

# Biološka svojstva silicijem dopiranog hidroksiapatit/polimer kompozitnog materijala - literaturni pregled

---

Pšeničnik, Borna

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:921286>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Borna Pšeničnik

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Borna Pšeničnik

**BIOLOŠKA SVOJSTVA SILICIJEM DOPIRANOG HIDROKSIAPATIT/POLIMER  
KOMPOZITNOG MATERIJALA**

**(literaturni pregled)**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

prof.dr.sc. Juraj Šipušić

dr.sc Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2018.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću i asistentici Ressler na stručnom mentorstvu, te obitelji i prijateljima na podršci.*

## SAŽETAK:

Hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) je mineral iz grupe kalcijevih fosfata koji po kemijskim i strukturnim karakteristikama najviše odgovara mineralnoj fazi prirodnog koštanog tkiva. Koristi se kao mineralna faza u koštanim okosnicama, premazima metalnih implantata i dentalnim nadomjescima. Osim mineralne faze prirodno koštano tkivo građeno je i od kolagena tipa I, i vode. Nadalje, prirodni hidroksiapatit sadrži ionske supstitucije ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ) u kristalnoj rešetci koje su neophodne za normalan rast i razvoj prirodnog koštanog tkiva. Supstitucijom građevnih elemenata u strukturi hidroksiapatita s metalnim i nemetalnim ionima utječe se na fizikalno-kemijska i bioaktivna svojstva. Iako mehanizam djelovanja silicija na regeneraciju koštanog tkiva nije u potpunosti razjašnjen, istraživanja pokazuju bolja biološka svojstva *in vitro* i *in vivo* silicijem supstituiranog hidroksiapatita od nesupstituiranog hidroksiapatita. Stoga okosnice za regeneraciju koštanog tkiva moraju biti građene od polimerne matrice koja imitira kolagen tipa I i supstituiranog hidroksiapatita kako bi se što bolje imitiralo prirodno koštano tkivo. Cilj rada je pružiti pregled dosadašnjih istraživanja provedenih na kompozitnim materijalima građeni od polimerne matrice i silicijem supstituiranog hidroksiapatita.

**Ključne riječi:** hidroksiapatit, silicij, supstitucija, polimer, koštano tkivo

**ABSTRACT:**

Hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is a mineral of a calcium phosphate group which, by chemical and structural characteristics, is best suited to natural bone tissue. It is used as a mineral phase in bone backbones, metal implants and dental replacements. In addition to the mineral phase, natural bone tissue was also constructed of collagen type I, and water. Furthermore, natural hydroxyapatite contains ionic substitutions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ) in the crystal lattice necessary for normal growth and development of natural bone tissue. The substitution of building elements in the hydroxyapatite structure with metal and non-metallic ions influences the physico-chemical and bioactive properties. Although the mechanism of action of silicon in the regeneration of bone tissue is not fully understood, biological studies show better properties *in vitro* and *in vivo* silicon-substituted hydroxyapatite of unsubstituted hydroxyapatite. Therefore, the backbone for bone tissue regeneration must be constructed of a polymer matrix that imitates collagen type I and substituted hydroxyapatite in order to better imitate natural bone tissue. The aim of the paper is to provide an overview of the current research carried out on composite materials constructed of polymer matrix and silicon-substituted hydroxyapatite.

**Keywords:** hydroxyapatite, silicon, substitution, polymer, bone tissue

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
<b>2.1. KOMPOZITNI MATERIJALI</b> .....	3
<b>2.1.1. Polimerni kompozitni materijali</b> .....	3
<b>2.2. HIDROKSIAPATIT</b> .....	5
<b>2.2.1. Struktura hidroksiapatita</b> .....	8
<b>3. SUPSTITUIRANI HIDROKSIAPATIT</b> .....	9
<b>3.1. KATIONSKE IZMJENE</b> .....	9
<b>3.2. ANIONSKE IZMJENE</b> .....	11
<b>3.2.1. Karbonatni ion</b> .....	11
<b>3.2.2. Silicijev ion</b> .....	12
<b>4. SILICIJEM SUPSTITUIRAN HIDROKSIAPATIT</b> .....	13
<b>5. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE SILICIJEM SUPSTITUIRANOG HIDROKSIAPATITA</b> .....	16
<b>6. KOMPZITNI MATERIJALI SA SILICIJEM SUPSTITUIRANIM HIDROKSIAPATITOM</b> .....	17
<b>7. BIOLOŠKA SVOJSTVA KOMPOZITNIH MATERIJALA SA SILICIJEM SUPSTITUIRANIM HIDROKSIAPATITOM</b> .....	18
<b>8. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>9. LITERATURA</b> .....	21
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	25

## 1. UVOD

Koštano tkivo je prirodni kompozitni materijal građen od organske matrice (koja je većinski sastavljena od kolagena tipa I) i kalcij fosfatne anorganske faze. Mineral iz grupe kalcijevih fosfata koji po kemijskim, strukturnim i morfološkim karakteristikama najviše odgovara anorganskoj fazi prirodnog koštanog tkiva je hidroksiapatit (HAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Ovisno da li materijali zamjenjuju tvrdo (engl. *Hard-tissue replacement*) ili meko koštano tkivo (engl. *Soft-tissue replacement*) te da li se radi o koštanom defektu većih ili manjih dimenzija upotrebljavaju se različiti bio-materijali.. Biomaterijali su biokompatibilni, bioaktivni i netkosični materijali namijenjeni za zamjenu tkiva i organa u tijelu [1].

Uprkos velikom napretku koji je postignut na polju inženjerstva koštanog tkiva proteklih nekoliko godina, još uvijek nije razvijen materijal koji bi dao zadovoljavajuće rezultate u obnovi velikih koštanih defekata. Umjetno dobiveni materijali za regeneraciju koštanog tkiva moraju imati zadovoljavajuća biološka (poticati obnovu koštanog tkiva) i mehanička (pružiti potporanj okolnom koštanom tkivu) svojstva. Danas biorazgradivi materijali mogu zamijeniti gotovo sve dijelove i funkcije ljudskog organizma. Ovisno o vrsti tkiva, upotrebljavaju se i različiti materijali koji se dijele u četiri glavne skupine koje čine metali, polimeri, keramika te njihove mješavine, odnosno, kompoziti [2]. U medicini postoji velika potreba za materijalima kojima će se liječiti koštani defekti ili ozljede. Bioaktivna resorbirajuća keramika pokazala se kao vrlo dobar materijal u liječenju i ispravljanju defekata. Kao obećavajući tip biokeramike pokazala se hidroksiapatitna keramika koja stvara direktnu vezu s okolnim koštanom tkivom živog organizma, dok druge vrste biokeramike tvore vezu preko sloja karbonatnog hidroksiapatita koji odgovara biološkom apatitu u koštanom tkivu.

