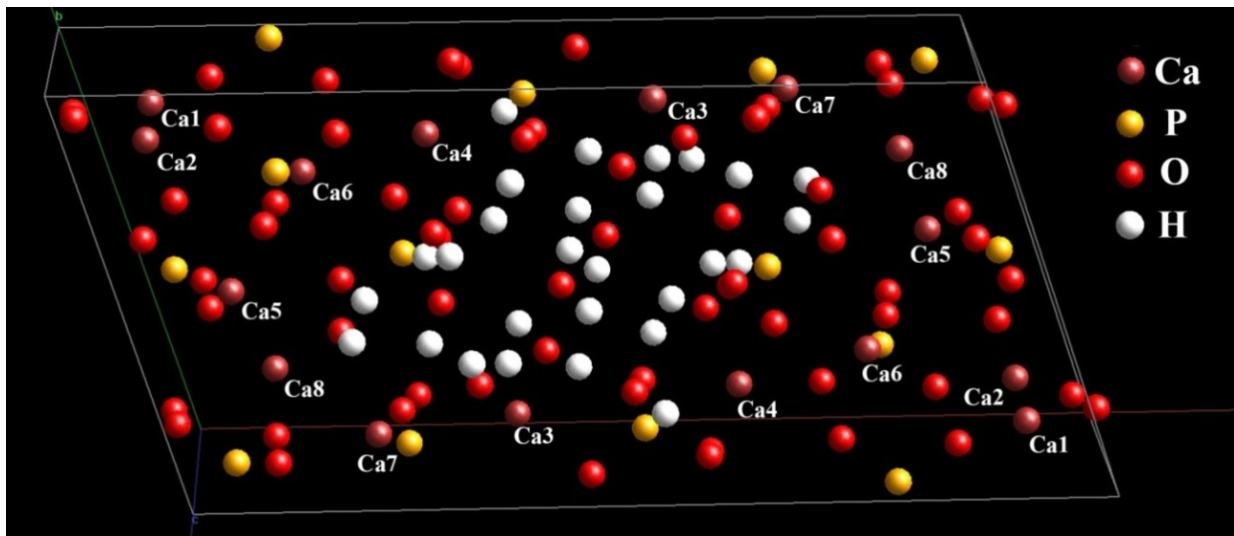
Sinteza apatita iz amornog prekursora odvija se u nekoliko koraka. Prvo dolazi do taloženja ACP-a iz otopine, zatim do prelaska ACP u termodinamički stabilnije stanje OCP, te konačno do prelaska OCP-a u najstabilnije stanje, apatit<sup>32</sup>. Svi prijelazi odvijaju se brzo, što onemogućuje preciznu analizu kemijskih, morfoloških i strukturnih svojstava navedenog sustava. Međutim, korištenjem kriogenog transmisijskog elektronskog mikroskopa (*engl.* cryogenic transmission electron microscopy) koji omogućuje vizualni prikaz pojedinih faza opisanog procesa uspješno je potvrđeno da je ACP prekursor OCP-a i HAp-a<sup>33</sup>.

ACP se u inženjerstvu koštanog tkiva koristi u pripravi kompozitnih materijala, posebice u dentalnoj medicini, zbog njegove sposobnosti otpuštanja kalcijevih i fosfatnih iona. Budući da ACP lako prelazi u apatitnu strukturu, koristi se kao prekursor za dobivanje bioaktivnih materijala s potencijalnom komercijalnom primjenom, primjerice ACP/PLLA kompozit<sup>34</sup>. Iako nestabilnost ACP-a ograničava njegovu masovnu proizvodnju i širu komercijalnu upotrebu, nužna su daljnja istraživanja njegovih svojstava zbog brojnih prednosti (visok stupanj osteoinduktivnosti i biorazgradljivosti)<sup>35</sup>.

### 2.3.2. Oktakalcijev fosfat pentahidrat

Berzelius prvi spominje OCP 1863. godine, a prihvaćen je tek početkom 20. stoljeća, dok je njegova važnost prepoznata tek krajem 50-ih godina. Često se javlja kao prijelazni spoj pri taloženju HAp, te je poznavanje transformacije OCP-a u HAp važno za razumijevanje

mineralizacije prirodnog mineralnog tkiva<sup>36</sup>. Kristalna rešetka OCP-a je triklinska (prostorna skupina P1), a parametri jedinične ćelije su:  $a = 19,692 \text{ \AA}$ ,  $b = 9,523 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,835 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90,15^\circ$ ,  $\beta = 92,54^\circ$ ,  $\gamma = 108,65^\circ$ <sup>36</sup>. Na slici 4 prikazana je struktura kristalne rešetke OCP-a s označenim pozicijama kalcijeva atoma.



**Slika 4.** Struktura kristalne rešetke oktakalcijeva fosfata s označenim pozicijama kalcijeva atoma, dobivena pomoću računalnog softvera DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Elementarnu ćeliju OCP-a gradi osam kalcijevih iona i dvije fosfatne skupine. Stehiometrijski omjer Ca/P u OCP-u iznosi 1,33. Rezultati istraživanja kristala OCP-a upućuju na nestehiometrijski sastav kemijske formule  $\text{Ca}_{16}\text{H}_{4+x}(\text{PO}_4)_{12}(\text{OH})_x \cdot 10\text{-X}(\text{H}_2\text{O})$ <sup>37</sup>. OCP ima strukturu vrlo sličnu HAp-u gdje šest kalcijevih kationa,  $\text{Ca}^{2+}$  (Ca1, Ca2, Ca5, Ca6, Ca7 i Ca8) i dvije fosfatne skupine ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) zauzimaju gotovo identične pozicije kao i u kristalnoj rešetki HAp-a. Druga dva kalcijeva kationa (Ca3 i Ca4) i jedna hidrogenfosfatna skupina ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) nalaze se u hidratiziranom sloju koji se nalazi između dva apatitna sloja.

Transformacija OCP-a u HAp potiče proliferaciju osteoblastičnih stanica i diferencijaciju stanica pri fiziološkim uvjetima *in vitro* i *in vivo*<sup>38</sup>. Osteoinduktivna svojstva (svojstva koja potiču nastajanje koštanog tkiva) ovise o načinu pripreme OCP kristala. Jedan od najbitnijih čimbenika je okolina u kojoj OCP nastaje, koja utječe na stehiometriju i morfologiju kristala<sup>39</sup>. Na sastav i morfologiju može se utjecati i organskim molekulama te anorganskim ionima, primjerice  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{CO}_3^{2-}$ . OCP pripravljen u strogo kontroliranim uvjetima potencijalno se može primijeniti u kompozitnim materijalima koji oponašaju prirodno koštano tkivo<sup>40</sup>.



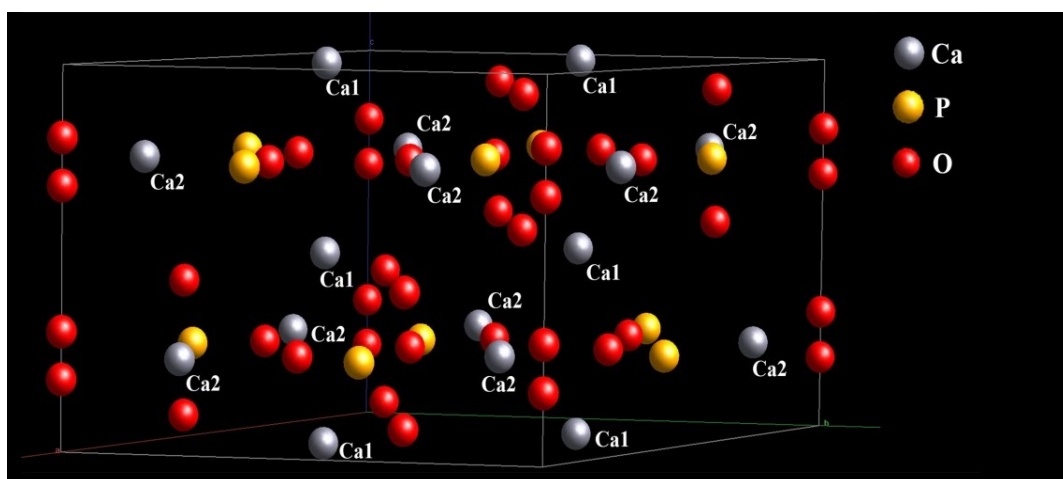
### 2.3.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit je prirodni materijal od velikog biološkog značaja jer se pojavljuje u ljudskoj i životinjskoj kosti s masenim udjelom od 50-60 % te je stoga temeljni mineralni sastojak kostiju. Njegova formula je  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , a molarni omjer kalcija i fosfora iznosi  $\text{Ca/P}=1,67$ . Stehiometrija HAp-a važna je pri toplinskoj obradi materijala, jer u slučaju odstupanja od stehiometrijskog molarnog omjera dolazi do pojave drugih kalcijevih fosfata i oksida. Pojava novih faza može utjecati na biološki odgovor tijela domaćina na nosač<sup>41</sup>.

Postoje dva slučaja:

1. Kada je molarni omjer  $\text{Ca/P}$  veći od 1,67 dolazi do nastajanja kalcijevog oksida ( $\text{CaO}$ ) zajedno sa hidroksiapatitnom fazom.
2. Kada je molarni omjer  $\text{Ca/P}$  manji je od 1,67, dolazi do nastajanja  $\alpha$ - ili  $\beta$ -TCP<sup>41</sup>.

HAp je mineral ionskog karaktera, a njegova kristalna rešetka heksagonske je simetrije. Parametri elementarne ćelije iznose  $a = b = 9,41369 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,90197 \text{ \AA}$ . Atomi kalcija i kisika nalaze se na različitim pozicijama. Od deset kalcijevih atoma, četiri se nalaze na poziciji Ca1, a njih šest na poziciji Ca2. Po jedan kisikov atom nalazi se na pozicijama O1 i O2, a dva kisikova atoma nalaze se na poziciji O3 u prostornoj grupi  $P6_3/m$ <sup>42</sup>. Na slici 5 prikazana je kristalna rešetka HAp-a s označenim pozicijama kalcijeva atoma.



**Slika 5.** Struktura kristalne rešetke hidroksiapatita dobivena pomoću računalnog softvera DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

U kristalnu strukturu HAp-a mogu se ugraditi različiti ioni koji pospješuju biokemijske funkcije u kojima sudjeluje HAp. Supstitucije se mogu odvijati na pozicijama kalcijevih iona, te na pozicijama fosfatnih ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) i hidroksilnih ( $\text{OH}^-$ ) iona. Ionske supstitucije utječu na parametre elementarne ćelije, topljivost, stabilnost i morfologiju kristala. Međutim, kristalna rešetka i nakon supstitucije ostaje u heksagonskoj prostornoj grupi  $P6_3/m^{42}$ . Na pozicije kalcijevih iona najčešće se supstituiraju kationi natrija, kalija, magnezija, cinka, stroncija i mangana, dok je na poziciji  $\text{PO}_4^{3-}$  najčešća supstitucija karbonatnim ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ionima, koja može biti:

1. A-tip; pri kojem dolazi do supstitucije  $\text{OH}^-$  s  $\text{CO}_3^{2-}$
2. B-tip; pri kojem dolazi do supstitucije  $\text{PO}_4^{3-}$  s  $\text{CO}_3^{2-}$

B-tip supstitucije povoljniji je kako bi se što bolje imitirala  $\text{CO}_3^{2-}$ -supstitucija u prirodnom koštanom tkivu.

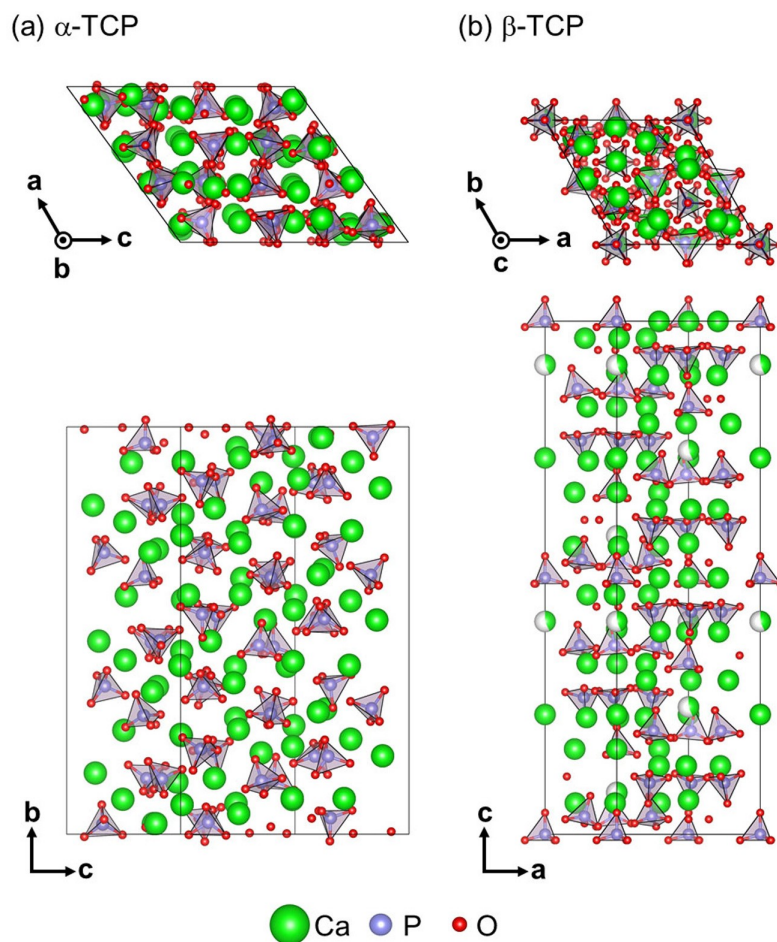
U današnje vrijeme postoji niz postupaka za dobivanje HAp-a, te se oni mogu podijeliti u tri grupe:

1. postupci pripreve suhom sintezom
2. mokri postupci pripreve (precipitacija, hidroliza, kondenzacija, hidrotermalna metoda)
3. postupci kondenzacije reaktanata u plinovitoj fazi; služe isključivo za pripravu tankih filmova HAp na odgovarajućim supstratima.

HAp je jedan od najvažnijih i najčešće korištenih oblika CaP keramike zbog njegove kemijske i strukturne sličnosti s mineralnom fazom prirodnog koštanog tkiva. Uz biokompatibilnost i bioaktivnost, HAp potiče obnovu koštanog tkiva u blizini implantata što ga čini izvrsnim materijalom za primjene u ortopediji, stomatologiji, za kontrolirano otpuštanje lijekova itd.<sup>23</sup>. Njegova prilagodljiva struktura podložna supstitucijama omogućuje sintezu materijala specifičnih svojstava, ovisno o primjeni. Međutim, u strukturu HAp mogu se ugraditi i nepoželjni ioni koji uzrokuju toksičnost materijala, te je prema tome prilikom sinteze HAp-a potrebno izbjeći supstitucije takvim ionima<sup>43</sup>.

### 2.3.4. Trikalcijev fosfat

TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se često koristi kao implantatni materijal ili kao dio kompozitnog materijala za regeneraciju koštanog tkiva, zbog svojih povoljnih resorpcijskih i osteoinduktivnih svojstava. TCP kristalizira u trigonskom sustavu, a njegova jedinična ćelija heksagonske je simetrije, dok je molarni omjer Ca/P 1,5. TCP ima dvije polimorfne modifikacije ( $\alpha$ -TCP i  $\beta$ -TCP) gdje je  $\beta$ -TCP je stabilan do  $1125^\circ\text{C}$ , a daljnjom toplinskom obradom prelazi u  $\alpha$ -TCP, veće topljivosti.  $\alpha$ -TCP spada u prostornu grupu  $\text{P2}_1/\text{a}$  sa parametrima elementarne ćelije  $a = 12,89 \text{ \AA}$ ,  $b = 27,28 \text{ \AA}$  i  $c = 15,22 \text{ \AA}$ , dok  $\beta$ -TCP kristalizira u trigonskom kristalnom sustavu, prostorne grupe  $\text{R}\bar{3}/\text{c}$ , a parametri elementarne ćelije su  $a = b = 10,44 \text{ \AA}$  i  $c = 37,40 \text{ \AA}$ . Ova polimorfna faza sadrži pet pozicija kalcijevog atoma, a pozicija Ca4 ima okupaciju  $0,5^{44}$ .



Slika 6. Kristalna struktura: a)  $\alpha$ -TCP i b)  $\beta$ -TCP<sup>45</sup>.

$\beta$ -TCP se koristi u stomatologiji i ortopediji u svrhu regeneracije oštećenog tkiva zbog dobrih osteoinduktivnih svojstava. Oštećeno tkivo obnavlja se unutar nekoliko tjedana jer se  $\beta$ -TCP izravno veže za koštano tkivo<sup>46</sup>. Moguća je supstitucija brojnim ionima kao što su:  $\text{Mg}^{2+}$ ,

$\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , čime se poboljšavaju fizikalna i biološka svojstva<sup>47</sup>.  $\beta$ -TCP se dobiva toplinskom obradom apatitnog trikalcijeva fosfata ili amorfnog trikalcijeva fosfata koji se mogu pripremiti u vodenoj otopini neutralizacijom ili hidrolizom, u alkoholnom mediju dvostrukom dekompozicijom i sol gel postupkom<sup>48</sup>.

#### 2.4. Supstituiranje kalcijevih fosfata metalnim ionima

Biološki CaP sadrže različite elemente u tragovima, primjerice  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$  (Tablica 2). Utvrđeno je da upravo elementi u tragovima imaju ključnu ulogu u nastajanju, rastu i obnavljanju kostiju, te je pomoću supstitucija moguće kontrolirati brzinu razgradnje materijala te poboljšati mehanička i biološka svojstva<sup>49</sup>. Zbog toga su mnoga istraživanja usmjerena na razvoj CaP supstituiranih biološki značajnim ionima koji će potaknuti rast novog koštanog tkiva.

**Tablica 2.** Sastav prirodnog koštanog tkiva<sup>50</sup>.

	KOST	CAKLINA	DENTIN
Ca (wt,%)	36,6	37,6	40,3
P(wt,%)	17,1	18,3	17,1
CO <sub>2</sub> (wt,%)	4,8	3,0	4,8
Na(wt,%)	1,0	0,7	0,1
K(wt,%)	0,07	0,05	0,7
Mg(wt,%)	0,6	0,2	1,1
Sr(wt,%)	0,05	0,03	0,04
F(wt,%)	0,1	0,01	0,07
Zn (ppm)	126-217	263	173
Si (ppm)	500	-	-

Kako bi supstitucija bila uspješna, određeni zahtjevi kao što su veličina iona te sposobnost strukture da se prilagodi određenom stupnju deformacije, moraju biti zadovoljeni. Prema Goldschmitovim pravilima, ion jednog elementa može zamijeniti određeni ion u kristalnoj rešetci kada se njihovi radijusi ne razlikuju više od 15%, uz zadovoljenu električnu neutralnost. U slučaju supstitucije heterovalentnih iona, mora doći do kompenzacije naboja daljnjom supstitucijom nekih od iona prisutnih u kristalnoj rešetci. Uspješnost supstitucije

može se utvrditi rendgenskom difrakcijskom analizom, odnosno analiziranjem parametara elementarne ćelije. Primjerice, supstitucijom iona većeg radijusa doći će do povećanja, dok supstitucijom manjih, do smanjenja duljine stranica elementarne ćelije<sup>51</sup>.

#### 2.4.1. Supstitucije jednovalentnim ionima

##### 2.4.1.1. Supstitucija natrijem

Prirodno koštano tkivo sadrži značajan udio natrija koji ima važnu ulogu u metabolizmu i resorpcijskom procesu tkiva. Također, poboljšava osteoinduktivna svojstva, to jest svojstva koja stimuliraju diferencijaciju stanica u koštane. Dosadašnja istraživanja pokazala su uspješno dopiranje HAp-a Na<sup>+</sup> ionom, koji je supstituiran na poziciju kalcija na Ca<sup>2+</sup> poziciji<sup>52</sup>. Kao rezultat supstitucije Na<sup>+</sup> ionom dolazi do blagog povećanja parametara elementarne ćelije, što dovodi do povećanja volumena elementarne ćelije. Kannan i sur. sintetizirali su metodom taloženja Na-supstituiran CaP koji se sastoji od dvije faze; HAp i  $\beta$ -TCP. Utvrđeno je da Na-supstituirani CaP dvofazni sustavima pokazuje bolja biološka svojstva (brže obnavljanje koštanog tkiva) u usporedbi s ne-supstituiranim CaP sustavom<sup>53</sup>.

##### 2.4.1.2. Supstitucija litijem

Litij je u ljudskom tijelu prisutan u vrlo malim količinama. Do sada se u medicini koristio kao lijek protiv bipolarnog i drugih psihičkih poremećaja. Tek nedavno su se pojavila istraživanja koja opisuju stimulirajući utjecaj litija na povećanje gustoće kostiju, proliferaciju (razmnožavanje koštanih stanica) i adheziju stanica<sup>54,55</sup>. Litij inhibira učinak glikogen sintaze kinaze (GSK 3), koji je negativni regulator Wnt signalnog puta<sup>56</sup>. Wnt signalni put jedan je od važnih za stvaranje i preoblikovanje koštanog tkiva. Zbog navedenog, litij je potencijalni kandidat za supstituiranje CaP u svrhu regeneracije koštanog tkiva. Kaygili i sur. sintetizirali su Li-supstituiran HAp sol-gel postupkom pri dva različita udjela Li<sup>+</sup> iona (10 i 20 wt%), a rezultat je bio potpun prelazak apatitne strukture u Ca<sub>10</sub>Li(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub><sup>57</sup>.

