

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Danijela Ivandić
Marina Monika Marić

**Priprema biomimetičke okosnice na temelju metalnim ionima
supstituiranog oktakalcij fosfata pentahidrata i biopolimera za primjene u
tkivnom inženjerstvu**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je izrađen pod vodstvom dr. sc. Antonie Ressler i predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA:

T – temperatura (°C)

mas. – maseni udio (%)

mol. – molarni udio (%)

at. – atomski udio (%)

M_w – maseni prosjek molekulskih masa

θ – kut loma (°)

DD - stupanj deacetilacije

CaP – kalcijev fosfat

HAp – hidroksiapatit

ACP – amorfni kalcijev fosfat

DCP – dikalcijev fosfat

OCP – oktakalcijev fosfat pentahidrat

α -TCP – α -trikalcijev fosfat

β -TCP – β -trikalcijev fosfat

CHAp – karbonatni hidroksiapatit s manjkom kalcijevih iona

DCPD – brušit

CHT – kitozan

C-CHT – karboksimetil kitozan

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

XRD – rendgenska difrakcijska analiza

SEM – pretražna elektronska mikroskopija

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNA - ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. PRIRODNO KOŠTANO TKIVO.....	3
2.2. INŽENJERSTVO TKIVA.....	4
2.2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	5
2.2.1.1. Biomimetički pristup izrade okosnice.....	6
2.3. HIDROKSIAPATIT U PRIRODNOM KOŠTANOM TKIVU.....	6
2.3.1. Amorfni kalcijev fosfat.....	7
2.3.2. Oktakalcij fosfat pentahidrat.....	7
2.3.3. Hidroksiapatit.....	8
2.3.4. OCP vs. HAp <i>in vivo</i>	11
2.4. IONSKE SUPSTITUCIJE.....	11
2.4.1. Supstitucija stroncijem.....	12
2.4.2. Supstitucija magnezijem.....	14
2.4.3. Supstitucija srebrom.....	15
2.4.4. Supstitucija cinkom.....	16
2.4.5. Supstitucija željezom.....	16
2.4.6. Supstitucija alkalijskim metalima.....	17
2.5. BIOPOLIMER KITOZAN KAO ZAMJENA ZA KOLAGEN.....	18
2.5.1. Karboksimetil kitozan.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. MATERIJALI.....	21
3.2. SINTEZE UZORAKA.....	22
3.2.1. Sinteza praškastog oktakalcij fosfata supstituiranog metalnim ionima.....	22
3.2.2. Sinteza okosnica na temelju karboksimetil kitozana.....	23
3.2.3. Priprava kompozitnih okosnica.....	23
3.3. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA.....	24
3.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza.....	24

3.3.2. Rietveldova metoda utočnjavanja.....	24
3.3.3. Mjerenje pH reakcijskih otopina	25
3.3.4. Pretražna elektronska mikroskopija.....	25
3.3.5. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama.....	25
3.3.6. Antibakterijska svojstva	25
3.3.7. Poroznost i distribucija pora kompozitnih uzoraka	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. ANORGANSKA FAZA	27
4.1.1. Rendgenska difrakcijska analiza	27
4.1.2. Pretražna elektronska mikroskopija.....	31
4.1.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama.....	33
4.1.4. Antibakterijska svojstva	35
4.2. ORGANSKA FAZA.....	36
4.2.1. Mikrostruktura visokoporoznih okosnica	36
4.2.2. Distribucija pora	39
4.2.3. Poroznost.....	40
4.3. KOMPOZITNE OKOSNICE	40
4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama.....	40
4.3.2. Mikrostruktura visokoporoznih kompozitnih okosnica	41
4.3.3. Distribucija pora	43
4.3.4. Poroznost.....	44
5. ZAKLJUČAK.....	45
6. ZAHVALE	46
7. LITERATURA	47
8. SAŽETAK	57
9. SUMMARY	58
10. ŽIVOTOPIS.....	59

1. UVOD

Bolesti i oštećenja koštanog tkiva predstavljaju jedan od globalnih problema u medicini. Učestalost koštanih oštećenja u Europi raste za ~28% godišnje, no iako su proteklih godina predložene razne metode liječenja koštanih bolesti i oštećenja, razvoj biomaterijala za regeneraciju koštanog tkiva i dalje predstavljaju veliki izazov.^{1,2} Jedan od tradicionalnih načina liječenja prijeloma koštanog tkiva je korištenje metalnih okosnica kao što su proteze, pločice i vijci koji pružaju potrebnu mehaničku i strukturnu podršku, međutim mogu uzrokovati imunološki odgovor ljudskog organizma i zamor materijala. Dodatno, upotrebom metalnih okosnica nije moguće ostvariti potrebne interakcije s okolnim tkivom te nemaju mogućnost biorazgradnje *in vivo*.³ Upravo iz tih razloga, u posljednjih 20 godina povećan je interes za istraživanjem novih biomaterijala za regeneraciju koštanog tkiva.¹

U novije vrijeme izbjegava se korištenje metala za pripremu materijala za regeneraciju koštanog tkiva, te se sve više koriste biokompatibilni materijali koji ne oštećuju biološku okolinu tijekom primjene u ljudskom organizmu. Među njih ubrajamo bioaktivne materijale kao što su biorazgradivi polimeri, bioresorbirajuća keramika, te njihovi kompoziti. Biomaterijali se odlikuju svojstvima koja omogućuju zamjenu dijelova i funkcija ljudskog organizma čime se unaprjeđuje kvaliteta života. Svojstvo bioaktivnosti potiče specifični odgovor organizma uslijed kontakta biomaterijala s tjelesnom tekućinom što rezultira stvaranjem veze s okolnim tkivom. Mogućnost kontrolirane biorazgradnje polimera, odnosno bioresorpcije keramike u tjelesnoj tekućini omogućuje postupno zamjenjivanje okosnice obnovljenim tkivom. Ispreplitanje spomenutih svojstava čini tzv. treću generaciju biomaterijala koja je osmišljena s ciljem da potiče stanični odgovor na molekularnoj razini i tako aktivira gene koji pomažu obnovi ljudskog tkiva. Multidisciplinarno područje koje se orijentira k razvoju i istraživanju spomenutih biomaterijala naziva se inženjerstvo koštanog tkiva.⁴

Inženjerstvo koštanog tkiva ujedinjuje više znanstvenih disciplina kao što su kemija, biologija, medicina, inženjerstvo materijala, analiza tržišta i transfera tehnologije u industriju. Usmjereno je na rješavanje problema dugotrajnih popravaka i zamjene oštećenog tkiva, te nudi razne mogućnosti u području regenerativne medicine. Od početka upotrebe okosnica, biomaterijala trodimenzijskih struktura u kojima se uzgajaju koštane stanice, inženjerstvo koštanog tkiva je napredovalo, a novija istraživanja usredotočila su se na biomimetički pristup njihove izrade.⁵ Cilj je zadovoljiti molekularnu, strukturnu i biološku kompatibilnost, a pritom

sačuvati sličnosti prirodnom koštanom tkivu kako bi se ostvario pozitivan regenerativni odgovor organizma.⁶

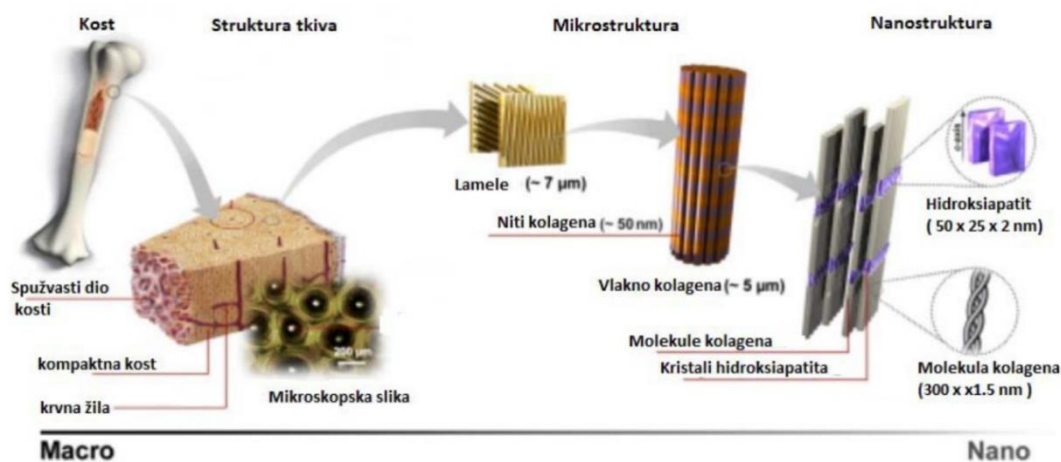
Kalcijevi fosfati (CaP) su biomaterijali koji se koriste u raznim koštanim okosnicama u svrhu unaprjeđenja osteogenih svojstava sintetskih materijala, te za poboljšanje samog procesa regeneracije koštanog tkiva.⁷ Najčešće korišteni CaP materijali su hidroksiapatit (HAp), α -trikalcij fosfat (α -TCP), β -trikalcij fosfat (β -TCP), brušit (DCPD) i oktakalcij fosfat pentahidrat (OCP).⁸ U skladu s biomimetičkim pristupom, gdje je cilj pripremiti kompozitne okosnice čiji sastav i struktura odgovaraju ljudskom koštanom tkivu, CaP imaju funkciju zamjene apatita odnosno anorganske faze, dok se organska faza (kolagen tipa I) zamjenjuje biorazgradivim polimerima prirodnog ili sintetskog podrijetla.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRIRODNO KOŠTANO TKIVO

Kost je mineralno vezivno tkivo koje se sastoji od ~70% anorganske tvari, ~20% organske tvari, dok ostatak čini voda. Najprisutnija anorganska tvar je hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), dok ~90% organske tvari čini kolagen.⁹ Preostalu organsku fazu čine proteini kao što su fosfoproteini, glikoproteini i proteoglikani.¹⁰ Struktura prirodnog karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijevih iona (CHAp, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$) slična je strukturi stehiometrijskog HAp-a. Iako imaju sličnu strukturu, HAp i CHAp razlikuju se u kemijskom sastavu.¹¹ Karbonati zamjenjuju hidroksidne (OH^-) i fosfatne (PO_4^{3-}) ione, dok ioni natrija (Na^+), kalija (K^+), magnezija (Mg^{2+}) i stroncija (Sr^{2+}) zamjenjuju kalcijeve (Ca^{2+}) ione u strukturi HAp-a prilikom čega nastaje CHAp.¹²

Kompaktna kost naziv je za vanjski dio kosti. Glatke je i čvrste strukture te okružuje porozan spužvasti dio kosti u kojem se nalaze krvne žile i živci. Vanjski dio kosti, isto kao i unutarnji, ispunjen je osteonima sastavljenih od lamela koje sadržavaju niti kolagena, između kojih se nalaze nanokristali CHAp-a.^{11,13} Međutim, za razliku od kompaktne kosti, lamele u spužvastom dijelu nalaze se u skupinama. Lamele pojedine skupine iste su orijentacije, ali ujedno i različite od druge skupine.¹⁴ Isto tako veliki utjecaj na mehanička svojstva kosti ima poroznost.¹⁵ Prosječna poroznost spužvastog dijela kosti znatno je veća (~80 %) u odnosu na vanjski dio što znači da ima veću specifičnu površinu, a samim time i veću površinu za remodeliranje.¹⁶ Na slici 1 prikazana je struktura kosti, od makrometarske do nanometarske razine.¹¹



Slika 1. Struktura kosti pri različitim uvećanjima (preuzeto uz dopuštenje Elseviera).¹¹

Osim što kost prolazi proces remodeliranja kroz stalno nastajanje i resorpciju kosti, isto tako ima važnu ulogu poput potpore, zaštite mekih tkiva te pohrane kalcija i fosfata u tijelu. Osnovne stanice u prirodnom koštanom tkivu su osteoblasti, osteoklasti i osteociti, koji su regulirani mehaničkim silama, hormonima te lokalnim čimbenicima. Osim što su osteoblasti uključeni u proces rasta kostiju, također sudjeluju u sintezi i mineralizaciji izvanstanične matrice proizvodnjom proteina, osteoida. Osteoklasti su stanice sastavljene od više različitih jezgri stanica koje sudjeluju u procesu resorpcije oslobađanjem kiselina i enzima potrebnih za otapanje minerala u kostima. Također imaju važnu ulogu prilikom okoštavanja ozlijeđene kosti tako što tvore nove puteve za živce i krvne žile. Najzastupljenije stanice u koštanom tkivu su osteociti. Iako se nalaze u mineraliziranom osteoidu kao neaktivne stanice, osteociti imaju ključnu ulogu u određivanju i održavanju strukture kostiju.¹⁷ Koštano tkivo ima sposobnost regeneracije, ali prilikom značajnih prijeloma ili oštećenja kostiju, taj proces je bezuspješan.¹⁸ Oštećenje kostiju je česta pojava kod ljudi nakon udarca visoke energije, kod određenih traumatičnih nezgoda ili razvoja bolesti. Veličina oštećenja utječe na način liječenja te je najprije potrebno odrediti radi li se o oštećenju kritične veličine. Oštećenja veličine > 1–2 cm nemaju mogućnost spontanog zacjeljivanja unatoč kirurškoj stabilizaciji i zahtijevaju daljnju kiruršku obradu.^{19,20}

2.2. INŽENJERSTVO TKIVA

Gubitak ili zatajenje organa i tkiva jedan je od najčešćih problema u zdravstvenoj skrbi. Iako je transplantacija organa jedno od rješenja, nerijetko je ograničena nedostatkom donora.²¹ Stoga je potrebno razviti materijale kao zamjene za organe i tkiva koji bi pomogli u procesu obnove i povećanja funkcije oštećenog dijela, što je glavna zadaća inženjerstva tkiva.²² Faktori rasta (engl. *growth factors*) imaju ključnu ulogu u tkivnom inženjerstvu jer pospješuju staničnu proliferaciju i morfogenezu tijekom razvoja i zacjeljivanja tkiva. Isto tako, poroznost okosnice ima važnu ulogu kako bi se omogućio rast i migracija stanica te difuzija hranjivih tvari kroz cijeli volumen okosnice.^{23,24}

Pristup inženjerstva tkiva korišten je u procesima presađivanja kože, obnove hrskavice, kosti i malih arterija kod pacijenata. Međutim, iako su stvoreni u laboratorijima, veći organi pripremljeni poput srca, pluća i jetre još nisu korišteni kod pacijenata.²⁵ Svrha inženjerstva tkiva je uspostaviti novu tehnologiju koja omogućuje olakšano liječenje bolesti u odnosu na postojeće metode.²³

2.2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Augmentacija ili ugradnja okosnice proces je koji omogućuje stvaranje kosti na mjestu gdje ona nedostaje, a moguća je zbog svojstva koštanog tkiva da se obnovi ako mu se omogući prostor u koji će ono rasti. Kako koštano tkivo raste, ono zamjenjuje usađeni biomaterijal i potpuno se povezuje s okolnom kosti. Osim osiguranog prostora za rast koštanog tkiva, potrebno je stvoriti zadovoljavajuće uvjete za regeneraciju kosti. Regeneracija kosti korištenjem koštane okosnice uključuje tri procesa: osteokondukciju, osteogenezu i osteoindukciju.²⁶ Osteokondukcija je proces u kojem koštana okosnica ima funkciju nosača za novonastalu kost, odnosno osteoblasti s ruba oštećenja ju koriste kao model za širenje i stvaranje nove kosti.²⁷ Osteogeneza je proces kojim osteoblasti iz koštane okosnice doprinose formiranju nove kosti, a osteoindukcijom okosnica potiče stanice na diferencijaciju u osteoblaste.²⁸ U osnovi, svaki materijal za koštanu regeneraciju trebao bi biti osteokonduktivan, a okosnica koju karakterizira osteokonduktivno i osteoinduktivno svojstvo ne služi samo kao model i potpora za postojeće osteoblaste, već potiče stvaranje novih osteoblasta i bržu integraciju same koštane okosnice.²⁶

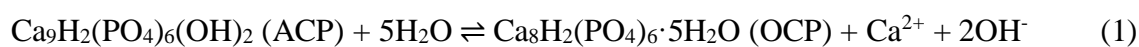
Koštane okosnice mogu biti temeljene na autolognom, alogenom, ksenogenom i aloplastičnom materijalu. Autologna okosnica sadržava vlastitu kost pacijenta, odnosno koštano tkivo iste osobe koja prima okosnicu, a smatra se zlatnim standardom u koštanoj augmentaciji jer je rizik od odbacivanja minimalan, te posjeduje izvrsnu kombinaciju osteogenih, osteoinduktivnih i osteokonduktivnih svojstava. Nedostatak autolognog materijala je ograničena zaliha te potreba za dodatnim kirurškim zahvatom i uzimanjem koštanog tkiva s drugog mjesta u tijelu pacijenata, što može prouzročiti potencijalno mjesto za komplikacije. Alogeni materijali također je ljudskog podrijetla, ali je riječ o koštanom tkivu druge osobe odnosno donora. Upotreba alogenog materijala zahtijeva sterilizaciju i deaktivaciju proteina koji se nalaze u zdravoj kosti čime se uklanjaju faktori rasta, proteini i drugi bioaktivni materijali potrebni za uspješnu regeneraciju. Ksenogeni materijali su životinjskog podrijetla, biokompatibilni su i posjeduju veća osteokonduktivna svojstva od sintetskih materijala.²⁹ Ksenogena okosnica mora dodatno proći kroz proces toplinske sterilizacije kako bi se uklonili potencijalni prenosioci bolesti sa životinjskog na ljudski organizam.^{30,31} Konačno, aloplastične koštane okosnice su sintetski materijali koji se mogu izraditi od CaP ili bioaktivnog stakla. Oni su biološki aktivni i biokompatibilni, a prednost aloplastičnih materijala je što ne sadržavaju ljudsko ili životinjsko tkivo, stoga ne postoji problem ograničenih zaliha.²⁶

2.2.1.1. Biomimetički pristup izrade okosnice

U inženjerstvu koštanog tkiva, biomaterijali se mogu koristiti kao privremene okosnice koje imaju specifičnu građu i potporu za rast i razvoj kostiju.³² Idealne okosnice za koštanu obnovu temelje se na biomimetičkom pristupu, odnosno posjeduju slična svojstva prirodnom koštanom tkivu. Okosnica mora biti biokompatibilna i ne smije biti toksična te mora imati mogućnost bioresorpcije i/ili biorazgradnje kako bi bilo moguće istovremeno stvaranje koštanog tkiva i razgradnja okosnice. Produkti degradacije ne smiju biti toksični, te moraju imati mogućnost izlučivanja bez zaostajanja u drugim organima.³³ Dodatno, okosnica mora biti bioaktivna, odnosno mora imati sposobnost stvaranja veze s okolnim tkivom.³⁴ Okosnice trebaju imati visokoporoznu strukturu, otvorenih i međusobno povezanih pora kako bi se omogućila migracija stanica, difuzija hranjivih tvari i metaboličkog otpada.³⁵ Optimalna veličina pora za koštanu regeneraciju je u rasponu od 200 do 500 μm , a poroznost u rasponu od 50 do 90%.^{29,36} Mehanička svojstva okosnice poput modula elastičnosti, vlačne čvrstoće, žilavosti i zamora, smatraju se ključnim za regeneraciju koštanog tkiva, a potrebno ih je prilagoditi mjestu koštanog oštećenja.³⁷ Cijeli proces pripreme i proizvodnje biomimetičke okosnice mora biti jednostavan kako bi se mogao reproducirati na industrijskoj razini, a potom biti ekonomski isplativ.³⁸

2.3. HIDROKSIAPATIT U PRIRODNOM KOŠTANOM TKIVU

Iako nije u potpunosti dokazano i potvrđeno, generalno je prihvaćena teorija da prilikom nastajanja apatita *in vivo* prvo dolazi do nastajanja amorfnog kalcijevog fosfata (ACP, $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$) koji se potom transformira u OCP nakon čega hidroliziranjem prelazi u termodinamički stabilan HAp. Ovo je u skladu s Ostwald-Lussac-ovim zakonom koji govori kako u uvjetima uzastopnog taloženja početna faza ima najveću topljivost, a taloženje kristalnih faza slijedi prema opadajućoj topljivosti. ACP (Ca/P = 1,0–2,2) stabilan je u rasponu pH vrijednosti 5,0–12,0, OCP (Ca/P = 1,33) u rasponu 5,5–7,0, te stehiometrijski HAp (Ca/P = 1,67) u rasponu 9,5–12,0.⁹ U usporedbi s drugim CaP, ACP je stabilniji u vodenim otopinama u širokom rasponu pH vrijednosti (pH = 4,2–8,0).³⁹ Transformacija ACP-a u OCP uključuje istovremeno otpuštanje Ca^{2+} i OH^- iona prema jednadžbi (1), dok transformacija OCP-a u HAp uključuje reakciju s Ca^{2+} ionima i otpuštanje H^+ iona prema jednadžbi (2):