Za bolja biološka svojstva potrebno je koristiti kompozitne polimerne okosnice sa supstituiranim hidroksiaptitiom kako bi se što bolje imitiralo prirodno koštano tkivo. Hidroksiapatit ima strukturu koja je vrlo pogodna za razne ionske supstitucije. Poznato je da je hidroksiapatit u prirodnoj kosti zapravo nestehiometrijski, te u svojoj strukturi sadrži različite ione poput  $\text{CO}_3^{2-}$ , te u manjoj količini ione  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  i dr. Takve supstitucije blago mijenjaju strukturu HAp i često imaju važne učinke na njegova svojstva kao što je topljivost, tvrdoća, krhkost i druga svojstva. Stoga, u kontekstu primjene



HAp kao materijala za liječenje koštanih defekata intenzivno se istražuju mogućnosti ugradnje različitih iona kojima bi se ubrzalo zacjeljivanje kosti i pospješio njen oporavak. Jedan od istraživanih supstituenata u strukturi HAp je silicij u obliku  $\text{SiO}_4^{4-}$  aniona. Silicij je potreban za formiranje kostiju i povezan je i s organskom i s anorganskom fazom kosti[3].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. KOMPOZITNI MATERIJALI

Kompozitni materijali dobiveni spajanjem dvaju ili više različitih materijala s ciljem postizanja specifičnih karakteristika i svojstava kakva ne posjeduje niti jedna komponenta sama za sebe. Sastoje se od osnovnog materijala (matrice) i dodatnog materijala (ojačavala i/ili punila) [4]. Bio-kompoziti na bazi polimera se smatraju trećom generacijom biomaterijala zbog svojih svojstava sličnih prirodnoj kosti u usporedbi sa prvom (metali i metalne legure) i drugom generacijom (biokeramika) materijala koji se koriste kao zamjene koštanog tkiva[5].

Na temelju činjenice da je prirodna kost sačinjena uglavnom od karbonatnog HAp (anorganska faza) i kolagena (organska faza), istražena je metoda kojom se uvelike poboljšavaju mehanička svojstva međupovezane porozne HAp okosnice ako je prevučemo slojem biorazgradivog polimera. Polimer se ugradi u pore okosnice kroz mikro pukotine pora bez da se naruši unutarnja povezanost strukture[6].

#### 2.1.1. Polimerni kompozitni materijali

Polimeri su primarni materijali korišteni za izradu skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva. Biorazgradivi polimeri mogu se podijeliti u dvije skupine:

- prirodni; uključujući polisaharide (škrob, alginat, hitin, kitozan, derivati hijaluronske kiseline) i proteine (soja, kolagen, fibrin gelovi, svila)
- sintetski polimeri (poli(mliječna kiselina), poliglikolid, polihidroksibutirat) [7]

Kitozan je intenzivno korišten u inženjerstvu koštanog tkiva nakon što je otkriveno da potiče rast i taloženje mineralizirane matrice u kulturi osteoblasta (koštanih stanica). Mnogo istraživanja usmjereno je na pripravu kompozitnih materijala na temelju kitozana i kalcijeva fosfata primjenjivih u inženjerstvu koštanog tkiva[8].

Sintetski polimeri imaju prednost nad prirodnim jer ih je lakše oblikovati i postići širi spektar željenih svojstava. Poli(mliječna kiselina) je jedan od obećavajućih sintetskih biorazgradivih polimera zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava, plastomerne preradljivosti i bioloških svojstava kao što su biokompatibilnost i biorazgradljivost. Poliglikolid je biokompatibilan i biorazgradiv, jer se razgrađuje hidrolizom i daje glikolnu kiselinu kao produkt razgradnje. Mana poliglikolida je vrlo visoka temperature taljenja (220°C) i netopivost u većini organskih otapala[9].

Kompozitni materijal sastoji se od tri osnovna dijela:

- organske matrice
- anorganskih čestica punila
- međugraničnoga vezivnog sredstva

Osim tih osnovnih sastojaka kompozitni materijal sadržava male količine brojnih drugih dodataka za njegovo poboljšanje kao što su stabilizatori boje, inhibitori i inicijatori za mehanizam očvršćivanja, rendgenski kontrastna sredstva i dr.

U zubnoj protetici puno se koriste različite anorganske čestice kao što su kvarc, koloidni silicijev dioksid, borosilikatno staklo, alumosilikati barija, stroncija, litija, cirkonija i kositra. Svako od navedenih punila rabi se zbog sebi svojstvenih karakteristika. Tako koloidni silicijev dioksid ima veličinu čestica manju od 0,1  $\mu\text{m}$ , inertan je i niske toplinske rastezljivosti te pridonosi boljoj poliranosti kompozita. Kvarc je visoke tvrdoće, ali može izazivati probleme kod poliranja i nešto veće trošenje ostalih zubi. Čestice anorganskog punila različite su veličine i oblika te se dodaju organskoj matrici do njezina zasićenja. Veličina čestica utječe na svojstva kompozita i jedan je od kriterija klasifikacije punila. Fizikalna svojstva kompozita određena su količinom anorganskog punila, koja se obično izražava volumnim udjelom.

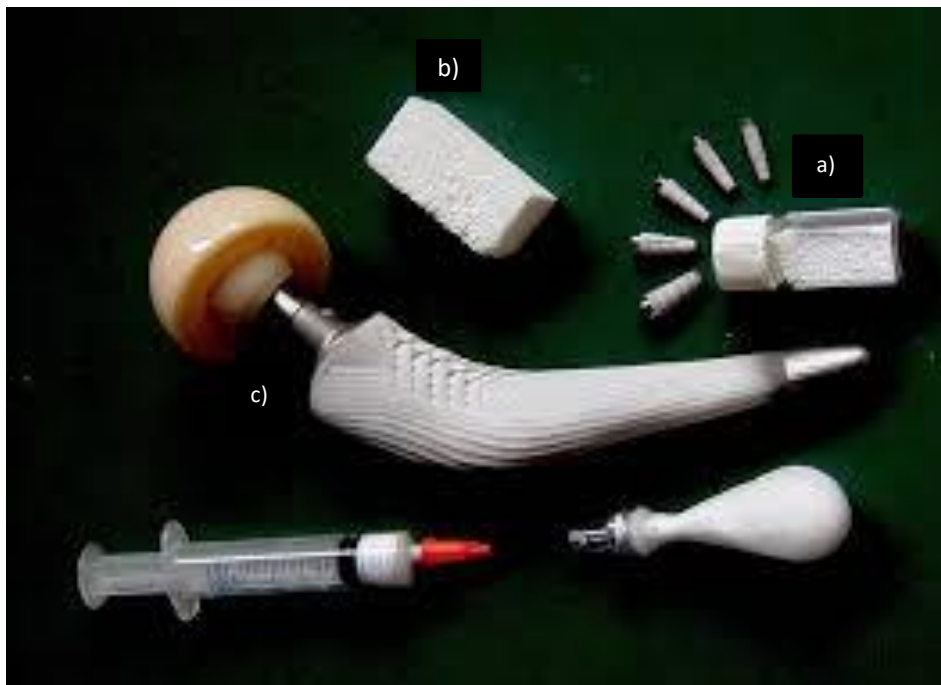
Kompoziti na bazi polimera i bioaktivne keramike mogu se koristiti kao prikladni materijali za stvaranje čvrste okosnice. Sintetski hidroksiapatit, koji je jedan oblik kalcijeva fosfata i vrlo je sličan prirodnoj kosti, pomaže rastu stanice unutar implantata i formira čvrstu vezu između tkiva i implantata. S druge strane, polimer osigurava matricu za okosnicu i

fleksibilnost kompozita. Kompoziti na bazi bioaktivnih polimera i bioaktivne keramike imaju vrlo dobra osteoinduktivna svojstva i mogu se koristiti kao zamjena za prirodnu kost [2].

## 2.2. HIDROKSIAPATIT

Hidroksiapatit glavni je mineral koji izgrađuje kosti i zube. Primjenjuje u inženjerstvu koštanog tkiva jer omogućuje obnavljanje kosti na spoju s protezom ili nekom drugom umjetnom nadopunom i time podržava bolje fiksiranje proteze [10].