### 2.4.1.3. Supstitucija srebrom

Srebro je jedan od metala iznimno široke primjene, primjerice u kozmetici, odjeći, nakitu, pročišćavanju vode i zraka, zbog antibakterijskih svojstava. Zbog svoje upotrebe protiv bakterijskih kultura otpornih na antibiotike privuklo je pozornost u polju inženjerstva tkiva, kako bi dobiveni nosači posjedovali antibakterijska svojstva. Uz antibakterijska svojstva, srebro je biokompatibilno i netoksično za ljudski organizam<sup>58</sup>. Antimikrobiološka svojstva CaP supstituiranih srebrom dokazana su za gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, među kojima je i *Escherichia coli*, čije djelovanje srebro inhibira<sup>59</sup>. Ag-supstituirani CaP sintetizirani su sol-gel metodom, metodom taloženja, metodom ionske izmjene te mikrovalnom sintezom. Korištenjem FTIR i XRD metoda dokazana je prisutnost iona srebra na mjestima kalcija unutar apatitne strukture<sup>59-61</sup>. Radijus  $\text{Ag}^+$  iona (0,126 nm) veći je od radijusa  $\text{Ca}^{2+}$  iona (0,100 nm)<sup>62</sup>. Nakon supstitucije trebalo bi doći do povećanja parametara elementarne ćelije, ali prema dosadašnjim istraživanjima parametri elementarne ćelije HAp supstituiranog  $\text{Ag}^+$  ionom ne mijenjaju se značajno od parametara elementarne ćelije čistog HAp, te ne dolazi do deformacije kristalne rešetke. Razlog tomu je nizak udio supstitucije  $\text{Ca}^{2+}$  sa  $\text{Ag}^+$  ionom u strukturi HAp (< 5 atom%), zbog prevelike razlike u veličinama iona Ag-supstituirani CaP najčešće se koriste u cementima i premazima, kako bi se spriječile infekcije nakon ugradnje nosača na oštećeno mjesto koštanog tkiva. Međutim, nizak stupanj supstitucije predstavlja problem te Ag-supstitucija CaP zahtijeva daljnja istraživanja<sup>60</sup>.

### 2.4.2. Supstituiranje dvovalentnim ionima

#### 2.4.2.1. Supstitucija magnezijem

Magnezij je jedan od važnijih elemenata u ljudskom tijelu. Oko 65% ukupnog magnezija u tijelu nalazi se u kostima i zubima<sup>63</sup>. Visok udio magnezija u prirodnom koštanom tkivu upućuje da je od ključne važnosti za održavanje sustava za kretanje, dok nedostatak magnezija u tijelu uzrokuje osteoporozu<sup>64</sup>. Osim što sprječava osteoporozu, magnezij također povećava gustoću kostiju te potiče proliferaciju stanica. Upravo zbog ovih svojstava je supstitucija  $\text{Ca}^{2+}$  s  $\text{Mg}^{2+}$  ionom jedna od čestih ionskih supstitucija CaP<sup>65</sup>. Mg-supstituirani CaP sintetizirani su metodom taloženja, sol-gel postupkom te mikrovalnom sintezom potpomognutom surfaktantima<sup>66</sup>. Landi i sur. su pokazali da je supstitucijom sa 5,7 mol%  $\text{Mg}^{2+}$  ionom sintetski HAp postao sličniji biološkom apatitu u pogledu sastava, morfologije i

kristalnosti<sup>65</sup>. Prema Bigi i sur., magnezij preferira supstituciju na poziciju Ca<sup>2+</sup><sup>67</sup> dok druga istraživanja kažu da je ta pozicija ipak Ca<sup>1</sup><sup>66</sup>. Razlog navedenih neslaganja može biti zbog različitog načina pripreme CaP, te zbog samog izvora Mg<sup>2+</sup> iona. Neovisno o poziciji supstitucije, Mg-supstituirani CaP pokazuju promjene parametara elementarne ćelije. Zbog manjeg radijusa Mg<sup>2+</sup> (0,069 nm) od Ca<sup>2+</sup> iona (0,100 nm), dolazi do smanjenja elementarne ćelije, što dovodi do njene deformacije i manje kristalnosti uzorka. Također dolazi do povećanja topljivosti uzoraka u fiziološkoj otopini, a toplinskom obradom Mg-supstituiranih CaP stabilizira se nastajanje  $\beta$ -TCP-a<sup>68</sup>. Povećanjem udjela magnezija smanjuje se kristalnost uzorka, odnosno povećava udio amorfne faze, a pri udjelu od 35 do 50 at.% magnezija uzorci postaju amorfni<sup>65</sup>. Supstitucija magnezijem uzrokuje smanjenje prosječne veličine čestica, čime se povećava otpornost CaP na lom. Također, smanjenjem prosječne veličine čestica povećava se specifična površina zbog čega su Mg-supstituirani CaP premazi povoljniji nosači lijekova ili proteina<sup>69,70</sup>. Osim premaza, Mg-supstituirani CaP koriste se u obliku cementa kako bi se pomoću magnezija kontrolirala razgradnja, mehanička svojstva te stanični odgovor<sup>71</sup>.

#### 2.4.2.2. Supstitucija cinkom

Udio cinka u ljudskom tijelu varira od 0,0126 do 0,0217 wt% te se<sup>72</sup> cink smatra jednim od najvažnijih elemenata za ljudski razvoj zbog njegove bitne uloge u nekoliko fizioloških procesa. Određeni metalni enzimi ga koriste kako bi tijelo moglo obavljati svoje regularne te katalitičke i strukturalne procese. Jedan od tih enzima je alkalna fosfataza (ALP) koja je ključna za proces mineralizacije. ALP regulira razinu fosfata, kako bi se stvorilo neutralno/alkalno okruženje koje pogoduje procesu mineralizacije kosti<sup>73</sup>. Dodatno, tijekom procesa preoblikovanja prirodnog koštanog tkiva, određeni udio cinka se otpušta iz koštanog tkiva. Otpušteni Zn<sup>2+</sup> ioni inhibiraju djelovanje osteoklastnih stanica te stimuliraju djelovanje osteoblastnih stanica. Zbog navedenog djelovanja Zn<sup>2+</sup> iona sprječava se smanjenje gustoće kostiju, to jest osteoporoza<sup>74</sup>. Cink povećava bioaktivnost te posjeduje antibakterijska svojstva, zbog čega se Zn-supstituirani CaP koriste kao premazi metalnih proteza<sup>75</sup>. Cementi u kojima se nalaze Zn-supstituirani CaP jedni su od najstarijih i najšire korištenih cementa u dentalnoj industriji. Zn-supstituirani CaP mogu se sintetizirati metodom kemijskog taloženja, ionske izmjene, hidrotermalnom metodom te i sol-gel postupkom<sup>76</sup>. Sol-gel postupak je pogodan za sintezu Zn-supstituiranog HAp-a koji se koristi kao premaz, a koncentracija cinka potrebna da bi posjedovali antibakterijska svojstva je >1000 ppm<sup>77</sup>. Supstitucija kalcija

cinkom rezultira smanjenjem parametara elementarne ćelije, zbog manjeg radijusa  $Zn^{2+}$  (0,074 nm) od  $Ca^{2+}$  iona (0,100 nm)<sup>78</sup>. Cink se prilikom supstitucije smješta na poziciju Ca2 zbog niže energije supstitucije i manje deformacije elementarne ćelije, što povoljno djeluje na vezanje i otpuštanje cinka<sup>79</sup>. Povećanjem koncentracije cinka dolazi do smanjenja kristalnosti i toplinske stabilnosti Zn-supstituiranih CaP, zbog čega dolazi do prelaska u  $\beta$ -TCP pri višim temperaturama. Takvi rezultati uočeni su i kod Mg-supstituiranih CaP iz čega se može zaključiti da ioni manjeg radijusa stabiliziraju  $\beta$ -TCP fazu nakon toplinske obrade<sup>80,81</sup>.

## 2.5. Supstituiranje kalcijevih fosfata stroncijevim ionima

Stroncij je element prirodno prisutan u ljudskom tijelu. Nalazi se u mineralnoj fazi kostiju, posebice u metabolički aktivnim dijelovima<sup>82</sup>. Njegova koncentracija u novonastaloj kompaktnoj kosti do četiri puta je veća nego u starijoj kompaktnoj kosti<sup>83</sup>. U posljednjih nekoliko godina stroncij se ubrzano istražuje zbog brojnih povoljnih učinaka na koštani sustav. Svojim dvojnim mehanizmom djelovanja stroncij omogućuje povećanje koštane mase i njene čvrstoće; inhibirajući resorpciju kostiju, te poticanjem nastajanja novog koštanog tkiva. Resorpciju sprječava inhibiranjem aktivnosti osteoklastnih stanica, a nastajanje novog koštanog tkiva potiče povećanjem broja osteoblastnih stanica, zaduženih za stvaranje nove kosti<sup>84</sup>. Stroncijevi ioni također potiču proliferaciju i sprječavaju apoptozu (smrt koštanih stanica), te poboljšavaju usklađivanje signala između osteoblasta i osteoklasta<sup>85</sup>. Jedan od komercijalnih primjera primjene stroncija je stroncijev ranelat, komercijalni lijek koji se koristi za sprječavanje osteoporoze. Dokazano je da lijek smanjuje vjerojatnost fraktura kod pacijenata koji boluju od osteoporoze<sup>86</sup>. Zbog navedenih povoljnih učinaka stroncija na ljudski koštani sustav, Sr-supstituirani CaP su biomaterijali od velikog potencijala za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva te se aktivno istražuju. Stroncij može zamijeniti kalcij u brojnim fiziološkim funkcijama, primjerice kontrakciji mišića i provođenju krvi,<sup>87</sup> jer je djelovanje stroncija u tijelu slično djelovanju kalcija. Razlog tomu je struktura  $Sr^{2+}$  koja je slična strukturi  $Ca^{2+}$  iona u pogledu atomskog radijusa<sup>88</sup>. Radijus  $Sr^{2+}$  iznosi 0,113 nm, dok  $Ca^{2+}$  iona 0,100 nm<sup>89</sup>. Ove razlike su neznatne, međutim supstitucijom  $Ca^{2+}$  iona  $Sr^{2+}$  ionom u rešetci može doći do deformacija u pogledu dimenzija elementarne ćelije, veličine kristala te povećane topljivosti<sup>90</sup>. Povećana topljivost je od iznimne važnosti pri postupnom otpuštanju  $Sr^{2+}$  iona u području implantata, jer to rezultira povećanjem aktivnosti osteoblasta<sup>91</sup>.



## 2.6. Biopolimeri u koštanom inženjerstvu

Prirodni materijali bolje su prihvaćeni u tijelu, odnosno pokazuju veću biokompatibilnost dok je sintetske lakše kontrolirati i oblikovati da bi se postigla željena svojstva. U slučajevima velikih koštanih oštećenja koštano tkivo će se regenerirati samo uz prisustvo implantata koji potiču diferencijaciju i proliferaciju. Primjenom biomaterijala trodimenzijskih struktura (*engl. scaffold*) u kojima se uzgajaju koštane stanice dovelo je do značajnog napretka u inženjerstvu tkiva. Temeljni zahtjevi koje biopolimeri za regeneraciju koštanog tkiva moraju ispuniti su biokompatibilnost, poroznost, bio-integracija, jednostavno rukovanje, mehanička svojstva te biorazgradnja<sup>92</sup>. Određeni sintetski i prirodni polimeri zadovoljavaju većinu navedenih zahtjeva, te su stoga često primjenjivani u inženjerstvu koštanog tkiva.

Osnovna podjela je:

### 1. Prirodni polimeri

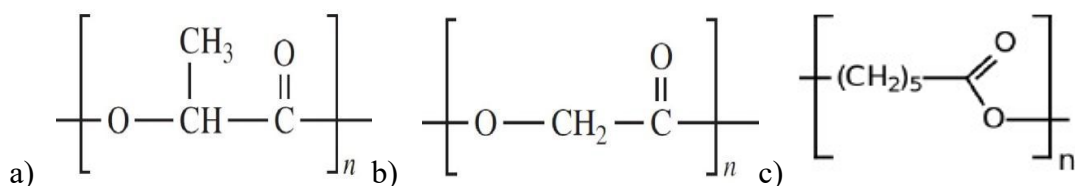
- a) polisaharidi - škrob, alginat, hitin, kitozan, derivati hijaluronske kiseline
- b) proteini – soja, kolagen, fibrin gelovi, svila

### 2. Sintetski polimeri – polimljična kiselina, poliglikolna kiselina, poliesteri<sup>14</sup>

Navedeni polimeri su biokompatibilni, netoksični i ne izazivaju upalne procese nakon implantacije. Osim toga, omogućuju lako kontroliranje kvalitete, kemijskih i fizikalnih svojstava što znatno proširuje primjenu. Na njihova svojstva utječe niz faktora, a neki od njih su: sastav, struktura, molekulska masa itd. Sintetski polimeri dijele se na biorazgradive i ne-biorazgradive<sup>93</sup>. Sintetski biorazgradivi polimeri pogodni su za primjenu u inženjerstvu tkiva jer smanjuju mogućnost reakcije tijela na novo strano tijelo (u odnosu na metale) i omogućuju stvaranje potpuno novog prirodnog tkiva. Nosači od sintetskih polimera imaju zadovoljavajuća mehanička svojstva te služe kao potporanj tijekom rasta novog tkiva. Biološki su inertni i ujednačenih svojstava, a osim kao nosači koriste se i kao sustavi za kontrolirano otpuštanje djelatnih tvari<sup>94</sup>.

Obzirom na mehanička i kemijska svojstva poli( $\alpha$ -2-hidroksi etanske kiseline), poli( $\alpha$ -hidroksi kiseline), poli( $\beta$ -hidroksi kiseline), polialkanoati, poliuretani, poliortoesteri, polikarbonati ili kopolimeri navedenih polimera pogodni su za primjenu u medicini. Na

slici 7 su prikazane strukture najčešće istraživanih sintetskih polimera: PLA(polilaktid, polilaktidna kiselina), PGA (poliglikol, poliglikolna kiselina) i PCL (poli(ε-kaprolakton))<sup>95</sup>.

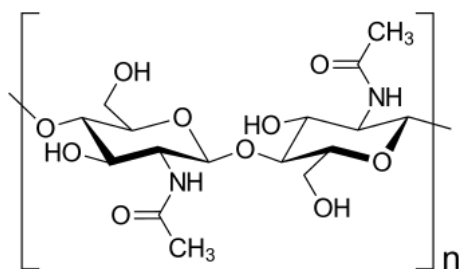


**Slika 7.** Struktura: a) PLA(polilaktid), b) PGA (poliglikolid) i c) PCL (poli(ε-kaprolakton))<sup>95</sup>.

Unatoč lakšoj obradi sintetskih polimera, prirodni polimeri znatno su biokompatibilniji te stimuliraju mineralizaciju kosti. Struktura im je vrlo organizirana te često sadrži ligande koji su neophodni za stvaranje veza sa staničnim receptorima. Sve su popularniji u području koštanog inženjerstva jer ne zahtijevaju drugi kirurški zahvat odnosno uklanjanje iz tijela. Ugrađuju se u strukturu te se vrlo lako prilagođavaju mjestu ugradnje. Neki životinjski i biljni polimeri koriste se kao nosači u inženjerstvu tkiva. Podrazumijeva se da se u takvoj primjeni prirodni polimeri nakon određenog vremena razgrađuju te se za to vrijeme stvara novo koštano tkivo, bez izazivanja upalnih procesa i toksičnih reakcija<sup>92</sup>. Osim toga prirodni polimeri stimuliraju imunološki odgovor domaćina prilikom pojave nečistoća ili otrovnih tvari u tijelu. Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su pokazala kako su biorazgradnja i biokompatibilnost svojstva koja daju značajnu prednost pri odabiru materijala za koštani nosač. Neki prirodni polimeri koji se koriste u koštanom inženjerstvu su: alginati, škrob, celuloza, želatina, hitin, kitozan i dr.<sup>96</sup>. Među navedenim prirodnim polimerima najistaknutiji i najčešće korišteni su hitin i kitozan.

### 2.6.1. Hitin

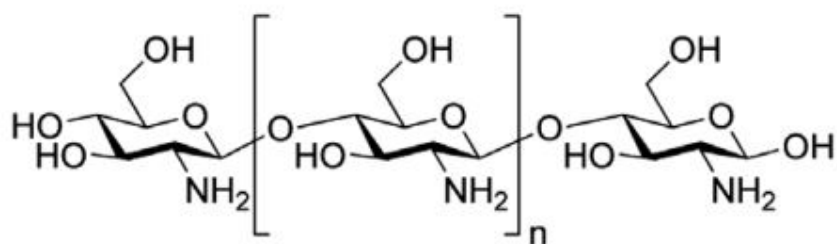
Hitin je linearni polisaharid sastavljen od dugih nizova N-acetila i D-glukozamina povezanih glikozidnom vezom. Struktura hitina slična je celulozi, a razlikuje se jedino po tome što je hidroksilna skupina (-OH) na drugom ugljikovu atomu glukoze zamijenjena acetiliranom amino skupinom (Slika 8). Hitin je pronađen u ljuskama rakova, jastoga i insekata, staničnim stjenkama gljiva i algi te ga se može dobiti fermentacijom gljivica. Uz celulozu najčešći je biopolimer u prirodi. Netopljiv je u vodi, organskim otapalima, blagim kiselinama i lužinama te mu to smanjuje primjenu. Djelomičnom deacetilacijom hitina dobiva se kitozan koji ima važnu ulogu u nosačima za inženjerstvo koštanog tkiva<sup>97,98</sup>.



**Slika 8.**Struktura isječka makromolekule hitina<sup>97</sup>.

### 2.6.2. Kitozan

Kitozan (CHT) je linearni polisaharid sastavljen od jedinica N-acetil D-glukozamina (slika 9). Dobiva se djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina i to tako da stupanj deacetilacije bude veći od 65%. Budući da je sirovina za proizvodnju kitozana prirodnog podrijetla, dolazi do varijacija u sastavu i kemijsko-fizikalnim svojstvima koja je teško predvidjeti<sup>9</sup>. CHT se sastoji od tri tipa reaktivnih funkcionalnih skupina: amino skupina, primarna i sekundarna hidroksilna skupina. Kemijska priroda kitozana pruža mnoge mogućnosti za kovalentne i ionske izmjene koje omogućuju veliku prilagodbu mehaničkih i bioloških svojstava<sup>98</sup>.



**Slika 9.**Struktura isječka makromolekule kitozana<sup>98</sup>.

Dok je hitin netopljiv u većini organskih otapala, kitozan je lako topljiv u razrijeđenim kiselim otopinama s  $\text{pH} < 6$  jer se smatra jakom bazom budući da posjeduje primarnu amino grupu s vrijednošću  $\text{pK}_a$  od 6,3. Kod nižih  $\text{pH}$  vrijednosti amino grupa se protonira i postaje pozitivno nabijena što čini kitozan topljivim u vodi, kationskim polielektrolitom. S druge strane, ako se  $\text{pH}$  povisi iznad 6 amino skupine kitozana se deprotoniraju, polimer gubi svoj

naboj i postaje netopljiv. Prijelaz iz topljivog u netopljivo područje događa se između pH vrijednosti 6 – 6,5. Topljivost kitozana također ovisi o stupnju deacetiliranja i metodi deacetiliranja. Najčešće otapalo za kitozan je razrijeđena octena kiselina, a topljiv je i u razrijeđenoj klorovodičnoj i dušičnoj, a nije topljiv u razrijeđenoj sumpornoj i fosfornoj kiselini. Kitozan je pogodan za stvaranje visokoporoznih trodimenzionalnih nosača zbog čega se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva<sup>9</sup>. Zbog pozitivnog naboja, kitozan reagira s negativnim dijelovima stanične membrane, što vodi reorganizaciji i otvaranju zgusnutih proteina. To objašnjava povećanu propusnost ovog polisaharida kroz staničnu membranu. Povećanjem broja amino skupina, tj. stupnjem deacetiliranja, ostvaruju se bolje interakcije između stanica i kitozana. Razgradnjom kitozana nastaju netoksični oligosaharidi različitih molekulskih masa koji se mogu razgraditi u organizmu ili dalje izlučiti iz tijela. Stupanj razgradnje kitozana usko je povezan s molekulskom masom i stupnjem deacetiliranja, a bolja mehanička svojstva pokazuje kitozan s većom molekulskom masom<sup>99</sup>.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Za pripremu prekursora kalcijevih iona korišteni su:

- kalcit,  $\text{CaCO}_3$ , dobiven iz sipine kosti (*Sepia officinalis* L.)
- kalcit,  $\text{CaCO}_3$ , (T.T.T d.o.o.)
- kalcijev oksid,  $\text{CaO}$ , dobiven iz sipine kosti (*Sepia officinalis* L.)
- natrijev hipoklorit,  $\text{NaClO}$ , (GramMol)

Za pripremu kalcijevih fosfata korišteni su:

- urea fosfat, UPH,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4$ , (Sigma-Aldrich)
- stroncijev nitrat,  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , (Acros Organics)
- biogeni prekursori kalcijevih iona

Za pripravu kompozita korišteni su:

- kitozan,  $M_w = 310\,000\text{--}375\,000\text{ g/mol}$ ,  $\text{DD} > 0,75$  (Lach:Ner)
- octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,8 %), (Sigma-Aldrich)
- pripremljeni kalcijevi fosfati

Za pripremu poroznih uzoraka iz pripremljenih kompozitnih materijala korišteni su:

- natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ , (Honeywell/Fluka)
- etanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , (KEFO)

Ostali korišteni materijali su:

- silicij, Si, NIST

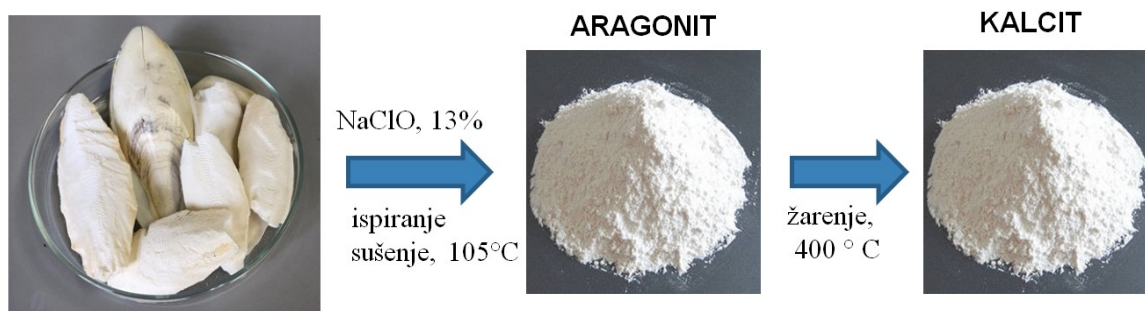
## 3.2. Sinteza

### 3.2.1. Preliminarna sinteza CaP iz biogenog izvora

Za dobivanje kalcijeva oksida korištene su sipine kosti (*Sepia officinalis* L.) iz Jadranskog mora. Nakon uklanjanja plašta, sipina kost (aragonit,  $\text{CaCO}_3$ ) je usitnjena i žarena pri  $900^\circ\text{C}$  (brzina zagrijavanja  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) tri sata kako bi se uklonio organski dio i dobio kalcijev oksid ( $\text{CaO}$ ). U demineraliziranu vodu dodana je odgovarajuća količina kalcijeva oksida i uree fosfata ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4$ ) kako bi omjer Ca/P iznosio 1,67, te se reakcija provodila sljedećih 5 dana pri  $50^\circ\text{C}$ , uz 1 dan starenja pri sobnoj temperaturi ( $23^\circ\text{C}$ ). Nakon sinteze, dobivena suspenzija je centrifugirana, a nastali kalcijev fosfat sušen je 24 sata na  $100^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2. Sinteza Sr-supstituiranih CaP iz biogenog izvora

Nakon što im se uklonio plašt, kosti su izrezane na komadiće veličine  $1\text{ cm}^3$  i stavljene u 13% otopinu natrijeva hipoklorita,  $\text{NaClO}$ , kako bi se unutar 24 sata uklonile organske komponente. Zatim su kosti ispirane kipućom demineraliziranom vodom te sušene na  $105^\circ\text{C}$ . Osušene kosti toplinski su obrađene na  $400^\circ\text{C}$  (brzina zagrijavanja  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) dva sata kako bi se dobio kalcijev karbonat u obliku kalcita (Slika 10).