Pri pH vrijednosti 4,50 OCP sadrži znatnu količinu strukturne vode što rezultira slabijom kristalnošću s amorfni karakterom iz čega se može zaključiti kako je OCP nastao iz ACP-a faznom transformacijom. Pri pH vrijednosti manjoj od 4,7 molekule vode difundiraju iz kristalne rešetke i time povećavaju kristalnost OCP-a. Pri porastu pH vrijednosti na 5 dolazi do ponovnog difundiranja molekula vode u kristalnu rešetku kroz hidratizirani sloj OCP-a. Preuređenje dovodi do strukturnih naprezanja koja rezultiraju pomicanjem HPO_4^{2-} molekula na položajima *P5* i *P6* te razdvajanjem preko *b* osi u slojeve apatita.^{17,40}

2.3.1. Amorfni kalcijev fosfat

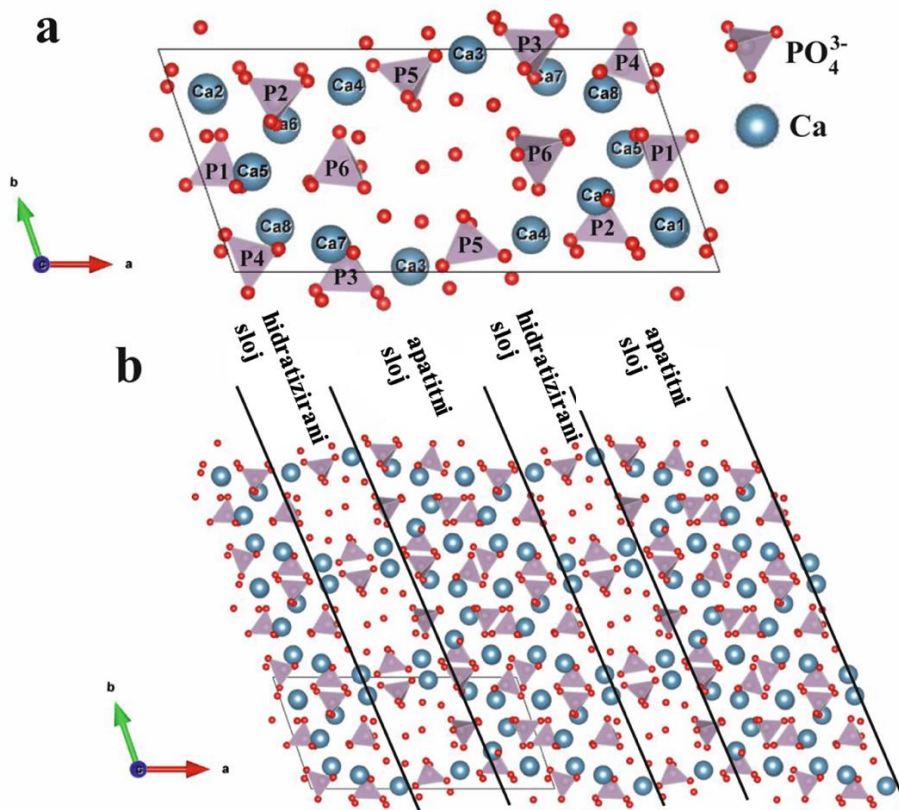
Savršeni beskonačni kristali ne postoje već dolazi do pojava nesavršenosti u obliku vakancija, nečistoća i drugih čimbenika koji narušavaju periodičnost i time određuju fizikalna svojstva kristala. Nasuprot tome, postoje visoko neuređene čvrste tvari nepravilne strukture, a takvi materijali nazivaju se amorfima.²⁵ Među postojećim amorfim materijalima u živim organizmima na temelju CaP najzastupljeniji su oni u zubima i egzoskeletu morskih beskralježnjaka. Nadalje, nedavna istraživanja na području nastajanja kostiju i zubi ukazale su na prisutnost amorfih mineralnih prekursora kod kralježnjaka i beskralježnjaka.⁴¹

Robinson i Watson⁴² prvi su predložili teoriju kako znatan dio novonastalog minerala u mladoj kosti nije kristalne strukture. Otkrili su kako prilikom miješanja otopina CaCl_2 i Na_2HPO_4 visokih koncentracija na sobnoj temperaturi i neutralnom pH, prve nastale čvrste tvari nisu bile kristalne strukture. Osnovni pristup spontanog taloženja miješanjem koncentriranih prekursora kalcija i fosfata još uvijek se široko koristi za pripremu ACP-a.⁴³ Istraživanja su pokazala da ACP ima bolju *in vivo* osteokonduktivnost od HAp-a, biorazgradivost od TCP-a, dobru bioaktivnost te nije citotoksičan.⁴⁴ Izvrsna biološka svojstva čine ACP široko primjenjivim u stomatologiji, ortopediji i medicini.⁴⁵

2.3.2. Oktakalcij fosfat pentahidrat

Kristalna struktura OCP-a ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) prvobitno je utvrđena 1962. godine.⁴⁶ Kristalna rešetka OCP-a triklineske je simetrije (prostorna grupa *P1*) s parametrima ćelije $a = 19,692 \text{ \AA}$, $b = 9,523 \text{ \AA}$, $c = 6,835 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,15^\circ$, $\beta = 92,54^\circ$ i $\gamma = 8,65^\circ$ i omjerom Ca/P = 1,33 (Slika 2a).⁴⁷ U strukturi OCP-a (Slika 2b) naizmjenično se nalaze apatitni i hidratizirani ($\text{HPO}_4\text{-OH}$, $\text{Ca}_4(\text{HPO}_4)_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) slojevi. Hidratizirani sloj sadrži molekule vode, hidratizirane fosfatne skupine (HPO_4^{2-}) na *P5* i *P6* položajima te Ca^{2+} ione na *Ca3* i *Ca4*

položajima. U apatitnom sloju smješteno je 6 Ca^{2+} iona te fosfatne skupine $P1-P4$ koje se nalaze gotovo u istom položaju kao kod kristalne rešetke HAp-a.¹⁷



Slika 2. Struktura kristalne rešetke oktakalcijeva fosfata pentahidrata s označenim položajima kalcijevih i fosforovih atoma (a) te prikaz strukture u kojoj se izmjenjuju apatitni i hidratizirani sloj (preuzeto uz dopuštenje Elseviera).¹⁷

Metoda pripreme OCP-a često uključuje hidrolizu drugih CaP, kao što su DCPD i α -TCP, te taloženjem iz vodene otopine. Prelazak u apatitnu fazu postiže se povišenjem pH vrijednosti ($> 6,5$) ili toplinskom obradom koja uzrokuje uklanjanje molekula vode iz OCP-a.^{48,49} OCP se često javlja kao međuprodukt prilikom taloženja termodinamički stabilnijeg HAp-a pri čemu dolazi do njegove hidrolize.^{47,48} Svojstva koja potiču nastajanje koštanog tkiva ovise o načinu i uvjetima pripreme kristala OCP-a.⁵⁰

2.3.3. Hidroksiapatit

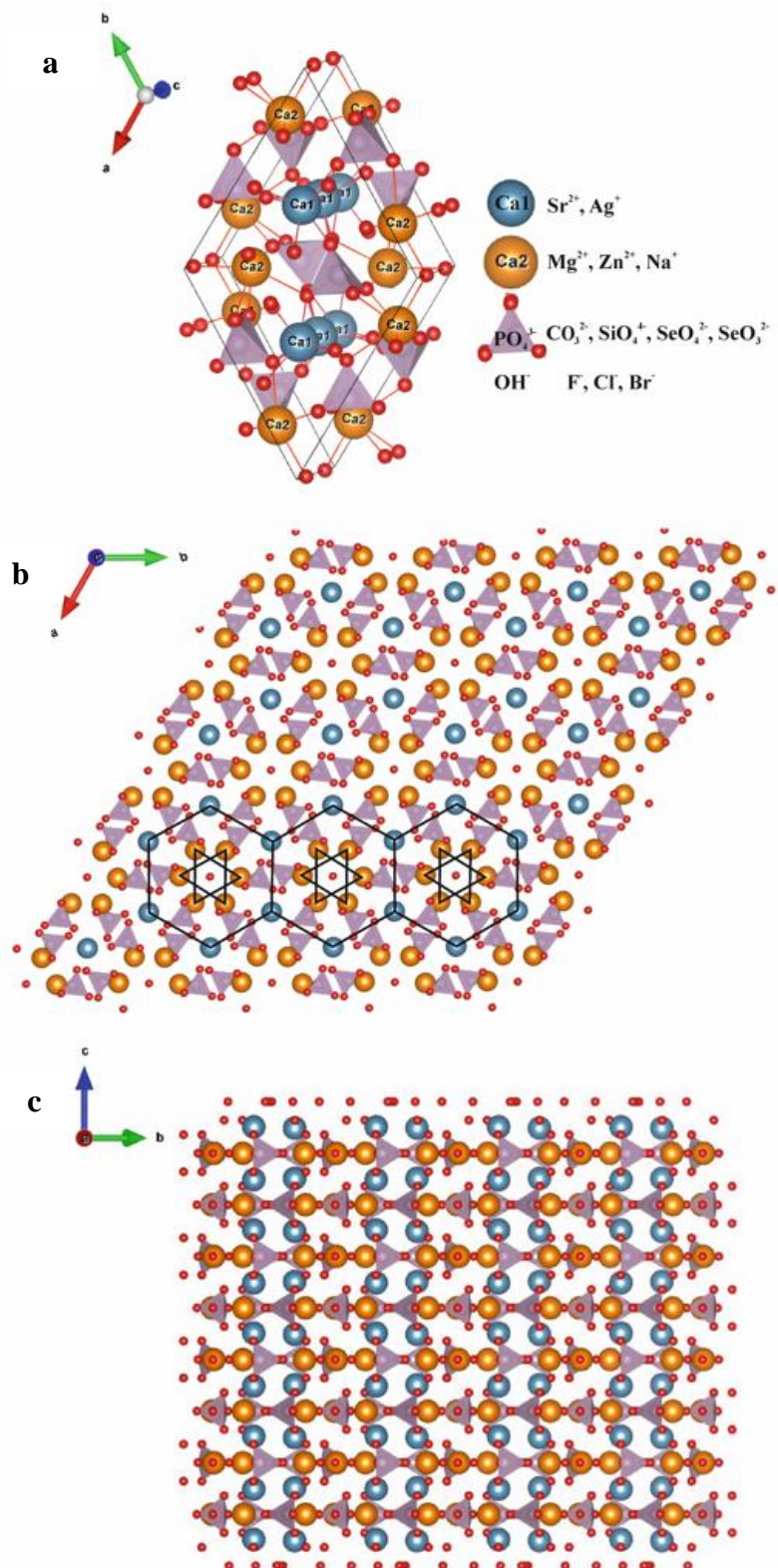
HAp je najstabilniji i najčešće korišten materijal za regeneraciju koštanog tkiva u usporedbi s ostalim CaP. Strukturno i kemijski najbliži je mineralnoj komponenti koja se nalazi u kostima i zubima, a može tvoriti jaku vezu s koštanim tkivom te nema štetnih učinaka

na ljudski organizam.^{51,52} Nadalje, biokompatibilan je i bioaktivan što ga čini izvrsnim biomaterijalom za primjene u ortopediji, stomatologiji te za kontrolirano otpuštanje lijekova.⁵³ Stabilna kristalna rešetka HAp-a omogućuje pripremu HAp-a supstituiranog raznim kemijskim elementima.⁵⁴ HAp može biti pripremljen na više načina, a postupci se mogu podijeliti u tri osnovne skupine:

1. Mokri kemijski postupci pripreme (precipitacija, kondenzacija, hidroliza)
2. Postupci pripreme suhom sintezom
3. Postupci kondenzacije reaktanata u plinovitoj fazi; služe isključivo za pripremu tankih filmova HAp-a na odgovarajućim supstratima.

Izabrana metoda pripreme ima velik utjecaj na morfologiju uzorka, specifičnu površinu, stehiometriju i kristalnost.⁵² Slika 3a prikazuje kristalnu rešetku HAp-a s označenim pozicijama kalcija te supstitucijskih iona. Na slici 3b prikazana je struktura HAp-a duž c osi, a na slici 3c duž a osi.

Kristalna rešetka HAp-a heksagonske je simetrije (prostorna grupa $P6_3/m$) te sadrži dva Ca^{2+} iona, Ca1 i Ca2. Parametri kristalne rešetke su: $a = b = 9,418 \text{ \AA}$, $c = 6,884 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ te omjer Ca/P iznosi 1,67. Tetraedar fosfatnog iona (PO_4^{3-}) tvori osnovnu strukturnu jedinicu, a koordinacijom oko različitih Ca položaja definira $\text{Ca}_1\text{O}_1\text{O}_2\text{O}_3$ metaprizmu i iskrivljeni $\text{Ca}_2\text{O}_1\text{O}_2\text{O}_3\text{O}_4(\text{OH})$ poliedar. Kalcijevi atomi na položaju Ca2 koordinirani su oko OH^- skupine tvoreći trokute okomite na c os. S obzirom na fleksibilnu strukturu HAp-a, moguće su kationske (Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Ag^+) i anionske (CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , SeO_3^{2-} , F^-) supstitucije. Četiri Ca1 iona čvrsto su povezana sa šest kisikovih atoma, a slabije s tri kisikova atoma čija je duljina veze $\text{Ca1-O} = 0,255 \text{ nm}$. Šest Ca2 atoma okruženo je sa sedam kisikovih atoma te duljina Ca2-O veze iznosi $0,245 \text{ nm}$. S obzirom na duljinu veze, supstituirani kationi koji imaju veći radijus od Ca atoma smjestit će se u položaj Ca1, dok će se manji kationi smjestiti u položaj Ca2. Iako HAp zadržava heksagonsku simetriju nakon supstitucije, moguće su promjene svojstava kao što su topljivost, čvrstoća i toplinska stabilnost.^{55,56,57}



Slika 3. Struktura kristalne rešetke hidroksiapatita s označenim položajima kalcijeva i supstitucijskih atoma (a) te prikaz strukture HAp-a duž *c* osi (b) i *a* osi (c) (preuzeto uz dopuštenje Elseviera).⁵⁵

2.3.4. OCP vs. HAp *in vivo*

U ranim 1990-ima provedena su *in vivo* usporedna istraživanja obnove koštanih oštećenja mišje lubanje korištenjem dikalcijeva fosfata (DCP, CaHPO_4 , Ca/P = 1,5), ACP-a (Ca/P = 1,5), OCP-a i stehiometrijskog HAp-a. Pokazano je da DCP, ACP i OCP potiču brže stvaranje koštanog tkiva u odnosu na HAp. Međutim, kako bi se ispravno usporedila osteokonduktivna svojstva OCP-a i HAp-a, veličina granula i kristala oba CaP mora biti jednaka.¹⁷ Iz tog razloga, 2006. godine provedeno je istraživanje regeneracija koštanih oštećenja kod koštane srži kunića korištenjem OCP-a i HAp-a sličnih veličina granula i načina pripreme. Pokazalo se kako je za obnovu koštanog tkiva korištenjem OCP-a potrebno 2–3 tjedna, dok je obnova ostvarena nakon 4–6 tjedana korištenjem HAp-a. Također, količina zaostalog OCP-a bila je manja u odnosu na HAp nakon 12 tjedana, što upućuje na bolju regeneraciju kosti uz pomoć OCP-a nego li HAp-a. Korištenjem OCP-a dolazi do bolje regeneracije koštanog tkiva u početnoj fazi te boljeg učinka u slučajevima kod kojih su važni istodobni procesi obnove kosti i resorpcije okosnice.⁵⁸ Međutim, nedostatak ovog istraživanja je korištenje toplinski obrađenog HAp-a na temperaturi od 1150°C te iz tog razloga ne može biti uspoređen s OCP-om koji ne može biti toplinski obrađen zbog transformacije u HAp.¹⁷ Kako bi prevladali ovaj izazov i zadržali faze koje se mogu usporediti *in vivo*, provedeno je istraživanje u kojem je HAp pripremljen hidrolizom OCP-a kako bi se dobio hidrolizirani prah s nedostatkom kalcija (Ca/P = 1,46) koji ima slična svojstva kao i OCP.⁸ Novonastali volumen kosti uspoređen je nakon 12 tjedana *in vivo*. Istraživanje je pokazalo kako OCP ima bolja regenerativna svojstva te se transformacija OCP-a u apatitnu fazu odvija unutar 11 dana *in vitro* i 21 dan *in vivo*. Prema spomenutim istraživanjima, OCP je pokazao bolja regenerativna svojstva u usporedbi s HAp-om.⁵⁹

2.4. IONSKE SUPSTITUCIJE

Faktori rasta, stvari potrebne za rast i diobu stanica nekog organizma, često se koriste u kombinaciji s CaP biokeramikom kako bi poboljšali osteogena svojstva.⁶⁰ Međutim, dovodi se u pitanje njihova sigurnost vezana za ektopično nastajanje kosti, prikladnu koncentraciju, nestabilnost, visoku cijenu i moguće dugotrajne negativne posljedice.^{61,62} Iz tih se razloga kao prikladna alternativa smatra CaP biokeramika supstituirana s ciljanim kationima i anionima koji se prirodno nalaze u mineralnom tkivu.⁶¹ *In vivo* istraživanja Suzuki i suradnika⁶³ pokazala su bolja regenerativna svojstva OCP-a u usporedbi s HAp fazom, a biološka učinkovitost OCP-

a *in vivo* može se dodatno poboljšati supstitucijom odgovarajućim ionima koji imaju ključnu ulogu u metabolizmu prirodnog koštanog tkiva.

Metastabilna struktura OCP-a može se stabilizirati ionskim supstitucijama. Ressler i suradnici⁶⁴ pripremili su višefazni CaP sustav koji sadrži HAp, OCP i ACP dobiven iz biogenog izvora (sipina kost), supstituiran s 0, 1, 5 i 10 mol.% Sr^{2+} iona. Pored dodanih Sr^{2+} iona, u pripremljenom sustavu dokazana je prisutnost Sr^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ i CO_3^{2-} iona zbog korištenja biogenog izvora kao prekursora. Udio OCP faze se nije značajno promijenio upotrebom različitih iona, a iznosio je ~41 mas.% u svim uzorcima čak i kada je pH vrijednost pripremljenih CaP otopina bila u rasponu od 6,40–7,60. Dobiveni rezultati upućuju na to da Sr^{2+} ioni prisutni u otopini mogu utjecati na faznu transformaciju i stabilizirati OCP pri višim pH vrijednostima. Međutim, daljnja istraživanja Ressler i suradnika⁶⁵ na istim višefaznim sustavima supstituiranih s 0, 1, 5 i 10 mol.% SeO_3^{2-} iona pokazala su destabilizirajući učinak SeO_3^{2-} iona na OCP. Stoga je potrebno istražiti utjecaj različitih iona na svojstva OCP-a kako bi se omogućilo daljnje razumijevanje i upotreba kompozita izrađenih na temelju supstituiranog OCP-a.

2.4.1. Supstitucija stroncijem

Osim sličnosti atomskih radijusa Ca^{2+} (0,100 nm) i Sr^{2+} (0,120 nm) iona, djelovanje stroncija u tijelu slično je djelovanju kalcija.⁶⁶ U skladu s time, 98% stroncija u ljudskom tijelu pohranjeno je upravo u mineralnoj fazi koštanog tkiva.⁶⁷ *In vitro* istraživanja pokazala su da Sr^{2+} ioni potiču vezanje, proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta, te usklađuju signale između osteoblasta i osteoklasta.⁶⁸ Brojna istraživanja pokazala su da koštane okosnice koje sadrže Sr^{2+} ione poboljšavaju obnovu koštanog tkiva.⁶⁷ Korištenje stroncijevog ranelata jedno je vrijeme predstavljalo način uvođenja Sr^{2+} iona u ljudski organizam, te se smatrao obećavajućim lijekom za osteoporozu. Međutim njegovo korištenje uzrokovalo je negativne posljedice poput kardiovaskularnih rizika, stvaranja krvnih ugrušaka, pojave simptoma autoimune bolesti DRESS (engl. *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*), te pojavu kožnih bolesti poput dermatitisa.⁶⁹ Budući da je upotreba stroncijevog ranelata kao izvora Sr^{2+} iona zabranjena, koštane okosnice supstituirane Sr^{2+} ionima smatraju se obećavajućim pristupom za uvođenje Sr^{2+} iona u oštećene dijelove kosti bez negativnih posljedica.¹⁷

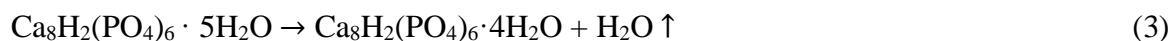
Matsunaga i Murata⁷⁰ svojim su istraživanjem značajno doprinijeli razumijevanju mehanizma supstitucije Sr^{2+} iona unutar OCP rešetke. Ionski radijus Sr^{2+} iona veći je od

radijusa Ca^{2+} , stoga supstitucija dovodi do povećanja parametara elementarne ćelije. Energije za Sr-supstituciju na Ca1, Ca2, Ca5 i Ca7 položajima u OCP-u, slične su energijama supstitucije za Ca1 i Ca2 položaje u HAp-u. Energije supstitucije za Ca3, Ca4 i Ca8 položaje u OCP-u su nižih vrijednosti, što upućuje na to da OCP može prihvatiti veći broj Sr^{2+} iona u svoju kristalnu rešetku u odnosu na HAp. Povećanje pH vrijednosti otopine dovodi do smanjenja energija supstitucije za sve položaje u kristalnoj rešetci OCP-a i HAp-a. To se može objasniti tako da pri nižim pH vrijednostima koncentracija Ca^{2+} iona u vodenoj otopini je veća i stoga je Ca^{2+} ionima otežano otpuštenje i supstituiranje Sr^{2+} ionima.