Primjena hidroksiapatita u medicini ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su: kemijski sastav, veličina i morfologija kristala, kristalno uređenje, termička stabilnost i topljivost. Hidroksiapatit se klinički može primjeniti kao punilo u popunjavanju defekata kod oštećenih kostiju, u obliku praha, granula ili poroznih struktura (blokova) s kontroliranim dimenzijama i oblikom pora, kao obloge na metalnim implantima (Slika 1.) i kao komponenta kompozitnih biomaterijala.



*Slika 1.* Hidroksiapatit u različitim oblicima: prah(a), sinterirani blok(b) i nanesen kao obloga na metalnim implantima(c) [11].

Za primjenu u medicini bitna su svojstva poroznost i osteokonduktivnost. Poroznost je sposobnost apatita da u sastav uključi veći dio periodnog sustava, po potrebi što omogućuje obogaćivanje okolnog tkiva potrebnim ionima. Osteokonduktivnost je svojstvo stvaranja podloge za nastanak nove kosti i podržavanje stvaranja osteoblasta [12].

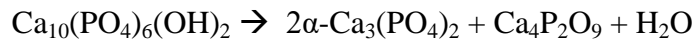
Prevlačenje biološki neaktivnog metala sa biološki aktivnim hidroksiapatitom smatra se jednim od najuspješnijih kombinacija za primjenu u ortopediji i stomatologiji. Ovakva prevlaka ima biološke prednosti poput bržeg sraščivanja kosti ili okolnog tkiva i proteze uz nemjerljivo bolje fiksiranje proteze i kosti, istovremeno smanjujući mogućnost otpuštanja potencijalno opasnih metalnih iona u ljudski organizam [10].

HAp se razlikuje od ostalih bioloških apatita (caklina, dentin, kost) u stehiometriji, strukturi, kristalčnosti te drugim fizikalno-kemijskim svojstvima. Biološki apatiti su uobičajeno s manjkom kalcija i uvijek s ugrađenom karbonatnom skupinom,  $\text{CO}_3^{2-}$ . Iz tog je razloga prikladnije da se biološki apatiti nazivaju karbonatnim apatitima (CHA), a ne hidroksiapatitom, HAp.

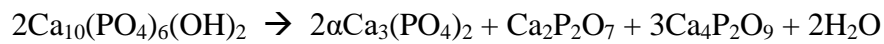
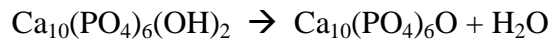
Stehiometrijski HAp ima molarni omjer Ca/P 1,67. Hidroksiapatit sa Ca/P molarnim omjerom nižim od 1,67 zove se hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona (engl. *calcium-deficient carbonated hydroxyapatite*, CDHA) kemijske formule  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ,  $0 < x < 1$ . CDHA je na osnovi stupnja kristalnosti i Ca/P omjera sličan apatitnoj fazi prirodnog koštanog tkiva. Topljivost CDHA je veća od stehiometrijskog hidroksiapatita i raste sa smanjenjem Ca/P omjera, stupnja kristalnosti i veličine kristala. Toplinskom obradom iznad  $700^\circ\text{C}$ , CDHA (Ca/P =1,5) pretvara se u  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ( $\beta$ -TCP) i sa  $1,5 < \text{Ca/P} > 1,67$  se pretvara u smjesu HAp-a i  $\beta$ -TCP-a. CDHA se ugrađuje u koštano tkivo, što je dovodi do regeneracije oštećenog tkiva [11].

Postoji niz postupaka koji se koriste za dobivanje HAp kao što su: mokre metode, suhe metode te metode kondenzacije reaktanta u plinovitoj fazi. Od mogućih načina dobivanja, mokro taloženje je najjednostavniji proces zbog niske cijene, jednostavne primjene u industriji uz dobre konačne proizvode te lakše kontrole procesnih parametara [13].

Na višim temperaturama HAp se može raspasti na trikalcij fosfat (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) i tetrakalcij fosfat ( $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ) prema kemijskoj reakciji [14]:

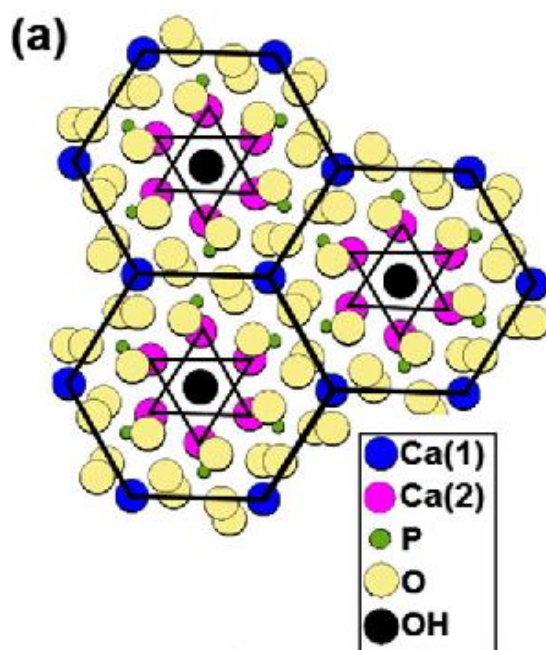


Zhou i suradnici [15] iznose da se HAp transformira u oksiapatit u temperaturnom području od  $1200^\circ\text{C}$  do  $1400^\circ\text{C}$  i u trikalcij fosfat, kalcij pirofosfat i tetrakalcij fosfat između  $1400^\circ\text{C}$  i  $1550^\circ\text{C}$ , prema sljedećim kemijskim reakcijama:



### 2.2.1. Struktura hidroksiapatita

Hidroksiapatit je mineral ionskog karaktera. Kristalna struktura se može opisati kao kompaktna heksagonska struktura kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u kristalnoj rešetki. U strukturi hidroksiapatita nalazi se deset atoma kalcija smještenih u dva simetrijski različita položaja, Ca1 i Ca2. Atomi kalcija u položaju Ca1 povezani su u kolone, svaki atom u ovom položaju okružen je s devet atoma kisika koji pripadaju  $\text{PO}_4^{3-}$  grupama. Preostalih šest atoma kalcija koji zauzimaju položaj Ca2 grade jednakostranične trokuteve. Atomi kalcija u ovom položaju okruženi su sa ukupno sedam atoma kisika od kojih šest pripadaju grupama  $\text{PO}_4^{3-}$ , a jedan pripada grupi  $\text{OH}^-$  [16].



Slika 2. Kristalna struktura hidroksiapatita i položaja Ca1 i Ca2 u hidroksiapatitu [17].

U kristalnoj strukturi hidroksiapatita dolazi do različitih ionskih supstitucija koje se odvijaju na mjestima kalcijevih iona, fosfatnih ili hidroksilnih skupina. Ionske supstitucije utječu na parametre ćelije, kristalnu strukturu, topljivost i stabilnost hidroksiapatita [18].