**Slika 10.** Postupak dobivanja kalcita,  $\text{CaCO}_3$  obradom sipine kosti.

U demineraliziranu vodu dodana je odgovarajuća količina stroncijeva nitrata, kalcijeva karbonata i uree fosfata kako bi omjer  $(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{P}$  iznosio 1,67, te se reakcija provodila sljedećih 5 dana pri  $50^\circ\text{C}$  (Slika 11), uz 1 dan starenja pri sobnoj temperaturi ( $23^\circ\text{C}$ ). Pripremljeni kalcijevi fosfati supstituirani su s 1, 5 i 10 *mol%* stroncijeva iona. Nesupstituiran CaP sustav pripremljen je na isti način, bez dodatka stroncijeva nitrata. Nakon sinteze pripremljeni CaP odvojeni su filtracijom i sušeni 24 sata na sobnoj temperaturi.



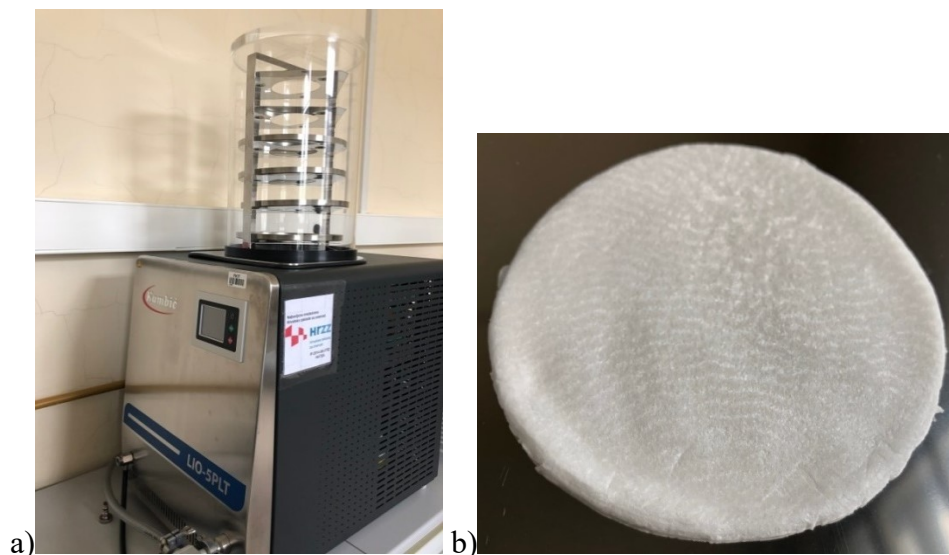
**Slika 11.** Sinteza kalcijeva fosfata iz kalcijeva karbonata (kalcit) i uree fosfata.

### 3.2.3. Priprema kompozitnih materijala

Kitozan je otopljen u 0,40 % -tnoj otopini octene kiseline te je potom filtriran. U otopinu kitozana (1,1 wt%) dodana je odgovarajuća količina pripremljenih CaP (0, 1, 5 i 10 mol% Sr) kako bi udio dodanih kalcijevih fosfata u otopini kitozana bio 30 wt%. Nakon dodatka određenog udjela kalcijeva fosfata u kitozan, CaP su dispergirani unutar polimerne matrice pomoću ultrazvučne kupelji tijekom 5 minuta.

### 3.2.4. Priprema poroznih struktura

Uzorci su smrznuti pri  $-33^{\circ}\text{C}$  u Petrijevim zdjelicama. Zatim su uzorci uronjeni u smjesu neotapala (NaOH/EtOH, volumni omjer 1:1) pri temperaturi od  $-33^{\circ}\text{C}$  tijekom 12 sati, što omogućuje neutralizaciju zaostale kiseline u uzorcima. Uzorci su zatim uronjeni u 96% etanol pri  $-33^{\circ}\text{C}$ , kako bi se tijekom 12 sati omogućilo ispiranje uzoraka od NaOH. Zatim su uronjeni u 96% etanol pri sobnoj temperaturi, te nakon 12 sati isprani su demineraliziranom vodom kako bi se uklonio zaostali etanol. Uzorci su zatim ponovno zamrznuti pri  $-33^{\circ}\text{C}$ , te liofilizirani (Slika 12a) kako bi se iz njih uklonila prisutna voda i kao produkt dobio kompozitni materijal kitozana i kalcijeva fosfata visokoporozne strukture (Slika 12b).



**Slika 12.** Liofilizator (a) i pripremljen kompozitni materijal kitozana i kalcijeva fosfata nakon liofilizacije (b).

### 3.3. Metode karakterizacije

#### 3.3.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

Dobiveni praškasti i kompozitni uzorci karakterizirani su infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovom transformacijom (FTIR). FTIR spektri snimljeni su ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometrom s dijamantnim kristalom (slika 13). Spektri su snimani 32 puta u apsorpcijskom režimu i rasponu mjernog područja od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  s rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$  pri 20 °C.



**Slika 13.** ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometar.



### 3.3.2. Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza

Mineralni sastav sintetiziranih i žarenih prašaka određen je rendgenskom difrakcijskom analizom, XRD pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000 s  $\text{CuK}\alpha$  (1.5406 Å) zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva  $3^\circ$ - $60^\circ$  za sintetizirane uzorke, te  $20^\circ$ - $70^\circ$  za žarene uzorke brzinom snimanja od  $0,2^\circ/10\text{s}$ . Difraktometar Shimadzu XRD-6000 prikazan je na slici 14. Kako bi se omogućilo određivanje udjela amornog kalcijeva fosfata, u praške pripremljenih kalcijevih fosfata umiješano je 5,0 wt% silicija, koji je korišten kao standard.

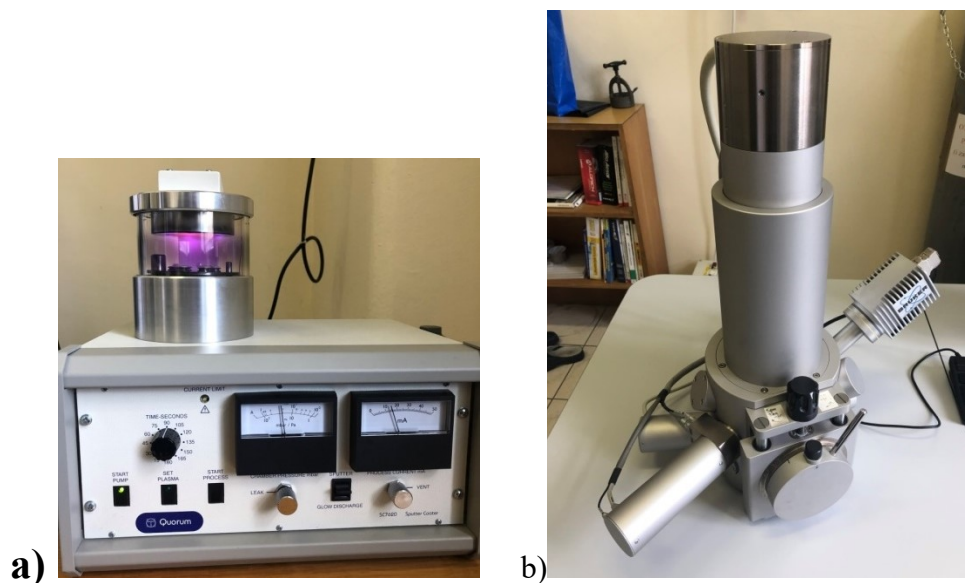


**Slika 14.** Shimadzu XRD-6000 difraktometar.

Pomoću računalnog softvera DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0 određeni su parametri elementarnih ćelija HAp-a, OCP-a i  $\beta$ -TCP-a, koristeći Rietveldovu metodu. Korišten strukturni model HAp-a preuzet je iz istraživanja Veselinović i sur.<sup>100</sup>, model OCP-a iz istraživanja Espanol i sur.<sup>101</sup>, model  $\beta$ -TCP-a iz istraživanja Hoshikawa i sur.<sup>44</sup> te model stroncijeva karbonata, ( $\text{SrCO}_3$ ) iz istraživanja Strommea i sur.<sup>102</sup>. Računati su parametri elementarne ćelije, faktori okupancije te duljina veze. Pozicije P, O i H držane su konstantnim, što je omogućilo preciznije određivanje okupancija pozicija Ca.

### 3.3.3. Pretražna elektronska mikroskopija

Morfologija nastalih kristala Sr-supstituiranih CaP i pripremljenih kompozitnih materijala kitozana i CaP analizirana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prije same mikroskopije uzorke je potrebno naporiti u uređaju za naporivanje (Slika 15a), koji uzorke izlaže utjecaju plazme zlata tijekom 45 (praškasti uzorci) i 90 sekundi (kompozitni uzorci) kako bi se osigurala njihova vodljivost. Korišten je pretražni elektronski mikroskop TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 kV (Slika 15b).



**Slika 15.** a) Naparivač (Quorum), b) pretražni elektronski mikroskop TESCAN Vega3SEM Easyprobe.

### 3.3.4. Masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom

Kemijski sastav uzoraka utvrđen je masenom spektroskopijom s induktivno spregnutom plazmom, ICP-MS, pomoću instrumenta Perkin Elmer ICP-MS ELAN DRC-e (Slika 16). Pripremljeni kalcijevi fosfati (100 mg) otopljeni su u 1 mL vodene otopine nitratne kiseline ( $c = 1 \text{ mol/dm}^3$ ),  $\text{HNO}_3$ , čiji je volumen povećan na 10 mL dodatkom ultračiste vode.



**Slika 16.** Istrument Perkin Elmer ICP-MS ELAN DRC-e.

### 3.3.5. Određivanje ukupnog organskog ugljika

Sadržaj ugljika u sintetiziranim prašcima utvrđen je uređajem za određivanje ukupnog organskog ugljika, Shimadzu TOC V-Series (Slika 17). Prašci su otopljeni u vodenoj otopini sumporne kiseline ( $c = 1 \text{ mol/dm}^3$ ),  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , iz koje je prethodno uklonjen ugljikov dioksid,  $\text{CO}_2$ .

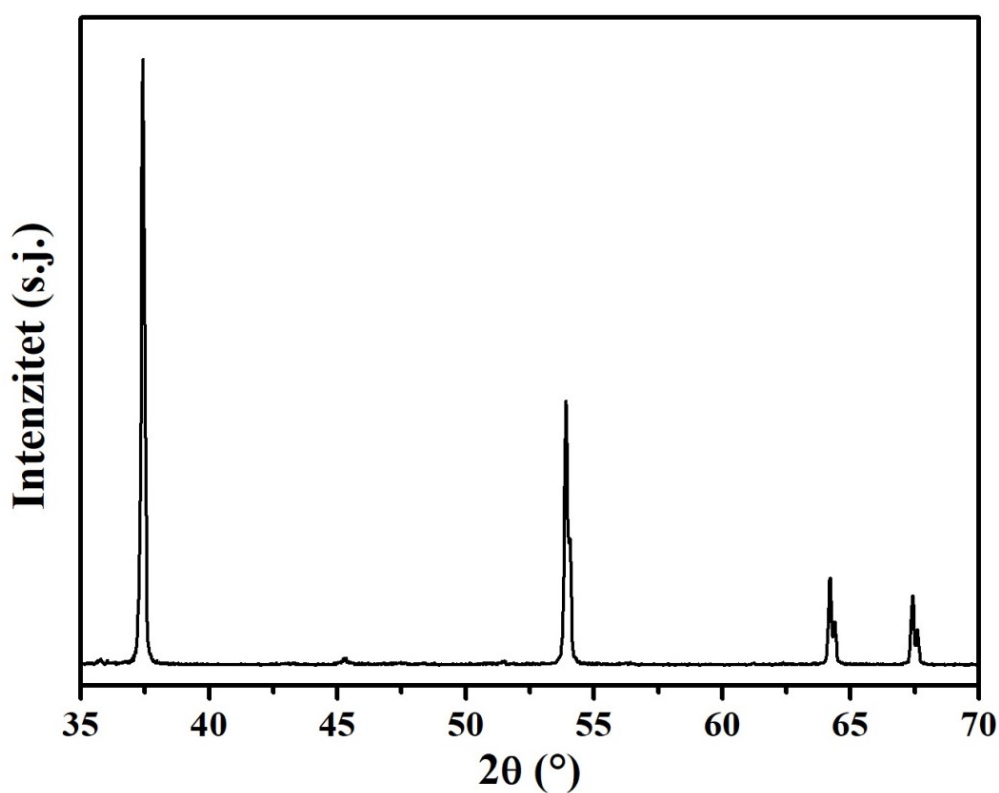


**Slika 17.** Uređaj Shimadzu TOC V-Series.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Preliminarno istraživanje sinteze kalcijeva fosfata iz biogenog izvora

Cilj preliminarnog istraživanja je sintetizirati sustav kalcijeva fosfata iz kalcijeva oksida pripremljenog iz sipine kosti te utvrditi koje faze kalcijeva fosfata nastaju. U cilju je približiti se kemijskom i faznom sastavu prirodnog mineralnog tkiva.

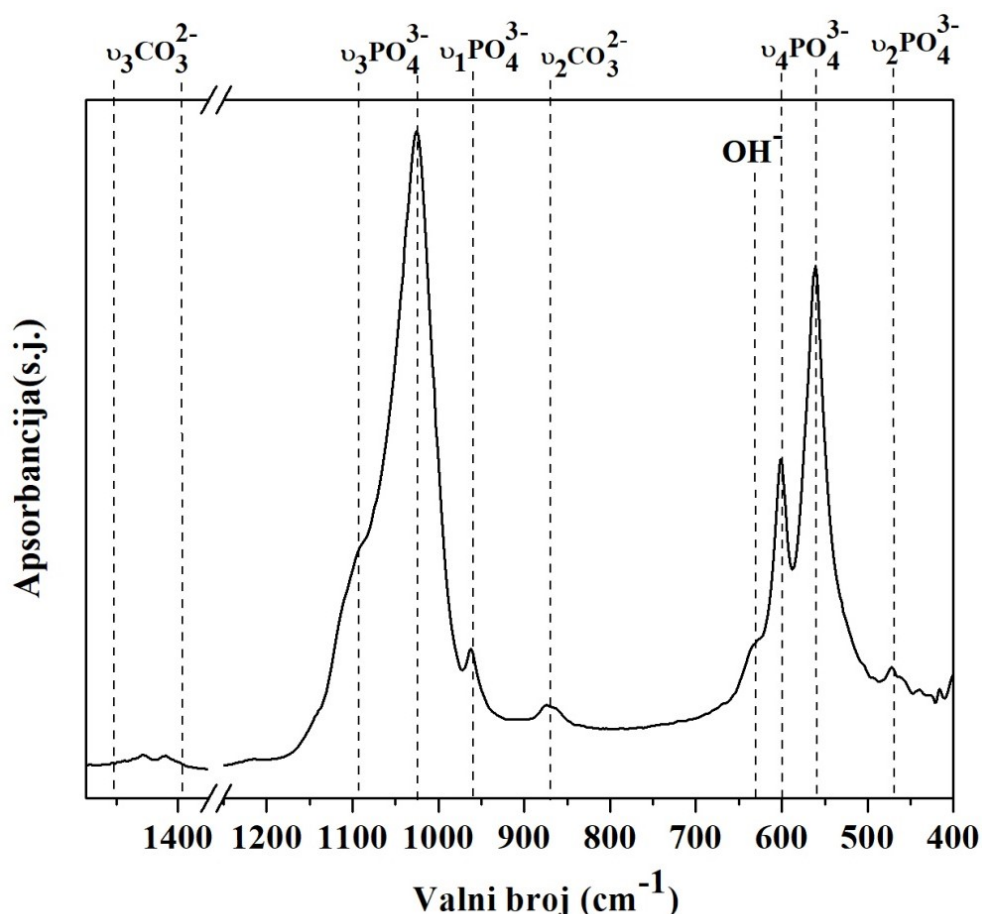


**Slika 18.** Difraktogram uzorka sipine kosti žarene na 900°C

Prema ICDD bazi podataka (*engl.* The International Centre for Diffraction Data) difrakcijski maksimumi na pozicijama  $2\theta = 37,46^\circ$ ;  $53,92^\circ$ ;  $64,14^\circ$  i  $67,37^\circ$  pripadaju kalcijevu oksidu, CaO (kartica CaO, ICDD 48-1467). Time je dokazano da je iz sipine kosti žarenjem dobiven kalcijev oksid, koji je korišten za daljnju sintezu kalcijevih fosfata.

#### 4.1.2. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

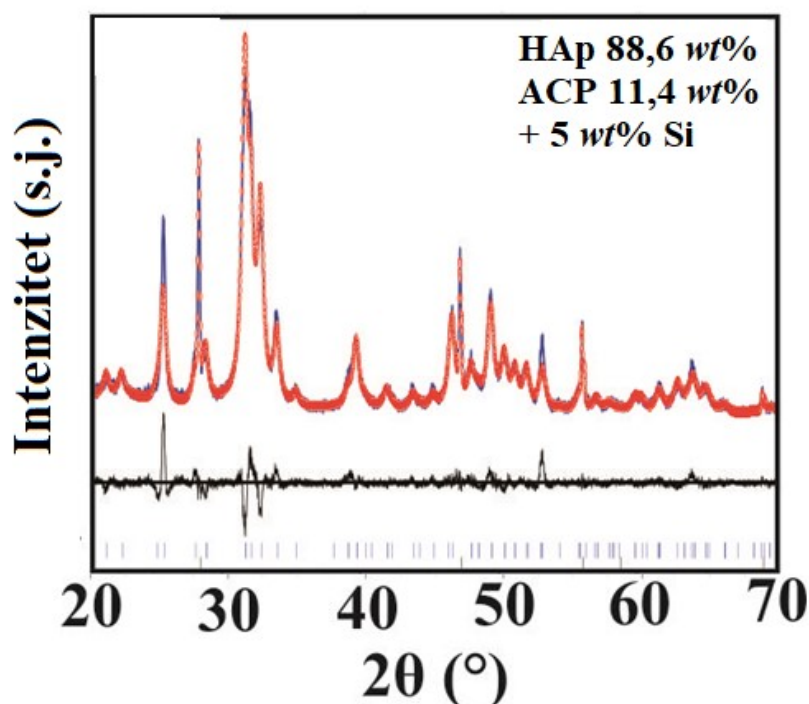
Na slici 19 prikazan je FTIR spektar sintetiziranog kalcijevog fosfata dobivenog iz biogenog kalcijevog oksida. Pojavljuju se karakteristične vrpce za  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine na:  $\nu_1=1095 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_3=1026$  i  $959 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_4=600$  i  $560 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2=560 \text{ cm}^{-1}$ <sup>103</sup>. FTIR spektar također pokazuje karakteristične vrpce za  $\text{CO}_3^{2-}$  skupine pri  $\nu_2=870$ ,  $\nu_3=1420$  i  $\nu_3=1459 \text{ cm}^{-1}$ , čiji položaji upućuju na B-tip supstitucije  $\text{PO}_4^{3-}$  s  $\text{CO}_3^{2-}$  skupinama, koja je karakteristična za prirodno mineralno tkivo<sup>5,109</sup>. Supstitucija sa  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima dogodila se zbog sinteze kalcijevog fosfata pri atmosferskim uvjetima kod kojih je došlo do otapanja  $\text{CO}_2$  iz zraka u vodenom mediju. Vrpca na  $629 \text{ cm}^{-1}$  karakteristična je za  $\text{OH}^-$  skupinu u kristalnoj rešetki hidroksiapatita<sup>103</sup>. Dobiveni rezultati FTIR spektroskopije upućuju na nastajanje karbonatnog hidroksiapatita (CHAp). Međutim kako bi se potvrdilo nastajanje CHAp-a potrebno je analizirati dobiveni kalcijev fosfat pomoću rendgenske difrakcijske analize.