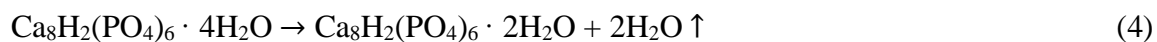
Ressler i suradnici⁶⁴ pripravili su trofazni sustav iz sipine kosti koji sadrži OCP, HAp i ACP supstituiran sa Sr^{2+} ionima (0, 1, 5 i 10 mol.%). Primijećen je porast parametara elementarne ćelije za obje kristalne faze, OCP i HAp, zbog većeg radijusa Sr^{2+} iona. Rietveldova metoda utočnjavanja pokazala je da Sr^{2+} ioni zauzimaju Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8 položaje u OCP strukturi. Usporedbom eksperimentalnih rezultata Ressler i suradnika⁶⁴ s teoretskim izračunima Matsunaga i Murata⁷⁰, eksperimentalni podaci poklapaju se s teorijskim za položaje Ca3, Ca4 i Ca8. Međutim, eksperimentalni rezultati prikazuju supstituciju na Ca7 položaju, iako je energija supstitucije prema teoriji viša nego za Ca1 i Ca5 položaje. Može se pretpostaviti da dodatni ioni prisutni u sustavu (Sr^{2+} , Mg^{2+} i Na^+) zbog korištenja biogenih prekursora utječu na energije supstitucije Ca položaja. Nadalje, rezultati infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) pokazuju vrpce karakteristične za karbonatne skupine (CO_3^{2-}) koje upućuje na supstituciju PO_4^{3-} iona (B-tip supstitucije) kao rezultat korištenja kalcijeva karbonata (CaCO_3) kao prekursora.^{64,71}

Shi i suradnici^{71,72} doprinijeli su razumijevanju supstitucije OCP-a sa Sr^{2+} ionima. Pripravljani su uzorci OCP i Sr-OCP molarnih udjela $\text{Sr}/(\text{Sr} + \text{Ca})$ u rasponu 0–0,25. Primijećeno je postupno povećanje parametara jedinične ćelije s povećanjem udjela supstitucije sve do smanjenja pri najvišem udjelu kada je uslijedila transformacija u amorfnu fazu. Dodatno, Shi i suradnici⁷³ istražili su utjecaj Sr^{2+} iona na termičku stabilnost OCP-a. Toplinska se obrada OCP-a može podijeliti u 3 koraka:

1. Toplinska obrada pri $< 100^\circ\text{C}$ je reverzibilan proces u kojemu se odvija dehidracija molekula vode prema jednadžbi (3):



2. Toplinska obrada u temperaturnom području $130\text{--}150^\circ\text{C}$ je ireverzibilan proces u kojemu se odvija daljnja dehidracija koja dovodi do fazne transformacije OCP-a u slabo kristalinični apatit, prema jednadžbi (4):



3. Toplinska obrada pri $> 200^\circ\text{C}$ koja uzrokuje potpunu transformaciju OCP-a u apatit.

Toplinskom obradom postupno se smanjuje veličina OCP kristala, te daljnjim povišenjem temperature dolazi do dehidracije unutar hidratiziranih slojeva što uzrokuje raspad kristala OCP-a.⁷³ Supstitucijom Sr^{2+} iona poboljšana je toplinska stabilnost OCP-a u odnosu na nesupstituirani OCP, dok su Rokidi i Koutsoukos⁵⁷ potvrdili da prisutnost Sr^{2+} iona inhibira ili usporava transformaciju OCP-a u HAp.

2.4.2. Supstitucija magnezijem

U odraslom ljudskom tijelu, magnezij je četvrti kation prema zastupljenosti, dok se 60% njegove ukupne količine nalazi u prirodnom mineralnom tkivu (kosti i zubi). Mg^{2+} ioni imaju vrlo bitnu ulogu u metabolizmu kostiju, ponajviše u ranoj fazi stvaranja kosti, dok se nedostatak magnezija direktno povezuje s osteoporozom.⁶³ Primjenom Mg-supstituirane CaP biokeramike dolazi do povećanja gustoće koštanog tkiva, adhezije osteoblastnih stanica, proliferacije i proizvodnje enzima alkalne fosfataze.⁷⁰

Mg^{2+} ioni (0,072 nm) imaju manji ionski radijus u odnosu na Ca^{2+} ione (0,100 nm). Koordinacijski brojevi Ca s najbližim kisikovim atomima u OCP strukturi su 6 i 7. Tijekom supstitucije, Mg^{2+} ioni zauzimaju Ca2, Ca3, Ca4, Ca6 i Ca8 položaje u OCP-u, gdje koordinacijski broj prema prvom najbližem kisiku iznosi 5. Smanjenje u koordinacijskim brojevima povezano je s manjim radijusom Mg^{2+} iona, koji nakon supstitucije na Ca položajima uzrokuje pomak O^{2-} iona prema kationima uslijed razlike u veličini, što uzrokuje elektronsko odbijanje aniona. Kako bi se smanjila razlika u energijama između dva O^{2-} iona, O^{2-} ioni se udaljuju od mjesta kationa, te se tako koordinacijski broj Mg^{2+} iona u OCP rešetki smanjuje. Kao što je već opisano za supstituciju Sr^{2+} ionima, energija supstitucije Mg^{2+} iona u OCP-u funkcija je pH vrijednosti tako da se ona smanjuje s povećanjem pH vrijednosti. Zbog manjeg ionskog radijusa Mg^{2+} iona, može se očekivati da se supstitucija odvija na Ca položajima s nižim koordinacijskim brojem s kisikom, što uključuje položaje Ca3, Ca5, Ca6 i Ca8. Od navedenih Ca položaja, Ca5 i Ca6 imaju najniže vrijednosti energije supstitucije, stoga se može očekivati da će se Mg supstitucija ponajviše odvijati na tim položajima.⁵⁷ Boanini i suradnici⁵¹ pripremili su Mg-supstituirani OCP u rasponu supstitucije od 5–60 Mg^{2+} at.% u otopini. Eksperimentalni podaci pokazali su da je OCP faza nastala u rasponu supstitucije od 5 do 15 at.%, dok su Mg^{2+} ioni pri višim supstitucijama uzrokovali formiranje sekundarne faze

(DCPD) i u potpunosti inhibirali stvaranje OCP-a. Smanjenje u parametrima ćelije supstituiranog OCP-a rezultat je manjeg radijusa Mg^{2+} iona. Mg^{2+} ioni imaju isti učinak na kristale OCP-a kao i Sr^{2+} ioni, gdje su SEM mikrografije pokazale kristale manjih dimenzija nedefiniranih rubova. Zeng i suradnici⁷⁵ pripravili su Mg-supstituirani OCP s molarnim omjerom $Mg/(Mg + Ca)$ od 0, 0,1 i 0,15. Pokazalo se da su Mg^{2+} ioni inhibirali kristalizaciju OCP-a, što se uočilo smanjenjem intenziteta pikova na XRD difraktogramu. Istraživanja Tsyganova i Golovanova⁷⁶ pokazali su slaganje s rezultatima prethodnih spomenutih istraživanja, u kojima je dokazano da Mg^{2+} ioni utječu na kristalizaciju OCP-a i potiču proces formiranja DCPD faze.

2.4.3. Supstitucija srebrom

Srebro je kemijski element poznat po svojim antibakterijskim svojstvima prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama među kojima su *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) i *Escherichia coli* (*E. Coli*).^{77,78} Srebro se istaknulo u polju inženjerstva tkiva, jer osim što je biokompatibilno i netoksično (pri niskim koncentracijama), pripravljene okosnice supstituirane Ag^+ ionima odlikuju se antibakterijskim djelovanjem.⁷⁹ Srebrovi ioni djeluju tako da uništavaju vanjsku membranu bakterije, odnosno mogu prodrijeti u unutrašnjost stanice i vezati se za tiolne skupine ribosomskih proteina, nukleinskih kiselina i respiratornih enzima uzrokujući apoptozu tj. staničnu smrti.⁷⁷

Sugiura i suradnici⁸⁰ uspješno su pripravili OCP supstituiran Ag^+ ionima (0,126 nm) u blago bazičnoj otopini koja sadrži Ag^+ ione koncentracije do 30 mmol/L. XRD rezultati ukazali su na prisutnost CaP u obliku čistog OCP-a i malog udjela HAp-a. Povećanjem koncentracije početne otopine (50 mmol/L) utvrđeno je da uz OCP nastaje i nova faza u obliku srebrova fosfata, Ag_3PO_4 . Sugiura i Horie⁸¹ koristili su Ag-supstituiran uzorak OCP-a kako bi proučavali prijelaz čvrsto-čvrsto Ag-OCP faze u apatitnu fazu uslijed supstitucije CO_3^{2-} iona. Koristili su otopine amonijeva karbonata ($(NH_4)_2CO_3$) različitih koncentracija, te je prijelaz u apatitnu fazu potvrđen XRD analizom, a FTIR i Ramanova spektroskopija potvrdili su da CO_3^{2-} ioni zamjenjuju OH^- (A-tip) i PO_4^{3-} (B-tip) grupe tijekom čvrsto-čvrsto transformacije. U početnom uzorku Ag-OCP, Ag^+ se supstituirao na položaju u OCP strukturi koji čini dio hidratiziranog sloja. Tijekom čvrsto-čvrsto faznog prijelaza dolazi do dehidratacije hidratiziranog sloja OCP-a, stoga se omjerima Ca/P i (Ca + Ag)/P pratila promjena kemijskog sastava uzoraka nakon faznog prijelaza. Utvrđeno je da Ca/P i (Ca + Ag)/P omjeri rastu, što potvrđuje prijelaz OCP u apatitnu fazu, a koncentracija Ag^+ iona ostala je gotovo jednaka u svim uzorcima što dokazuje

da je udio Ag gotovo u potpunosti očuvan, te se preraspodijelio u novonastaloj apatitnoj rešetki nakon fazne transformacije.

2.4.4. Supstitucija cinkom

Cink je neophodan element u ljudskom tijelu koji je uključen u strukturne, katalitičke i/ili regulatorne radnje u ključnim metaloenzimima. Jedan od njih je alkalna fosfataza koja sadrži dva Zn^{2+} i jedan Mg^{2+} ion smještenih u aktivnom položaju. Alkalna fosfataza proizvodi fosfate putem hidrolize pirofosfata, te tako stvara lužnatu okolinu koja je pogodna za precipitaciju CaP i mineralizaciju izvanstanične matrice.⁶⁷

Zn^{2+} ioni, isto kao i Mg^{2+} ioni, imaju manji ionski radijus (0,074 nm) u odnosu na Ca^{2+} ione (0,100 nm), stoga se mehanizam supstitucije i smanjenje koordinacijskog broja za Mg^{2+} ione može primijeniti i na Zn^{2+} ione. Ovisno o atomskom mjestu, koordinacijski brojevi Zn^{2+} iona u OCP rešetki iznose 4 ili 5, što je manje od koordinacijskih brojeva za Mg^{2+} ione (5 ili 6).⁷⁶ Honda i suradnici⁸² pripravili su OCP supstituiran sa Zn^{2+} ionima u $Zn/(Zn + Ca)$ molarnim udjelima 0,00; 0,72; 1,63; 2,26; 3,76; 5,55 i 7,98. Pikovi karakteristični za OCP uočeni su za $Zn/(Zn + Ca)$ molarni omjer manji od 2,26. Sve do te razine supstitucije, najizraženiji pik pri 4.9° (100) postaje sve širi s povećanjem količine Zn^{2+} iona, upućujući na to da dolazi do nastajanja amorfne faze. Iako pri višim razinama supstitucije Zn^{2+} ionima nisu primijećeni karakteristični pikovi za OCP fazu, pripremljeni praškasti uzorci vjerojatno imaju svojstva karakteristična za OCP, budući da Ca/P omjer u svim uzorcima iznosi ~1,33. Ustanovljeno je da prisutnost Zn^{2+} iona usporava proces hidrolize u apatitnu fazu i unaprjeđuje proces stvaranja amorfne faze.

2.4.5. Supstitucija željezom

Željezo je temeljni element u staničnom metabolizmu te ima ključnu ulogu u proliferaciji stanica. Neophodan je za ljudsko preživljavanje, a ponajviše se pohranjuje u kostima i zubima.⁷⁰

Preliminarno istraživanje OCP-a supstituiranog Fe^{3+} ionima proveli su Shi i suradnici.⁷² Zbog manjeg ionskog radijusa Fe^{3+} (0,065 nm) u usporedbi s Ca^{2+} (0,100 nm) ionima očekivano je smanjenje parametara ćelije, međutim ustanovljeno je povećanje u smjeru *a* i *c* osi, te slabo smanjenje *b* osi u odnosu na nesupstituirani OCP. Ovaj obrnuti eksperimentalni rezultat objasnili su Shi i suradnici⁷² uspostavom ravnoteže naboja koji se dogodio u sustavu.

Pretpostavlja se da je jedan dio Ca^{2+} iona zamijenjen Fe^{3+} ionima, a drugi dio Fe-hidroksi ionima ($\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ ili $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$). Razlika u Raman spektru za HPO_4^{2-} skupine između Fe-supstituiranog i nesupstituiranog OCP-a moguća je posljedica nedostatka aniona u obliku PO_4^{3-} ili prijelaz PO_4^{3-} iona u $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ radi uspostavljanja ravnoteže naboja. Morfologija kristala Fe-supstituiranog OCP-a pokazuje jasno definiran pločasti oblik kristala.⁷² Istraživanje termičke stabilnosti upućuje na to da Sr^{2+} ioni poboljšavaju termičku stabilnost OCP kristala, dok supstitucija s Fe^{3+} ionima ima suprotno djelovanje.⁵⁷

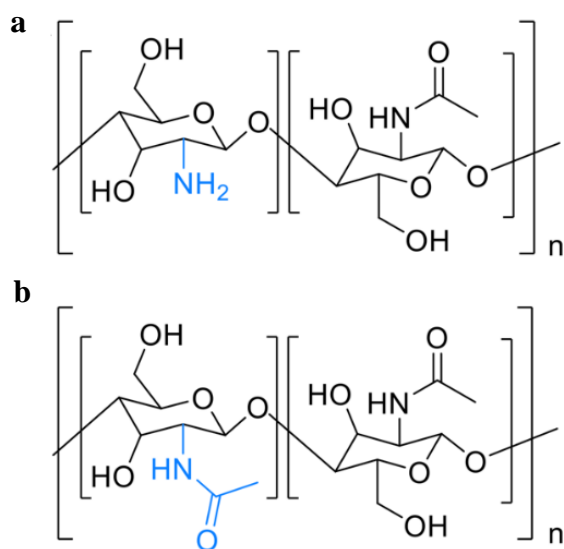
2.4.6. Supstitucija alkalijskim metalima

Sugiura i suradnici⁸³ istraživali su utjecaj iona alkalijskih metala (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ i Cs^+) na stvaranje OCP faze i razvoja njegove slojevite strukture procesom hidrolize DCPD faze u vodenoj otopini alkalijskih klorida. Ispitan je utjecaj mogućnosti uklapanja monovalentnih iona u OCP strukturu putem supstitucije. Utvrđeno je da Li^+ ($r = 0,076$ nm) i niske koncentracije K^+ ($r = 0,138$ nm) iona mogu biti supstituirane u OCP rešetku, dok se Na^+ ($r = 0,102$ nm) može supstituirati u većoj mjeri. Rb^+ ($r = 0,152$ nm) se može supstituirati pri nižim koncentracijama od K^+ iona, dok Cs^+ ($r = 0,167$ nm) inhibira stvaranje OCP-a. Na temelju rezultata može se zaključiti da se ioni s ionskim radijusom ~ 1.5 puta manjim od Ca^{2+} mogu uklopiti u OCP strukturu, dok ioni s ionskim radijusom ~ 1.5 puta većim od Ca^{2+} iona imaju inhibitorški utjecaj na formiranje OCP faze. U istraživanju Sugiura i Makita⁸⁴ proučavan je utjecaj Na^+ iona na konverziju DCPD u OCP fazu, te je utvrđeno da OCP stvara hidratiziranu slojevitou strukturu koja se raspada pri nižim temperaturama kada je prisutna sve viša koncentracija Na^+ iona u otopini. Nadalje, u daljnjim istraživanjima Sugiura i suradnika⁸³, primijećena je dodatna vrpca na FTIR spektru u području valnih brojeva povezanim s vibracijama P5 položaja, gdje se vrpca pomiče pri nižim vrijednostima valnih brojeva s povećanjem koncentracije Na^+ iona. U provedenom istraživanju, proučavala se supstitucija Na^+ i NH_4^+ ionima, koji imaju bolji utjecaj na stvaranje OCP faze u odnosu na monokalcij hidrogen fosfat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Rezultati su pokazali da Na^+ ioni imaju veću tendenciju supstitucije u kristalnu rešetku OCP-a i utjecaj na njegova svojstva u odnosu na NH_4^+ iona. U istraživanju Sugiura i Horie⁸⁵ ispitivao se utjecaj Na^+ supstitucije na OCP sintezu u kiselom i blago lužnatom mediju. Utvrđeno je da će pri kiselim uvjetima ($\text{pH} < 5$) Na^+ ioni vjerojatnije supstituirati konjugirani položaj P3, dok će pri bazičnim uvjetima ($\text{pH} = 5-10$) Na^+ ioni vjerojatnije supstituirati konjugirani položaj P5.

2.5. BIOPOLIMER KITOZAN KAO ZAMJENA ZA KOLAGEN

Prirodni polimeri dobiveni su iz prirodnih izvora kao što su biljke, životinje i mikroorganizmi te se zbog specifične strukture i fizioloških svojstava koriste u različitim područjima inženjerstva tkiva.⁸⁶ Biopolimeri kao što su polisaharidi (celuloza, kitozan, hitin) i proteini (kolagen, elastin) imaju slična svojstva kao izvanstanična matrica bez izazivanja toksičnih ili negativnih imunoloških reakcija pri korištenju *in vivo*. Zbog toga je u posljednja dva desetljeća povećan interes za izradu kompozitnih okosnica na temelju prirodnih polimera.⁸⁷

Kitozan (CHT), kao prirodni polimer dobiven iz hitina, predstavlja jedno od glavnih područja interesa u inženjerstvu tkiva. Hitin je strukturni polimer u ljušturama rakova i člankonožaca. Kitozan je linearni polimer sastavljen od (1→4)-2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukan(*N*-acetil-D-glukozamin)skih (glukozamina) i (1→4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukan(*N*-acetil-D-glukozamin) (*N*-acetilglukozamina) sastavnih jedinica dobiven procesom deacetilacije hitina, reakcijama hidrolize u lužnatim uvjetima ili enzimskom hidrolizom uz enzim hitin-deacetilazu.⁶⁸ Strukture kitozana i hitina prikazane su na slici 4.



Slika 4. Struktura kitozana (a) i hitina (b) nacrtane pomoću ChemDraw.

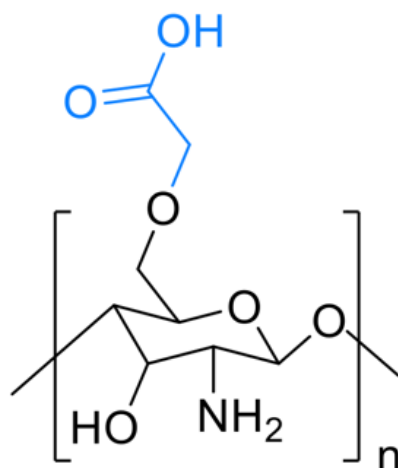
Dodatno, povećan je interes za pripremu kompozitnih materijalima na temelju kitozana i njihovu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Razlog tome su odlična svojstva kompozita na temelju kitozana kao što su biorazgradivost, biokompatibilnost, mogućnost stvaranja poroznih struktura i široka mogućnost oblikovanja.⁸⁸ Neka od povoljnih svojstava proizlazi iz prisutnosti amino skupina duž polimernog lanca. Amino skupine D-glukozamina mogu biti

protonirane osiguravajući tako topljivost u razrijeđenim kiselim vodenim otopinama ($\text{pH} < 6$).⁸⁹ Topljivost kitozana ovisi o metodi i stupnju deacetilacije (engl. *Deacetylation degree*, DD), molekulskoj masi (engl. *Molecular weight*, M_w) i rasporedu skupina unutar lanca.⁸⁸ Reakcija visokofunkcionalnih amino skupina ($-\text{NH}_2$) s aldehydima i ketonima uzrokuju antibakterijska, protugljivična, protuvirusna i netoksična svojstva, dok hidroksilne funkcionalne skupine pridonose povećanju njegove topljivosti.^{33,90}

Kao što je istaknuto, kitozan je polisaharid koji sadrži glikozidne veze što je važno za biorazgradivost prirodnog polimera. Razgrađuje se djelovanjem proteaza, ali ponajviše enzimom lizozimom. Produkti biorazgradnje kitozana su netoksični oligosaharidi različitih duljina lanca. Brzina razgradnje kitozana ovisna je o DD, distribuciji *N*-acetil D-glukozamina i M_w kitozana.⁸⁹ S obzirom na to da kitozan ispunjava sve uvjete (biokompatibilnost, mehanička svojstva, itd.) koje mora ispuniti biomaterijal za pripravu okosnica, može se koristiti kao zamjena za oštećeno tkivo ili organe. Topljiv je u razrijeđenim kiselinama; međutim, pri pH vrijednostima višim od 6,0 amino skupine su deprotonirane prilikom čega polimer gubi svoj naboj i dolazi do njegovog taloženja. Netopljivost kitozana u neutralnom mediju kao što je voda zahtjeva dodatan korak neutralizacije što otežava pripravu okosnica na temelju kitozana i OCP-a.⁹⁰

2.5.1. Karboksimetil kitozan

Primjena kitozana je ograničena s obzirom na netopljivost u neutralnom ili alkalnom mediju zbog stabilne kristalne strukture koja je posljedica prisutnih jakih vodikovih veza. Međutim, topljivost u neutralnom vodenom mediju ima karboksimetil kitozan (C-CHT) čija je struktura prikazana na slici 5.⁹¹ Umreženje C-CHT postiže se reakcijama s 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDC), izravnim alkiliranjem ili redukcijskim alkiliranjem.^{91,92} Topljivost u vodi pri različitim pH vrijednostima ovisi o stupnju karboksimetilacije.⁹³ Međutim, C-CHT biološki je inertan zbog čega je potrebna obrada površine kako bi se poboljšala biokompatibilnost.⁹⁴



Slika 5. Struktura karboksimetil kitozana nacrtana pomoću ChemDraw.