### 3. SUPSTITUIRANI HIDROKSIAPATIT

Hidroksiapatitna struktura je stabilna i fleksibilna što omogućava širok spektar ionskih izmjena, kako kationskih tako i anionskih. Mogućnost poboljšanja bioaktivnosti hidroksiapatita je u tome da uz fosfatne, kalcijeve i hidroksilne ione sadrži i značajne koncentracije drugih iona kao što su magnezij, natrij, karbonatni ion i u tragovima silicij, cink, aluminij, kalij, srebro, olovo, kadmij, barij, stroncij. Uključenjem tih iona u kristalnu rešetku apatita dolazi do bolje bioaktivnosti materijala i razvoja supstituiranih apatita[19]. Biološki apatiti su uobičajeno s manjkom kalcija i uvijek s ugrađenom karbonatnom skupinom,  $\text{CO}_3^{2-}$ . Iz tog je razloga prikladnije da se biološki apatiti nazivaju karbonatnim apatitima (CHAp). Kod bioloških apatita  $\text{CO}_3^{2-}$  grupe su ugrađene na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa, a uz to su zbog očuvanja jednakosti naboja  $\text{Ca}^{2+}$  ioni zamijenjeni  $\text{Na}^+$  ionima. Neke značajnije promjene unutar strukture hidroksiapatita izazvane ionskim izmjenama, opisane su dalje u tekstu. Izmjene u strukturi HAp-a mogu uzrokovati promjene u karakteristikama, parametara rešetke, kristalnoj simetriji, termalnoj stabilnosti, morfologiji, topljivosti, kemijskim i biološkim osobinama. Fizikalno-kemijska svojstva dopiranih hidroksiapatita zavise od vrste i količine prisutnog iona metala u kristalnoj rešetki.

#### 3.1. KATIONSKE IZMJENE

Kalcij se može izmjeniti s raznim kationima, jednovalentnim: Na(I), K(I), Ag(I), dvovalentnim: Mg(II), Sr(II), Mn(II), Pb(II), Ba(II) Cu(II), Zn(II), trovalentnim: Cr(III), Fe(III) i drugim. Kristalna struktura hidroksiapatita sadrži dva neekvivalentna Ca položaja: Ca(1) i Ca(2). Supstitucija iona Ca(II) u položaju Ca(2) je energetski povoljnija. Naime, položaj Ca(2) je za 0,013 eV energetski stabilniji od položaja Ca(1) [20].

Razmak između iona kalcija u položajima Ca(1) i Ca(2) je veći. Ioni metala sa većim promjerom i većom elektronegativnošću supstituiraju ione kalcija u položaju Ca(1), ioni s manjim promjerom i manjom elektronegativnošću u položaju Ca(2) [21].



Supstitucijom dvovalentnog Ca(II) sa monovalentnim ionima: Na(I) i K(I) u apatitnoj kristalnoj rešetki nastaje razlika u naboju koja se može neutralizirati stvaranjem dodatnih vakancija (odsutnost atoma ili iona u kristalnoj rešetki) [22]. Ioni kalija se znatno manje ugrađuju u hidroksiapatit od iona natrija. Rendgenskom stuktornom analizom HAp-a, sintetiranog u prisustvu Na(I), utvrđeno je da ioni natrija prvenstveno supstituiraju ione kalcija u položaju Ca(2) [23].

Srebro i spojevi srebra su antimikrobni agensi (imaju antivirusna, antibakterijska i/ili antifungalna svojstva). Povećanjem udjela srebra u materijalu povećava mu se antimikrobni efekt, ali se istovremeno povećava toksičnost. Potrebno je optimizirati dovoljan udio srebra koji rezultira odličnim antibakterijskim svojstvima.

Magnezij je prisutan u biološkom apatitu, bitan je u metabolizmu kostiju, ima utjecaj na aktivnost ćelija: osteoblasta i osteoklasta, stimulirajući rast kostiju. Ioni magnezija imaju inhibitorski utjecaj na rast čestica, potiču stvaranje kiselijih Ca/P faza, dok se sa porastom njihovog udjela smanjuje stupanj kristalnosti i raste topljivost HAp [24].

Cink supstituira kalcij do 15% u hidroksiapatitu. Pokazalo se da ima inhibirajući učinak na daljnji razvoj bakterija u odnosu na sam hidroksiapatit, odnosno nakon određenog vremena kultura se prestaje razvijati [25].

Ba(II), Cd(II), Sr(II) i Pb(II) mogu u potpunosti supstituirati ione kalcija u hidroksiapatitu. Rendgenskom stuktornom analizom uzoraka s različitim sadržajem ovih iona ustanovljeno je da supstituiraju ione kalcija prvenstveno u položaju Ca(2) [26].

## 3.2. ANIONSKE IZMJENE

Hidroksidni anion se uglavnom supstituira s: F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, s druge strane fosfatni anion se može zamjeniti sa: SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [27].

### 3.2.1. Karbonatni ion

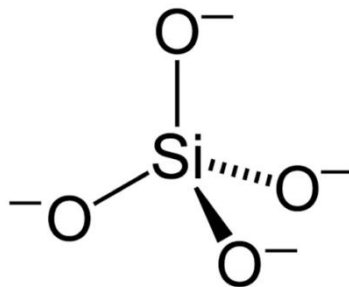
Karbonatni anion (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) se može ugraditi u strukturu HAp-a na dva načina: zamjenom dvije hidroksilne skupine iz kristalne rešetke (A-tip supstitucije) ili zamjenom fosfatnog aniona kristalne rešetke (B-tip supstitucije), pri tome ravnotežni naboj se održava otpuštanjem odgovarajuće količine iona kalcija. Oba tipa supstitucije A i B se mogu javiti istovremeno, tada se radi o mješovitom AB-tipu. A-tip apatita se može dobiti tretiranjem čistog hidroksiapatita s CO<sub>2</sub>, dok B-tip apatita se može ostvariti iz vodenih otopina. Biološki apatiti se deklariraju kao B-tip. S porastom sadržaja karbonata kod A-tipa dolazi do porasta parametra a i smanjenja c parametra kristalne rešetke HAp, a kod B-tipa do smanjenja a i porasta c parametra [28].

Obzirom da CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> i F<sup>-</sup> u apatitu imaju suprotan učinak na kristalnost i topljivost, uz manipulaciju njihove koncentracije može se dobiti CFHAp željene topljivosti. S obzirom na veličine radijusa fluorov ion pritom zauzima poziciju OH<sup>-</sup> iona dok CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ion ostvaruje svoj B-tip strukture [26].

### 3.2.2. Silicijev ion

Sinteza i karakterizacija silicijem supstituiranog HAp (Si-HA) je u posljednje vrijeme predmet istraživanja mnogih znanstvenika širom svijeta. Ugradnjom silicija u strukturu HAp postiže se bolja bioaktivnost te visoka aktivnost površine koja se objašnjava formiranjem silanolnih grupa Si-OH na površinu materijala. Zbog razlike u veličini ortosilikatnog i fosfatnog iona supstitucija uzrokuje mikronaprezanja apatitne strukture zbog čega dolazi do segregacije silicijevih iona na površinu [29].

Pored kisika, silicij je najzastupljeniji element u Zemljinoj kori. U organizmu sisavaca, silicij je zastupljen u različitim količinama. Tako koncentracija silicija u serumu iznosi približno 1 ppm, 2-10 ppm u jetri, bubrezima, plućima i mišićima. Oko 100 ppm silicija se nalazi u kostima i ligamentima, a oko 200-600 ppm u hrskavici i drugom vezivnom tkivu. Visoka koncentracija silicija primjećena je u sastavnim djelovima unutarstanične matrice, ukazujući na ulogu koju ima silicij u biološkom povezivanju faktora koji doprinose arhitekturi i elastičnosti vezivnog tkiva [30].