Slika 19. FTIR spektar kalcijeva fosfata sintetiziranog iz biogenog kalcijeva oksida.

#### 4.1.3. Rendgenska difrakcijska analiza

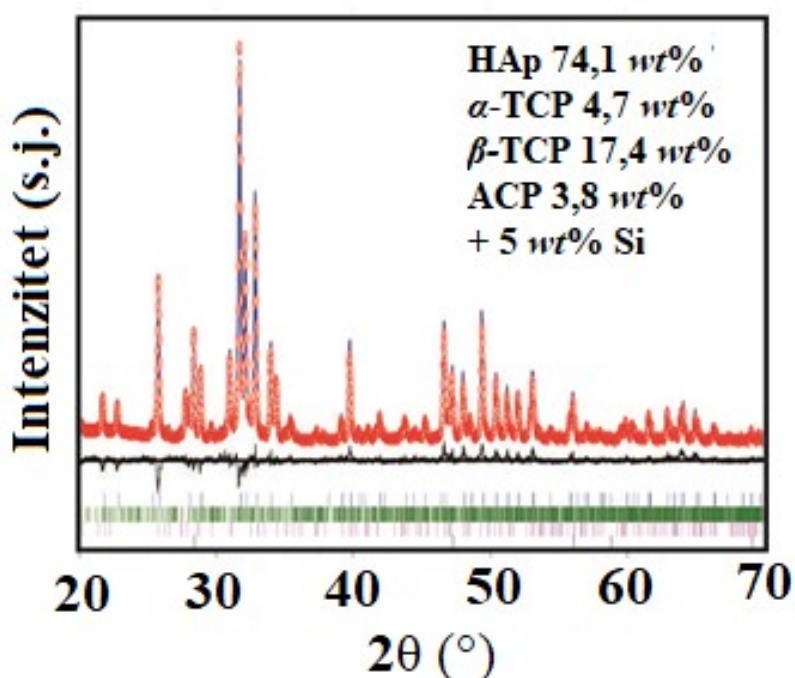
Difraktogram kalcijeva fosfata, sintetiziranog iz biogenog kalcijeva oksida prikazan na slici 20 pokazuje karakteristične difrakcijske maksimume za hidroksiapatit (ICDD 09-0432). Daljnjom obradom podataka pomoću Rietveldove metode uz dodatak 5,0 wt% -silicija (ICDD 27-1402) kao standarda utvrđeno je da se uzorak sastoji od 88,6 wt% hidroksiapatita i 11,4 wt% amornog kalcijevog fosfata. Pripremljen je dvofazni sustav amornog kalcijevog fosfata i karbonatnog hidroksiapatita (supstitucija B-tipa). Danas se sve više istražuju dvofazni, trofazni i višefazni sustavi kalcijevih fosfata za primjene u inženjerstvu košanog tkiva. Uz hidroksiapatit važni kalcijevi fosfati za takve sustave su oktakalcijev fosfat (OCP), amorfni kalcijev fosfat (ACP),  $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$  i  $\beta$ -TCP). Višefazni sustavi ne razlikuju se značajno od jednofaznih sustava po mehaničkim, fizikalnim ili kemijskim svojstvima, već po *in vivo* resorpciji. Kombinacijom različitih kalcijevih fosfata brzina resorpcije implantata može se prilagoditi prema koštanom oštećenju ili starosti pacijenta<sup>104,105</sup>.



**Slika 20.** Rietveldova analiza difraktograma kalcijeva fosfata, sintetiziranog iz biogenog kalcijeva oksida. Snimljeni difraktogram prikazan je crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ( $R_{wp} < 10\%$ ,  $R_{exp} < 3\%$ ). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma hidroksiapatita i silicija (standard) prikazani su na dnu slike.



Na slici 21 prikazan je difraktogram kalcijeva fosfata sintetiziranog iz biogenog kalcijeva oksida toplinski obrađenog na 1200 °C. Rietveldovom metodom uz dodatak 5,0 wt% silicija kao standarda utvrđeno je da se uzorak sastoji od 74,1 wt% hidroksiapatita, 3,8 wt% amornog kalcijeva fosfata, 4,7 wt%  $\alpha$ -trikalcijskog fosfata (ICDD 70-0364), 17,4 wt%  $\beta$ -trikalcijskog fosfata (ICDD 09-0169). Stehiometrijski hidroksiapatit ima Ca/P omjer 1.67 te je vrlo stabilan do 1200 °C. Na temperaturama >1200 °C dolazi do nastajanja  $\beta$ -TCP faze, a na temperaturama od 1400-1550 °C dolazi do nastajanja  $\alpha$ -TCP faze<sup>106</sup>. Kristalizacijom  $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP pri 1200 °C upućuju da je nastao nestehiometrijski hidroksiapatit. Osim FTIR spektroskopijom utvrđene ugradnje CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> iona (B-tip susstitucije PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> s CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> skupinama), može se pretpostaviti da je kristalizaciji nestehiometrijskog hidroksiapatita doprinjela i prisutnost drugih iona koji se nalaze u biogenom izvoru koji je korišten kao prekursor za Ca<sup>2+</sup> ione. Može se pretpostaviti da su korištenjem biogenog izvora sintetizirane kalcij fosfatne faze (HAp i ACP) po sastavu bliže prirodnom mineralnom koštanom tkivu, čiji su glavni sastojci hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona i 1-30 wt % ACP<sup>22</sup>.



**Slika 21.** Difraktogram kalcijeva fosfata sintetiziranog iz biogenog kalcijeva oksida toplinski obrađenog na 1200 °C. Snimljeni difraktogram prikazan je crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ( $R_{wp} < 10 \%$ ,  $R_{exp} < 3\%$ ). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma hidroksiapatita,  $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijskog fosfata i silicija (standard) dani su na dnu slike.

Za sintezu kalcij-fosfatnih sustav što sličnijih prirodnom mineralnom tkivu pogodno je imati prisutnu supstituciju  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima. Količina  $\text{CO}_3$ -supstitucije može se povećati korištenjem kalcijeva karbonata kao prekursora  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Zbog niže pH vrijednosti vodene otopine kalcijeva karbonata nego li kalcijeva oksida, moguća je precipitacija oktakalcijeva fosfata uz hidroksiapatit i amorfni kalcijev fosfat.

#### 4.2. Karakterizacija Sr-supstituiranih CaP prašaka

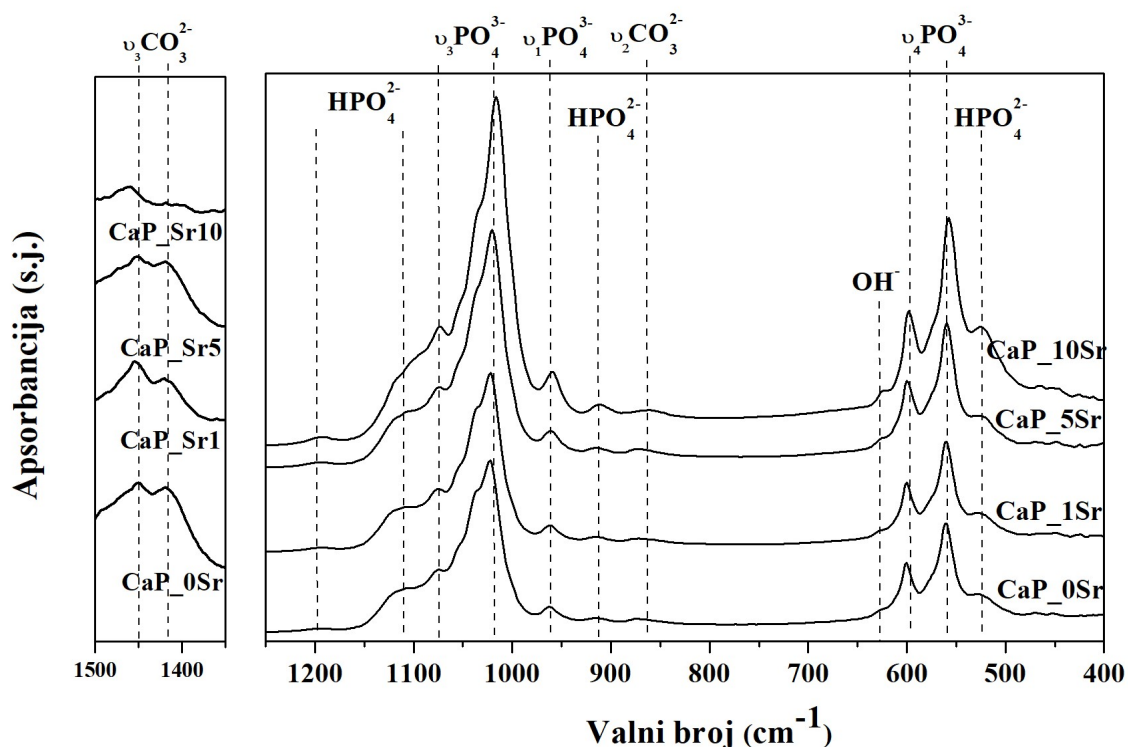
Pripremljeni kalcij-fosfatni sustavi supstituirani stroncijevim ionima karakterizirani su FTIR analizom, XRD analizom, SEM-om, a kemijski sastav određen je masenom spektroskopijom s induktivno spregnutom plazmom, ICP-MS te određivanjem ukupnog organskog ugljika, TOC.

##### 4.2.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

FTIR spektri (Slika 22) pripremljenih CaP sustava supstituiranih s 0, 1, 5 i 10 mol%  $\text{Sr}^{2+}$  ionom označeni su CaP\_0Sr, CaP\_1Sr, CaP\_5Sr i CaP\_10Sr. Uočene su karakteristične fosfatne ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) vrpce na valnim duljinama 1021 i 1078  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ , asimetrično rastezanje P-O veze), 562 i 598  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ , vibracije savijanja O-P-O veze) i 964  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ , simetrično rastezanje P-O veze). Vrpca na 626  $\text{cm}^{-1}$  upućuje na  $\text{OH}^-$  skupinu koja je karakteristična za HAp. Uočene vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{OH}^-$  skupina karakteristične su za nastajanje hidroksiapatita<sup>103</sup>. Povećanjem molarnog udjela supstituiranog  $\text{Sr}^{2+}$  iona dolazi do pomicanja vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina prema nižim valnim duljinama kao što su prethodno opisali Bigi i sur.<sup>51</sup>. Apsorpcijske vrpce na 522, 911, 1116 i 1192  $\text{cm}^{-1}$  pripisuju se  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupini koja upućuje na stvaranje ACP i/ili OCP faze<sup>107,108</sup>.

Apsorpcijske vrpce pri valnim duljinama 873  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ , asimetrično savijanje), 1408 i 1452  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ , asimetrično rastezanje) karakteristične su za  $\text{CO}_3^{2-}$  skupinu, te položaji vrpca upućuju na B-tip supstitucije. B-tip supstitucije karakterističan je kod prirodnog mineralnog tkiva<sup>5,109</sup>.



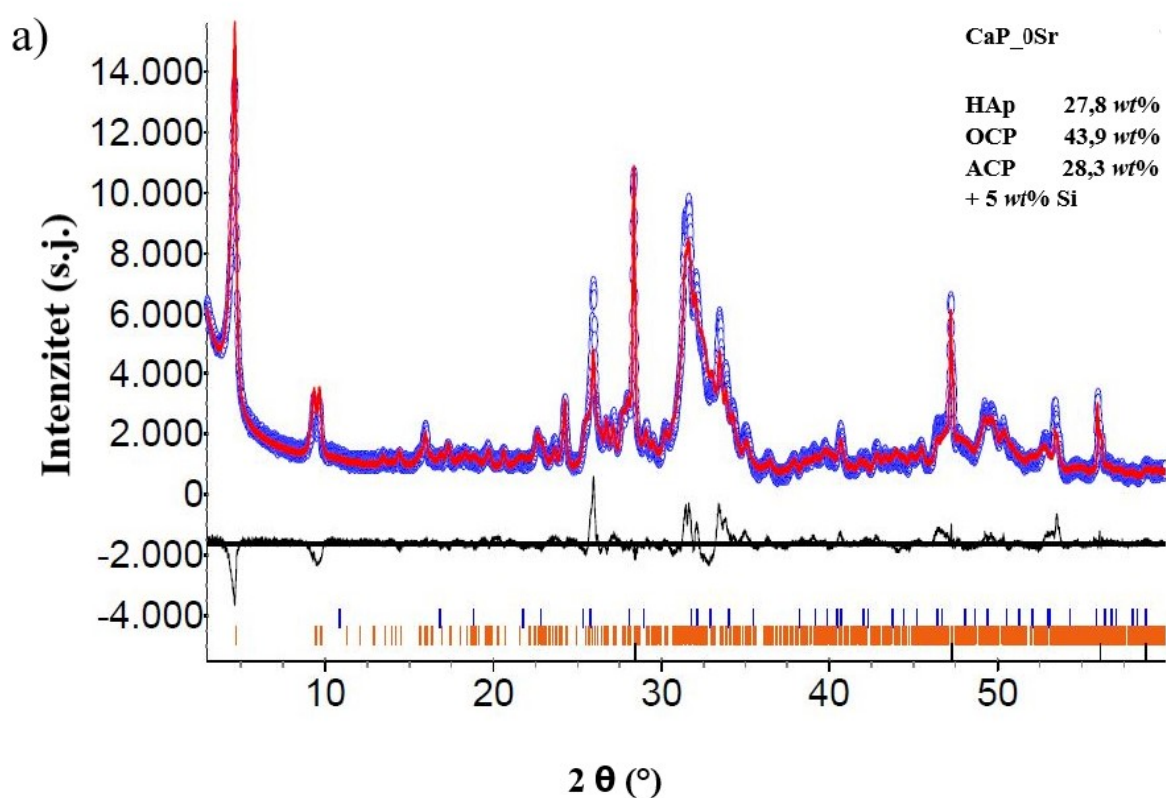


**Slika 22.** FTIR spektri pripremljenih kalcijevih fosfata CaP\_0Sr, CaP\_1Sr, CaP\_5Sr i CaP\_10Sr.

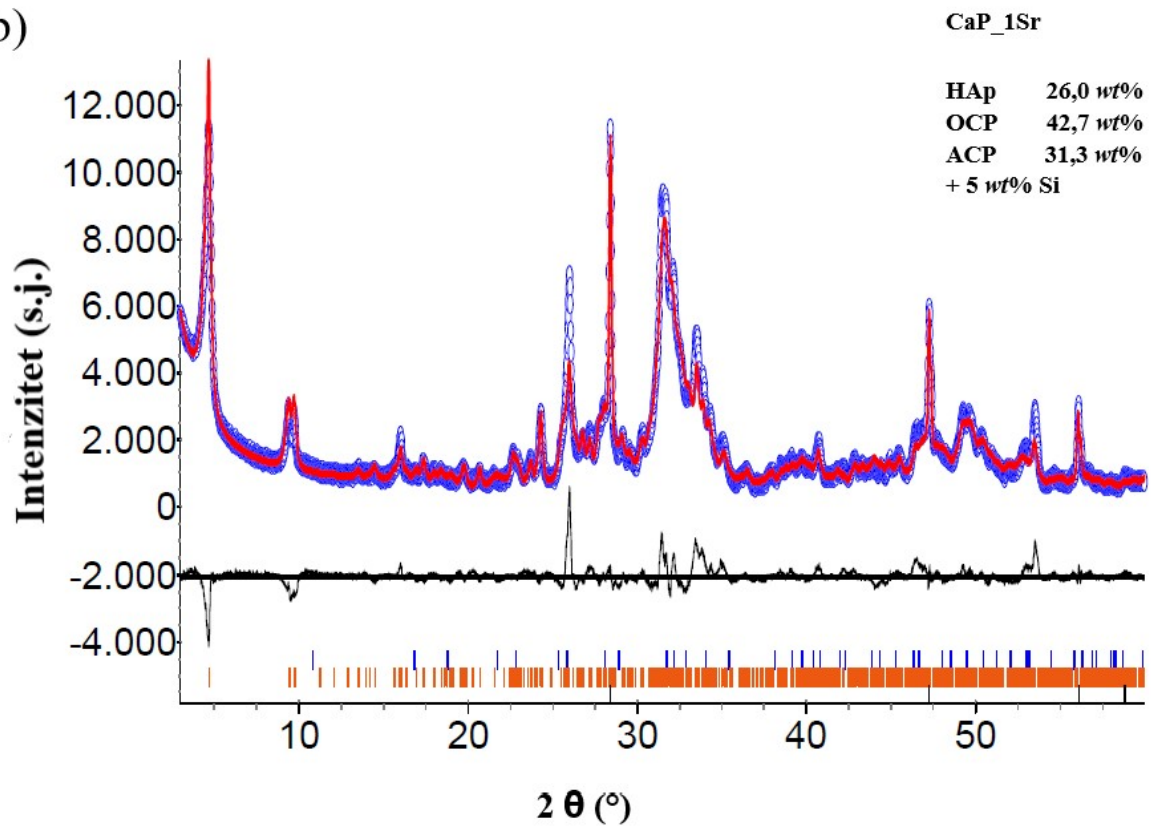
#### 4.2.2. Rendgenska difrakcijska analiza

Difraktogrami ne-supstituiranih (CaP\_0Sr) i Sr-supstituiranih (CaP\_1Sr, CaP\_5Sr, CaP\_10Sr) CaP sustava prikazani su na slici 23. Difraktogram svakog pojedinog CaP sustava pokazuje karakteristične pikove HAp i OCP faze, te karakteristične pikove silicija (standard). Dodatni pikovi karakteristični za stroncijeve spojeve ne pojavljuju se niti u jednom difraktogramu CaP sustava supstituiranih Sr<sup>2+</sup> ionom, što upućuje na uspješnu supstituciju stroncijem. Maseni udio (Tablica 3) ACP-a je podjednak u CaP\_0Sr (28,3 wt%), CaP\_1Sr (31,3 wt%) i CaP\_5Sr (29,1 wt%) uzorcima. Jedino u uzorku s najvećim udjelom stroncija (CaP\_10Sr) dolazi do porasta udjela ACP faze na 41,2 wt%. Veći udio ACP faze ukazuje na promjene u sustavu koje mogu biti rezultat ograničene supstitucije Sr<sup>2+</sup> ionom pri višim koncentracijama. ACP je poželjna faza u materijalima za regeneraciju koštanog tkiva, međutim njegov maseni udio u pripremljenom sustavu teško je kontrolirati. Nadalje, udio OCP-a ne mijenja se značajno između kalcijevih fosfata s različitim udjelima Sr<sup>2+</sup> iona i iznosi ~42 wt%. Nedavna istraživanja pokazala su da su i ACP i OCP prekursori za formiranje prirodne mineralne faze. Agregacija Ca(HPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>4-</sup> kompleksa početni je korak koji se odvija u fazi prije nukleacije.