C-CHT najčešće se primjenjuje u regenerativnoj medicini kao biomaterijal za regeneraciju koštanog tkiva i zacjeljivanja rana, nevezano radi li se o kroničnim ili drugim predisponiranim stanjima. Isto tako, zbog mehaničkih svojstava i praktične mogućnosti primjene u praksi, koristi se u sustavima za prijenos lijekova. Većina provedenih istraživanja pokazuje učinkovitu kontrolu oslobađanja lijeka i povećanje topljivosti sustava što samim time povećava ili održava farmakodinamičke i biološke odgovore.⁹³

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Korišteni materijali za pripremu metalnim ionima supstituiranog oktakalcijeva fosfata pentahidrata:

- * kalcit, CaCO_3 (T.T.T.)
- * urea fosfat, UPH, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$, (Sigma-Aldrich)
- * stroncijev nitrat, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, (Acros Organics)
- * magnezijev klorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (KEMING)
- * srebrov nitrat, AgNO_3 , (VWR Chemicals)

Korišteni materijali za pripremu kompozita:

- * pripravljeni oktakalcij fosfat pentahidrat
- * karboksimetil kitozan, (DD = 90 %, $M_w = 100\text{--}300$ kg/mol, ChemCruz)
- * etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, (KEFO)

Korišteni materijali za umrežavanje karboksimetil kitozana:

- * pufer 2-(*N*-morfolino)etansulfonske kiseline (MES), $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$, (VWR Chemicals)
- * 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC),
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$, (Alfa Aesar)
- * *N*-hidroksisukcinimid (NHS), $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, (Alfa Aesar)

3.2. SINTEZE UZORAKA

3.2.1. Sinteza praškastog oktakalcij fosfata supstituiranog metalnim ionima

Uzorci OCP-a supstituirani (0, 1 i 2,5 mol.%) stroncijevim, magnezijevim i srebrovim ionima pripremljeni su metodom precipitacije. Kao prekursor Sr^{2+} iona korišten je $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, Mg^{2+} iona $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i Ag^+ iona AgNO_3 . Sinteza započinje otapanjem određene količine prekursora metalnih iona u destiliranoj vodi (30°C). Nakon otapanja dodana je odgovarajuća količina CaCO_3 kao izvora Ca^{2+} iona (40°C) i UPH (50°C) kako bi se postigao omjer $(\text{Ca}+\text{M})/\text{P} = 1,33$. Reakcija se provodila 4 dana pri temperaturi od 50°C uz 24 sata starenja pri sobnoj temperaturi. Konačni produkt je filtriran i sušen 24 sata pri sobnoj temperaturi ($T = 24,25 \pm 0,30^\circ\text{C}$).

Pripremljeni uzorci supstituirani Sr^{2+} ionima označeni su OCP_1Sr i OCP_2,5Sr, supstituirani Mg^{2+} ionima OCP_1Mg i OCP_2,5Mg i supstituirani Ag^+ ionima OCP_1Ag i OCP_2,5Ag, dok je nesupstituirani uzorak označen s OCP. Kako bi se ispitaio istovremeni utjecaj iona, uzorci supstituirani 1 mol.% Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+ ionima umiješani su u jednakim količinama tako da maseni udio pojedinog uzorka iznosi 33,3 mas.%, a molarni udio svakog supstituenta u konačnoj mješavini iznosi 0,33 mol.%. Takva mješavina imenovana je oznakom OCP_1MIX dok oznaka OCP_2,5MIX predstavlja mješavinu koja sadrži 33,3 mas.% svakog uzorka supstituiranog s 2,5 mol.% Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+ ionima, odnosno 0,83 mol.% svakog pojedinog supstituenta. Uzorci OCP_1MIX i OCP_2,5MIX pripremljeni su u svrhu sinteze kompozitnih materijala s odgovarajućom koncentracijom C-CHT polimera. Pregled oznaka i sastava pripremljenih supstituiranih uzoraka prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Pregled oznaka i molarnog udjela susptitucije sintetiziranih uzoraka oktakalcij fosfata supstituiranog Sr²⁺, Mg²⁺ i Ag⁺ ionima.

Uzorak	Sr / mol.%	Mg / mol.%	Ag / mol.%
OCP	0	0	0
OCP_1Sr	1	0	0
OCP_2,5Sr	2,5	0	0
OCP_1Mg	0	1	0
OCP_2,5Mg	0	2,5	0
OCP_1Ag	0	0	1
OCP_2,5Ag	0	0	2,5
OCP_1MIX	0,33	0,33	0,33
OCP_2,5MIX	0,83	0,83	0,83

3.2.2. Sinteza okosnica na temelju karboksimetil kitozana

C-CHT otopljen je u demineraliziranoj vodi kako bi se dobile 1,2 (C-CHT_1,2), 1,5 (C-CHT_1,5), 1,8 (C-CHT_1,8), 2,1 (C-CHT_2,1), 2,5 (C-CHT_2,5), 2,8 (C-CHT_2,8), 3,1 (C-CHT_3,1) i 3,4 (C-CHT_3,4) mas.% polimerne otopine. Pripravljene C-CHT otopine zamrznute (-30°C) su u pločicama s 24 jažice. Nakon 24 satnog zamrzavanja, uzorci su liofilizirani (LIO-5 PLT, Kambič) da se iz njih ukloni prisutna voda i kao produkt ostanu visokoporozne strukture na temelju C-CHT.

Nakon liofilizacije, visokoporozne okosnice na temelju C-CHT uronjene su u otopinu za umrežavanje koje sadrži MES pufersku otopinu (50 mmol/l, 70% EtOH), EDC (50 mmol/l) i NHS (25 mmol/l). Nakon 24 sata umreživanja, okosnice su ispirane pet puta u 70% EtOH i tri puta u demineraliziranoj vodi. Nakon ispiranja, uzorci su zamrznuti (-30°C) i liofilizirani.

3.2.3. Priprava kompozitnih okosnica

Uzorci OCP_1MIX i OCP_2,5 MIX odvagani su kako bi maseni udio OCP faze u polimernoj matrici (C-CHT_3,1) iznosio 30 mas.%. Nakon dodatka određene količine OCP-a u 3,1 mas.% polimernu otopinu, suspenzija je homogenizirana pomoću ultrazvučne sonde (Ultrasonication XO-650D, Nanjing Xianou Instruments Manufacture). Homogenizirane kompozitne suspenzije su zamrznute pri -30°C u pločicama s 24 jažice. Nakon 24 sata

zamrzavanja, uzorci su liofilizirani te umreženi kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. *Sinteza okosnica na temelju karboksimetil kitozana.*

Uzorci OCP_1MIX i OCP_2,5MIX, umiješani u polimernu matricu C-CHT_3,1, označeni su kao C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX. Kompozitna okosnica s nesupstituiranim OCP-om označena je C-CHTOCP, dok je kao kontrola korišten kompozit na temelju C-CHT i HAp-a označen C-CHTHAp. Pregled oznaka i sastava pripremljenih kompozitnih okosnica prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Pregled oznaka i sastava sintetiziranih kompozitnih materijala.

Anorganska faza	Organska faza/ mas. % C-CHT	Kompozitne okosnice	mas. % anorganske faze u kompozitu	mas. % pojedine anorganske faze unutar smjese
HAp	3,1	C-CHTHAp	30	100,00
OCP	3,1	C-CHTOCP	30	100,00
OCP_1Sr				33,33
OCP_1Mg	3,1	C-CHT1MIX	30	33,33
OCP_1Ag				33,33
OCP_2,5Sr				33,33
OCP_2,5Mg	3,1	C-CHT2,5MIX	30	33,33
OCP_2,5Ag				33,33

3.3. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA

3.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Za određivanje mineralošskog sastava praškastih uzoraka korištena je rendgenska difrakcijska analiza (XRD). Analiza je provedena pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000 s $\text{CuK}\alpha$ ($1,5406 \text{ \AA}$) zračenjem pri naponu u cijevi od 40 kV i jakosti struje od 30 mA. Snimanja su provedena u mjernom području kuteva $3^\circ < 2\theta > 60^\circ$ brzinom snimanja od $0,2^\circ/5\text{s}$.

3.3.2. Rietveldova metoda utočnjavanja

Za obradu podataka Rietveldovom metodom utočnjavanja korišten je računalni program DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0 pomoću kojeg je određen udio pojedinih faza u

ukupnom uzorku, te parametri elementarnih ćelija uzoraka OCP-a. Svim uzorcima dodan je Si (NIST SRN 640e, Sigma Aldrich) kao standard (ICDD 27-1402) u masenom udjelu od 5,0 mas.%, te je korištena kristalografska baza ICDD (engl. *International Centre of Diffraction Data*) za identifikaciju kristalnih faza.

3.3.3. Mjerenje pH reakcijskih otopina

pH vrijednost reakcijskih otopina mjerena je na kraju reakcije pri sobnoj temperaturi na Schottovom CG pH-metru uz BlueLine14 elektrodu s preciznošću od $\text{pH} = 0,01$.

3.3.4. Pretražna elektronska mikroskopija

Morfologija kristala OCP-a i pripremljenih okosnica analizirana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prije početka snimanja uzorci se pomoću uređaja za napanje izlažu utjecaju plazme zlata i paladija u trajanju od 90 sekundi kako bi se osigurala njihova vodljivost. Korišten je pretražni elektronski mikroskop TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 kV.

3.3.5. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Infracrveni spektri s Fourierovim transformacijama (FTIR) pripremljenih uzoraka OCP-a i kompozitnih okosnica snimljeni su ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometrom s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani 32 puta u apsorpcijskom režimu i mjernom području valnog broja od 4000 do 400 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1} pri 20°C .

3.3.6. Antibakterijska svojstva

Antibakterijsko djelovanje pripremljenih uzoraka OCP-a ispitano je na bakteriji *S. aureus* (ATCC 25923). Bakterije su kriogeno skladištene, a zatim revitalizirane 24 sata prije ispitivanja na pločama Luria Bertani (LB) agara koje sadrže 10 g triptona, 5 g aktivnog sastojka kvasca, 5 g NaCl, 15 g agar i 1 L deionizirane vode pri temperaturi od 37°C .

Provedena je disk difuzijska metoda prema standardiziranoj metodi za antibiotska ispitivanja (EUCAST). Pripremljena je suspenzija s 3×10^8 stanica/ml (0,5 McFarland) bakterija u sterilnoj fiziološkoj otopini. Sterilni štapići za bris uronjeni su u suspenziju, te nanoseni na ploče LB

agara kako bi došlo do rasta bakterija. Praškasti uzorci OCP, OCP_1MIX i OCP_2,5MIX su prešani i oblikovani u diskove promjera 11 mm, a zatim postavljeni na površinu inokuliranog agara i inkubirani. Uzorci su pažljivo uklonjeni s površine agara i postavljeni na sterilnu Petrijevu zdjelicu tako da površina uzorka koja je bila u kontaktu s inokuliranim agarom je okrenuta prema gore. Uzorcima je dodana otopina 2% paraformaldehida u otopini fosfatnog pufera (PBS) kako bi se prekrila njihova površina i tako fiksirale bakterijske stanice pri temperaturi od 4°C u periodu od 24 sata. Zatim je uslijedilo ispiranje uzoraka sterilnom otopinom PBS-a, te dehidratacija uranjanjem uzoraka u otopinama etanola: 30%/2 min, 50%/2 min, 70%/2 min, 96%/5 min, 99,9%/5 min, 99,9%/5 min. Uzorci su sušeni 30 min na temperaturi 50°C te napareni plazmom zlata i paladija 180 s. Površina uzoraka analizirana je pomoću SEM metode, a mikrografije uzoraka i bakterija obojene su u Adobe Photoshop 2022 programu.

3.3.7. Poroznost i distribucija pora kompozitnih uzoraka

Poroznost okosnica ($n = 5$) mjerena je prema Arhimedovom zakonu. Poroznost je izračunata kao omjer volumena pora i ukupnog volumena okosnice prema jednadžbi 5:

$$Poroznost (\%) = \frac{V_{pore}}{V_{CHT/OCP}} \quad (5)$$

Uzorci cilindričnog oblika promjera 6 mm i visine 1 mm su izvagani u suhom stanju (W_d), zatim uronjeni u otopinu etanola ($\rho = 0,789 \text{ g cm}^{-3}$) pod vakuumom pri sobnoj temperaturi, te nakon uklanjanja viška etanola, izvagani u mokrom stanju (W_e). Volumen pora izračunat je prema jednadžbi 6:⁹⁵

$$V_{pore} = \frac{W_e - W_d}{\rho_{etanol}} \quad (6)$$

Distribucija pora određena je pomoću ImageJ računalnog programa na 100 pora koristeći mikrografije dobivene pomoću SEM-a.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANORGANSKA FAZA

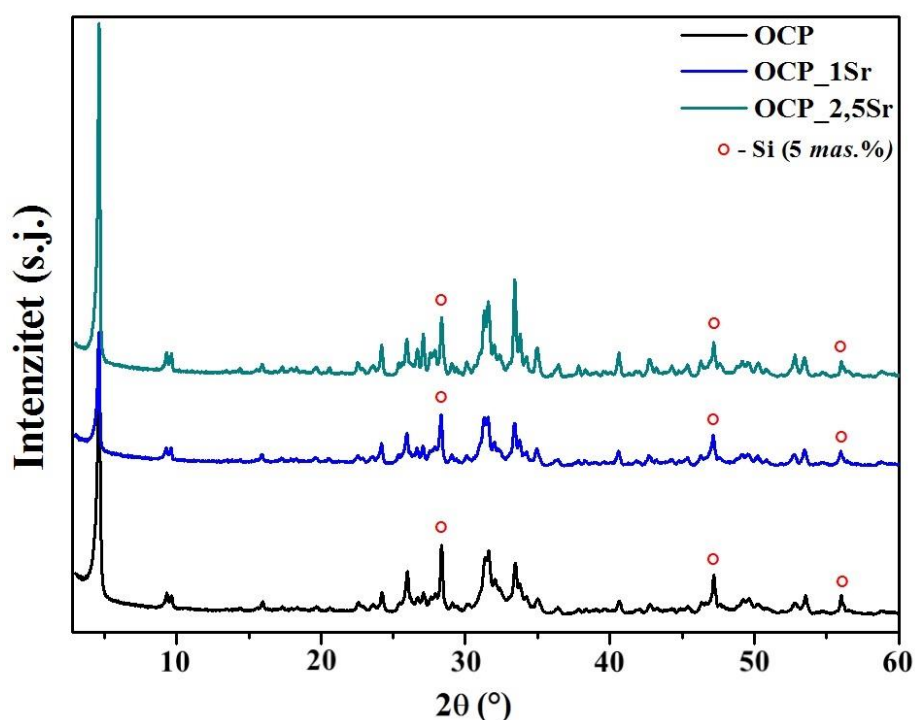
4.1.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Provedena je rendgenska difrakcijska analiza nesupstituiranog i metalnim ionima supstituiranog OCP-a te su difraktogrami prikazani na slikama 6–8. Prije rendgenske difrakcije analize u uzorke je umiješano 5 mas.% silicija (ICDD 27-1402) kao unutarnjeg standarda kako bi se provela kvantitativna analiza Rietveldovom metodom utočnjavanja. Rezultati parametara elementarne ćelije (Å), masenih udjela faza (mas.%) i konačne pH vrijednosti suspenzija pri sobnoj temperaturi prikazani su u tablicama 3–5.

Difraktogrami OCP-a supstituiranih s 0, 1 i 2,5 mol.% Sr^{2+} iona (slika 6) pokazuju karakteristične difrakcijske maksimume za OCP (ICDD 79-0423). Izostanak maksimuma karakterističnih za stroncijeve spojeve ukazuje na uspješnu supstituciju Sr^{2+} ionima u kristalnu rešetku OCP-a. Međutim, djelomična adsorpcija Sr^{2+} iona na površini kristala ne može biti isključena. Daljnjom obradom rezultata pomoću Rietveldove metode utočnjavanja utvrđeno je da uzorci osim OCP-a kao kristalne faze sadrže značajnu količinu ACP-a (tablica 3). Kvantitativni fazni udjeli OCP i ACP faze nemaju značajne razlike s povećanjem udjela supstitucije, te udio OCP-a u uzorcima iznosi OCP - 46,2 mas.%, OCP_1Sr - 43,9 mas.%, OCP_2,5Sr - 47,7 mas.%. Iako OCP ima metastabilnu strukturu koja ima tendenciju prijelaza u stabilnu apatitnu fazu, usporedbom difraktograma s karticom ICDD 09-0432 i Rietveldovom metodom utočnjavanja nije zabilježena prisutnost HAp-a što je u skladu s istraživanjem Rokidi i Koutsoukus⁵⁷ gdje je utvrđeno da prisutnost Sr^{2+} iona inhibira ili usporava transformaciju OCP-a u stabilnu HAp fazu. S povećanjem udjela Sr-supstitucije povećavaju se parametri jedinične ćelije. Parametri *b* i *c* povećavaju se linearno, dok pravilno povećanje parametra *a* nije uočeno. Razlog porasta parametara jedinične ćelije je razlika u ionskim radijusima Ca^{2+} i Sr^{2+} iona. Ionski radijus Sr^{2+} (0,120 nm) veći je od ionskog radijusa Ca^{2+} iona (0,100 nm) stoga dolazi do povećanja volumena ćelije. Isti trend uočen je u istraživanju Ressler i suradika⁶⁴ kod pripreve trofaznog sustava HAp, OCP i ACP supstituiranom Sr^{2+} ionima (0, 1, 5 i 10 mol.%). Shi i suradnici⁷¹ pripravili su Sr-supstituirani OCP (5 mol.%) te je opaženo da su pikovi na XRD difraktogramima pomaknuti ulijevo u odnosu na nesupstituirani OCP. To upućuje na deformaciju kristalne rešetke i veći međuplošni razmak. Prema Braggovoj jednadžbi, smanjenje difrakcijskog kuta je posljedica povećanja međuplošnog razmaka, što odgovara

širenju rešetke. Sr^{2+} ioni se u OCP strukturu mogu supstituirati na položaje Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8 čije su energije supstitucije niže u odnosu na HAp.¹⁷

Uz temperaturu, koncentraciju kalcija i fosfata i prisutnost drugih iona, jedan od glavnih parametara u procesu nastajanja CaP je pH vrijednost. Različite CaP faze nastajat će se pri različitim pH vrijednostima, pa tako pri pH u rasponu 4–6 nastaje DCPD, 5,5–7 nastaje OCP, te pri pH vrijednostima > 7 nastaje HAp.⁹⁶ pH vrijednosti suspenzija pripremljenih uzoraka pogodne su za nastajanje OCP-a, jer se nalaze u rasponu 5,5–5,9.⁸



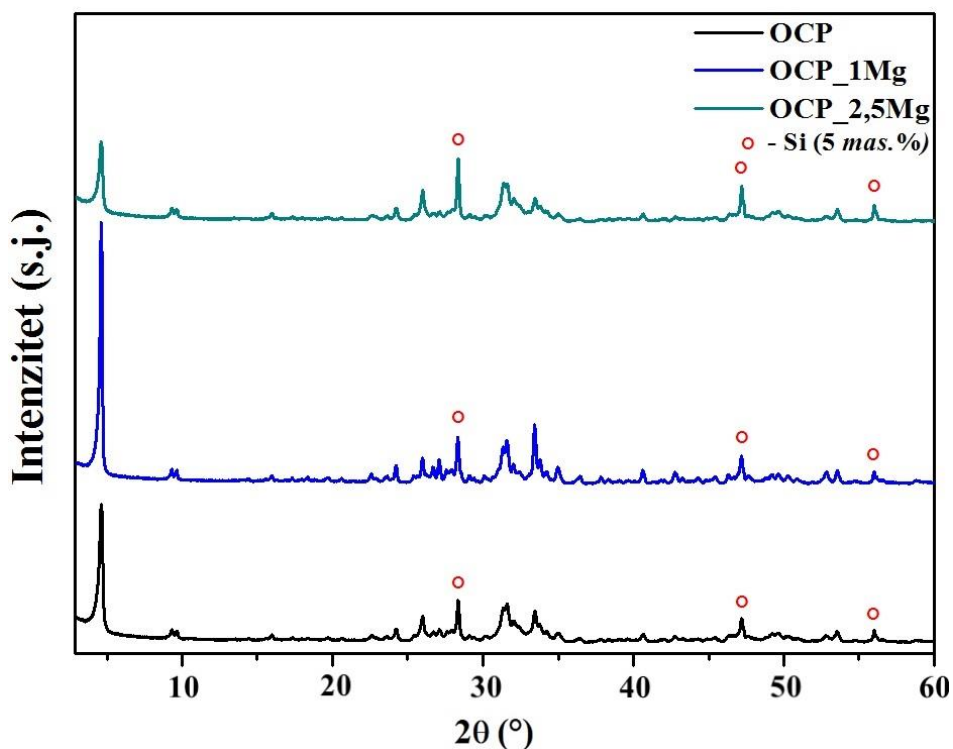
Slika 6. Difraktogram nesupstituiranog i Sr-supstituiranog oktakalcij fosfata pentahidrata.