Slika 4. Molekulska struktura  $\text{SiO}_4^{4-}$  [31].

#### 4. SLICIJEM SUPSTITUIRAN HIDROKSIAPATIT

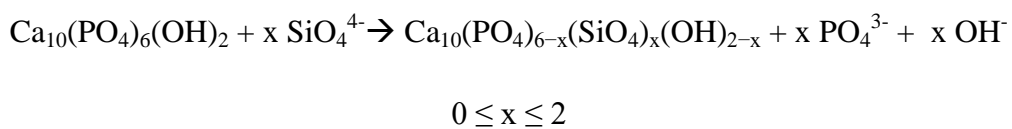
Kost je prirodni kompozitni materijal uglavnom građen od kolagena tipa I i hidroksiapatita (HAp). Glavna anorganska komponenta u kostima kralježnjaka je hidroksiapatit koji se široko koristi za biomedicinski materijal za popravak kostiju, kao što je punjenje kostiju i biokompatibilni premazi za metalni implantat. Međutim, unatoč svojoj biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti, HAp nema poseban osteoinduktivni učinak [32].

Raspodjela atoma na površini spomenutih biomaterijala je od velike važnosti jer se veza između čvrstog materijala (implantanta) i biološkog medija formira tamo gdje dolazi do djelovanja proteina, što dovodi do resorpcije i obnavljanja koštanog tkiva. Jedno od takvih istraživanja provedeno je i na površini HAp-a. U slučaju kada u masi kristala dolazi do razdvajanja i stvaranja pukotina, atomi koji se nalaze blizu površine reagiraju mijenjajući svoj položaj. Rekonstrukcija površine proučavanih kalcij-fosfata nastoji da neutralizira površinsku elektriziranost, ali su fosfatne grupe na površini manje koordinirane kisikom, što stvara prilično reaktivnu površinu. Površina HAp je opsežno proučavana, a utvrđeno je da postoji nekoliko izraženih, visokoindeksiranih površina ovisno o vrsti kidanja. Površinska energija može biti procjenjena, a moguće je predvidjeti i njenu relativnu stabilnost. Ipak, simulacija uvjeta na površini čvrste faze i vakuuma nije od velikog značaja za proučavanje u biološkom mediju. Simulacija tako složenih sistema je izvan mogućnosti predložene metode, ali prvi korak predstavlja proučavanje interakcija jedne ili dvije molekule vode s površinom. Utvrđeno je da postoje jake interakcije molekula vode sa svim promatranim površinama HAp zbog postojanja izloženih, nezasićenih atoma kisika i disocijacije koja postoji u većini slučajeva. Površine (010) tipa predstavljaju najreaktivnije, a (001) najmanje reaktivne površine u HAp, što ovisi o morfologiji kristala HAp u vodenoj otopini, a naročito prirodom pločastih kristala HAp pronađenih u prirodnim kostima. Gubitak Ca u izmjeni s dva vodika iz okolne sredine predstavlja energetski veoma favoriziranu reakciju, što može imati značajan utjecaj na bioaktivnost materijala. Nedavno objavljena istraživanja ukazuju da predložena metoda daje korisne informacije kada se koristi zajedno s eksperimentom i u slučaju kada se raspolože informacijama o strukturi materijala na atomskom nivou [33].

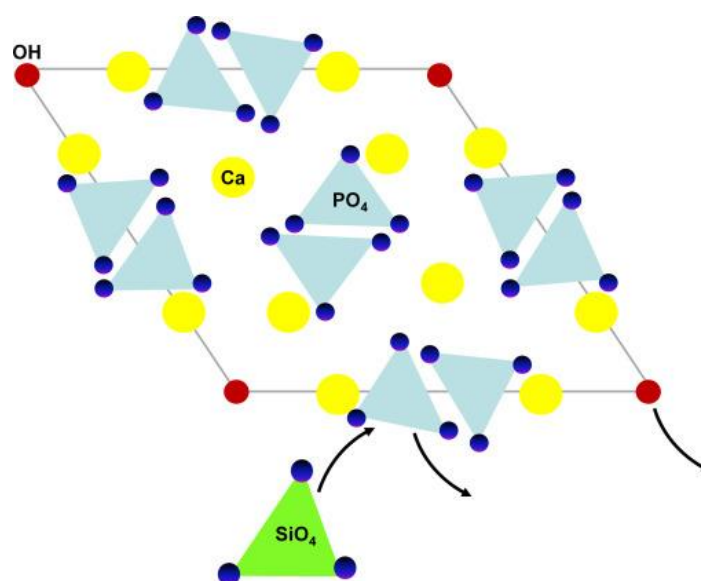
Budući da silicij ima promotivan učinak na mineralizaciju kostiju, silicijem dopiran hidroksiapatit (Si-HAp) može se koristiti za poboljšanje osteokonduktivnosti, te se time potiče rano zacjeljivanje kostiju.

Na osnovu promjena parametara kristalne rešetke nakon uključivanja silicija u strukturu HAp, promatranjem atomskih radijusa, najjednostavniji model predlaže da pripajanje podrazumijeva zamjenu  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa s  $\text{SiO}_4^{4-}$  grupama. U cilju postizanja elektroneutralnosti, ovakva supstitucija  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa je praćena stvaranjem drugih defekata kako bi se izjednačila promjena naboja.

Mehanizam kompenzacije, kada ortosilikatni ion ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) supstituira fosfatni ion ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), odvija se stvaranjem vakancija na mjestima  $\text{OH}^-$  skupina u rešetki HAp-a:



Postoje mnogi mogući mehanizmi kompenzacije naboja koji ovise o termodinamičkim uvjetima tijekom procesa sinteze. Promatrani mehanizmi uključuju stvaranje vakancija O i višak Ca, od kojih svaka kompenzira promjenu izazvanu uvođenjem dva iona silicija. Također, višak H u Si-HAp može kompenzirati promjenu naboja, kompenzacija može biti postignuta stvaranjem OH vakancija [34,35].



Slika 5. Supstitucija ortosilikatnog iona u HAp kristal [36].

Si-HAp predstavlja zanimljiv slučaj, jer kompenzacija promjene naboja uvođenjem silicija može biti postignuta viškom Ca i H atoma ili stvaranjem O i/ili OH vakancija. Koji će od predloženih mehanizama biti dominantan ovisi o količine vode prisutne tijekom procesa sinteze, što može rezultirati dobivanjem različitih materijala. Kemijska formula koja je predložena za Si-HAp polazi od pretpostavke da se kompenzacija naboja odvija stvaranjem OH i H vakancija [35].

Različite mješavine faza Si-HAp,  $\beta$ -TCP, Si- $\alpha$ -TCP, kao i druge faze, poput silikokarnotita i amorfnih spojeva, nastaju u ovisnosti o temperaturi sinteriranja, Ca/P i Ca/(P+Si) odnosa u sistemu, kao i o količini dodanog silicija. Jednofazni Si-HAp, različitog stupnja dopiranosti, može biti dobiven održavanjem konstantnog Ca/(P+Si) odnosa između 1,67-1,75 ako se silicij dodaje u koncentraciji do 1,97 mas.% [37].