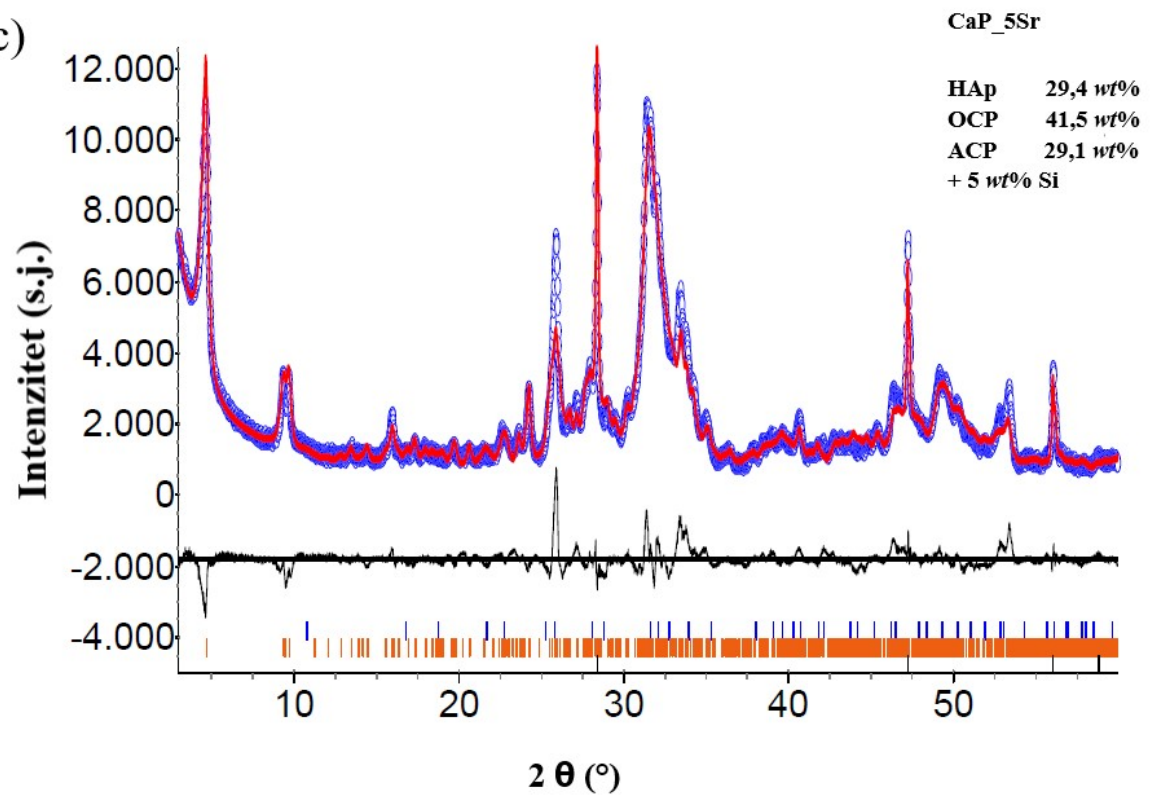
Zatim dolazi do otpuštanja  $H^+$  iona ili vezanja  $Ca^{2+}$  iona, što dovodi do nukleacije te taloženja sferičnih čestica ACP-a koje se sastoje od  $Ca_2(HPO_4)_3^{2-}$  kompleksa. Iz sferičnih čestica ACP-a počinju se formirati vrpce OCP-a s manjkom kalcija. Promjer vrpce je oko 1,4 nm i ne može se detektirati XRD analizom. Nastale se vrpce transformiraju u veće pločice OCP-a, koje prelaze u pločice hidroksiapatita s manjkom kalcija (CDHAp). Mineralna faza kosti može sadržavati 1–30 wt% ACP-a, koji može povoljno djelovati na brzinu obnavljanja koštanog tkiva<sup>22,104</sup>. Širina pikova OCP i HAp faze upućuje na nisku kristalnost, koja je karakteristična za prirodno mineralno tkivo.

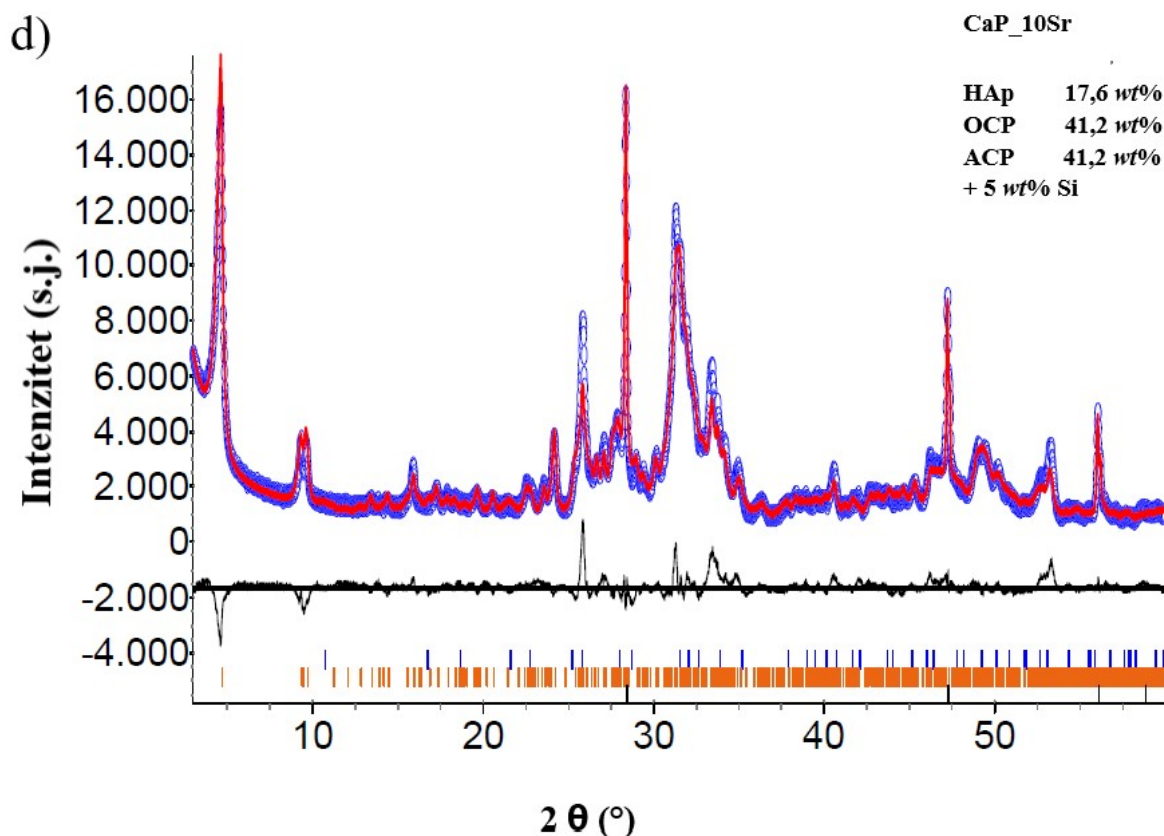


b)



c)





**Slika 23.** Difraktogrami a) ne-supstituiranog (CaP\_0Sr) i stroncijem supstituiranih; b) CaP\_1Sr, c) CaP\_5Sr, d) CaP\_10Sr kalcij fosfatnih sustava. Snimljeni difraktogram prikazani su crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ( $R_{wp} < 10\%$ ,  $R_{exp} < 3\%$ ). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma hidroksiapatita, OCP-a i silicija (standard) dani su na dnu slike.

Rezultati izračuna dimenzija jedinične ćelije hidroksiapatita i oktakalcijeva fosfata ovisno o udjelu stroncija prikazani su u Tablici 3. Dolazi do povećanja  $a = b$  osi u hidroksiapatitu, dok se  $c$  os ne mijenja značajno. Rezultat toga je povećanje volumena jedinične ćelije s  $529,6925 \text{ \AA}^3$  za 0% Sr do konačnih  $538,2464 \text{ \AA}^3$  za 10 % Sr. U kristalnoj rešetki oktakalcijeva fosfata dolazi do povećanja svih parametara elementarne ćelije, a rezultat toga je i povećanje volumena jedinične ćelije OCP-a od  $1220,9606 \text{ \AA}^3$  do konačnih  $1233,5943 \text{ \AA}^3$  (CaP\_10Sr). Povećanje parametara elementarne rešetke hidroksiapatita i oktakalcijeva fosfata posljedica je zamjene manjeg  $\text{Ca}^{2+}$  iona ( $r_{\text{Ca}^{2+}} = 0,100 \text{ nm}$ ) većim  $\text{Sr}^{2+}$  ionom ( $r_{\text{Sr}^{2+}} = 0,113 \text{ nm}$ )<sup>89</sup>. Povećanje parametara elementarne ćelije i izostanak pikova stroncijevih spojeva dokaz je djelomične supstitucije  $\text{Ca}^{2+}$  iona sa stroncijevim u nastalim kalcij-fosfatnim fazama. Međutim, ne može se isključiti moguća djelomična adsorpcija  $\text{Sr}^{2+}$  iona na površini kristala

HAp-a i OCP-a. Zbog boljeg razumijevanja mehanizma supstitucije i predviđanja brzine otpuštanja iona *in vivo*, od iznimne je važnosti odrediti da li su  $\text{Sr}^{2+}$  ioni zaista supstituirali  $\text{Ca}^{2+}$  ione ili su se smjestili u vakacije u kristalnim rešetkama ili su se apsorbirali na površinu kristala.

**Tablica 3.** Maseni udjeli (*wt%*) i parametri elementarne ćelije hidroksiapatita i oktakalcijeva fosfata u ne-supstituiranom (CaP\_0Sr) i Sr-supstituiranim (CaP\_1Sr, CaP\_5Sr, CaP\_10Sr) kalcij-fosfatnim uzorcima.

HAp						
	HAp ( <i>wt%</i> )	ACP ( <i>wt%</i> )	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å <sup>3</sup> )
CaP_0Sr	27,8	28,3	9,41369	9,41369	6,90197	529,6925
CaP_1Sr	26,0	31,3	9,43005	9,43005	6,88380	530,1351
CaP_5Sr	29,4	29,1	9,46036	9,46036	6,89567	534,4684
CaP_10Sr	17,6	41,2	9,49446	9,49446	6,89461	538,2464
OCP						
	OCP ( <i>wt%</i> )	ACP ( <i>wt%</i> )	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å <sup>3</sup> )
CaP_0Sr	43,9	28,3	19,69511	9,53534	6,85167	1220,9606
CaP_1Sr	42,7	31,3	19,70591	9,54063	6,85980	1223,4897
CaP_5Sr	41,5	29,1	19,72191	9,55317	6,87736	1229,1811
CaP_10Sr	41,2	41,2	19,73528	9,57108	6,88204	1233,5943

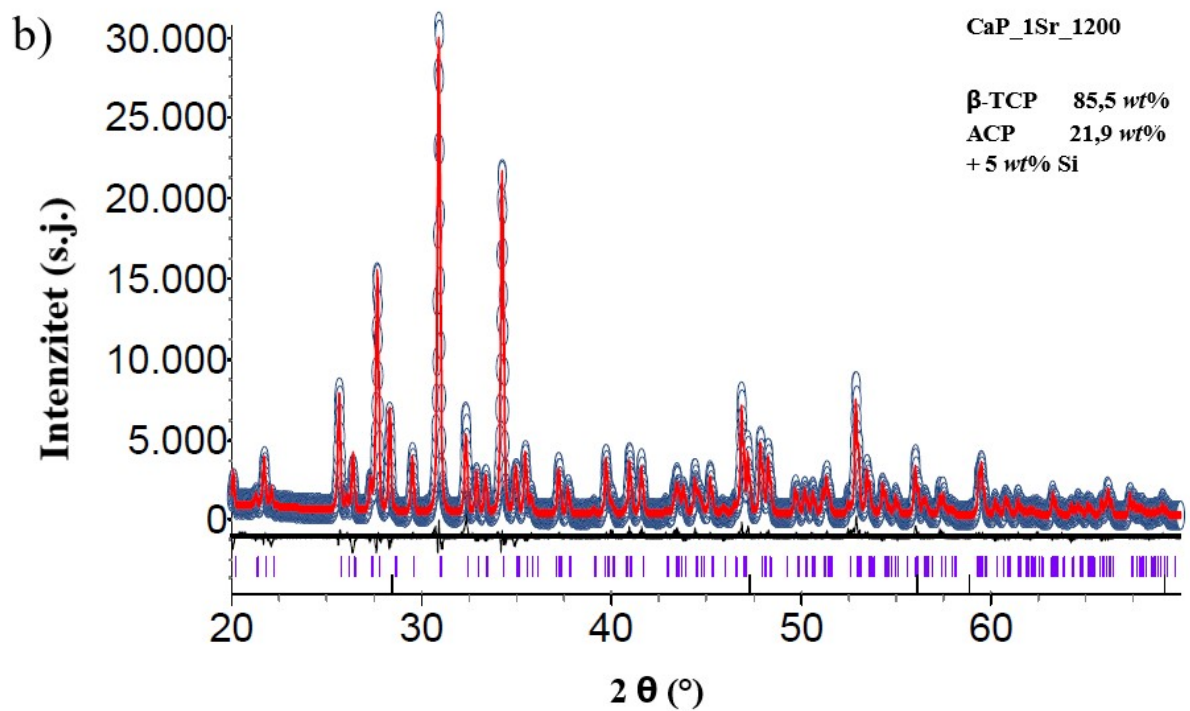
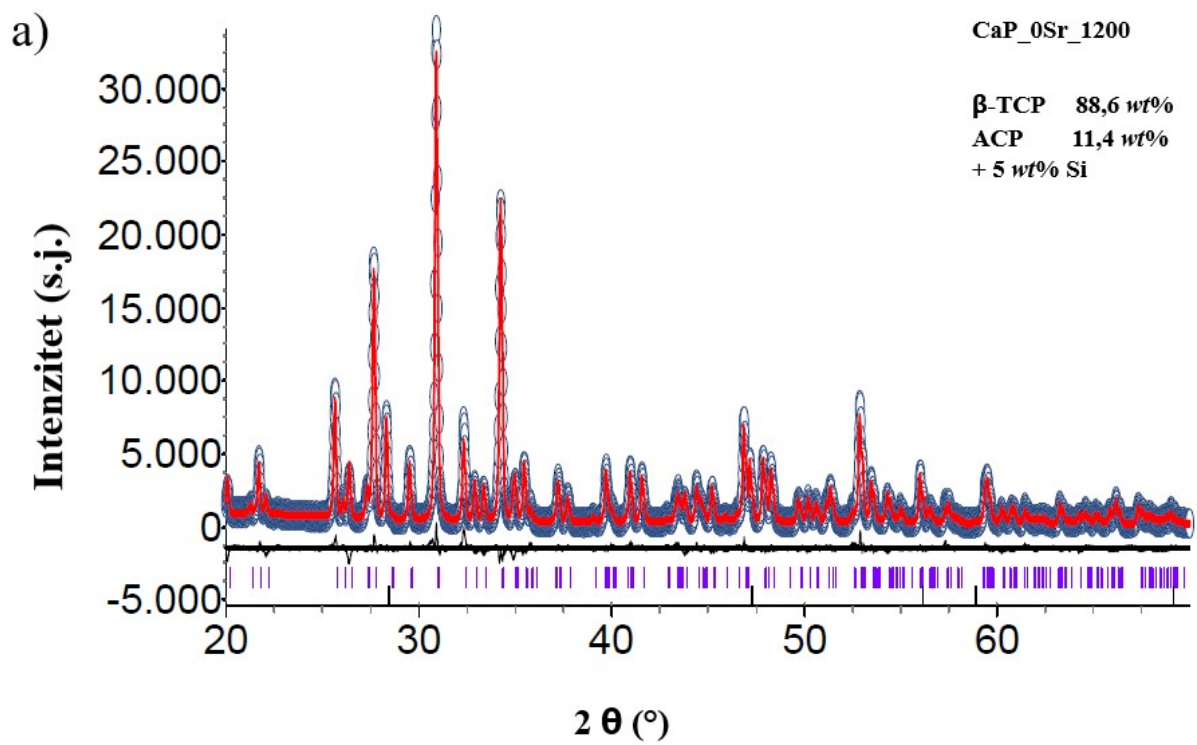
Prema istraživanju Matsunage i Murate<sup>111</sup> stroncijev ion supstituira  $\text{Ca}^{2+}$  ion na poziciji Ca1 u HAp-u, zbog niže energije supstitucije u odnosu na Ca2 poziciju.  $\text{Sr}^{2+}$  ionu pogodnija je supstitucija na poziciju Ca1 jer je ona prostorno veća. Energija supstitucije pozicije Ca1 niža je jer je veza Ca1-O dulja (0,246 nm) od veze Ca2-O (0,241 nm).  $\text{Sr}^{2+}$  se u kristalnu rešetku OCP-a supstituira na pozicije Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8. Pozicije Ca3 i Ca4 nalaze se u hidratiziranom sloju te zbog toga zahtijevaju niže energije supstitucije iako su prostorno te pozicije manje. Pozicije Ca7 i Ca8 povoljne su za supstituciju zbog veće duljine veze Ca-O. Zbog većeg broja Ca pozicija, u kristalnu rešetku OCP-a može se supstituirati veći udio

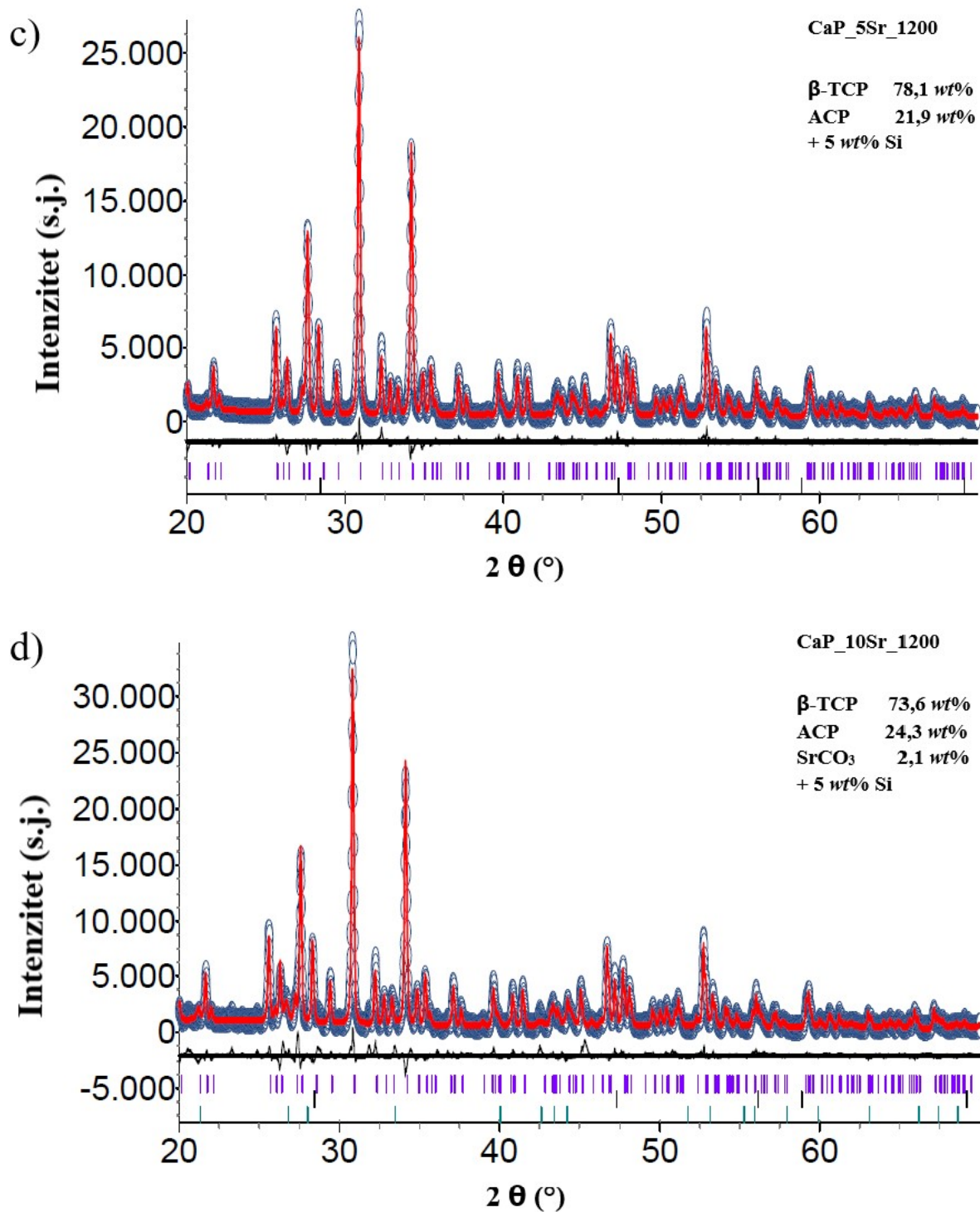
Sr<sup>2+</sup>iona nego li u kristalnu rešetku HAp-a. Povećanjem koncentracije Sr<sup>2+</sup> iona, energije supstitucije dodatno se smanjuju, što rezultira povećanjem stupnja Sr-supstitucije na navedenim pozicijama<sup>45</sup>.

Kako bi se odredila njihova toplinska stabilnost, uzorci su žareni na 1200 °C i analizirani pomoću XRD analize. Difraktogrami žarenih ne-supstituiranih (CaP\_0Sr\_1200) i Sr-supstituiranih (CaP\_1Sr\_1200, CaP\_5Sr\_1200, CaP\_10Sr\_1200) uzoraka prikazani su na slici 24. Na difraktogramima svih toplinski obrađenih uzoraka pojavljuju se karakteristični maksimumi  $\beta$ -TCP-a. Kristalizacija  $\beta$ -TCP-a ukazuje da je došlo do razgradnje nestehiometrijskog HAp-a i OCP-a. U preliminarnim istraživanjima dobiveni CaP\_0Sr sustav, sintetiziran iz biogenog CaO, nakon toplinske obrade sadržavao je HAp,  $\alpha$ -TCP i  $\beta$ -TCP faze. Dobiveni CaP\_0Sr sustav, sintetiziran iz biogenog CaCO<sub>3</sub>, nakon toplinske obrade u potpunosti se sastoji od  $\beta$ -TCP faze. Razlog potpune razgradnje nestehiometrijskog HAp-a i OCP-a u čisti  $\beta$ -TCP posljedica je još veće nestehiometrije u prethodno formiranom trofaznom sustavu HAp-a, OCP-a i ACP-a.

Pikovi stroncijevih spojeva ne pojavljuju se u uzorcima CaP\_1Sr i CaP\_5Sr, što dodatno potvrđuje ugradnju stroncija u rešetke HAp-a i OCP-a. Međutim, na difraktogramu uzorka CaP\_10Sr pojavljuje se pik stroncijeva karbonata, SrCO<sub>3</sub>, iz čega se može zaključiti da je 10 mol% Sr previše da se sav ugradi u  $\beta$ -TCP pa se višak Sr<sup>2+</sup> iona adsorbira na površinu kristala. Tijekom toplinske obrade adsorbirani stroncij oksidira u SrO koji stajanjem na zraku veže na sebe CO<sub>2</sub> i prelazi u SrCO<sub>3</sub>. Također je za pretpostaviti da je zbog nastajanja većeg masenog udjela ACP faze u uzorku CaP\_10Sr veći dio Sr<sup>2+</sup> iona ostao u amorfnoj fazi te je nakon toplinske obrade nastao SrCO<sub>3</sub> (Tablica 4).