Tablica 3. Prikaz parametara elementarne ćelije, masenih udjela faza i pH vrijednosti za uzorke supstituirane Sr^{2+} ionima.

Uzorak	Parametri elementarne ćelije				Maseni udio faza (%)		pH vrijednosti
	Volumen ćelije (Å^3)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	OCP	ACP	
OCP	1225,05	19,71800	9,55625	6,84438	46,17	53,83	5,75
OCP_1Sr	1228,76	19,71793	9,57027	6,85312	43,86	56,14	5,48
OCP_2,5Sr	1230,74	19,71891	9,57129	6,85733	47,69	52,31	5,88

Difraktogrami OCP-a supstituiranih s 0, 1 i 2,5 mol.% Mg^{2+} iona prikazani na slici 7 pokazuju karakteristične difrakcijske maksimume za OCP (ICDD 79-0423) s pikom najvišeg intenziteta pri $2\theta = 4,7^\circ$. Osim kristalne faze OCP-a, u uzorcima je Rietveldovom metodom utočnjavanja utvrđena značajna količina ACP-a. Iz tablice 4 vidljivo je da povećanjem udjela supstitucije dolazi do smanjenja masenog udjela OCP faze: OCP - 46,2 mas.%, OCP_1Mg - 41,6 mas.%, te OCP_2,5Mg - 33,4 mas.%. Smanjenje udjela OCP-a upućuje na inhibicijski učinak Mg^{2+} iona na kristalizaciju.

Supstitucijom OCP-a ionima manjeg ionskog radijusa poput Mg^{2+} (0,072 nm) iona dolazi do smanjenja parametara elementarne ćelije.⁷⁴ Parametri b i c za uzorak OCP_1Mg nisu se mijenjali nakon supstitucije, a dolazi do smanjenja parametra a . Tek je povećanjem udjela supstitucije došlo do smanjenja svih parametara, te se volumen ćelije uzorka OCP_2,5Mg smanjio s 1225,05 Å³ (OCP) na 1220,96 Å³. pH vrijednosti suspenzija Mg-supstituiranih uzoraka pogoduju nastanku OCP faze jer se nalaze u željenom rasponu 5,6–5,8.

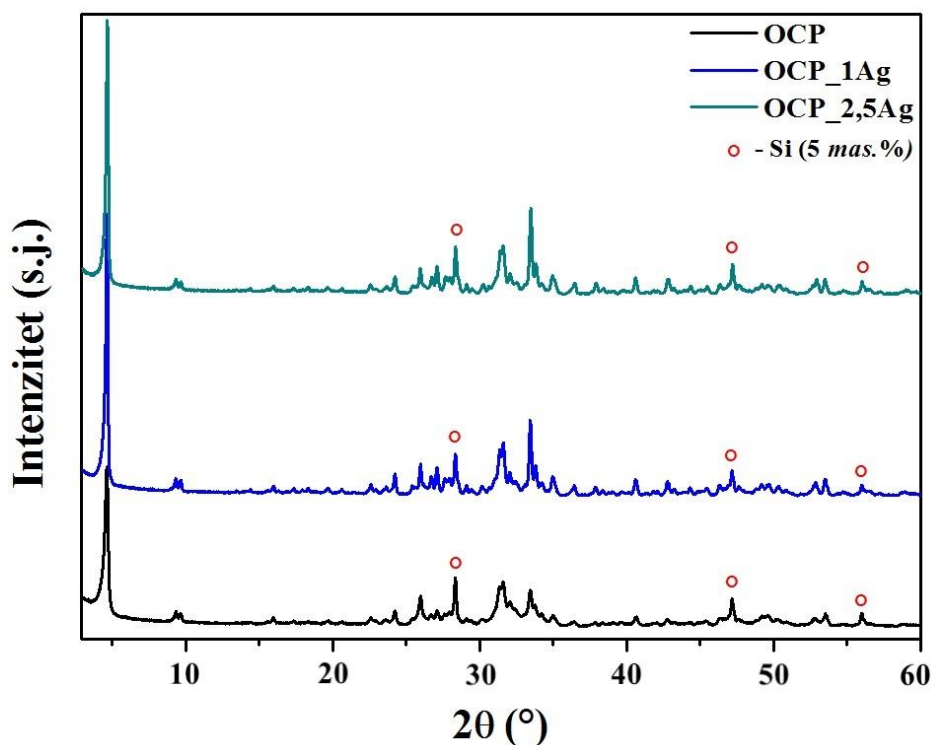


Slika 7. Difraktogram nesupstituiranog i Mg-supstituiranog oktakalcij fosfata pentahidrata.

Tablica 4. Prikaz parametara elementarne ćelije, masenih udjela faza i pH vrijednosti za uzorke supstituirane Mg^{2+} ionima.

Uzorak	Parametri elementarne ćelije (\AA^3)				Maseni udio faza (%)		pH vrijednosti
	Volumen ćelije (\AA^3)	a (\AA)	b (\AA)	c (\AA)	OCP	ACP	
OCP	1225,05	19,71800	9,55625	6,84438	46,17	53,83	5,75
OCP_1Mg	1224,89	19,71359	9,55625	6,84438	41,63	58,37	5,61
OCP_2,5Mg	1220,96	19,70353	9,54915	6,83903	33,37	66,63	5,78

Difraktogrami OCP-a supstituirani s 0, 1 i 2,5 mol.% Ag^+ iona prikazani na slici 8 pokazuju karakteristične difrakcijske maksimume za OCP (ICDD 79-0423). Sukladno prethodnim uzorcima, Rietveldovom metodom utočnjavanja utvrđeno je da uzorci osim OCP-a kao kristalne faze sadrže značajnu količinu ACP-a (tablica 5). Kvantitativni fazni udjeli OCP faze se mijenjaju povećanjem udjela supstitucije, ali bez uočene pravilnosti (OCP - 46,2 mas.%, OCP_1Ag - 61,4 mas.%, OCP_2,5Ag - 37,2 mas.%). Supstitucijom ionima većeg radijusa dolazi do povećanja parametara elementarne ćelije. Budući da ionski radijus Ag^+ iznosi 0,126 nm, a radijus Ca^{2+} iona 0,100 nm, kod uzoraka OCP_1Ag i OCP_2,5Ag uočeno je povećanje svih parametra elementarne ćelije uslijed porasta udjela supstitucije. pH vrijednosti suspenzija Ag-supstituiranih uzoraka pogodne su za nastanak OCP faze jer se nalaze u željenom rasponu 5,7–6,2.



Slika 8. Difraktogram nesupstituiranog i Ag-supstituiranog oktalcij fosfata pentahidrata.

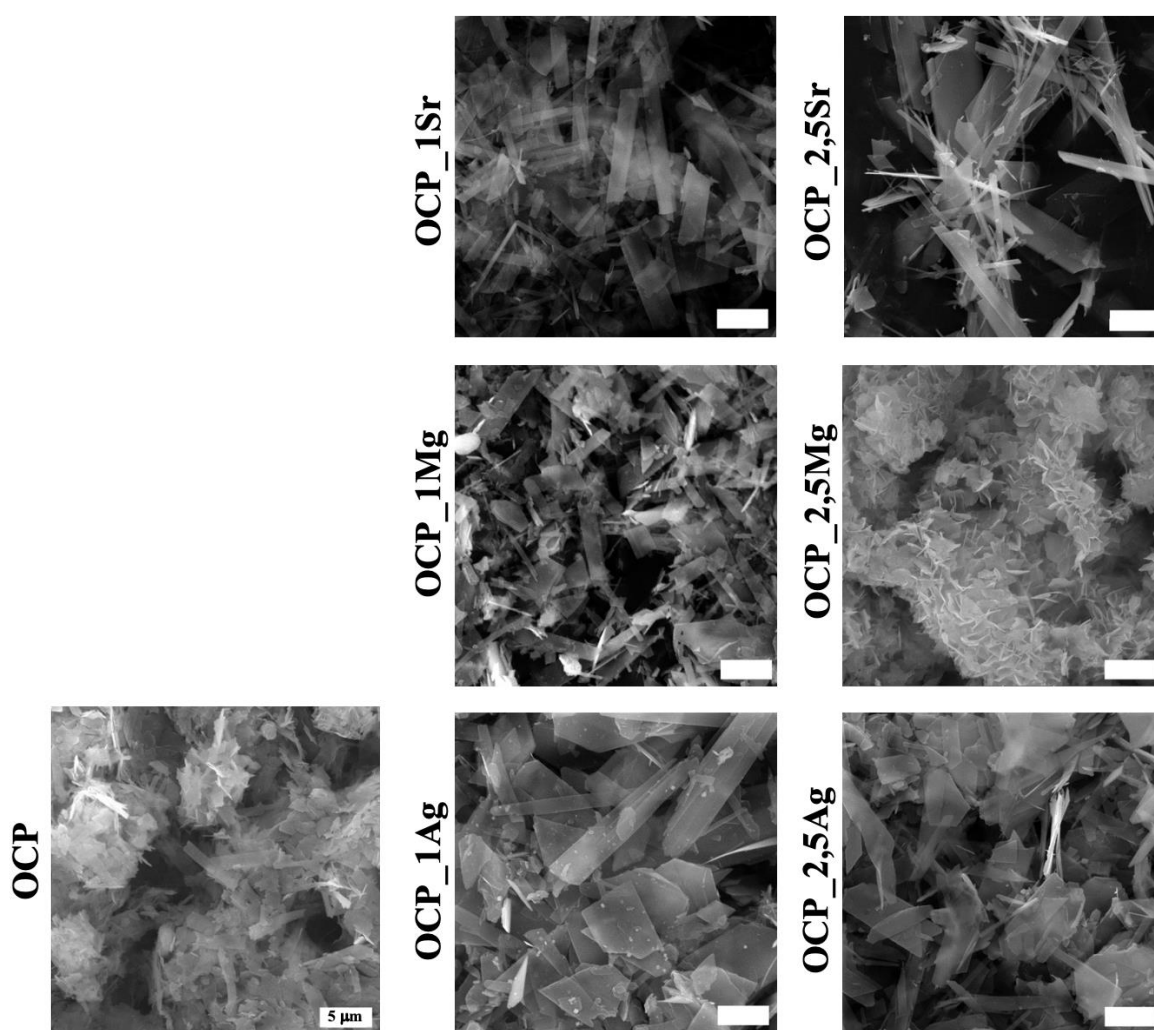
Tablica 5. Prikaz parametara elementarne ćelije, masenih udjela faza i pH vrijednosti za uzorke supstituirane Ag⁺ ionima.

Uzorak	Parametri elementarne ćelije (Å ³)				Maseni udio faza (%)		pH vrijednosti
	Volumen ćelije (Å ³)	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	OCP	ACP	
OCP	1225,05	19,71800	9,55625	6,84438	46,17	53,83	5,75
OCP_1Ag	1226,05	19,72180	9,55826	6,84818	61,42	38,58	6,54
OCP_2,5Ag	1227,46	19,73061	9,56476	6,85520	37,23	62,77	6,19

4.1.2. Pretražna elektronska mikroskopija

Pretražnom elektronskom mikroskopijom proučavana je morfologija praškastih uzoraka OCP-a supstituiranih s 0, 1 i 2,5 mol.% Sr²⁺, Mg²⁺ i Ag⁺ ionima (slika 9). Kod nesupstituiranog uzorka vidljiv je karakterističan pločasti oblik kristala OCP-a.¹⁷ Morfologije uzorka OCP_1Sr i OCP_2,5Sr pokazuju povećanje veličine kristala uslijed supstitucije Sr²⁺ ionima što je u skladu s povećanjem parametara elementarne ćelije. Prema literaturi, povećanjem molarnog udjela Sr-supstitucije, širina kristala raste, dok se duljina smanjuje. To je rezultat rasta kristala u smjeru *a* i *b* osi, te postupne inhibicije rasta u smjeru *c* osi.⁷¹ Za ione manjeg ionskog radijusa,

kao što je Mg^{2+} karakteristično je da se vežu za centre nukleacije i sprječavaju rast kristala,⁹⁷ pa tako morfologije uzorka OCP_2,5Mg ukazuju na promjenu oblika kristala i narušenu kristalnu strukturu u odnosu na nesupstituirani uzorak, dok između uzoraka OCP-a i OCP_1Mg nema vidljive razlike. Dobiveni rezultat je u skladu s rezultatima kvantitativne analize gdje uzorak OCP_2,5Mg sadrži najniži udio OCP faze (33,4 mas.%), odnosno najviši udio ACP faze (66,6 mas.%). Supstitucijom OCP-a Ag^+ ionima veličina kristala raste u smjeru *a*, *b* i *c* osi. Morfologija OCP_1Ag uzorka ukazuje na kristale jasno pločastog oblika što se može povezati s kvantitativnom analizom kojom je utvrđeno da ima najveći udio OCP faze (61,4 mas.%).

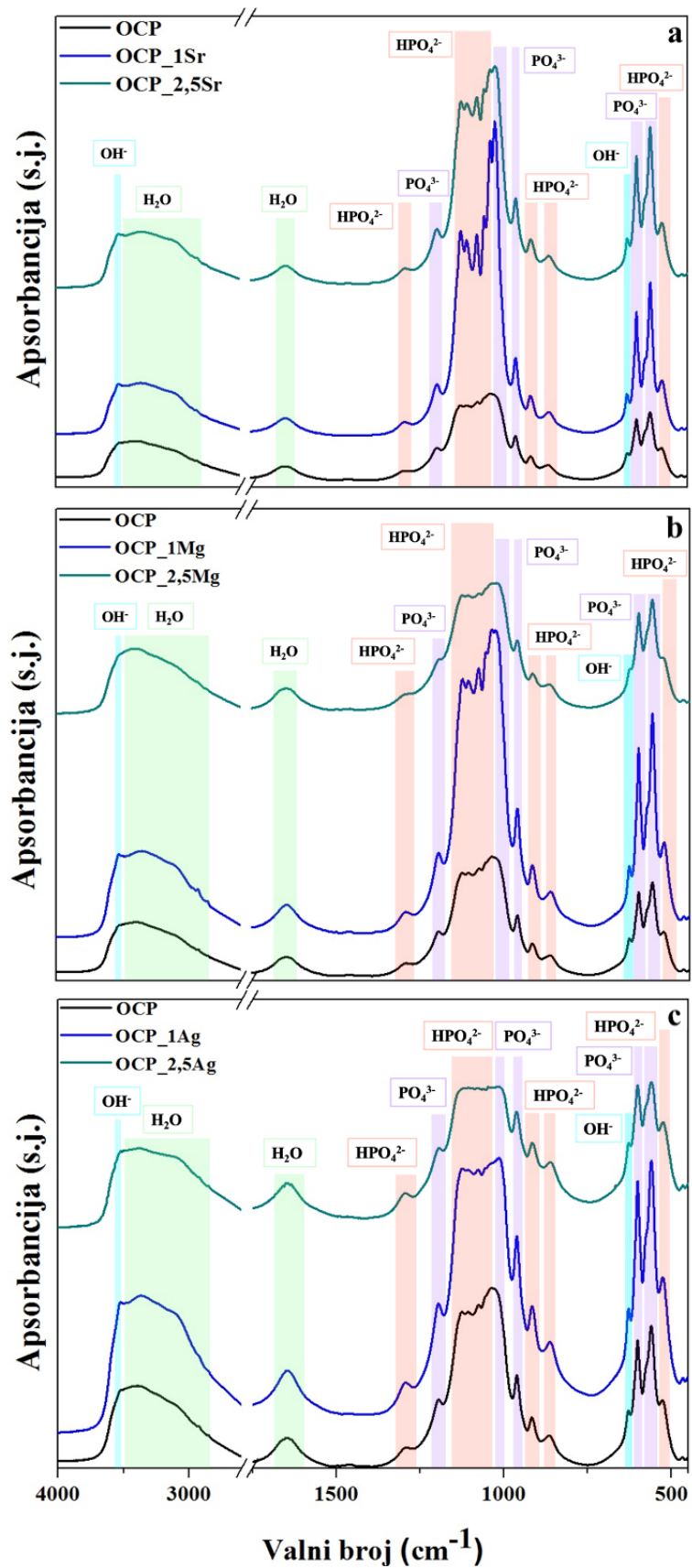


Slika 9. SEM slike kristala oktakalcijeva fosfata pentahidrata supstituiranog stroncijevim, magnezijevim i srebovim ionima. Skala: 5 μ m.

4.1.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Rezultati karakterizacije uzoraka OCP-a supstituiranih s 0, 1 i 2,5 mol.% Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+ ionima infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama prikazana je na slici 10. Svi pripremljeni uzorci imaju slične apsorpcijske spektre.

Vidljive su vrpce karakteristične za fosfatnu (PO_4^{3-}) skupinu na valnim brojevima 560 i 602 cm^{-1} koje odgovaraju simetričnom istezanju O–P–O veze te vrpce na 960, 1019 i 1195 cm^{-1} koje odgovaraju asimetričnom istezanju P–O veze.^{82,98} Rezultati FTIR spektroskopije u skladu su s rezultatima XRD analize, gdje je nastajanje OCP-a potvrđeno pojavom karakterističnih vrpca za hidrogenfosfatnu skupinu (HPO_4^{2-}) na 524, 862, 913, 1077, 1109 i 1294 cm^{-1} . Vrpca pri 862 cm^{-1} pripisuje se karakterističnoj apsorpciji HPO_4^{2-} skupine u hidratiziranom sloju OCP-a, a dublet vrpca na 1077 i 1109 cm^{-1} karakteristične su za OCP.^{71,73,82} Dodatno, pojavljuje se karakteristična vrpca OH^- skupine pri 630 cm^{-1} koja odgovara savijanju O–H veze u apatitnom sloju OCP faze. Osim navedenih vrpca, prisutna je vrpca na 1649 cm^{-1} i široka vrpca u području 3600-3000 cm^{-1} koje se pripisuju vezanoj vodi.⁹⁸



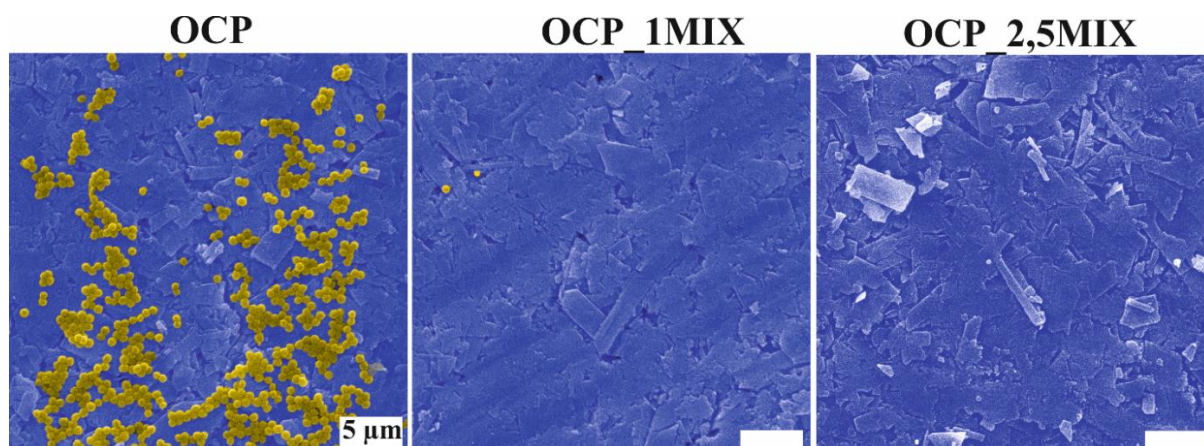
Slika 10. FTIR spektri oktakalcijeva fosfata pentahidrata supstituiranog stroncijevim (a), magnezijevim (b) i srebrovim (c) ionima.