Ako se fiksira Ca/P odnos, a mijenja količina dodanog silicija, moguće je dobiti mješavinu faza. Npr., za Ca/P odnos fiksiran na vrijednost 1,67 uz dodatak silicija od 8 mas.%, dobiva se višefazni sistem koji se sastoji od Si-TCP, Si-HAp,  $\beta$ -TCP i amorfne faze promjenjivog Si-Ca-P sastava. Razvoj ovih faza takođe ovisi o načinu na koji se silicij uvodi u HAp. Kada se silicij u sistem uvodi korištenjem izvornih oblika tvari TEOS-a ili silicij-acetata ( $\text{Si}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ ), a ne nanofaznim  $\text{SiO}_2$ , dobiva se manje  $\alpha$ -TCP ili Si-TCP faze, pri većim koncentracijama dolazi do nastajanja silikonkarnotita. Ovo ukazuje na ulogu  $\text{SiO}_2$ -HAp međuspoja na stabilizaciju Si- $\alpha$ -TCP faze koja kreće od reakcije HAp sa Si. Alternativno objašnjenje može biti i inhibirajući efekt  $\text{CO}_3^{2-}$  supstitucije [34].

## 5. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE SILICIJEM SUPSTITUIRANOG HIDROKSIAPATITA

Sinteza Si-HAp je bazirana na metodama dobivanja iz vodenih otopina, gdje se silicij unosi korištenjem izvornog oblika tvari, kao što su tetraetilortosilikat (TEOS) ili tetrapropilortosilikat (TPOS), silicijev(IV)acetat ( $\text{Si}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ ) ili u formi nanočestičnog silicija ili žarenja amorfnog kalcij-fosfata ili nanokristalnog HAp [37].

Također, ispitivano je i dobivanje Si-HAp reakcijama u čvrstom stanju i hidrotermalnim postupkom [38]. Materijali se uobičajeno sinteriraju na temperaturama između 800 i 1200°C. Hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona CDHA ili amorfni kalcij-fosfatni materijali sa odnosom kalcija i fosfora između 1,50 i 1,67 se razlažu na  $\beta$ -TCP ili ostaju u formi dvofaznog sistema  $\beta$ -TCP i HAp sintezom na temperaturama između 700 i 1250°C [34,37]. Fazni sastav ovisi o odnosu Ca/(P+Si) i Ca/P u sistemu, količine dodanog silicija, načina na koji se silicij uvodi u sistem i uvjeta sinteriranja, osobito temperature.

Priroda strukture kalcij-fosfata, u kojima su  $\text{PO}_4^{3-}$  grupe smještene u kolonama vezane s ionima  $\text{Ca}^{2+}$ , može se izračunati korištenjem teorije funkcionalne gustoće (DFT). Ova istraživanja su korištena za simulaciju svojstava materijala u masi i na površini, kao i utjecaja nakon dopiranja HAp-a i TCP-a silicijem. Postavljanjem pravih uvjeta DFT metoda je predvidljiva, a istraživanja bazirana na ovoj metodi su otkrila detalje vezane za energiju i strukturu na atomskom nivou [39].

Simulacija ukazuje na to koji od mehanizama izjednačavanja naboja je moguć dopiranjem HAp silicijem: OH vakancije, formiranje  $\text{SiO}_3\text{OH}$  ili nastanak  $\text{Si}_2\text{O}_7$  uzrokovan O vakancijom. Zaključeno je da ne postoji jedinstven Si-HAp materijal nego različiti tipovi, zavisno od uvjeta tijekom dobivanja. Ovo se može smatrati točnim i u slučaju HAp, voda prisutna tokom sinteze može uvjetovati prisustvo vode u strukturi materijala nakon sinteze [40].

## 6. KOMPZITNI MATERIJALI SA SILICIJEM SUPSTITUIRANIM HIDROKSIAPATITOM

Govoreći o značaju uloge koju ima silicij na ubrzanje procesa zarastanja koštanog tkiva, ne iznenađuje činjenica da i biokeramika u koju je uveden silicij pokazuje povećanu bioaktivnost. Ovo uključuje i materijale s velikim sadržajem silicija kao što su biostaklo (Na-Ca-P-Si stakla promjenljivog sastava) i pseudovolastonit ( $\text{CaSiO}_3$ ), kao i materijale na bazi kalcij-fosfata dopirane silicijem u malom postotku, kao što je Si-HAp i Si-TCP. *In vivo* istraživanja koja su provedena usporedbom biološke aktivnosti Si-HAp i HAp granula ukazuju na povećanje rasta koštanog tkiva od 14,5 % kod Si-HAp u usporedbi sa stehiometrijskim HAp. Ovo istraživanje pokazuje da se morfologija istaloženog apatita i redoslijed procesa koji se događaju razlikuju na površini Si-HAp i HAp implanta. Dvotjedno proučavanje na malim životinjama, izvedeno od strane Hing-a i suradnika je pokazalo da su stupanj stvaranja kosti, urastanje i remodeliranje značajno uvjetovani sadržajem silicija u Si-HAp, pokazujući da prisustvo silicija od 0,8 mas.% daje odgovor na ćelije koje sudjeluju u procesu formiranja i resorpcije kosti. Stehiometrijski HAp materijali slične poroznosti ostaju skoro nepromijenjeni i nakon 5 godina [41].

*In vitro* proučavanja doprinose razumijevanju specifičnih interakcija između materijala Si-HAp i HAp. Potvrđeno je da Si-HAp i HAp materijali pomažu razvoju osteoklasta iz mononuklearnih ćelija, pokazujući resorpciju u prisustvu osteoklasta. Materijali na bazi Si-TCP i Si-HAp pokazuju i povećanu osteogenezu ćelija sličnih osteoblastima što je praćeno povećanjem novoformirane matrice *in vitro* [37].

Lai i suradnici su pokazali da prisustvo silicija u biomaterijalima implantiranim u koštano tkivo nema neželjeno djelovanje na organizam, što je potvrđeno mjerenjem tragova silicija u krvi i urinu nakon implantiranja. Također, nije primjećeno ni povećanje silicija u kostima, bubrezima, jetri, plućima, limfnim čvorovima i slezeni, ukazujući da se silicij bez štetnog djelovanja izlučuje iz organizma [42].



## 7. BIOLOŠKA SVOJSTVA KOMPOZITNIH MATERIJALA SA SILICIJEM SUPSTITUIRANIM HIDROKSIAPATITOM

Kada se biomaterijal implantira u biološki sistem dolazi do dinamičke reakcije na spoju materijal-tkivo koja određuje stupanj i sastav specifičnih proteina koji utječu na oporavak ćelija, stimuliraju razvoj novog tkiva. Biomimetičko taloženje (taloženje biološki sličnog, karbonatnog HAp) na površini implantata je povezano s bioaktivnošću različitih tipova implantnih materijala [43].

Utvrđeno je da materijali koji ubrzavaju biomimetičko taloženje adsorbiraju fibronektin RGD protein, dodatno povećavaju funkciju vezanja fibronektina na pripremljenu površinu, što dovodi do vezanja osteoblasta. Naprijed navedeno predstavlja polaznu reakciju materijala u tekućem mediju koja se događa tijekom prvih 48 sati inkubacije kada dolazi do adsorpcije proteina koji privlače ćelije, koje dalje pripremaju površinu. Primjer koji ukazuje na vezu između biomimetičkog taloženja i biološke aktivnosti, predstavlja kemijsko tretiranje površine silicijem kako bi se stvorile Si-OH veze ili primjena negativnog potencijala na sloj silicija, koja će uzrokovati taloženje faze slične apatitu u otopini, stvaranjem materijala koji će mineralizirati osteoblasti. Ograničena bioaktivnost keramike na bazi stehiometrijskog HAp je u velikoj stabilnosti HAp u mediju, što ne poboljšava proces biomimetičkog taloženja uvjetovan površinom materijala [44].