Slika 24. Difraktogrami a) ne-supstituiranog (CaP\_0Sr\_1200) i stroncijem supstituiranih; b) CaP\_1Sr\_1200, c) CaP\_5Sr\_1200, d) CaP\_10Sr\_1200 kalcij fosfatnih sustava toplinski obrađenih na 1200 °C. Snimljeni difraktogram prikazani su crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ( $R_{wp} < 10 \%$ ,  $R_{exp} < 3\%$ ). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma  $\beta$ -TCP, SrCO<sub>3</sub> i Si (standard) dani su na dnu slike.

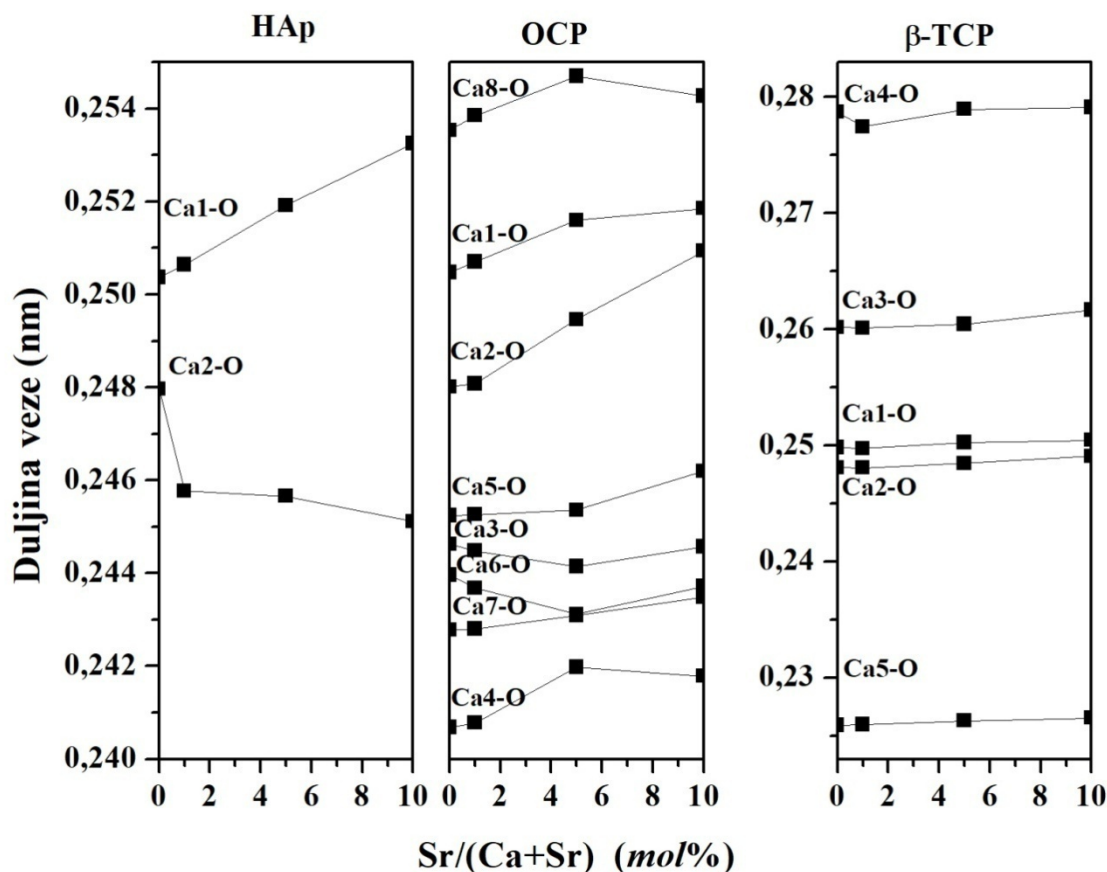


U tablici 4 prikazani su parametri elementarne ćelije  $\beta$ -TCP-a u toplinski obrađenom ne-supstituiranom CaP\_0Sr\_1200 i Sr-supstituiranim (CaP\_1Sr\_1200, CaP\_5Sr\_1200, CaP\_10Sr\_1200) CaP sustavima. Dolazi do povećanja  $a = b$  i  $c$  osi, a kao rezultat toga i volumena ćelije od početnih  $3519,1591 \text{ \AA}^3$  (CaP\_0Sr\_1200) do  $3550,9417 \text{ \AA}^3$  (CaP\_10Sr\_1200). Do porasta parametara elementarne ćelije dolazi do zbog već spomenute zamjene  $\text{Ca}^{2+}$  iona sa  $\text{Sr}^{2+}$  iona većeg radijusa.  $\text{Ca}^{2+}$  ion u strukturi  $\beta$ -TCP-a zauzima pet pozicija, pri čemu je pozicija Ca4 djelomično okupirana (0,5). Istraživanja Kannan i sur. potvrđuju dobivene rezultate da se  $\text{Sr}^{2+}$  ion u strukturi  $\beta$ -TCP-a supstituira na pozicijama Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4. Ca4-O veza najduža je veza u strukturi  $\beta$ -TCP-a, te je stoga najpogodnija za supstituciju većih iona ( $\text{Sr}^{2+}$ ). Najkraća veza je Ca5-O te je zbog toga Ca5 pozicija nije pogodna za supstituciju većeg  $\text{Sr}^{2+}$  iona<sup>45,53</sup>.

**Tablica 4.** Maseni udjeli (wt%) i parametri elementarne ćelije  $\beta$ -TCP-a u toplinski obrađenim ne-supstituiranom CaP\_0Sr\_1200 i žarenim Sr-supstituiranim (CaP\_1Sr\_1200, CaP\_5Sr\_1200, CaP\_10Sr\_1200) CaP.

$\beta$ -TCP						
	$\beta$ -TCP (wt%)	ACP (wt%)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å <sup>3</sup> )
CaP_0Sr_1200	88,6	11,4	10,42847	10,42847	37,36519	3519,1591
CaP_1Sr_1200	85,5	14,5	10,43379	10,43379	37,63744	3522,9652
CaP_5Sr_1200	78,1	21,9	10,45219	10,45219	37,40247	3538,7134
CaP_10Sr_1200	73,6	24,3	10,46383	10,46383	37,44826	3550,9417

Na slici 25 prikazane su duljine veza u kristalnoj rešetci HAp-a, OCP-a i  $\beta$ -TCP-a između kalcija i kisika.



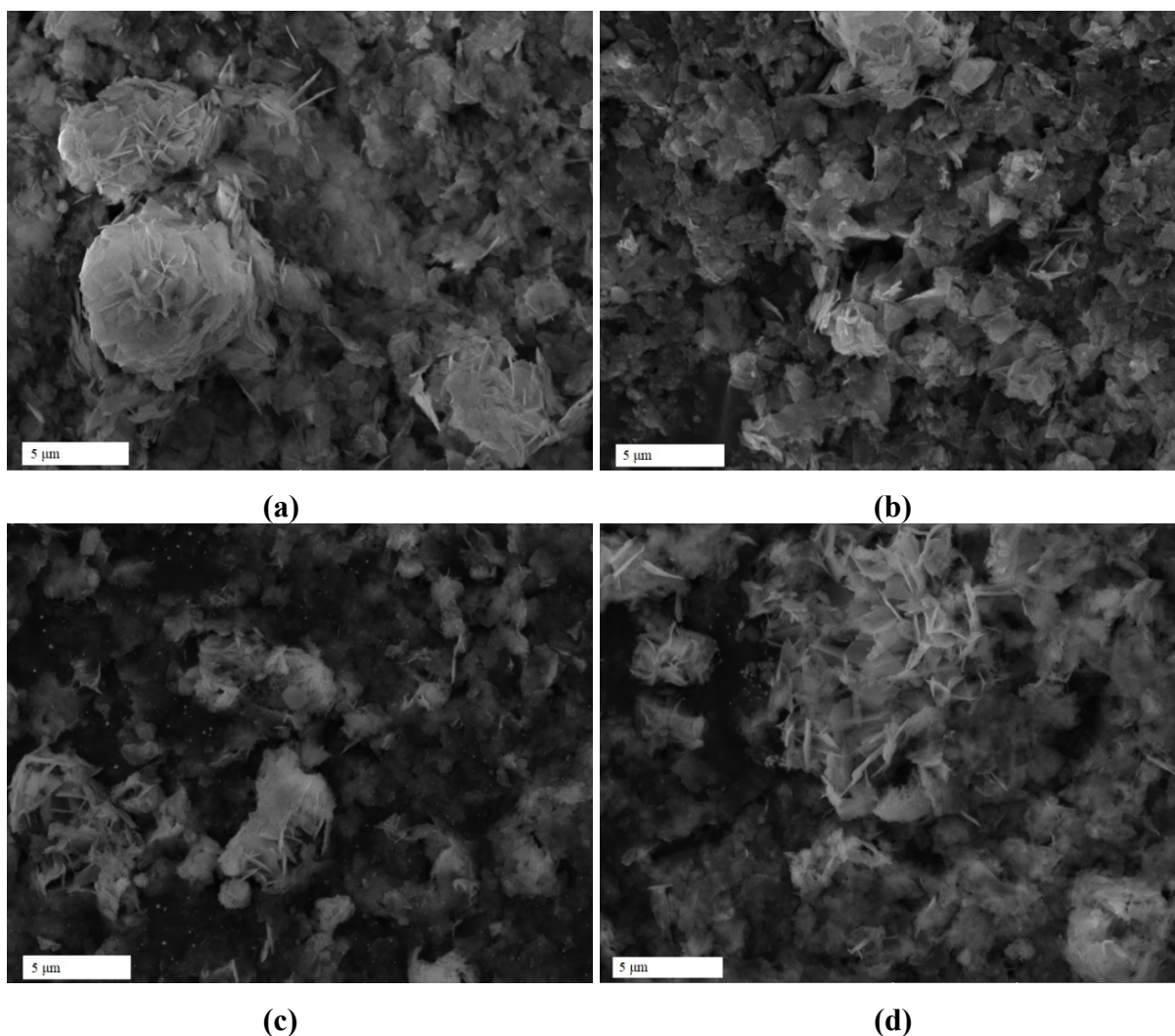
**Slika 25.** Prosječna duljina veze (nm) između pozicije kalcija i najbližeg susjednog atoma kisika u HAp-u, OCP-u i  $\beta$ -TCP-u u ovisnosti o molarnom udjelu Sr-supstitucije (mol%).

Duljina veze Ca1-O u strukturi HAp- se povećava kako se povećava molarni udio  $\text{Sr}^{2+}$  iona. Nasuprot tomu, duljina veze Ca2-O opada povećanjem molarnog udjela  $\text{Sr}^{2+}$  iona. U strukturi OCP-a duljina veza između Ca(3,6)-O opada povećanjem molarnog udjela  $\text{Sr}^{2+}$ , dok duljina ostalih Ca-O veza raste. U  $\beta$ -TCP-u duljina svih Ca-O veza raste povećanjem stupnja Sr-supstitucije, osim veze Ca5-O, čija duljina ostaje gotovo nepromijenjena.

#### 4.2.3. Analiza mikrostrukture sintetiziranih CaP prašaka pomoću pretražne elektronske mikroskopije

Pretražnim elektronskim mikroskopom proučavana je morfologija ne-supstituiranog (CaP\_0Sr) i Sr-supstituiranih (CaP\_1Sr, CaP\_5Sr, CaP\_10Sr) kalcij fosfatnih uzoraka (Slika 26). Kristali OCP-a u obliku su pločica, dok se kristali HAp-a javljaju u nekoliko oblika, primjerice cvijeta, rozete, pločice, sfere te pahuljice<sup>4,112</sup>. Na mikrografijama

prikazanim na slici 26. vidljivo je da su kristali HAp-a u obliku pločica, koje tvore nakupine u obliku cvijeta („pustinjske ruže“). Povećanjem udjela stroncija u uzorcima, veličina kristala se smanjuje. Dobiveni rezultati se podudaraju s onima Martiziaha i sur. te Boaninia i sur., koji su pokazali da smanjenje veličine kristala HAp-a i OCP-a upućuju na viši udio stroncija u uzorcima, budući da stroncij inhibira rast kristala HAp-a i OCP-a<sup>112,113</sup>.



**Slika 26.** Mikrografije mikrostrukture pripremljenih kalcijevih fosfata: a) CaP\_0Sr, b) CaP\_1Sr, c) CaP\_5Sr, d) CaP\_10Sr. Skala: 5 µm.

#### 4.2.4. Analiza kemijskog sastava sintetiziranih CaP prašaka pomoću metoda ICP-MS i TOC

Kemijski sastav uzoraka (Tablica 5) analiziran je ICP-MS metodom kojom su izračunati molarni udjeli supstitucije  $\text{Ca}^{2+}$  sa  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$  ionima. Udio molarne supstitucije fosfatne skupine,  $\text{PO}_4^{3-}$  s  $\text{CO}_3^{2-}$  skupinom određen je iz ukupne koncentracije ugljika određene pomoću TOC metode. Prisutnost elemenata u tragovima očekivana je u ne-supstituiranom uzorku,

CaP\_0Sr te u Sr-supstituiranim uzorcima, CaP\_1Sr, CaP\_5Sr, CaP\_10Sr. Prisutnost stroncija u nedopiranom uzorku (CaP\_0Sr) rezultat je sinteze iz biogenog izvora (sipine kosti), jer su prema istraživanju stroncij, natrij i magnezij izvorno prisutni u sipinoj kosti<sup>114</sup>. U uzorku CaP\_0Sr uz 0,49 mol% stroncija, prisutno je i 2,80 mol% natrija te 0,89 mol% magnezija. Zbog već prisutnih 0,49 mol% stroncija u CaP\_0Sr uzorku, udio Sr<sup>2+</sup> u Sr-supstituiranim CaP je veći od teoretski očekivanog dodavanjem Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Mg-supstituirani CaP sprječavaju osteoporozu, povećavaju gustoću kostiju te potiču proliferaciju i proizvodnju ALP-a, enzima odgovornog za proces mineralizacije<sup>65</sup>. Na-supstituirani CaP poboljšavaju osteoinduktivna svojstva i povećavaju toplinsku stabilnost. Na<sup>+</sup> ion je jednovalentan, za razliku od dvovalentnog Ca<sup>2+</sup> iona. Zbog toga, prema Paulingovim pravilima, mora doći do kompenzacije naboja kako bi se zadovoljila električka neutralnost<sup>51</sup>. Ona se postiže nastajanjem hidrogenfosfatne skupine, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Konačne pH vrijednosti nakon sinteze su 7,60 (CaP\_0Sr), 7,20 (CaP\_1Sr), 6,85 (CaP\_5Sr) i 6,40 (CaP\_10Sr). Vidljivo je da zbog pada pH vrijednosti i kompenzacije naboja HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> skupinom dolazi do precipitacije OCP faze.

Budući da se kao prekursor Ca<sup>2+</sup> iona koristio CaCO<sub>3</sub>, očekivana je supstitucija fosfatne skupine, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, karbonatnom skupinom CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, što je prethodno utvrđeno FTIR spektroskopijom. Molarni udjeli CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> skupine u kontroli i CaP uzorcima su podjednaki, dok s povećanjem udjela stroncija raste i udio CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> skupine u Sr-supstituiranim CaP, kao što je prethodno opisano u literaturi<sup>88</sup>. Osim iz korištenog prekursora, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ioni se mogu biti prisutni u reakcijskom mediju otapanjem CO<sub>2</sub> iz zraka kao što je dokazano u preliminarnim istraživanjima<sup>103</sup>. CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> skupina može supstituirati OH<sup>-</sup> skupinu (A-tip supstitucije) ili PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> skupinu (B-tip supstitucije). B-tip supstitucije je povoljniji kako bi se što bolje imitirala CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-supstitucija koja se odvija u prirodnom koštanom tkivu<sup>40</sup>. Ca/P omjer ne-supstituiranih i supstituiranih CaP razlikuje se od teoretskog omjera (1.67) zbog različitih faza CaP i koncentracija elemenata u tragovima. Zbog elemenata u tragovima koji su prisutni u biogenim izvorima, CaP sintetizirani iz biogenih izvora bolje su prihvaćeni u ljudskom tijelu, kao rezultat njihove fiziološke i kemijske sličnosti s mineralnom fazom ljudske kosti.<sup>4</sup>

**Tablica 5.** Kemijski sastav i Ca/P omjer uzoraka kontrole, ne-supstituiranog (CaP\_0Sr) i Sr-supstituiranih uzoraka (CaP\_1Sr, CaP\_5Sr, CaP\_10Sr).

	Kontrola	CaP_0Sr	CaP_1Sr	CaP_5Sr	CaP_10Sr
$Sr_{teo}(mol\%)$	-	-	1,0	5,0	10,0
$Sr_{exp}(mol\%)$	0,02	0,49	1,68	5,92	10,49
Na (mol%)	0,03	2,80	1,84	1,78	1,57
Mg (mol%)	0,86	0,89	0,79	0,66	0,45
$CO_3^{2-}$ (mol%)	7,00	7,93	4,53	11,24	14,75
Ca/P (mol/mol)	1,68	1,56	1,80	1,61	1,56

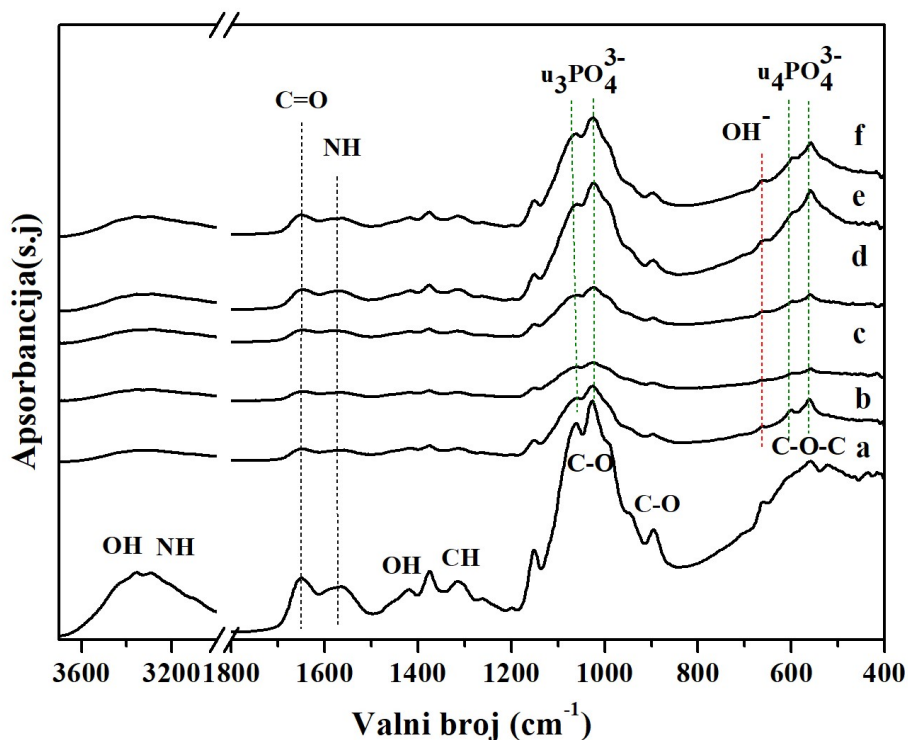
### 4.3. Karakterizacija kompozitnih poroznih 3D struktura

#### 4.3.1. Analiza kompozitnih uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama

Rezultati FTIR spektroskopije nosača na temelju kitozana (polimerna matrica) i Sr-supstituiranih CaP (anorganska faza) prikazani su na slici 27. Uzorak s dodatkom ne-supstituiranog, CaP\_0Sr, u kitozansku maticu označen je kao CHT/CaP\_0Sr, s dodatkom CaP supstituiranog s 1mol%  $Sr^{2+}$  iona CHT/CaP\_1Sr, 5mol%  $Sr^{2+}$  iona CHT/CaP\_5Sr i 10mol%  $Sr^{2+}$  iona CHT/CaP\_10Sr. Kao kontrolni materijali korišteni su: nosač kitozana bez dodane anorganske faze (CHT) i nosač kitozana s dodatkom CaP dobivenog iz sintetskog kalcita (CHT/CaP\_k).

Pripremljeni kompozitni materijali posjeduju karakteristične vrpce za kitozan uz vrpce koje pripadaju prisutnosti kalcij fosfatne faze: karakteristične fosfatne ( $PO_4^{3-}$ ) vrpce na  $564\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ),  $600\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) i  $1030\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) što ukazuje na postojanje hidroksiapatita kao anorganske komponente. Dodatno, karakteristična vrpca za  $OH^-$  skupinu koja se nalazi u kristalnoj rešetki HAp-a pojavljuje se na  $634\text{ cm}^{-1}$  <sup>103</sup>. Karakteristične vrpce za hidrogen fosfatnu skupinu ( $HPO_4^{2-}$ ) koje se nalaze u strukturi OCP i ACP faze nisu uočene. Razlog tomu je transformacija OCP i ACP faze u termodinamički stabilnije stanje HAp tijekom neutralizacije nosača u otopini NaOH/EtOH kako je prethodno opisano <sup>108,109,112</sup>.