4.1.4. Antibakterijska svojstva

Upotrebom koštanih okosnica u medicini, posebno u ortopedskom i stomatološkom području, postoji značajan rizik od infekcije.⁷⁹ Iako okosnice izrađene uglavnom od CaP-a imaju izvrsna svojstva u regeneraciji koštanog tkiva, one ne posjeduju svojstva koja bi omogućila sprječavanje razvoja bakterija i infekcija.⁹⁹ Jedan od načina suzbijanja rizika od infekcije i odbacivanja usađenog materijala je primjena antibakterijskog sredstva poput srebra u sastavu koštane okosnice.⁷⁹ Antibakterijsko djelovanje srebra temelji se na vezanju Ag^+ iona za proteine na membrani bakterija što uzrokuje oštećenje membrane te dolazi do prodora Ag^+ iona u bakterijsku stanicu uzrokujući staničnu smrt (apoptoza).^{100,101}

Prema istraživanju Jain i suradnika,¹⁰² minimalna koncentracija Ag za postizanje antibakterijskih svojstava prema standardnim bakterijskim kulturama poput *S. aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 117), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC 23564) i dr., iznosi 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Unatoč odličnim antibakterijskim svojstvima srebro može biti štetno za ljudske stanice uslijed prekomjerne koncentracije jer izaziva citotoksičnost. Stoga je prilagođavanje koncentracije srebra u okosnicama od velike važnosti kako bi se postigla zadovoljavajuća antimikrobna aktivnost bez pojave citotoksičnosti.¹⁰³ Mogući pristup ublažavanja štetnosti Ag^+ iona, uz zadržavanje antibakterijskih svojstava, je uključivanje dodatnih ionskih supstitucija (npr. Mg^{2+} , Sr^{2+}) koji potiču osteogenezu. Ressler i suradnici¹⁰⁴ uočili su sinergijski utjecaj Sr^{2+} i Ag^+ iona u antibakterijskom djelovanju prema gram-pozitivnim (*S. aureus*) i gram-negativnim (*E. coli*) bakterijama. Također, istraživanje Gopi i suradnika¹⁰⁵ pokazuje da se supstitucijom Ag-CaP okosnice Mg^{2+} ionima može ublažiti negativni utjecaj srebra i poboljšati vijabilnost stanica. S obzirom na primijećen sinergijski učinak Sr^{2+} i Mg^{2+} s Ag^+ ionima, uzorci za ispitivanje antibakterijskog djelovanja prema *S. aureus* (OCP_1MIX i OCP_2,5MIX) pripremljeni su kao mješavine Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+ iona u različitim molarnim udjelima (1 i 2,5 mol.%).

Morfologija uzoraka nakon kontakta s bakterijama *S. aureus* snimljena je pomoću SEM-a, te prikazana na slici 11 gdje su bakterije obojene žutom, a površina uzoraka plavom bojom. Na nesupstituiranom uzorku OCP-a vidljiva je kolonija bakterijskih stanica okruglog oblika karakterističnog za *S. aureus* bakterije. Samo su dvije bakterijske stanice uočene na uzorku OCP_1MIX, dok uzorak OCP_2,5MIX ne sadrži bakterije. Rezultati upućuju na antibakterijsko djelovanje uzoraka koji u sastavu sadrže Ag^+ ione, te je vidljivo da se povećanjem molarnog udjela iona povećava antibakterijski učinak.



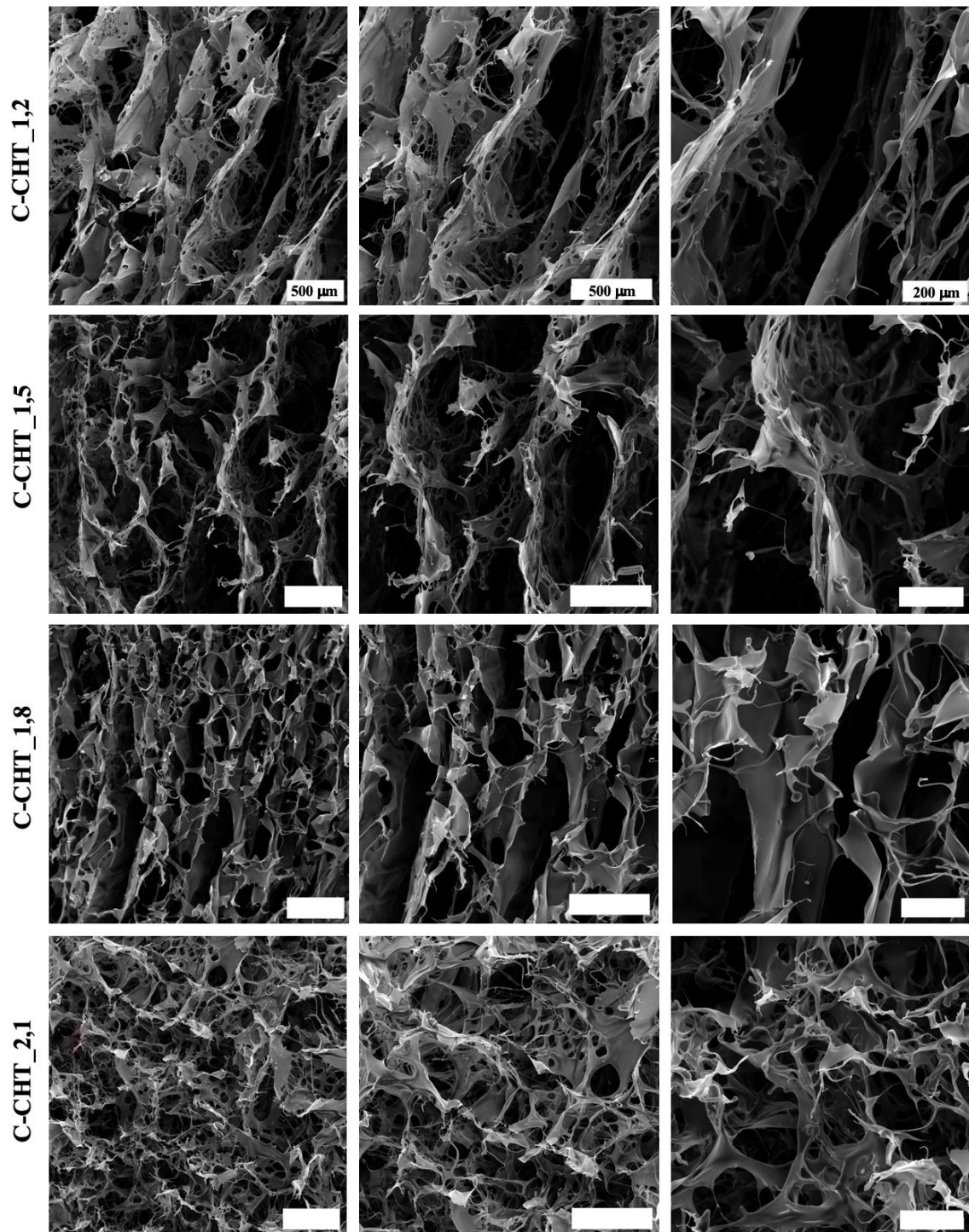
Slika 11. SEM slike bakterija *S. aureus* na diskovima pripremljenih od uzoraka OCP, OCP_1MIX i OCP_2,5MIX. Skala: 5µm.

4.2. ORGANSKA FAZA

Karboksimetil kitozan korišten je kao organska faza za pripravu kompozitnih okosnica. Kako bi se osigurala zadovoljavajuća morfologija, poroznost te distribucija pora kompozitnih okosnica, potrebno je ispitati koncentracije polimera u vodenoj otopini koje omogućuju pripravu okosnica koje zadovoljavaju zadane uvjete inženjerstva koštanog tkiva. Ispitivanja su provedena na uzorcima C-CHT masenih udjela polimera u rasponu 1,2–3,4 mas.%.

4.2.1. Mikrostruktura visokoporoznih okosnica

Pretražni elektronski mikroskop korišten je za analizu mikrostrukture i distribucije pora pripremljenih okosnica kitozana. Na slici 12 prikazane su mikrostrukture visokoporoznih okosnica C-CHT_1,2, C-CHT_1,5, C-CHT_1,8 i C-CHT_2,1, dok su na slici 13 prikazane mikrostrukture visokoporoznih okosnica C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1, C-CHT_3,4. Okosnice s manjim udjelom kitozana (C-CHT_1,2, C-CHT_1,5 i C-CHT_1,8) pokazuju listaste strukture, te nemaju zadovoljavajuću mikrostrukturu koja bi trebala oponašati visokoporoznu strukturu koštanog tkiva. Pretpostavlja se da je takva struktura posljedica manjeg udjela polimera i većeg udjela vode. S obzirom na nepovezanost pora i odvajanje slojeva navedene okosnice nisu korištene za daljnju SEM i FTIR analizu. Iako okosnica C-CHT_2,1 ima zadovoljavajuću mikrostrukturu, kao i okosnice C-CHT_1,2, C-CHT_1,5 i C-CHT_1,8, zbog nižeg udjela polimera struktura nije stabilna prilikom rukovanja.

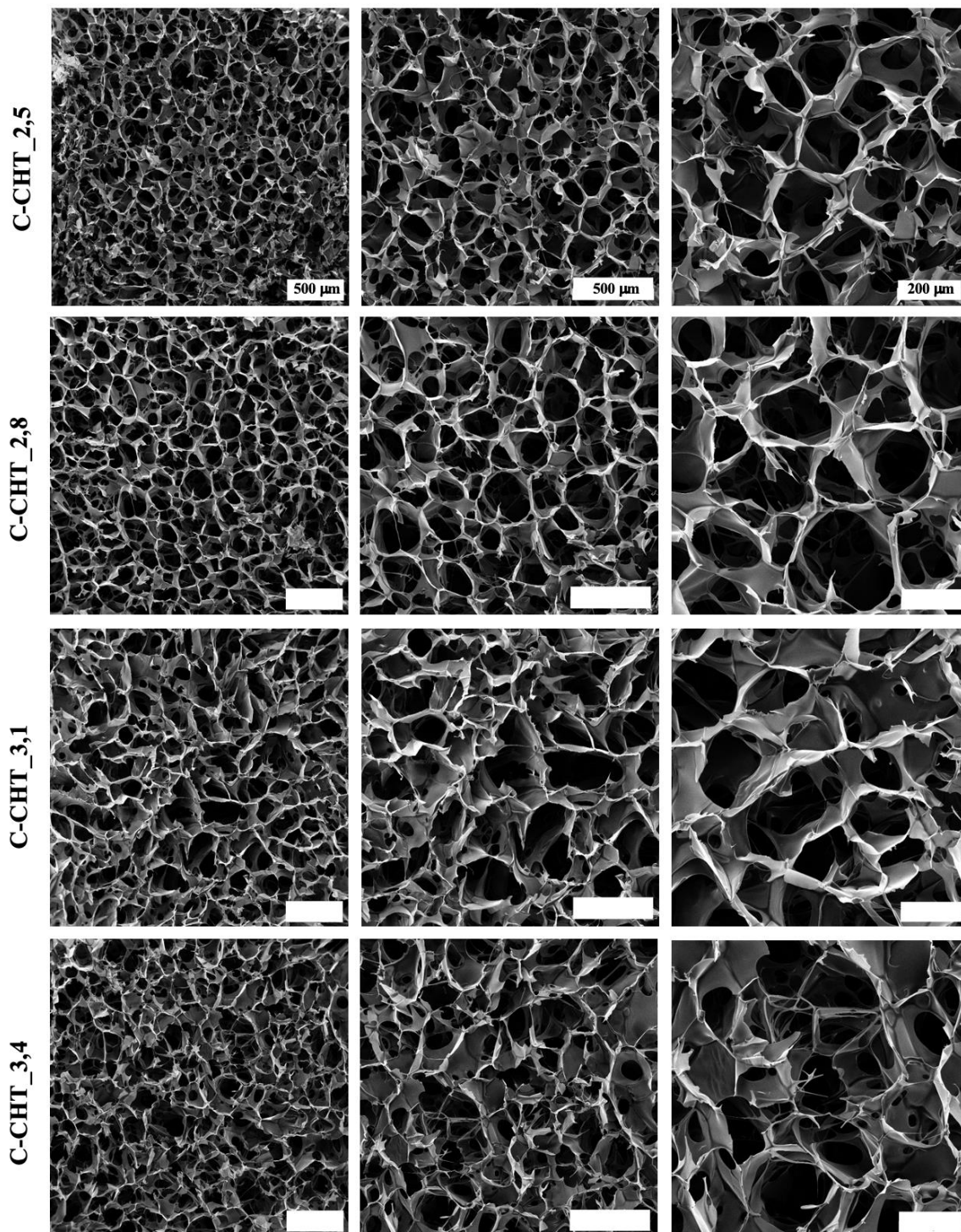


Slika 12. SEM slike struktura uzoraka C-CHT_1,2, C-CHT_1,5, C-CHT_1,8 i C-CHT_2,1.

Skala: 500 μm i 200 μm .

Pore okosnica C-CHT_2,5 C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4 (slika 13) pravilnijeg su oblika te su međusobno povezane što omogućuje integraciju novonastalog tkiva. Nadalje, visokoporozna struktura važna je za difuziju hranjivih tvari i kisika, nastajanje izvanstanične

matrice te olakšano uklanjanje otpadnih tvari (metabolički otpad) iz željenog područja.¹⁰⁶ S obzirom na zadovoljavajuća morfološka svojstva, okosnice viših koncentracija karboksimetil kitozana (C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4) korištene su za daljnju karakterizaciju.

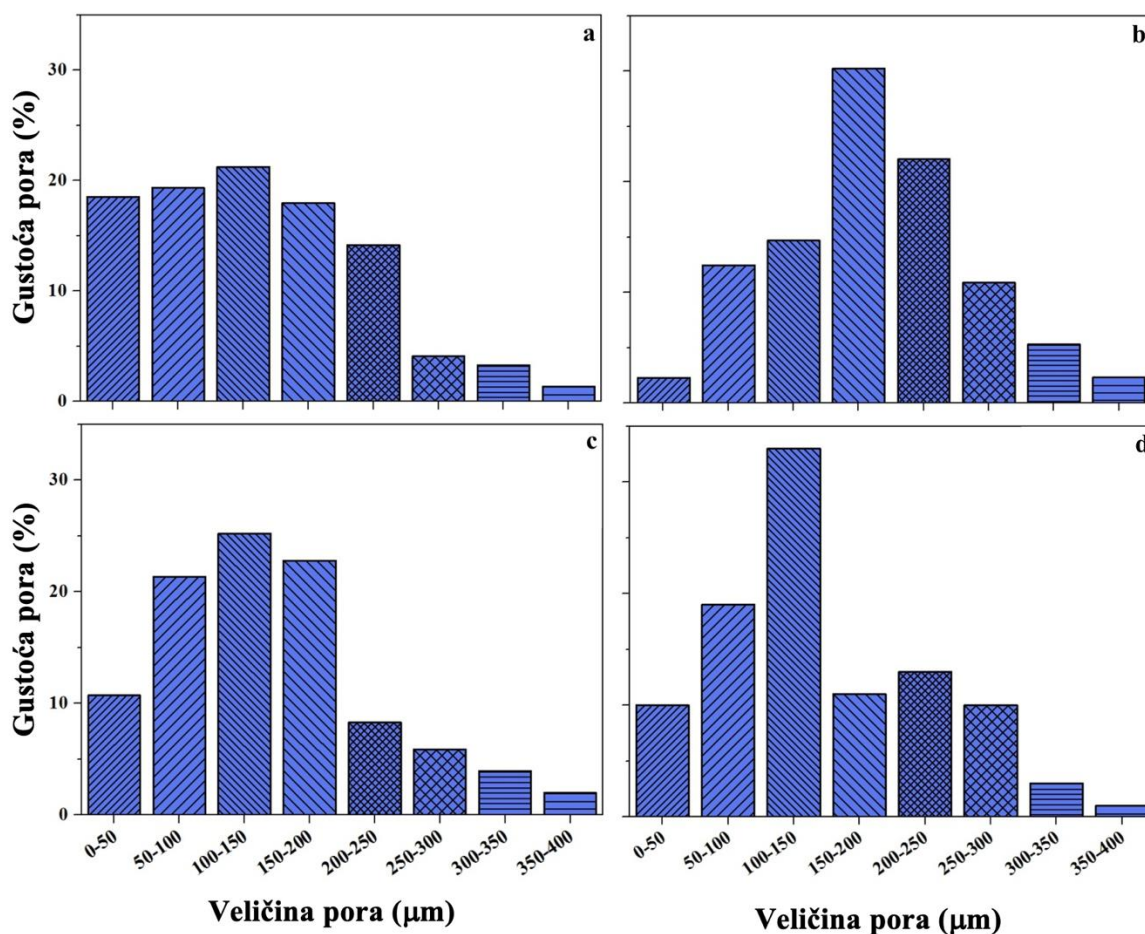


Slika 13. SEM slike struktura uzoraka C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4.

Skala: 500 μm i 200 μm.

4.2.2. Distribucija pora

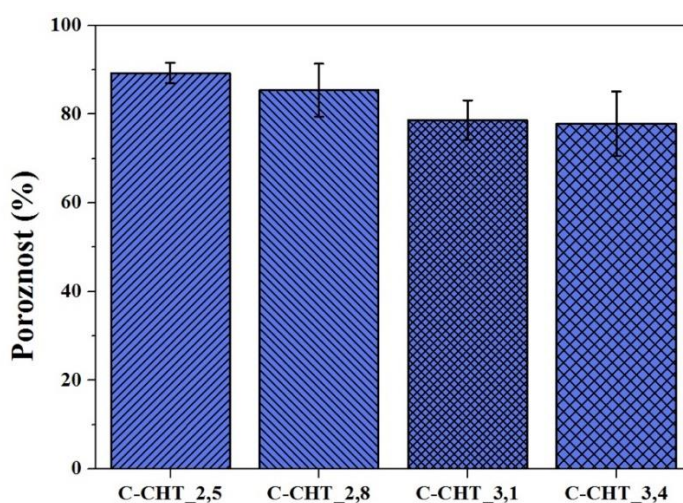
Raspodjele veličina pora za okosnice C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4 prikazane su na slici 14. Veličina pora za sve uzorke nalazi se u jednakom rasponu od 10 do 400 μm ; međutim, distribucija pora u tom rasponu je drugačija. Kod uzoraka C-CHT_2,5, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4 prevladavaju veličine pora u rasponu od 10–250 μm , dok kod uzorka C-CHT_2,8 prevladavaju pore veličine od 50–300 μm . Kod svih uzoraka primijećena je slaba zastupljenost veličina pora u rasponu od 350–400 μm . Promjer pora zadovoljava zahtjeve minimalne veličine kako bi se omogućila vaskularizacija, integracija novonastalog tkiva i spriječilo začepljenje površinskih pora stanicama. Začepljenje površinskih pora okosnice uzrokuje nejednoliku regeneraciju tkiva unutar okosnice. Mikroporoznost ($< 50 \mu\text{m}$) je važna za uspješno nasađivanje stanica, dok makroporoznost ($> 100\text{--}400 \mu\text{m}$) potiče osteogenezu. Međutim, visoka koncentracija makropora može negativno utjecati na mehanička svojstva okosnica.^{68,107}



Slika 14. Raspodjela veličina pora za uzorke C-CHT_2,5 (a), C-CHT_2,8 (b), C-CHT_3,1 (c) i C-CHT_3,4 (d).

4.2.3. Poroznost

Na slici 15 prikazani su rezultati određivanja poroznosti uzoraka C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4. Poroznost C-CHT_2,5 iznosi $89,24\% \pm 2,31\%$, C-CHT_2,8 iznosi $85,37\% \pm 5,96\%$, C-CHT_3,1 iznosi $78,61\% \pm 4,50\%$ i C-CHT_3,4 iznosi $77,80\% \pm 7,23\%$. Između uzoraka nema značajne razlike u poroznosti, a poroznost se nalazi u željenom rasponu 50–90%. Poroznost je usko povezana s mehaničkim svojstvima, te je prilikom izrade okosnica potrebno kompenzirati između visoke poroznosti i zadovoljavajućih mehaničkih svojstava.⁶⁸



Slika 15. Prikaz poroznosti uzoraka C-CHT_2,5, C-CHT_2,8, C-CHT_3,1 i C-CHT_3,4.