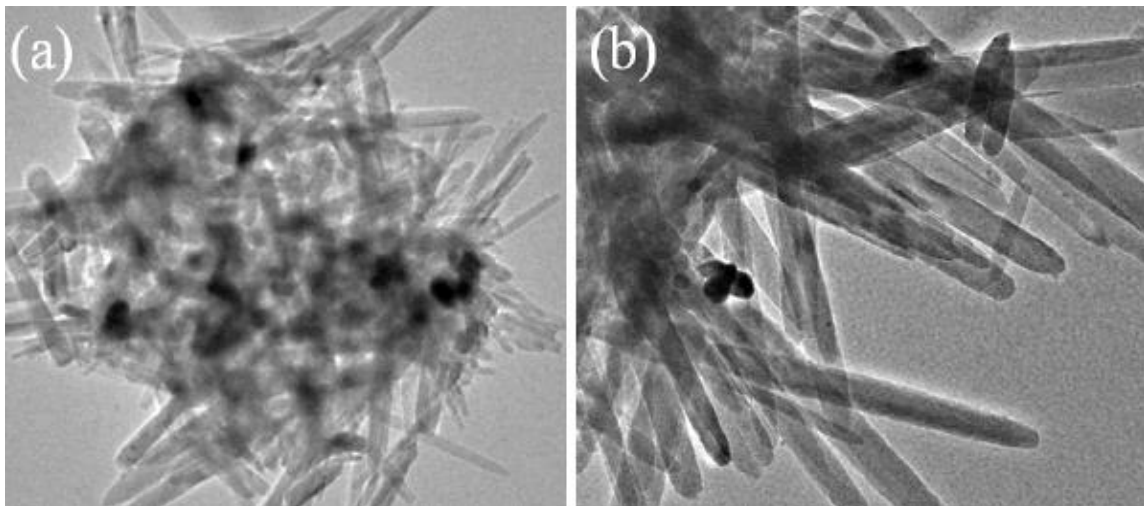
Sposobnost kalcij-fosfatnih materijala da induciraju biomimetičko taloženje je u uzajamnoj vezi s topljivošću  $\beta$ -TCP faze prisutne u materijalu koji se implantira. Međutim, kemijski sastav površine također uvjetuje biomimetičko taloženje. Činjenica je da se biomimetičko taloženje događa na različitim materijalima kao što su Bioglass, silicij i titan dobiven sol-gel metodom, kao i polimerima poput polietilen-oksida [45].

Biomimetičko taloženje se pospješuje postojanjem topljivih kalcij-fosfatnih materijala, razvijanjem negativno nabijene površine uslijed disocijacije kemijskih grupa kao što su Ti-OH ili Si-OH, specifičnom kemijom površine, kao i nanokristalnom strukturom [46].

Proučavanjem atomskih sila Si-HA i HAp utvrđeno je da korištenjem vrha koji završava  $\text{COO}^-$  grupom Si-HAp pokazuje prisustvo komponenata s jačim van der Waalsovima silama, elektronegativnije površine i povećanu površinsku adheziju. Istraživanja provedena mikroskopijom atomskih sila (AFM) uz korištenje RGD proteinom funkcionalnih vrhova su pokazala veću adheziju Si-TCP površina na kojima dolazi do bržeg biomimetičkog taloženja

koje je praćeno većom biološkom aktivnošću. Ovo istraživanje je pokazalo i porast elektronegativnosti površine s povećanjem kolićine silicija u sustavu, što nužno ne ukazuje na bolji biološki odgovor. Vjeruje se da supstitucija  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa sa  $\text{SiO}_4^{4-}$  grupama olakšava stvaranje negativnije nabijene površine kod materijala koji sadrže silicij [47].

Dobro je poznato da brojni biospojivi poput proteina, glikoproteina i polisaharida imaju znaćajan utjecaj na ubrzanje ili usporavanje nukleacije i rasta, kao i na morfologiju istaloženih kalcij-fosfatnih spojeva u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Usporedba HAp i Si-HAp u *in vitro* i *in vivo* uvjetima ukazuje da se stupanj topljivosti u spomenuta dva okruženja ne razlikuje, ali se mehanizam raspadanja i morfologija kristala koji se formiraju na HAp i Si-HAp znatno razlikuju. TEM mikrografi HAp i SiHAp prašaka sinteriranih na  $900^\circ\text{C}$  pokazuju kako silicij ima negativan utjecaj na velićinu kristala (Slika 6.), tj. velićina se smanjuje s povećanjem udjela silicija.



Slika 6. TEM mikrograf: a) Si-HAp b) čisti Hap [48]

U *in vitro* uvjetima dolazi do formiranja naslaga apatita, ali u *in vivo* uvjetima nastaju ploćasti kristali apatita, ukazujući na utjecaj proteina na morfologiju apatita koji se izdvaja na površini u *in vivo* okruženju [49].

## 8. ZAKLJUČAK

Ovim preglednim radom pokazana je važnost biokeramičkog materijala, kao što je hidroksiapatit, tvorbenika tvrdog tkiva u organizmu koji ima nestehiometrijski sastav. Zamjenom iona kalcija, manjim ionima smanjuje se veličina kristala i mijenja njihova morfologija što ovom materijalu daje strukturne karakteristike, koje više odgovaraju karakteristikama prirodnog koštanog tkiva. Teško je predvidjeti na koje mjesto će pojedini ion doći, međutim prethodno poznavanje karakteristika iona (polarnosti, elektronegativnosti te radijusa) može uvelike pomoći. Testiranjima u sličnim tekućinama, sustavima *in vitro* i *in vivo* potvrđena je njegova bioaktivnost i biokompatibilnost. Na ovaj način ispitivani materijal postaje pogodniji za eventualnu primjenu u medicini.

U cilju poboljšanja bioaktivnosti hidroksiapatita sinteriran je silicijem dopirani hidroksiapatit u postupku na povišenoj temperaturi. Za dobivanje hidroksiapatita poznate strukture i kemijskog sastava, bitne za medicinsku primjenu HAp, primenjena su dva postupka sinteze, polazeći od čestica hidroksiapatita vlaknaste i sferne strukture različitog Ca/P odnosa.

Kako bi HAp još bolje imitirao sastav prirodne kosti, rađena su istraživanja koja predlažu novu strategiju prema kojoj bi se u HAp osim silicija mogli ugraditi i drugi ioni. Ugrađivanje više od dvije vrste iona je područje koje do sada nije detaljno istraživano, što znači da bi nova istraživanja mogla krenuti u tom smjeru.