Kitozan pokazuje karakteristične vrpce od 3665 do 3022  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju vrpcama karakterističnim za amino (NH) i hidroksilne (OH) skupine, vrpce na 2916  $\text{cm}^{-1}$  i 1334  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju CH vezi, dok su vrpce amidne skupine (CO-NH) na 1565  $\text{cm}^{-1}$ . Vrpca na 1419  $\text{cm}^{-1}$  odgovara OH vezi, dok područje valnih brojeva od 1066 do 893  $\text{cm}^{-1}$  odgovara C-O vezi prstena. Valna vrpca na 1654  $\text{cm}^{-1}$  karakteristična je za C=O vezu, a područje od 663 do 420  $\text{cm}^{-1}$  odgovara C-O-C vezi<sup>115,116</sup>.



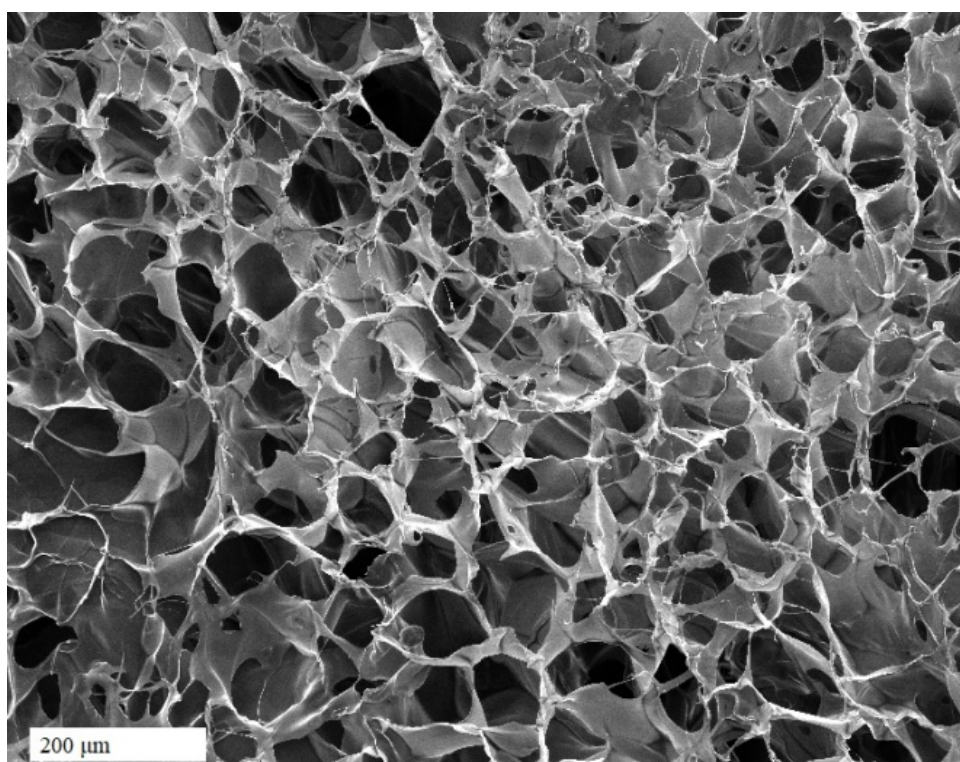
**Slika 27.** FTIR spektri sintetiziranih kompozitnih uzoraka: a) CHT, b) CHT/CaP\_k, c) CHT/CaP\_0Sr, d) CHT/CaP\_1Sr, e) CHT/CaP\_5Sr, f) CHT/CaP\_10Sr.

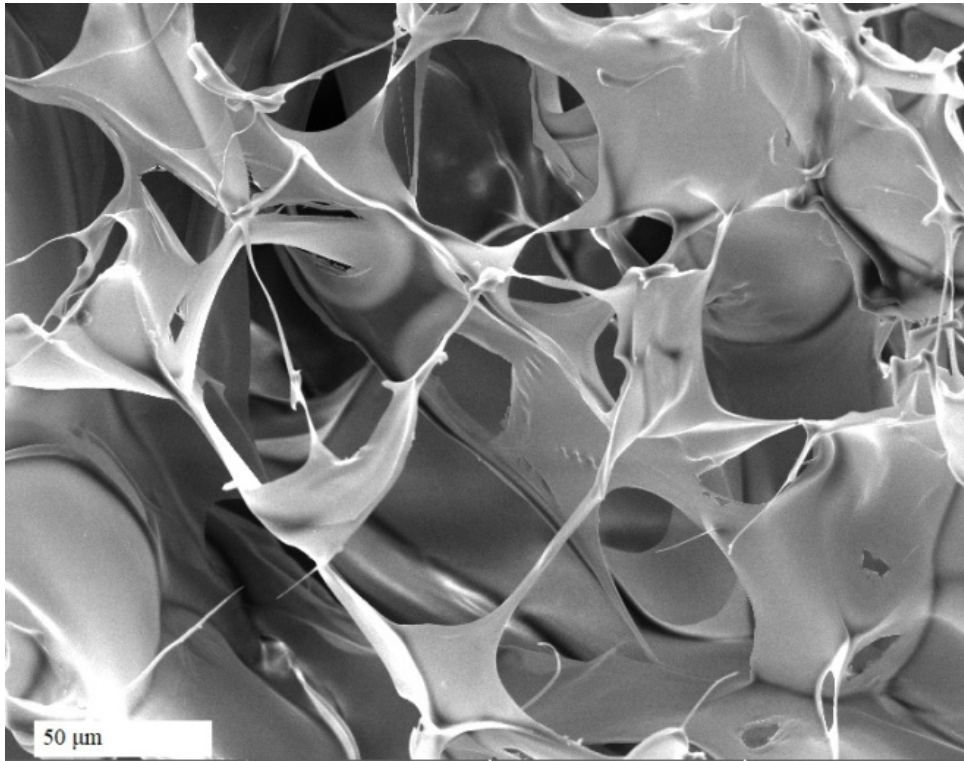
#### 4.3.2. Analiza mikrostrukture kompozitnih 3D uzoraka pretražnom elektronskom mikroskopijom

Organsko-anorganski kompozitni nosači nastali su umiješavanjem CaP u polimernu matricu kitozana. Slike 28-30 prikazuju morfologiju pripremljenih nosača kitozana i kalcijevih fosfata supstituiranih  $\text{Sr}^{2+}$  ionom analiziranih pretražnim elektronskim mikroskopom. Kao kontrolni uzorci korišteni su: nosač kitozana bez dodane anorganske faze (CHT) i nosač kitozana s dodatkom CaP dobivenog iz sintetskog kalcita (CHT/CaP\_k).

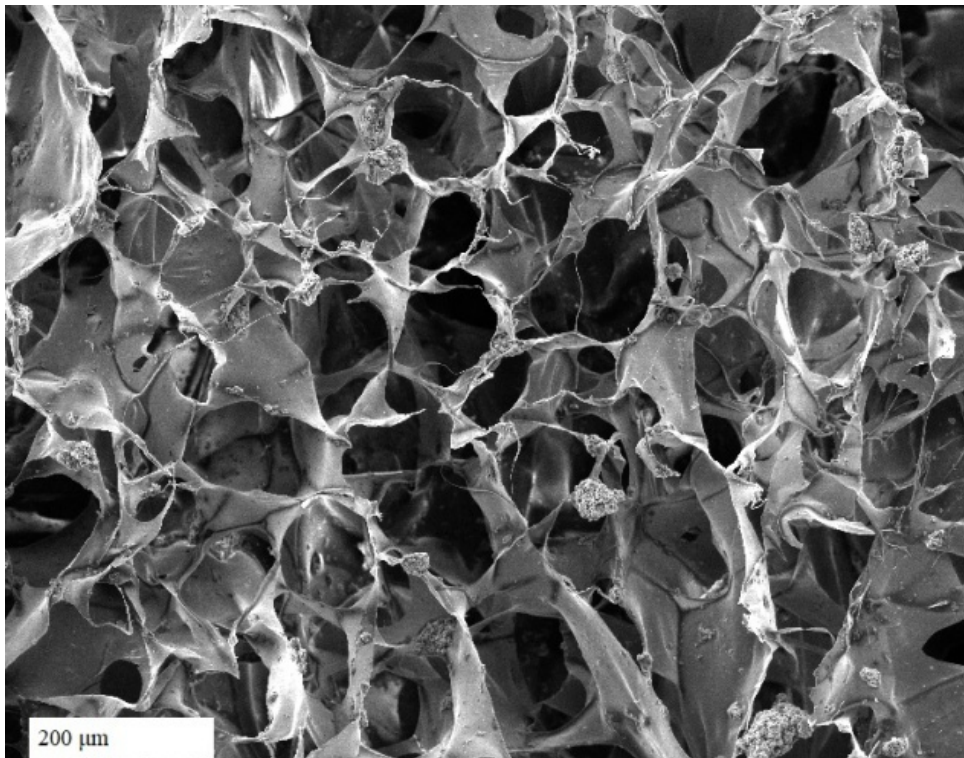


Nosač koji ne sadrži CaP u svojoj polimernoj matrici (Slika 28) pokazuje viskoporoznu strukturu, a pore su međusobno povezane kroz cijeli volumen uzorka. Veličina pora je u rasponu od 50-200  $\mu\text{m}$ . Viskoporozne strukture su bitne za bolji prijenos hranjivih tvari i kisika kroz nosač. Kompozitni uzorci zadržavaju viskoporoznu strukturu kao i kod čistog kitozana (slike 29-30). Kristali HAp-a homogeno su raspoređeni unutar polimerne matrice. Međutim, mogu se uočiti aglomerati kristala kroz uzorak veličine do 40  $\mu\text{m}$ . Daljnja istraživanja biti će usmjerena na pripremu poroznih nosača bez aglomeriranih kristala HAp-a. Razbijanje aglomerata provest će se tretiranjem kompozitnih suspenzija ultrazvučnom kupelji kroz određeni vremenski period.

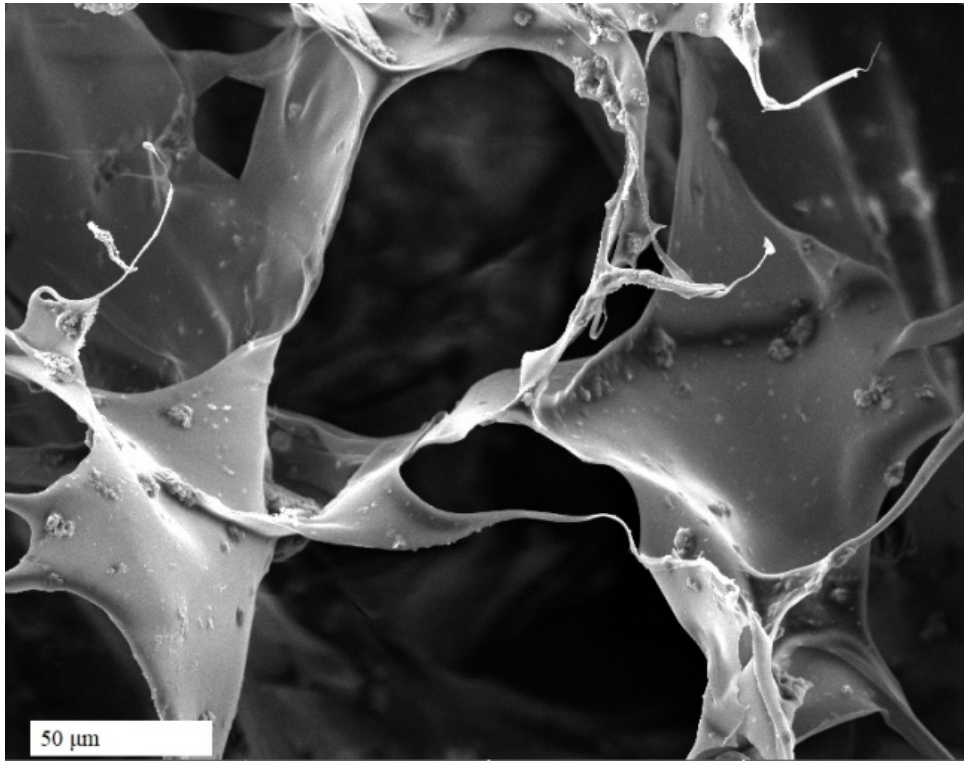




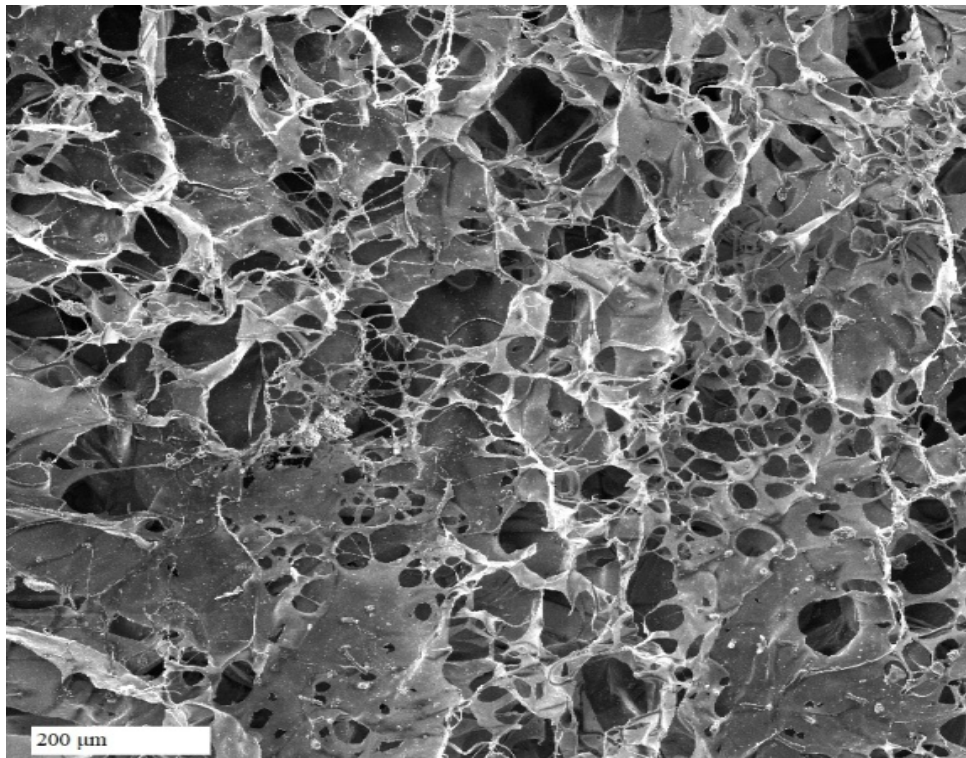
**Slika 28.** Morfologija 3D nosača kitozana (CHT). Skala: 200 i 50 μm.

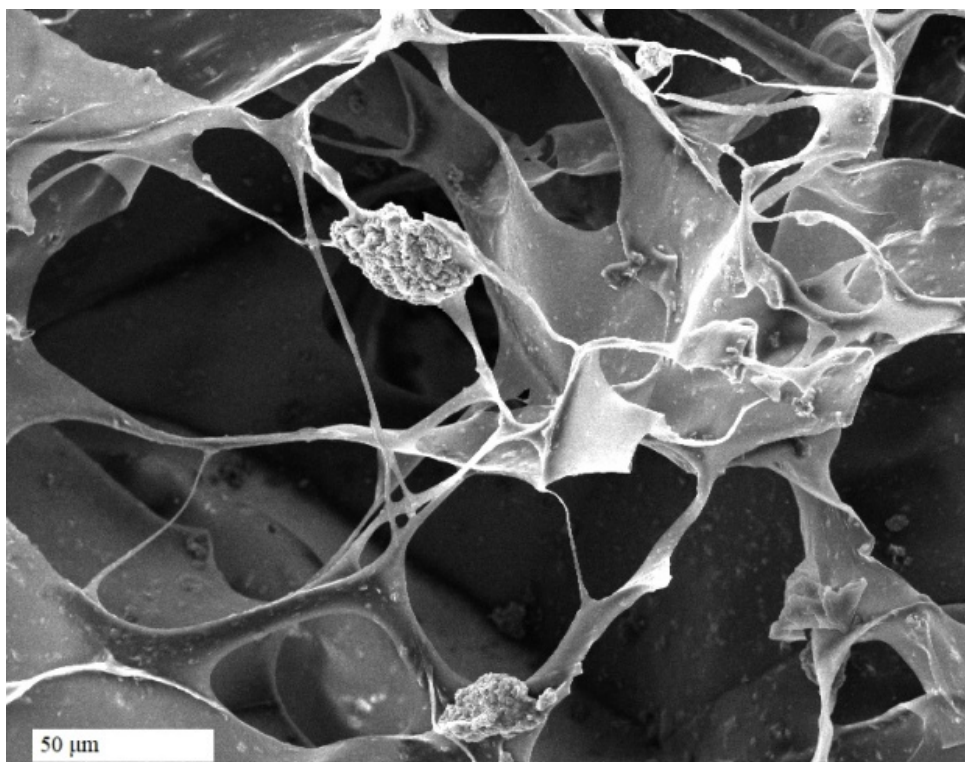






**Slika 29.** Morfologija 3D nosača CHT/CaP\_k. Skala: 200 i 50 μm.





**Slika 30.** Morfologija 3D nosača uzorka CHT/CaP\_10Sr. Skala: 200 i 50 μm.

## 5. ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je moguće sintetizirati višefazne i supstituirane kalcijeve fosfate iz biogenog izvora, metodom precipitacije pri blagim uvjetima u vodenom mediju. Najviše istraživani kalcijevi fosfati su apatit s manjkom kalcijeva iona (CDHA), oktakalcij fosfat (OCP) i amorfni kalcijev fosfat (ACP).

Prisutnost stroncijeva iona rezultira njegovom ugradnjom u kristalnu rešetku CDHA, OCP-a, ali i u kristalnu rešetku  $\beta$ -TCP-a, dobivenog žarenjem pripremljenih prašaka pri 1200 °C. Kako su sintetizirane faze kalcijeva fosfata topljivije u odnosu na stehiometrijski hidroksiapatit, moguće je od njih pripremiti resorbirajući materijal za biomedicinsku primjenu. Pripremljene su visokoporozne 3D biorazgradive kompozitne strukture od pripremljenih stroncijem supstituiranih kalcij-fosfatnih prašaka i kitozana kao polimerne matrice, što je vrlo važno za bolji prijenos hranjivih tvari i kisika kroz cijeli volumen nosača.

## 6. ZAHVALE

*Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću, našem mentoru na iskazanom povjerenju i prilici za rad na ovom projektu. Asistentici Antoniji Ressler zahvaljujemo na, nesebičnoj znanstvenoj pomoći tijekom izrade ovog rada, na mnogobrojnim savjetima i neiscrpnom strpljenju.*

*Također se zahvaljujemo asistentu Matiji Cvetniću za izvođenje karakterizacije određivanja elemenata u tragovima pomoću ICP-MS i TOC analize.*

*Zahvalne smo našim obiteljima na potpori, pomoći, razumijevanju i povjerenju koje nam je pruženo tijekom studiranja!*

## 7. LITERATURA

1. Macan, J., Profesionalne bolesti mišićno-koštanog sustava. *Sigur.* **49** (2007) 359–397.
2. Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala. *Kem. u Ind.* **54** (2005) 131–134.
3. Zavaglia, C. A. C., Prado da Silva, M. H., Reference Module in Materials Science and Materials Engineering: Feature Article: Biomaterials, 2016.
4. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biomater.* **9** (2013) 7591–7621.
5. Lafon, J. P., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$  ceramics with controlled composition. *J. Eur. Ceram. Soc.* **28** (2008) 139–147.
6. Bianco, A., Cacciotti, I., Lombardi, M., Montanaro, L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability. *Mater. Res. Bull.* **44** (2009) 345–354.
7. Birgani, Z. T., Malhotra, A., van Blitterswijk, C. A., Habibovic, P., Human mesenchymal stromal cells response to biomimetic octacalcium phosphate containing strontium. *J. Biomed. Mater. Res. A* **104** (2016) 1946–1960.
8. Ramesh, S., Loo, Z. Z., Tan, C. Y., Chew, W. J. K., Ching, Y. C., Tarlochan, F., Chandran, H., Krishnasamy, S., Bang, L. T., Sarhan, A. A. D., Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications. *Ceram. Int.* **44** (2018) 10525–10530.
9. Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, C. P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 641–678.
10. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biomater.* **9** (2013) 7591–7621.
11. Dallas, S. L., Prideaux, M., Bonewald, L. F., The osteocyte: An endocrine cell...and more. *Endocr. Rev.* **34** (2013) 658–690.
12. Hou, Y. C., Wu, C. C., Liao, M. T., Lu, C. L., Role of nutritional vitamin D in osteoporosis treatment. *Clin. Chim. Acta.* **484** (2018) 179–191.
13. Bhattarai, D. P., Aguilar, L. E., Park, C. H., Kim, C. S., A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering. *Membranes* **8** (2018) 1–24.

14. Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., Mequanint, K., Rizkalla, A. S., Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. *J. Funct. Biomater.* **3** (2012) 432–463.
15. [http://www.wikilectures.eu/index.php/Tissue\\_engineering\\_principle](http://www.wikilectures.eu/index.php/Tissue_engineering_principle). (pristup: 22.11.2018)
16. Langer, R., Vacanti, J. P., Tissue engineering. *Science* **14** (1993) 920–926.
17. Hasnain, M. S., Ahmad, S. A., Chaudhary, N., Hoda, M. N., Nayak, A. K., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering. *Appl. of Nanocomp. Math. in Orthop.* **95** (2019) 1-37.
18. Place, E. S., Evans, N. D., Stevens, M. M., Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* **8** (2009) 457–470.
19. Tverdokhlebov, S. I., Bolbasov, E. N., Shesterikov, E. V., Osteogenesis: Scaffold Materials Based on Fluorocarbon Composites Modified with RF Magnetron Sputtering, In Tech (2012) 84-115.
20. Bombaldi de Souza, R. F., Bombaldi de Souza, F. C., Rodrigues, C., Drouin, B., Popat, K. C., Montovani, D., Moraes, A. M., Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. *Mat. Sci. Eng.C.* **94** (2019) 364-375.
21. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J., Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier Inc, 2004.
22. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., Bohner, M., Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?. *Mater. Today* **19** (2016) 69–87.
23. Naga, S. M., El-Maghraby, H. F., Sayed, M., Saad, E. A., Highly porous scaffolds made of nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshells. *J. Ceram. Sci. Technol.* **6** (2015) 237–243.
24. Bohner, M., Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* **31** (2000) 37–47.
25. Dorozhkin, S. V., Calcium orthophosphates: applications in nature, biology, and medicine, Jenny Stanford Publishing, 2012.
26. Chow, C. L., Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent. Mater. J.* **28** (2009) 1–10.
27. Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* **25** (2004) 987–994.
28. Cheng, Y. T., Johnson, W. L. Disordered materials: A survey of amorphous solids.

- Science* **235** (1987) 997–1002.
29. Eanes, E. D., Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems, Amorphous Calcium Phosphate: Thermodynamic and Kinetic Considerations, Springer, Boston, 1998, 21-39.
  30. Weiner, S., Transient precursor strategy in mineral formation of bone. *Bone* **39** (2006) 431–433.
  31. Termine, J. D., Eanes, E. D., Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations. *Calcif. Tissue Res.* **10** (1972) 171–197.
  32. Christoffersen, J., Christoffersen, M. R., Kibalczyk, W., Andersen, F. A., A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates. *Cryst. Growth* **94** (1989) 767–777.
  33. Habraken W. J., Tao, J., Brylka, L. J., Friedrich, H., Bertinetti, L., Schenk, A. S., Verch, A., Dmitrovic, V., Bomans, P. H. H., Frederik, P. M., Laven, J., van der Schoot, P., Aichmayer, B., de With, G., DeYoreo, J. J., Sommerdijk, N. A., Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nat. Commun.* **4** (2013).
  34. Gao, Y., Weng, W., Cheng, K., Du, P., Shen, G., Han, G., Guan, B., Yan, W., Preparation, characterization and cytocompatibility of porous ACP/PLLA composites. *J Biomed. Mater. Res. A* **79** (2006) 193–200.
  35. Tadic, D., Peters, F., Epple, M., Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials* **23** (2002) 2553–2559.
  36. Elliot, J. C., Studies in Inorganic Chemistry: Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
  37. Suzuki, O., Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry. *Acta Biomater.* **6** (2010) 3379–3387.
  38. Brown, W. E., Smith, J. P., Lehr, J. R., Frazier, A. W., Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* **196** (1962) 1050–1055.
  39. Farid, S. B. H., Osteoinduction, osteoconduction, and osseointegration. *Bioceram. Mater. Sci. Eng.* (2018) 77–96.
  40. Boanini, E., Gazzano, M. Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.* **6** (2010) 1882–1894.
  41. Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S., Huang, J., Bioceramics: Past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* **28** (2008) 1319–1327.

42. LeGeros, R.Z., LeGeros, J. P., Dense Hydroxyapatite, u: Hench, L. L., Wilson, J., An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapur, 1993, 139–180.
43. Orlić, S., Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike. Doktorska disertacija, Zagreb (2012).
44. Yashima, M., Sakai, A., Takashi, K., Hoshikawa, A., Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate by neutron powder diffraction., *J. solid State Chem.* (2013) 272–277.
45. Matsunaga, K., Kubota, T., Toyoura, K., Nakamura, A., First-principles calculations of divalent substitution of  $\text{Ca}^{2+}$  in tricalcium phosphates. *Acta Biomater.* **23** (2015) 329–337.
46. Weinand, C., Pomerantseva, I., Neville, C. M., Gupta, R., Hydrogel- $\beta$ -TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone* **38** (2006) 555-563.
47. Kotani, S., Fujita, Y., Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, C., Ohtsuki, T., Kokubo, T., Bone bonding mechanism of  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J. Biomed. Mater. Res.* **25** (1991) 1303–1315.
48. Sanosh K. P., Chu, M. C., Balakrishnan, A., Kim, T. N., Cho, S., Sol-gel synthesis of pure nanosized  $\beta$ -tricalcium phosphate crystalline powders. *Curr. Appl. Phys.* **10** (2010) 68–71.
49. Bandyopadhyay, A., Bernard, S., Xiue, W., Bose, S. ,Calcium phosphate-based resorbable ceramics: influence of MgO, ZnO, and SiO<sub>2</sub> dopants., *J. Am. Ceram. Soc.* **89** (2006) 2675–2688.
50. LeGeros, R. Z., Li, X., Sogo, Y., Ito, A., Mutsuzaki, H., Ochiai, N., Kobayashi, T., Nakamura, S., Yamashita, K., The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. *Mater. Sci. Eng. C* **29** (2009) 969–975.
51. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M., Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 1009–1016.
52. El Feki, H., Ben Salah, A., Daoud, A., Lamure, A. Lacabanne, C., Studies by thermally stimulated current (TSC) of hydroxy- and fluoro-carbonated apatites containing sodium ions., *J. Phys. Condens. Matter* **12** (2000) 8331–8343.
53. Kannan, S., Ventura, J. M. G., Lemos, A. F., Barba, A. Ferreira, J. M. F. Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites and biphasic ceramics. *Ceram. Int.* **34** (2008) 7–13.
54. Zamani, A., Omrani, G. R., Nasab, M. M., Lithium's effect on bone mineral density. *Bone* **44** (2009) 331–334.



55. Wang, J., de Groot, K., van Blitterswijk, C., de Boer, J., Electrolytic deposition of lithium into calcium phosphate coatings. *Dent. Mater.* **25** (2009) 353–359.
56. Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., Klein, P. S., Activation of the wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action. *Dev. Biol.* **185** (1997) 82–91.
57. Kaygili, O., Synthesis and characterization of Fe-containing biphasic calcium phosphate ceramics. *J. Aust. Ceram. Soc.* **36** (2018) 7779–7785.
58. Crockett, R., Biochemical composition of the superficial layer of articular cartilage, *J. Biomed. Mater. Res. A* **67** (2017) 1180–1185.
59. Kim, T. N., Feng, Q. L., Kim, J. O., Wu, J., Wang, H., Chen, G. C., Cui, F. Z., Antimicrobial effects of metal ions (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9** (1998) 129–134.
60. Ewald, A., Hösel, D., Patel, S., Grover, L. M., Barralet J. E., Gbureck, U., Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity. *Acta Biomater.* **7** (2011) 4064–4070.
61. Iconaru, S. L., Ciobanu, C. S., Chifiriuc M. C., Costescu, A., Le Coustumer, P., Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomed Res. Int.* (2013) 1–10.
62. Filipović, I., Lipanović, S., Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1973.
63. Rude, R. K., Gruber, H. E., Wei, L. Y., Frausto, A., Kilburn, J., Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in the rat. *Bone* **37** (2005) 211–219.
64. Stendig-Lindberg, G., Koeller, W., Bauer, A., Rob, P. M., Experimentally induced prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat. *Eur. J. Intern. Med.* **15** (2004) 97–107.
65. Landi, E., Logroscino, G., Proietti, L., Tampieri, A., Sandri, M., Sprio, S., Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19** (2008) 239–247.
66. Tampieri, A., Celotti, G. C., Landi, E., Sandri, M., Magnesium doped hydroxyapatite: synthesis and characterization. *Key Eng. Mater.* **264–268** (2009) 2051–2054.
67. Bigi, A., Falini, G., Foresti, E., Gazzano, M., Rimponi. A., Roveri, N., Rietveld structure refinements of calcium hydroxylapatite containing magnesium. *Acta Crystallogr.* **52** (1996) 87-92.
68. Fadeev, I. V., Shvorneva, L. I., Barinov, S. M., Orlovskii, V. P. O., Synthesis and

- structure of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Inorg. Mat.* **39** (2003) 947–950.
69. Zyman, Z., Tkachenko, M., Epple, M., Polyakov, M., Naboka, M., Magnesium-substituted hydroxyapatite ceramics, *Materwiss. Werksttech.* **37** (2006) 474–477.
  70. Jiao, M. J., Wang, X. X., Electrolytic deposition of magnesium-substituted hydroxyapatite crystals on titanium substrate, *Mater. Lett.* **63** (2009) 2286–2289.
  71. Wei, S., Lu, J., Wei, J., Li, H., Jia, J., Guo, H., Xiao, T., Liu, C., Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22** (2011) 607–615.
  72. Tamm, T., Peld, M., Computational study of cation substitutions in apatites. *J. Solid State Chem.* **179** (2006) 1581–1587.
  73. Yamaguchi, M., Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol. Cell. Biochem.* **338** (2010) 241–254.
  74. Hadley, K. B., Newman, S. M., Hunt, J. R., Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats. *J. Nutr. Biochem.* **21** (2010) 297–303.
  75. Sutha, S., Karunakaran, G., Rajendran, V., Enhancement of antimicrobial and long-term biostability of the zinc-incorporated hydroxyapatite coated 316L stainless steel implant for biomedical application. *Ceram. Int.* **39** (2013) 5205–5212.
  76. Šupova, M., Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram. Int.* **41** (2015) 9203–9231.
  77. Chung, R. J., Hsieh, M., F., Huang, C. W., Perng, L. H., Wen, H. W., Chin, T. S., Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **76** (2006) 169–178.
  78. Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y., Formation and structure of zinc-substituted calcium Hydroxyapatite. *Mater. Res. Bul.* **40** (2005) 209–220.
  79. Tang, Y., Chappell, H. F., Dove, M. T., Reeder, R. J., Lee, Y. J., Zinc incorporation into hydroxylapatite, *Biomaterials* **30** (2009) 2864–2872.
  80. Kanzaki, N., Onuma, K., Treboux, G., Tsutsumi, S., Ito, A., Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face. *J. Phys. Chem. B* **104** (2002) 4189–4194.
  81. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M., Roveri, N., Inhibiting effect of zinc on hydroxyapatite crystallization. *Inorg. Biochem.* **58** (1995) 49–58.
  82. Blake, G. M., Živanović, M. A., McEwan, A. J., Ackery, D. M., Sr-89 therapy: Strontium kinetics in disseminated carcinoma of the prostate. *Eur. J. Nucl. Med.* **12**

- (1986) 447–454.
83. Marie, P. J., Ammann, P., Boivin, G., Rey, C., Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif. Tissue Int.* **69** (2001) 121–129.
  84. Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., Marie, P. J., The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell. *Bone* **18** (1996) 517–523.
  85. Xue, W., Moore, J. L., Hosick, H. L., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Lu, W. W., Cheung, K. M., Luk, K. D., Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **79** (2006) 804–814.
  86. Ammann, P., Strontium ranelate: A novel mode of action leading to renewed bone quality. *Osteoporos. Int.* **16** (2005) 11-15.
  87. Pors Nielsen, S., The biological role of strontium. *Bone* **35** (2004) 583-588.
  88. Li, Z. Y., Lam, W. M., Yang, C., Xu, B., Ni, G. X., Abbah, S. A., Cheung, K. M. C., Luk, K. D. K., Lu, W. W., Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* **28** (2007) 1452–1460.
  89. Jegou Saint-Jean, S., Camiré, C. L., Nevsten, P., Hansen, S., Ginebra, M. P., Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted  $\alpha$ -TCP cements. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16** (2005) 993–1001.
  90. Christoffersen, J., Christoffersen, M. R., Kolthoff, N., Bärenholdt, O., Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* **20** (1997) 47–54.
  91. Curran, D. J., Fleming, T. J., Towler, M. R., Hampshire, S., Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4** (2011) 2063–2073.
  92. Hasnain, M. S., Ahmad, S. A., Chaudhary, N., Hoda, M. N., Nayak, A. K., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering, Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics, Elsevier, Amsterdam, 2018.
  93. Tipton, A. J., Middleton, J. C., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* **21** (2000) 2335–2346.
  94. Guanatillake, P. A., Adhikari, R., Biodegradable syntethic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* **5** (2003) 1–16.
  95. Colwell, J. M., Synthesis of polycaprolactone polymers for bone tissue repair, Doktorska disertacija, Universite Montpellier II, 2004.
  96. Hasnain, M. S., Nayak, A. K., Singh, R., Ahmad, F., Emerging trends of natural-based

- polymeric systems for drug delivery in tissue engineering applications. *Sci. J.* **1** (2010) 1–13
97. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chitin> (pristup 22.03.2019.)
  98. Sharma, C. P., Willi, P., Pillai, C. K. S., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fibre formation, *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 641–678.
  99. Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **49** (2013) 780–792 .
  100. Veselinović, L., Karanović, Lj., Stojanović, Z., S., Bračko, I., Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing. *J. Appl. Crystallogr.* **43** (2010) 320–327.
  101. Espanol, M., Portillo, J., Manero, J. M., Ginebra, M. P., Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of  $\alpha$ -tricalcium phosphate by transmission electron microscopy. *Cryst. Eng. Comm.* **12** (2010) 3318–3326.
  102. Strømme, K. O., On the crystal structures of the high-temperature forms of strontium and barium carbonate and structurally related compounds. *Acta Chem. Scand.* **29a** (1975) 105–110.
  103. Moreira, M. P., de Almeida Soares, D., Dentzer, J., Anselme, K., de Sena, L. Á., Kuznetsov, A., dos Santos, E. A., Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium. *Mater. Sci. Eng. C* **61** (2016) 736–743.
  104. Dorozhkin, S. V., Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* **8** (2012) 963–977.
  105. Ebrahimi, M., Botelho, M. G., Dorozhkin, S. V., Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research, *Mater. Sci. Eng. C* **71** (2017) 1293–1312.
  106. Krajewski, A., Ravaglioli, A., Bioceramics and biological glasses, u: Barbutti, R., Integrated Biomaterials Science, Springer, 2005., 189–254.
  107. Terra, J., Dourado, E. R., Eon, J. G., Ellis, D. E., Gonzalez, G., Malta Rossi, A., The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (2008) 568–577.
  108. Sji, H., He, F., Ye, J., Synthesis and structure of iron- and strontium-substituted octacalcium phosphate: effects of ionic charge and radius. *J. Mater. Chem. B* **9** (2016). 1712–1719.

109. Gibson, I. R., Bonfield, W., Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **59** (2002) 697–708.
110. Dorozhkin, S. V., Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* **6** (2010) 4457–4475.
111. Matsunaga, K., Murata, H., Strontium substitution in bioactive calcium phosphates: A first-principles study. *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 3584–3589.
112. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.* **6** (2010) 1882–1894.
113. Mardziah, C. M., Sopyan, I., Ramesh, S., Strontium-doped hydroxyapatite nanopowder via sol-gel method: Effect of strontium concentration and calcination temperature on phase behavior. *Trends Biomater. Artif. Organs* **23** (2009) 105–113.
114. Hewit, R. A., Analysis of aragonite from the cuttlefish of *Sepia Officinalis*. *Mar. Geol.* **18** (1975) 1–5.
115. Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **33** (2013) 4539–4544.
116. Wei, G., Ma, P. X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25** (2004) 4749–4757.

## 8. SAŽETAK

Sinteza metalnim ionima supstituirane kalcij fosfatne biokeramike u polimernoj matrici kitozana za biomedicinsku primjenu

Gudelj Ana, Zadro Karla

Kalcijevi fosfati skupina su spojeva koji se koriste kao materijali u inženjerstvu koštanog tkiva koje za cilj ima pripremiti optimalan materijal koji odgovara svim traženim uvjetima, odnosno materijal koji je kemijski i strukturno najbliži prirodnom koštanom tkivu. Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je nastajanje kalcijevog oksida dobivenog iz biogenog izvora, sipe kosti, iz kojeg je zatim sintetiziran kalcij fosfatni sustav. Nakon utvrđivanja najpovoljnijeg prekursora  $\text{Ca}^{2+}$  iona, kalcijevi fosfati (CaP) supstituirani stroncijevim ionima (0, 1, 5 i 10 mol%) pripremljeni su metodom taloženja, a kao prekursor kalcijeva iona korišten je kalcit dobiven iz biogenog izvora (sipina kost). Sastav dobivenih uzoraka utvrđen je rendgenskom difrakcijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama. Rezultati rendgenske difrakcijske analize dodatno su obrađeni pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. Kemijski sastav određen je pomoću masene spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom, a morfologija kristala proučavana je pretražnim elektronskim mikroskopom. Uzorci su toplinski obrađeni pri 1200 °C kako bi se utvrdila njihova toplinska stabilnost. Pripremljeni CaP sastoje se od hidroksiapatita (HAp), oktakalcijevog fosfata pentahidrata (OCP) i amornog kalcijevog fosfata (ACP), a toplinski obrađeni uzorci od  $\beta$ -trikalcijskog fosfata ( $\beta$ -TCP) i ACP-a. Uz supstituciju  $\text{Ca}^{2+}$  sa  $\text{Sr}^{2+}$  ionima, dolazi i do supstitucije s  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima kao rezultat korištenja biogenog izvora. Povećanjem udjela stroncija dolazi do povećanja parametara jedinične ćelije u dobivenim CaP zbog supstitucije ionom većeg ionskog radijusa. Stroncij se u HAp-u nalazi na Ca1 poziciji, u OCP na Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8 pozicijama, a u  $\beta$ -TCP-u na Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4 pozicijama. Dobiveni uzorci umiješani su u kitozan (CHT), biopolimer koji se koristi u koštanom inženjerstvu. CHT zamjenjuje nosač, odnosno organski dio prirodnog koštanog tkiva, dok su CaP anorganski dio. Nakon umiješavanja strukture su zamrznute, neutralizirane te liofilizirane. Za određivanje sastava dobivenih spužvi snimljen je FTIR, a morfologija je promatrana pretražnim elektronskim mikroskopom.

**Ključne riječi:** kalcijev fosfat, biogeni izvor, stroncij, supstitucija, kitozan

## 9. SUMMARY

Synthesis of calcium phosphate bioceramic substituted with metal ions in chitosan matrix for biomedical applications

Gudelj Ana, Zadro Karla

Calcium phosphates (CaPs) are used as inorganic compounds in materials for bone tissue engineering. The main goal is to synthesize a material (scaffold) that is chemically and structurally similar to natural bony tissue. Calcium oxide synthesized from biogenic source, cuttlefish bone, was obtained in preliminary research and therefore cuttlefish bone was used to synthesize calcium phosphate system. After the most suitable precursor of  $\text{Ca}^{2+}$  ions was determined, strontium substituted CaPs (0, 1, 5, and 10 mol%) were prepared by wet precipitation method. Calcite was obtained from biogenic source (cuttlefish bone) and was used as a precursor of calcium ion. Composition of prepared samples was determined by X-ray diffraction (XRD) analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy. Results of XRD analysis were additionally processed by computer software DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. Chemical composition was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), while crystal morphology was observed with a scanning electron microscope (SEM). Samples were heat treated at  $1200^{\circ}\text{C}$  to determine thermal stability. Prepared CaPs are composed of hydroxyapatite (HAp), octacalcium phosphate pentahydrate (OCP) and amorphous calcium phosphate (ACP), while heat treated samples of  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and ACP. Along with substitution of  $\text{Ca}^{2+}$  with  $\text{Sr}^{2+}$  ions, substitution with  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  ions occurred, as a result of using biogenic source. Along with Sr-substitution level, lattice parameters increase in as-prepared CaPs, due to larger ionic radius of substituted  $\text{Sr}^{2+}$  ion. The  $\text{Sr}^{2+}$  ion occupies Ca1 site in HAp, sites Ca3, Ca4, Ca7, Ca8 in OCP and Ca1, Ca2, Ca3, Ca4 sites in  $\beta$ -TCP. The obtained powders were dispersed into chitosan (CHT) matrix, biopolymer often used in bone tissue engineering. CHT replaces bone scaffold, organic part of natural bone tissue, while CaP is an inorganic part. Obtained organic-inorganic suspensions were frozen, neutralized and lyophilized. Scaffolds were analysed by FTIR to determine the composition, and morphology was observed by scanning electron microscopy.

**Keywords:** calcium phosphate, biogenic source, strontium, substitution, chitosan

## 10. ŽIVOTOPIS

Ana Gudelj rođena je 26.10.1996. godine u Zagrebu, gdje je završila Osnovnu školu Jure Kaštelana. 2011. godine upisala je VII. Gimnaziju u Zagrebu. Maturirala je 2015. godine te zatim upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala. Diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala upisala je 2018. godine, također na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2019. godine sudjeluje s usmenim izlaganjem na projektnoj HaTEA radionici (*engl.* Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering Applications) s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata dobivenih iz biogenih izvora“. Na Prvom studentskom kongresu o inženjerstvu materijala (e-SKIM) osvaja prvo mjesto za usmeno izlaganje s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata“, te drugo mjesto za postersko izlaganje.

Karla Zadro rođena je 12.01.1996. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Ljudevita Gaja završila je u Zaprešiću. Nakon završene osnovne škole upisala je XVI. Gimnaziju u Zagrebu i maturirala 2014. godine, te potom upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. 2018. godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo, također na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2019. godine sudjeluje s usmenim izlaganjem na projektnoj HaTEA radionici (*engl.* Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering Applications) s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata dobivenih iz biogenih izvora“. Na Prvom studentskom kongresu o inženjerstvu materijala (e-SKIM) osvaja prvo mjesto za usmeno izlaganje s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata“, te drugo mjesto za postersko izlaganje. Od 2018. godine radi kao student u Plivi.