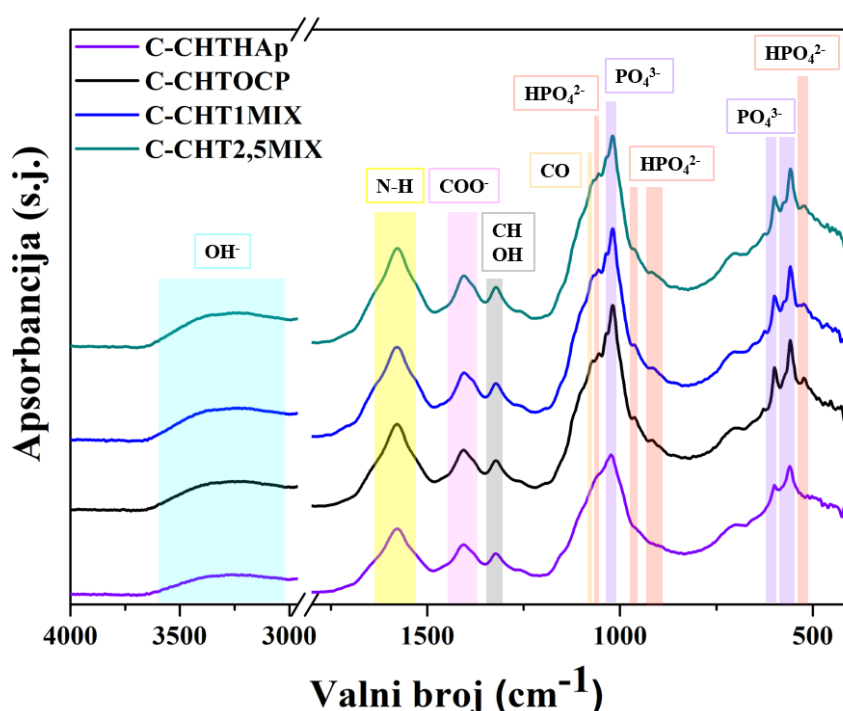
4.3. KOMPOZITNE OKOSNICE

Za daljnju pripremu kompozitnih okosnica odabran je uzorak C-CHT_3,1 s obzirom na zadovoljavajuću mikrostrukturu, distribuciju pora, poroznost i lakoću rukovanja. Uz nesupstituirani OCP, kao anorganska faza korišteni su uzorci OCP_1MIX i OCP_2,5MIX koji sadrže Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+ ione kako bi se ispitaio istovremeni utjecaj iona na svojstva kompozitnih materijala. Dodatno, pripremljene okosnice na temelju C-CHT i HAp-a korištene su kao kontrola.

4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Kompozitni materijali C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX na temelju C-CHT i CaP biokeramike imaju slične apsorpcijske spektre (slika 16). Karakteristične

vrpce za PO_4^{3-} skupinu prisutne su kod svih kompozitnih materijala na 556 , 600 i 1020 cm^{-1} , dok su karakteristične apsorpcijske vrpce za HPO_4^{2-} skupinu vidljive na valnim brojevima 520 , 915 , 959 i 1054 cm^{-1} .^{47,108} Apsorpcijske vrpce kitozana vidljive na 1320 cm^{-1} karakteristične su za C–H i O–H vezu prstena, na 1404 cm^{-1} za COO– skupinu, na 1577 za N–H vezu, dok vrpca na 1040 cm^{-1} odgovara istezanju C–O–C glikozidne veze.^{29,109-111} Vrpca na valnom broju 1577 cm^{-1} karakteristična za N–H vezu preklapa se sa vrpcom karakterističnom za karboksimetilnu skupinu C-CHT polimera.¹¹¹ Široka vrpca u području $3600-300\text{ cm}^{-1}$ odgovara fizikalno vezanoj vodi.⁹⁸

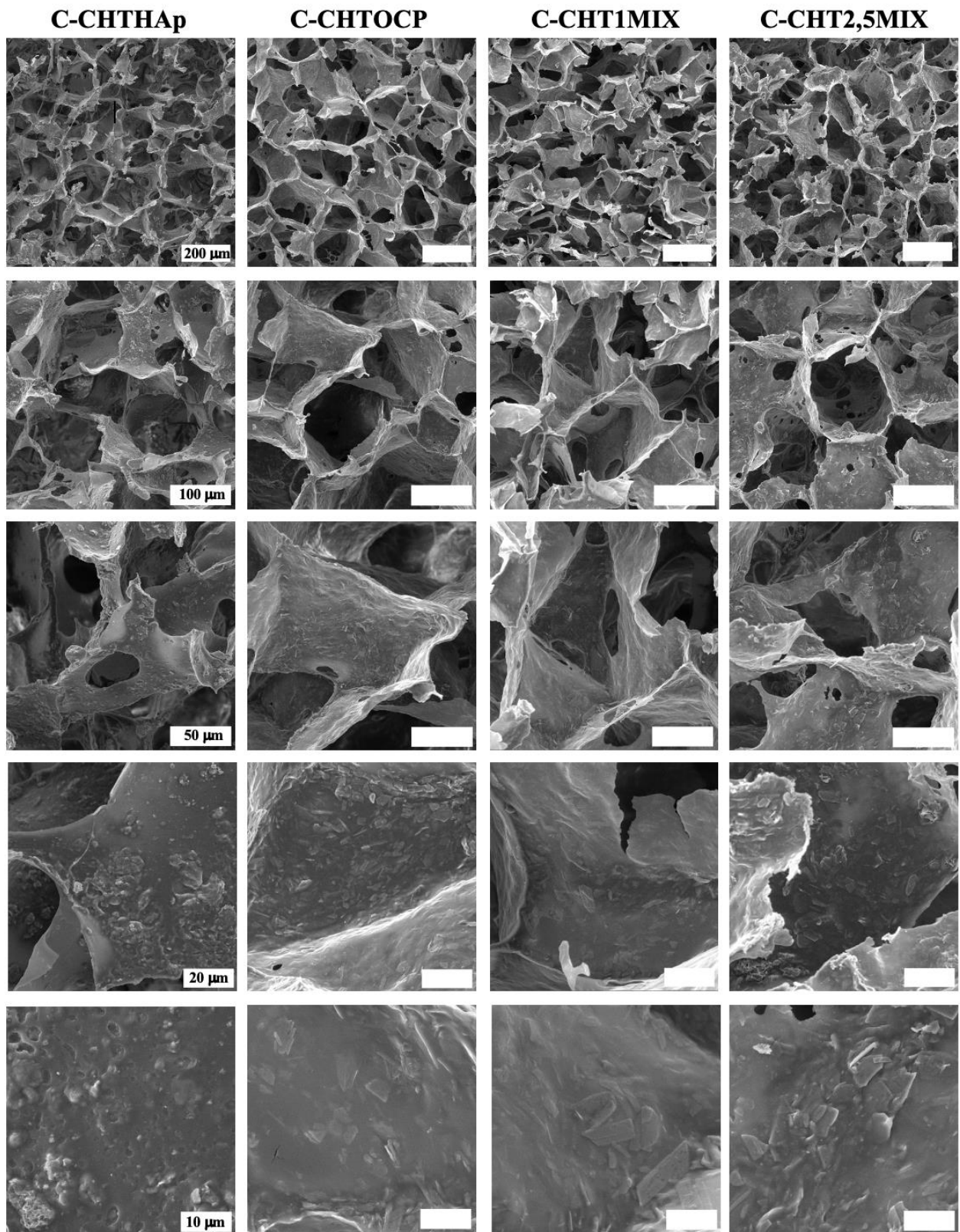


Slika 16. FTIR spektar kompozitnih okosnica C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX.

4.3.2. Mikrostruktura visokoporoznih kompozitnih okosnica

Kompozitne okosnice C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX pripremljene su umješavanjem OCP-a u polimernu maticu karboksimetil kitozana te je mikrostruktura poroznih okosnica istražena SEM analizom (slika 17). Okosnice zadržavaju visokoporoznu strukturu polimera te se mikrostruktura između pripremljenih okosnica ne razlikuje. Nadalje, anorganska faza homogeno je raspodijeljena u polimernoj matrici te je

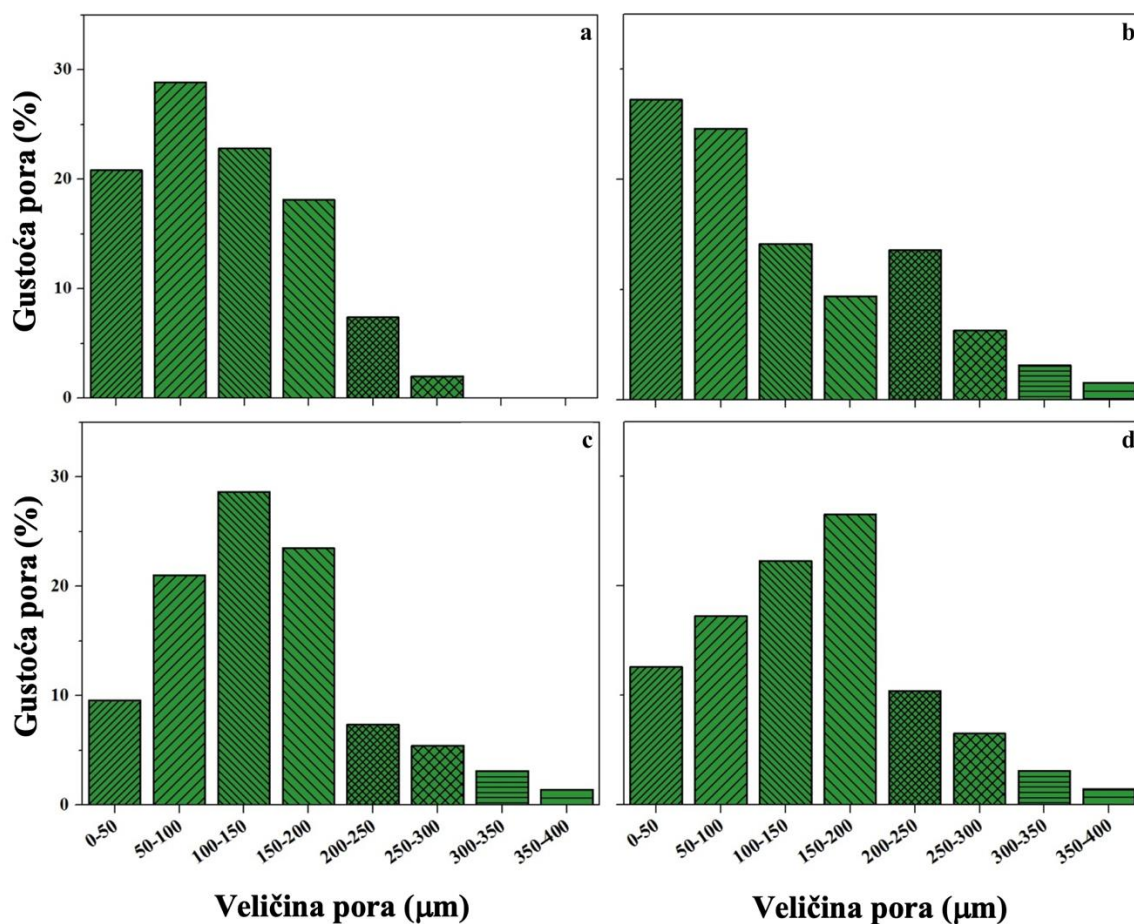
očuvan pločasti oblik kristala OCP-a. Za razliku od kristala OCP-a, kod kontrolnog uzorka (C-CHTHAp) vidljivi su sferni oblici kristala apatita.



Slika 17. SEM slike pripremljenih kompozitnih okosnica C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX. Skala: 200, 100, 50, 20 i 10 μm .

4.3.3. Distribucija pora

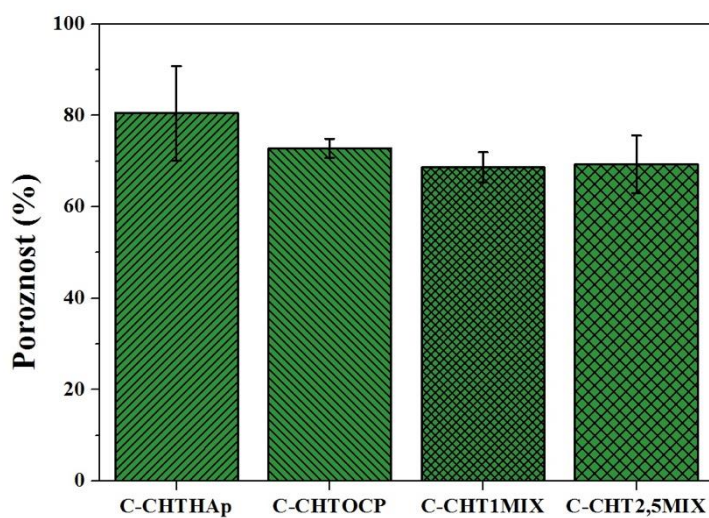
Raspodjela veličina pora za okosnice C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX prikazana je na slici 18. Sve okosnice imaju širok raspon pora. Okosnica C-CHTHAp (kontrolni uzorak) ima manje veličine pora (20–300 μm) u odnosu na kompozitne okosnice pripravljene s OCP-om čije se pore nalaze u rasponu od 20 do 400 μm . Uzorci C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX pokazuju veću raznovrsnost pora u odnosu na kompozit bez iona. Prevladavaju veličine pora do 200 μm čime je zadovoljen zahtjev minimalne veličine pora.⁶⁸ Pore veličine 100–400 μm (makroporoznost) pogodne su za osteoprovodnost i regeneraciju tkiva, dok mikroporoznost okosnice omogućuje uspješno nasadivanje stanica, uspostavljanje veza između stanica te stanica i tkiva.¹¹²



Slika 18. Raspodjela veličina pora za kompozite C-CHTHAp (a), C-CHTOCP (b), C-CHT1MIX (c) i C-CHT2,5MIX (d).

4.3.4. Poroznost

Na slici 19 prikazani su rezultati određivanja poroznosti uzoraka C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX. Poroznost kompozitne okosnice C-CHTHAp iznosi $80,51\% \pm 10,35\%$, dok je poroznost okosnice C-CHTOCP iznosi $72,78\% \pm 2,10\%$, C-CHT1MIX iznosi $68,60\% \pm 3,33\%$ i C-CHT2,5MIX iznosi $69,26\% \pm 6,29\%$. Kompozitne okosnice C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX imaju niže vrijednosti poroznosti u odnosu na C-CHTHAp, ali bez značajne razlike. Sve kompozitne okosnice imaju zadovoljavajuću poroznost za potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva.



Slika 19. Prikaz poroznosti kompozitnih okosnica C-CHTHAp, C-CHTOCP, C-CHT1MIX i C-CHT2,5MIX.

5. ZAKLJUČAK

Metodom precipitacije pripremljeni su uzorci OCP-a supstituirani s 0, 1 i 2,5 mol.% stroncijevih, magnezijevih i srebrovih iona. Pripremljene su i visokoporozne kompozitne okosnice na temelju polimera karboksimetil kitozana i kalcij-fosfatne biokeramike (OCP i ACP) supstituirane metalnim ionima. Na temelju identifikacije i karakterizacije uzoraka može se zaključiti:

- Metoda precipitacije pokazala se kao pogodna metoda za sintezu biomimetičkog kalcij-fosfatnog sustava.
- Metalni ioni (Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+) uspješno su supstituirani u kristalnu strukturu OCP-a, pri čemu supstitucijom iona većeg radijusa dolazi do povećanja parametara elementarne ćelije, dok supstitucijom iona manjeg radijusa parametri se smanjuju.
- Analiza antibakterijskih svojstava potvrdila je antibakterijsko djelovanje Ag^+ iona u praškastim OCP mješavinama prema gram-pozitivnoj *S.aureus* bakteriji.
- Na temelju zadovoljavajuće morfologije, poroznosti i distribucije pora uzorak C-CHT_3,1 odabran je za pripremu kompozitnih okosnica.
- Pretražnom elektronskom mikroskopijom je utvrđena visokoporozna struktura međusobno povezanih i otvorenih pora kompozitnih okosnica.
- Poroznost i distribucija pora kompozitnih materijala je u zadovoljavajućem rasponu za uspješno nasađivanje, migraciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, te vaskularizaciju i regeneraciju koštanog tkiva.

Biomimetičke kompozitne okosnice pripremljene su pomoću biorazgradivog polimera, trodimenzionalne su visokoporozne strukture povezanih pora, te kao takve su pogodne za potencijalnu primjenu u tkivnom inženjerstvu pri koštanim oštećenjima.

Kao daljnji korak karakterizacije ispitat će se biološka svojstava kompozitnih okosnica pomoću ljudskih matičnih stanica kako bi se odredio uzorak s najboljim regenerativnim svojstvima. Pored simulacije bioloških uvjeta u organizmu ispitat će se bubrenje i degradacija pripremljenih okosnica uz prisutnost enzima lizozima tijekom 28 dana.

6. ZAHVALE

Zahvaljujemo se dr. sc. Antoniji Ressler na prenesenom znanju, svakodnevnoj podršci i pomoći pri izvedbi i pisanju rada. Hvala na ugodnoj radnoj atmosferi i motivaciji, ukazanom povjerenju i prijateljskom pristupu.

Zahvaljujemo se doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na pomoći oko istraživanja antibakterijskih svojstava pripremljenih materijala.

Zahvaljujemo se našim obiteljima i prijateljima na neizmjernej potpori, razumijevanju i pomoći.

7. LITERATURA

1. Zhu, G., Zhang, T., Chen, M., Yao, K., Huang, X., Zhang, B., Li, Y., Liu, J., Wang, Y., Zhao, Z., Bone physiological microenvironment and healing mechanism: basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials* **6** (2021) 4110-4140.
2. Agarwal, R., García, A. J., Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* **94** (2015) 53–62.
3. Atala, A., Kasper, F. K., Mikos, A. G., Engineering complex tissues. *Science Translational Medicine* **4** (2012) 1-10.
4. Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala. *Kemija u Industriji* **54** (3) (2005) 131-134.
5. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., Chiellini, E., Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* **35** (2010) 403-440.
6. Cordonnier, T., Sohier, J., Rosset, P., Layrolle, P., Biomimetic materials for bone tissue engineering - state of the art and future trends. *Advanced Engineering Materials* **13** (2011) 135-150.
7. Dorozhkin, S. V., Epple, M., Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition in English* **41** (2002) 3130-3146.
8. Dorozhkin, S. V., Calcium orthophosphates: occurrence, properties and major applications. *Bioceramics Development and Applications* **4** (2014) 1000081.
9. Lafon, J. P., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Processing of AB.type carbonater 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, *Journal of the European Ceramic Society*, **28** (2008) 139-147.
10. Tournis, S., Markis, K., Clinical Use of Bone Turnover Markers in Osteoporosis, Elsevier, Athens, 2018, 1-17.
11. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for ninosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biomaterialia* **9** (8) (2013) 7591-7621.
12. Garskaite, E., Gross, K. A., Yang, S. W., Yang, T. C. K., Yang, J. C., Kareiva, A., Effect of processing conditions on the crysallinity and structure of carbonated calcium hydroxyapatite (CHAp). *The Royal Society of Chemistry* **16** (2014) 3950-3959.

13. Clarke, B., Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3** (2008) 131-139.
14. Reznikov, N., Chase, H., Brumfeld, V., Shahar, R., Weiner, S., The 3D structure of the collagen fibril network in the human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone* **71** (2015) 189-195.
15. Porrelli, D., Abrami, M., Pelizzo, P., Formentin, C., Ratti, C., Turco, G., Grassi, M., Canton, G., Grassi, G., Murena, L., Trabecular bone porosity and pore size distribution in osteoporotic patients – A low field nuclear magnetic resonance and microcomputed tomography investigation. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* **125** (2022) 104933.
16. Renders, G. A. P., Mulder, L., van Ruijven, L. J., van Eijden T. M. G. J., Porosity of human mandibular condylar bone. *J. Anat.* **210** (2007) 239-248.
17. Ressler, A., Ivanišević, I., Žužić, A., Somers, N., The ionic substituted octacalcium phosphate for biomedical applications: A new pathway to follow?. *Ceramics International* **48** (7) (2021) 8838-8851.
18. <https://www.proquest.com/openview/f2f21631bd07dd1dc025d163581d9bec/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750> (pristup 19.3.2022.)
19. Schemitsch, E. H., Size matters: Defining Critical in Bone Defect Size. *J. Orthop. Trauma* **17** (2017) 20-22.
20. Keating, J. F., Simpson, A. H., Robinson, C. M., The management of fractures with bone loss. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **87** (2005) 142-150.
21. Langer, R., Vacanti, J. P., Tissue Engineering. *Science* **1** (1993) 920-926.
22. Khademhosseini, A., Langer, R., A decade of progress in tissue engineering. *Nature protocols* **11** (2016) 1775-1781.
23. Ikada, Y., Challenges in tissue engineering. *Interface* **3** (2006) 589-601.
24. Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M., Julier, Z., Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **7** (469) (2020) 1-9.
25. Cheng, Y. T., Johnson, W. L., Disordered Materials: A Survey of Amorphous Solids. *Science* **235** (1987) 997–1002.
26. Gregorić, S., Augmentacija kosti predvidljivim (sintetskim) materijalima. *Dental Tribune Croatia* **3** (2021) 10.

27. Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S. F., Bone graft substitutes. *Expert Review of Medical Devices* **3** (1) (2016) 49-57.
28. Hung, N. N., Basic Knowledge of Bone Grafting, u: A. Zorzi, J. Batista de Miranda, Bone Grafting, Rijeka, InTech (2012.), 11-39.
29. Ressler, A., Antunović, M., Teruel-Biosca, L., Gallego Ferrer, G., Babić, S., Urlić, I., Ivanković, M., Ivanković, H., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on substituted calcium phosphate/chitosan composite scaffold. *Carbohydrate Polymers* **277** (2022) 118883.
30. Keane, T. J., Badylak, S. F., The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **9** (5) (2015) 504-511.
31. Dohmen, P. M., Konertz, W., Tissue-Engineered Heart Valve Scaffolds. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **15** (6) (2009) 362-367.
32. Bouet, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., Vico, L., In vitro three-dimensional bone tissue models: from cells to controlled and dynamic environment. *Tissue Engineering Part B: Review* **21** (2015) 133–156.
33. Chan, B. P., Leong, K. W., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* **17** (2008) 467–479.
34. Chen, Q., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials, *Topics in Tissue Engineering* **6** (2008) 1–27.
35. Amini, A. R., Laurencin, C. T., Nukavarapu, S. P., Bone Tissue Engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **40** (2012) 363–408.
36. Thavornyutikarn, B., Chantarapanich, N., Sitthiseripratip, K., Thouas, G. A., Chen, Q., Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Progress in Biomaterials* **3** (2014) 61–102.
37. Kumbar, S., Laurencin, C., Deng, M., Natural and Synthetic Biomedical Polymers, first ed., Elsevier, Philadelphia, 2014.
38. Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., Grigolo, B., Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Material Science and Engineering C* **78** (2017) 1246-1262.
39. Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S., Huang, J., Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of European Ceramics Society* **28** (2008) 1319-1327.

40. Tseng, Y. H., Mou, C. Y., Chan, J. C. C., Solid-State NMR Study of the Transformation of Octacalcium Phosphate to Hydroxyapatite: A Mechanistic Model for Central Dark Line Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 6909-6918.
41. Dorozhkin, S. V., Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 4457-4475.
42. Robinson, R. A., Watson, M. L., Crystal–collagen relationships in bone as observed in the electron microscope III crystal and collagen morphology as a function of age. *Annals of New York Academy of Sciences* **60** (1955) 596–660.
43. Eanes, E. D., Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems, Amorphous Calcium Phosphate: Thermodynamic and Kinetic Considerations, Springer, Boston, 1998, 21-39.
44. Boskey, A. L., Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone. *Journal of Dental Research* **76** (1997) 1433-1436.
45. Zhao, J., Liu, Y., Sun, W., Zhang, H., Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chemistry Central Journal* **5** (40) (2011).
46. Brown, W. E., Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: Crystal structure of octacalcium phosphate. *Nature* **196** (1962) 1048-1050.
47. Mathew, M., Takagi, S., Structures of biological minerals in dental research, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **106** (2001) 1035-1044.
48. Bigi, A., Boanini, E., Functionalization of octacalcium phosphate for bone replacement. *Elsevier* (2020) 37-54.
49. Pompe, W., Worch, H., Habraken, W. J. E. M., Simon, P., Kniep, R., Ehrlich, H., Paufler, P., Octacalcium phosphate – a metastable mineral phase controls the evolution of scaffold forming proteins. *J. Mater. Chem. B.* **3** (2015) 5318-5329.
50. Farid, S. B. H., Osteoinduction, osteoconduction, and osseointegration. *Bioceramics: For Materials Science Engineering* (2018) 77–96.
51. Boanini, E., Gazzano, M., Rubini, K., Bigi, A., Collapsed Octacalcium Phosphate Stabilized by Ionic Substitutions. *Crystal Growth and Design* **10** (2010) 3612-3617.
52. Orlovski, V. P., Komlev, V. S., Barinov, S. M., Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials* **10** (2002) 973-984.

53. Naga, S. M., El-Maghraby, H. F., Sayed, M., Saad, E. A., Highly porous scaffolds made of nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshells. *Journal of Ceramic Science and Technoogy* **6** (2015) 237–243.
54. Orlić, S., Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike. Doktorska disertacija, Zagreb (2012).
55. Ressler, A., Žužić, A., Ivanišević, I., Kamboj, N., Ivanković, H., Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceramics* **6** (2021) 100122.
56. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., Ion substitution in calcium phosphates at low temperature. *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 1882 – 1894.
57. Rokidi, S., Koutsokos, P., Crystal growth of calcium phosphates from aqueous solutions in the presence of strontium. *Chemical Engineering Science* **77** (2012) 157-164.
58. Imaizumi, H., Sakurai, M., Kashimoto, O., Kikawa, T., Suzuki, O., Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcified Tissue International* **78** (2006) 45-54.
59. Suzuki, O., Kamakura, S., Katagiri, T., Nakamura, M., Zhao, B., Honda, Y., Kamijo, R., Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* **27** (2006) 2671-2681.
60. Somers, N., Lasgorceix, M., Overview of substitutes for bone Replacement: natural and synthetic products, in: M. Pomeroy (Ed.), *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses*, Elsevier, (2021), 473-492.
61. Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S., Bandyopadhyay, Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology* **31** (2013) 594-605.
62. Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A., Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair. *RSC Advances* **9** (2019) 18124-18146.

63. Suzuki, O., Nakamura, M., Miyasaka, Y., Kagayama, M., Sakurai, M., Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **164** (1991) 37-50.
64. Ressler, A., Cvetnić, M., Antunović, M., Marijanović, I., Ivanković, M., Ivanković, H., Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **108** (2020) 1697-1709.
65. Ressler, A., Antunović, M., Cvetnić, M., Ivanković, M., Ivanković, H., Selenite substituted calcium phosphates: preparation, characterization, and cytotoxic activity. *Materials* **14** (2021) 3436.
66. 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.
67. Wang, W., Yeung, K. W. K., Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. *Bioactive Materials* **2** (2017) 224-247.
68. Ressler, A., Biomaterijali na temelju kitozana i hidroksiapatita supstituiranog metalnim ionima za primjene u tkivnom inženjerstvu. Doktorska disertacija, Zagreb (2020).
69. Pilmane, M., Salma-Ancane, K., Loca, D., Locs, J., Berzina-Clmdina, L., Strontium and strontium ranelate: historical review of some of their functions. *Materials Science and Engineering Part C Biological Application* **78** (2017) 1222-1230.
70. Matsunaga, K., Murata, H., Strontium substitution in bioactive calcium phosphates: a first-principle study. *The Journal of Physical Chemistry B* **113** (2009) 3584-3589.
71. Shi, H., He, F., Ye, J., Synthesis and structure of iron- and strontium-substituted octacalcium phosphate: effect of ionic charge and radius. *Journal of Materials Chemistry B* **4** (2016) 1712-1719.
72. Shi, H., Ye, X., Wu, T., Zhang, J., Ye, J., Regulating the physicochemical and biological properties in vitro of octacalcium phosphate by substitution with strontium in a large doping range. *Materials Today Chemistry* **5** (2017) 81-91.

73. Shi, H., Ye, X., Zhang, J., Wu, T., Zhou, C., Ye, J., A thermostability perspective on enhancing physicochemical and cytological characteristics of octacalcium phosphate by doping iron and strontium. *Bioactive Materials* **6** (2021) 1267-1282.
74. Matsunaga, K., First-principle study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate. *The Journal of Chemical Physics* **8** (2008) 245101.
75. Zeng, S., Shi, H., Yu, T., Zhou, C., Enhanced hydrated properties of alpha-tricalcium phosphate bone cement mediated by loading magnesium substituted octacalcium phosphate. *Advanced Powder Technology* **28** (2017) 3288-3295.
76. Tsyganova, A. A., Golovanova, O. A., Role of Mg^{2+} , Sr^{2+} , and F^- ions in octacalcium phosphate crystalization. *Inorganic Materials* **53** (2017) 1261-1269.
77. Zhang, X., Wang, B., Ma, L., Xie, L., Yang, H., Li, Y., Wang, S., Qiao, H., Lin, H., Lan, J., Huang, Y., Chemical stability, antibacterial and osteogenic activities study of strontium-silver co-substituted fluorohydroxyapatite nanopillars: a potential multifunctional biological coating. *Ceramics International* **46** (2020) 27758-27773.
78. Geng, Z., Cui, Z., Li, Z., Zhu, S., Liang, Y., Lui, Y., Li, X., He, Y., Yu, X., Wang, R., Yang, X., Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Material Science and Engineering: C Materials for Biological Application* **58** (2016) 467-477.
79. Crockett, R., Biochemical composition of the superficial layer of articular cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **67** (2017) 1180-1185.
80. Sugiura, Y., Obika, H., Horie, M., Nitsu, K., Makita, Y., Aesthetic silver-doped octacalcium phosphate powders exhibiting both contact antibacterial ability and low cytotoxicity. *ACS Omega* **5** (2020) 24434-24444.
81. Sugiura, Y., Horie, M., Fabrication of silver-doped apatite powders from silver-substituted octacalcium phosphate powders via solid-solid phase-conversion process. *Ceramics International* **47** (2021) 25614-25621.
82. Honda, Y., Anada, T., Morimoto, S., Shiwaku, Y., Suzuki, O., Effect of Zn^{2+} on the physicochemical characteristics of octacalcium phosphate and its hydrolysis into apatitic phase. *Crystal Growth & Design* **11** (2011) 1462-1468.

83. Suguira, Y., Saito, Y., Endo, T., Makita, Y., Effect of the ionic radius of alkali metal ions on octacalcium phosphate formation via different substitution modes. *Crystal Growth & Design* **19** (2019) 4162-4171.
84. Suguira, Y., Makita, Y., Sodium induces octacalcium phosphate formation and enhances its layer structure by affecting the hydrous layer phosphate. *Crystal Growth & Design* **18** (2018) 6165-6171.
85. Suguira, Y., Horie, M., Fabrication of silver-doped apatite powders from silver-substituted octacalcium phosphate powders via solid-solid phase-conversion process. *Ceramics International* **47** (2021) 25614-25621.
86. Gomes, M., Azevedo, H., Malafaya, P., Silva, S., Oliveira, J., Silva, G., Sousa, R., Mano, J., Reis, R., Chapter 6 – Natural Polymers in tissue engineering applications. *Tissue Engineering* (2008) 145-192.
87. Pina, S., Oliveira, J. M., Reis, R. L., Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Adv. Mater.* **27** (2015) 1143-1169.
88. Venkatesan, J., Kim, S. K., Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. *Marine Drugs* **8** (2010) 2252-2266.
89. Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* **49** (2013) 780-792.
90. Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, C. P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* **34** (2009) 641-678.
91. Mourya, V., K., Inamdar, N., N., Tiwari, A., Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters* **1** (2010) 11-33.
92. Lu, G., Sheng, B., Wei, Y., Wang, G., Zhang, L., Ao, Q., Gong, Y., Zhang, X., Collagen nanofiber-covered porous biodegradable carboxymethyl chitosan microcarriers for tissue engineering cartilage. *European Polymer Journal* **44** (2008) 2820-2829.
93. Fonesca-Santos, B., Chorilli, M., An overview of carboxymethyl derivates of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. *Materials Science and Engineering* **77** (2017) 1349-1362.

94. Sun, L., Du, Y., Chen, X., Shi, X., Quarternized carboxymethyl chitosan: a new approach to chemically modified chitosan I: preparation and characterization. *Asian Chitin Journal* **1** (2005) 25-32.
95. Ressler, A., Gudelj, A., Zadro, K., Ivanković, M., Cvetnić, M., Antunović, M., Ivanković, H., From Bio-waste to Bone Substitute; Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite and Its Use in Chitosan-based Composite Scaffold Preparation. *Chemical and Biochemical Engngineering Quarterly* **34** (2) (2020) 59-71.
96. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., Bohner, M., Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?. *Materials Today* **19** (2016) 69–87.
97. Habraken, W., Tao, J., Brylka, L. J., Friendrich, H., Bertinetti, L., Schenk, A. S., Verch, A., Dmitrović, V., Bomans, P. H. H., Frederik, P. M., Laven, J., van der Schoot, P., Aichmayer, B., de With, G., DeYoreo, J. J., Sommerdijk, N., Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nature Communications* **4** (2013) 1507-1519.
98. He, J., Ye, H., Li, Y., Fang, J., Mei, Q., Lu, X., F. Ren, Cancellous-Bone-like Porous Iron Scaffold Coated with Strontium Incorporated Octacalcium Phosphate Nanowiskers for Bone Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **5** (2019) 509-518.
99. Zmistowski, B., Karam, J. A., Durinka, J. B., Casper, D. S., Parvizi, J., Periprosthetic Joint Infection Increases the Risk of One-Year Mortality. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **95** (24) (2013) 2177-2184.
100. Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., Park, Y. H., Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (2008) 2171-2178.
101. Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., Kim, J. Q., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research* **52** (2000) 662-668.
102. Jain, J., Arora, S., Rajwade, J. M., Omray, P., Khandelwal, S., Paknikar, K. M., Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Molecular Pharmaceutics* **6** (2009) 1388-1401.

103. Roy, M., Fielding, G. A., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A., Bose, S., Mechanical, *In vitro* Antimicrobial, and Biological Properties of Plasma-Sprayed Silver-Doped Hydroxyapatite Coating. *ACS Applied Materials & Interface* **4** (3) (2012) 1341-1349.
104. Ressler, A., Ivanković, T., Polak, B., Ivanišević, I., Kovačić, M., Urlić, I., Hussainova, I., Ivanković, H., A multifunctional strontium/silver-co-substituted hydroxyapatite derived from biogenic source as antibacterial biomaterial. *Ceramics International* **8** (2022) 18361-18373.
105. Gopi, D., Shinyjoy, E., Kavitha, L., Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **127** (5) (2014) 286-291.
106. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M., Roveri, N., Inhibiting Effect of Zinc on Hydroxyapatite Crystallization. *Journal of Inorganic Biochemistry* **58** (1995) 49-58.
107. Fernandez-Yague, A. M., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., Biggs, M. J., Biomimetic approaches in bone tissue engineering: integrating biological and physicommechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **84** (2014) 1-29.
108. Pawlak, A., Mucha, M., Termogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta* **396** (2003) 153-166.
109. Wang, S. M., Huang, Q. Z., Wang, Q. S., Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide *Carbohydrate Research* **340** (2005) 1143-1147.
110. Barbosa, H. F. G., Francisco, D. S., Ferreira, A. P. G., Cavalheiro, E. T. G., A new look toward the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. *Carbohydrate Polymers* **225** (1) (2019) 115232.
111. Kurniasih, M., Cahyati, T., Dewi, R. S., Carboxymethylchitosan as an antifungal agent on gauze. *International Journal of Biomedical Macromolecules* **119** (2018) 166-171.
112. Lee, H., Kim, G. H., Cryogenically fabricated three-dimensional chitosan scaffolds with pore size-controlled structures for biomedical applications. *Cabohydrate Polymers* **85** (2010) 817-823.

8. SAŽETAK

Priprema biomimetičke okosnice na temelju metalnim ionima supstituiranog oktakalcij fosfata pentahidrata i biopolimera za primjene u tkivnom inženjerstvu

Marić Marina Monika, Ivandić Danijela

Inženjerstvo koštanog tkiva pristup je liječenju koštanih oštećenja uzrokovanih prijelomima i bolestima, a temelji se na upotrebi okosnica koje oponašaju prirodno koštano tkivo te su molekulski, strukturno i biološki kompatibilne. Zbog mogućeg štetnog utjecaja faktora rasta korištenih za poticanje osteogenih svojstava biomaterijala, današnja su istraživanja usmjerena na supstituciju kalcij fosfatne (CaP) biokeramike s ciljanim kationima i anionima koji se prirodno nalaze u mineralnom tkivu.

U ovom radu pripremljeni su uzorci oktakalcij fosfata pentahidrata (OCP) supstituirani (0, 1 i 2,5 mol.%) stroncijevim (Sr^{2+}), magnezijevim (Mg^{2+}) i srebrovim (Ag^+) ionima metodom precipitacije. Rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama utvrđen je nastanak OCP-a kao kristalne faze. Daljnjom obradom XRD rezultata Rietveldovom metodom utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0 potvrđen je dvofazni CaP sustav (OCP i amorfni kalcijev fosfat) u svim pripremljenim uzorcima. Dodatno, Rietveldovom metodom utočnjavanja određeni su parametri elementarnih ćelija ovisno o supstituciji za svaki pojedini ion. Pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) istražena je morfologija uzoraka koja pokazuje pločasti oblik kristala karakterističan za OCP. Ispitivanjem antibakterijskih svojstava, uzorci su pokazali antibakterijsko djelovanje prema gram-pozitivnoj bakteriji *S. aureus*. Za određivanje optimalne koncentracije polimera za pripremu kompozitnih okosnica, pripremljene su otopine karboksimetil kitozana (C-CHT) različitih masenih udjela (1,2, 1,5, 1,8, 2,1, 2,5, 2,8, 3,1 i 3,4 mas.%). Ispitivanjem morfologije, poroznosti i raspodjele veličine pora, okosnica pripremljena iz 3,1 mas.% polimerne otopine korištena je za pripremu kompozitnih materijala. Pripremljene su visokoporozne kompozitne okosnice na temelju C-CHT-a i OCP-a supstituiranog metalnim ionima (Sr^{2+} , Mg^{2+} i Ag^+) metodom toplinski inducirane faze separacije uz naknadno umrežavanje polimera. SEM analiza potvrdila je homogenu raspodjela anorganske faze u polimernoj matrici, te je potvrđena visokoporozna struktura s poroznošću između 68–80 % i veličine pora u rasponu 50–400 μm .

Ključne riječi: kitozan, metalni ioni, okosnice, oktakalcijev fosfat pentahidrat, supstitucija

9. SUMMARY

Preparation of biomimetic scaffold based on metal ion substituted octacalcium phosphate pentahydrate and biopolymer for tissue engineering application

Marić Marina Monika, Ivandić Danijela

Bone tissue engineering, as an approach to treat bone defects caused by trauma or diseases, is based on using scaffolds that mimic natural bone tissue and have molecular, structural and biological compatibility. Due to the safety issues concerning growth factors used to promote osteogenic properties, substitution with target cations and anions has been considered as an alternative route.

In this study, octacalcium phosphate pentahydrate (OCP) substituted (0, 1 i 2.5 mol.%) with strontium (Sr^{2+}), magnesium (Mg^{2+}) and silver (Ag^+) ions has been prepared by wet precipitation method. Precipitation of OCP was confirmed by X-ray diffraction analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy. Rietveld refinement study, processed by computer software DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0, revealed amorphous calcium phosphate precipitation along with OCP. In addition, cell parameters were determined as a function of the substitution level of each ion. Morphology of prepared powder samples, investigated by scanning electron microscopy (SEM), shows the formation of plate-like crystals characteristic for OCP. Antibacterial properties analysis of substituted-OCP samples showed antibacterial activity against Gram-positive bacteria *S. aureus*. Carboxymethyl chitosan (C-CHT) solutions with different weight percentages (1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.5, 2.8, 3.1 and 3.4 wt.%) were prepared in order to determine an optimal polymer concentration for further composite scaffold synthesis. After observing the morphology, porosity and pore size distribution of prepared scaffolds, a polymer solution with 3.1 wt.% of C-CHT was selected for composite scaffold preparation. Highly porous scaffolds were prepared using C-CHT and OCP-substituted with metal ions (Sr^{2+} , Mg^{2+} and Ag^+) via heat-induced phase separation with subsequent crosslinking of the polymer. Results of SEM analysis show highly porous scaffolds with interconnected pores and homogeneously dispersed inorganic particles within the C-CHT matrix. Obtained scaffold's porosity (68–80 %) and pore size distribution (50–400 μm) are suitable for applications in bone tissue engineering.

Keywords: chitosan, metal ions, octacalcium phosphate pentahydrate, scaffolds, substitution

10. ŽIVOTOPIS

Marina Monika Marić rođena je 25.11.1997. godine u Trstu, Italiji. Svoje školovanje započinje u Zagrebu u Osnovnoj školi Borovje, te 2012. godine upisuje jezičnu XVI. gimnaziju u Zagrebu. Godine 2016. upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju. Završni rad radila je na Zavodu za organsku kemiju. Za vrijeme studiranja postaje član Studentske sekcije HDKI-ja, te je bila moderator na projektu za žene u znanost "Ms? or Mrs? Dr!". 2022. godine sudjeluje na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim izlaganjem na temu „Razvoj sinteze aminoskvaraina kao funkcionalnih materijala u hibridnim fotonaponskim uređajima". U veljači 2022. godine sudjeluje na ACerS Winter Workshop 2022 radionici (organizator: The American Ceramics Society). Radila je kao demonstrator 2018. godine na vježbama iz Kemijske analize materijala na Zavodu za analitičku kemiju, te tijekom cijelog studiranja obavlja studentski posao u prodaji.

Danijela Ivandić rođena je 4. listopada 1997. godine u Šibeniku. Svoje školovanje započinje u Zagrebu u Osnovnoj školi Alojzija Stepinca. Zatim upisuje X. gimnaziju „Ivan Supek“ u Zagrebu. Za vrijeme srednje škole postaje član hrvatske reprezentacije brzog klizanja na kratke staze. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala, upisuje 2016. godine. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju. Završni rad radila je na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju. Za vrijeme studiranja postaje član Studentske sekcije HDKI-ja te sudjeluje u različitim projektima i pisanju članaka za studentski znanstveni časopis "Reaktor ideja". U veljači 2022. godine sudjeluje na ACerS Winter Workshop 2022 radionici (organizator: The American Ceramics Society). Također govori engleski i njemački jezik, te se trenutno nalazi u Leuvenu na fakultetu KU Leuven, Pharmaceutical Sciences, u Belgiji na Erasmus+ studentskoj razmjeni.