## 9. LITERATURA

1. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Biomaterials Science, A Multidisciplinary Endeavor, Biomaterials science (drugo izdanje), San Diego, 2006., str.31.
2. Dorozhkin, S.V., Calcium orthophosphate-based bioceramics, Materials, 6 (2013) 3840–3942.
3. Wopenkat, B., Pasteris, J.D., Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite, Materials Science and Engineering, C 25 (2005) 131 – 143.
4. Šercer, M., Predavanja - Prerada kompozitnih tvorevina, FSB, Zagreb, 2008./2009.
5. Traykova, T., Aparicio, C., Ginebra, M.P., Planell, J.A., Bioceramics as nanomaterials, Nanomedicine, 1 (2006) 91-106.
6. Zhao, J., Guo, L.Y., Yang, X.B., Weng, J., Appl Surf Sci, 255 (2008) 2942-2949.
7. Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, Polymer Degradation and Stability 95 (2010) 2126 – 2146.
8. Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, European Polymer Journal 49 (2013) 780 – 792.
9. Gupta, B., Revagade, N., Hilborn, J., Poly(lactic acid) fiber: An overview, Progress in Polymer Science 32 (2007) 455 – 482.
10. Davis, J.R., Handbook of Materials for Medical Devices, ASM International, 2003., str.73.
11. Dorozhkin, S.V., Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, Materials, 2 (2009) 399–498.
12. Dorozhkin, S.V., Calcium Orthophosphate: Applications in Nature, Biology and Medicine, Pan Stanford Publishing, Boca Raton (2012) 288-295.
13. Liu, C., Huang, Y., Shen, W., Cui, J., Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11, Biomaterials, 22 (2001) 301 – 306.

14. Orlovski, V.P., Komlev, V.S., Barino, S.M., Hydroxyapatite and hydroxyapatitebased ceramics, *Inorg. Mater.*, 38 (2002) 973–984.
15. Zhou, J., Zhang, X., Chen, J., Zend, S., de Groot, K., *Biomaterials, Mater J. Sci.Mater. Med.*, 4 (1993) 83–85.
16. Leeuw, N.H., Local ordering of hydroxyl groups in hydroxyapatite, *Chemical Communications*, (2001) 1646-1647.
17. <https://www.semanticscholar.org/paper/Ca-L2%2C3-edge-XANES-and-Sr-K-edge-EXAFS-study-of-and-Zougrou-Katsikini/5de461b8be466f0ef6d5f59bef969173dc26699c> , (pristup 27.srpnja 2018.)
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293032>, (pristup 27.srpnja 2018.)
19. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x>, (pristup 30.srpnja 2018.)
20. Tang, Y., Chappell, H.F, Dove, M.T., Reeder, R.J., Lee, Y.J., Zinc incorporation into hydroxylapatite, *Biomaterials*, 30 (2009) 2864–2872.
21. Zhu, K., Qiu, J., Ji, H., Yanagisawa, K., Shimanouchi, R., Onda, A., Kajiyoshi, K., Crystallographic study of lead-substituted hydroxyapatite synthesized by hightemperature mixing method under hydrothermal conditions, *Inorg. Chim. Acta*, 363 (2010) 1785–1790.
22. El Feki, H., Ben Salah, A., Daoud, A., Lamure, A., Lacabanne, C., Studies by thermally stimulated current (TSC) of hydroxyl and fluoro-carbonated apatites containing sodium ions, *J. Phys. Condens. Mater.*, 12 (2000) 8331–8343.
23. De Maeyer, E.A.P., Verbeeck, R.M.H., Pieters, I.Y., Effect of K<sup>+</sup> on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of monetite, *Inorg. Chem.*, (1996) 857–863.
24. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.*, 6 (2010) 1882–1894.
25. Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y., Formation and structure of zincsubstituted calcium hydroxyapatite, *Materials Research Bulletin*, 40 (2004) 357-360.
26. Zhu, K., Yanagisawa, K., Shimanouchi, R., Onda, A., Kajiyoshi, K., Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 26 (2006) 509–513.
27. Narasaraju, T.S.B., Phebe, D.E., Some physico-chemical aspects of hydroxyapatite, *J. Mat. Sci.*, 31 (1996) 1–21.

28. Lee, Y., Hahm, Y.M., Matsuya, S., Nakagawa, M., Ishikawa, K., Characterization of macroporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions, *J. Mater. Sci.*, 42 (2007) 7843–7849.
29. Wei, X., Akinc, M., Si, Zn modified tricalcium phosphates: Phase composition and crystal structure study, *Key Eng Mater*, (2005) 284–286.
30. Schwarz, K., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 70 (1973) 1608-1612.
31. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-78522015000400202](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522015000400202) , (pristup 8.kolovoza 2018.)
32. Reid, J., Tuck, L., Sayer, M., Fargo, K., Hendry, J., Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted alpha-tricalcium phosphate, *Biomaterials*, 27 (2006.) 2916-2925.
33. Astala, R., Stott, M., First principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption, *J Chem Phys.*, 86 (2006.) 551-571.
34. Sayer, M., Stratilatov, A., Reid, J., Calderin, L., Stott, M., Yin, X., Structure and composition of silicon stabilized tricalcium phosphate, *Biomaterials*, 24 (2002.) 369-382.
35. Gibson, I., Best, S., Bonfield, W., Chemical characterization of silicon substituted hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res*, 44 (1999.) 422-428.
36. [www.researchgate.net/figure/figure-scheme-of-silicate-substitution-into-the-HA-crystal\\_fig2\\_319617455&sq=35.+https%3A%2F%2F](http://www.researchgate.net/figure/figure-scheme-of-silicate-substitution-into-the-HA-crystal_fig2_319617455&sq=35.+https%3A%2F%2F) , (pristup 1.rujan 2018.)
37. Langstaff, S., Sayer, M., Smith, T., Pugh, S., Hesp, S., Thompson, W., Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization, *Biomaterials*, 20 (1999.) 1727-1741.
38. Pek, Y.S., Kurisawa, M., Gao, S., Chung, J.E., Ying, J.Y., The development of a chyaluronic acid-tyramine composite as an injectable bone cement, *Biomaterials*, 30 (2009.) 822–828.
39. Yin, X., Stott, M., Surface and adsorption properties of alpha tricalcium phosphate, *J Chem Phys*, 124 (2006.) 156-169.
40. Elsevier, J., Elliott, C., Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, 1994., str.169-179.
41. Mastrogiacoma, M., Corsi, A., Francioso, E., Di Comite, M., Monetti, F., Scaglione, S., Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate, *Tissue Eng*, 12 (2006.) 1261–1273.

42. Lai, W., Garino, J., Ducheyne, P., Si excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone, *Biomaterials*, 23 (2002.) 213–227.
43. Lewandrowski, K.U., Hile, D.D., Thompson, B.M., Wise, D.L., Tomford, W.W., Trantolo, D.J., Quantitative measures of osteoinductivity of a porous poly(propylene fumarate) bone graft extender, *Tissue Eng*, 9 (2003.) 85–93.
44. Yuan, H., de Bruijn, J.D., Zhang, X., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5), *J Biomed Mater Res*, 58 (2001.) 270–276.
45. Sepulveda, P., Jones, J.R., Hench, L.L., Bioactive sol–gel foams for tissue repair, *J Biomed Mater Res*, 59 (2002.) 340–348.
46. Rubin, J.P., Yaremchuk, M.J., Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery, *Plast Reconstr Surg*, 100 (1997.) 1336–1353.
47. Santin, M., Motta, A., Freddi, G., Cannas, M., In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin, *J Biomed Mater Res*, 3 (1999.) 82–89.
48. <https://www.omicsonline.org/open-access/solgel-mediated-synthesis-of-pure-hydroxyapatite-at-different-temperatures-and-silver-substituted-hydroxyapatite-for-biomedical-ap-2155-952X275-97369.html>, (pristup 2.rujan 2018.)
49. Yang, X.B., Roach, H.I., Clarke, N.M., Howdle, S.M., Quirk, R., Shakesheff, K.M., Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification, *Bone*, 29 (2001.) 523–531.

