

Priprava kompozitnog biomaterijala na temelju polimerne matrice i hidroksiapatita dopiranog metalnim ionima

Beus, Nediljko

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:149:546503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nediljko Beus

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Nediljko Beus

**Priprava kompozitnog biomaterijala na temelju
polimerne matrice i hidroksiapatita dopiranog
metalnim ionima**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Dr. sc. Dajana Milovac

Dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2017.

Zahvala

Mentoru prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću zahvaljujem na stručnom vodstvu i savjetima za izradu diplomskog rada.

Dr. sc. Dajani Milovac zahvaljujem se na pruženoj pomoći i vodstvu, te ukazanom strpljenu pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se obitelji na pruženoj podršci, te prijateljima koji su mi olakšali studiranje.

SAŽETAK

Cilj rada bio je priprava kompozitnog materijala na temelju hidroksiapatita supstituiranog magnezijem i biorazgradivih polimera za potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje koje razvija 3D strukture, okosnice, koje služe kao predložak za rast novog tkiva, a sve s ciljem obnavljanja, zamjene ili poboljšanja funkcije oštećenih kosti. S obzirom da je prirodno koštano tkivo kompozitni materijal anorganskog hidroksiapatita i organskog kolagena, razvijanje okosnica ide u smjeru oponašanja prirodnog tkiva, odnosno korištenje bioaktivne keramike i biorazgradivih polimera.

Provedena je ugradnja Mg^{2+} iona u strukturu hidroksiapatita hidrotermalnom konverzijom sipine kosti, pri čemu je kao izvor magnezijevih iona korišten magnezijev perklorat – $Mg(ClO_4)_2$. Pripravljene su kompozitni materijali Mg-HA i PCL/CS metodom vakuumske impregnacije za uzorke s udjelom magnezija od 1 mol.%. XRD analiza potvrđuje nastanak nove faze koja je identificirana kao vitlokit i/ili Mg/ β -TCP kao posljedica supstitucije kalcija magnezijem u strukturi HA. Zaključeno je da je hidrotermalnom sintezom dobiven dvofazni sustav kojeg čine HA i vitlokit pri nižim koncentracijama magnezija (1 i 3 mol.%), dok pri većoj koncentraciji (5 mol.%) koegzistiraju HA i Mg/ β -TCP. FTIR spektri uzoraka s različitim udjelom magnezija pokazuju smanjenje inteziteta fosfatnih, karbonatnih i hidroksilnih skupina. TGA metodom pokazano je blago smanjenje termičke stabilnosti HA povećanjem udjela magnezija, a udio PCL-a i kitozana u kompozitu iznosi 2.49 mas.%. SEM mikrofafi hidroksiapatita pokazuju da je originalna arhitektura sipine kosti u potpunosti očuvana i nakon hidrotermalne reakcije. Povećanjem udjela magnezija, početne sferične čestice čistog HA se smanjuju. Povećanjem udjela magnezija, čestice HA potpuno gube svoju početnu sferičnu formu i tvore aglomerate zajedno s novonastalim fazama. Mikrofafi kompozitnih uzoraka pokazuju da na površini materijala postoji tanki polimerni film koji prekriva HA čestice.

Ključne riječi: inženjerstvo tkiva, hidroksiapatit, magnezij, kitozan, polikaprolakton

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare composite material based on magnesium-substituted hydroxyapatite and biodegradable polymers for potential use in bone tissue engineering. Bone tissue engineering is an interdisciplinary field that develops 3D structures, scaffolds, which serve as a template for the growth of new tissue, intended to restore, replace or improve damaged tissues. Since natural bone tissue is a composite material of inorganic hydroxyapatite and organic collagen, materials based on bioactive ceramics and biodegradable polymers have gained much attention in developing scaffolds for bone tissue engineering.

By hydrothermal conversion of aragonite from the cuttlebone at 200° C for 48h magnesium-substituted hydroxyapatite (Mg-HA) was prepared, using magnesium perchlorate as a source of magnesium. Composite materials of Mg-HA and PCL/CS were prepared using vacuum impregnation technique. Quantitative XRD analysis showed the existence of a two-phase system consisting of HA and whitlockite at lower magnesium concentrations (1 and 3 mol.%), while HA and Mg/ β -TCP phase coexist at higher magnesium concentrations (5 mol.%). FTIR spectra of the samples showed a decrease in the intensity of phosphate, carbonate and hydroxyl groups with increased magnesium content. TGA analysis showed a slight decrease of thermal stability of HA when increasing the magnesium content, and that the composite samples contain 2.49 wt. % of the polymer. SEM micrograph of hydroxyapatite shows that the original architecture of the cuttlebone is completely preserved after hydrothermal reaction. By increasing the magnesium content, the spherical particles of pure HA gradually lose their initial shape and form agglomerates at 5 wt.% of added magnesium. Micrographs of the composite samples show a thin polymer film covering the HA particles.

Key words: tissue engineering, hydroxyapatite, magnesium, chitosan, polycaprolactone

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA	2
2.1. KOŠTANO TKIVO	2
2.1.1. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva	4
2.1.2. BIOKERAMIKA.....	4
3. BIORAZGRADIVI POLIMERI	10
3.1. KITOZAN	11
3.2. POLIKAPROLAKTON (PCL)	13
4. EKSPERIMENTALNI DIO	14
4.1. Priprava hidrokisapatita.....	14
4.2. Impregnacija kitozanom i PCL-om	14
4.3. Karakterizacija materijala.....	15
4.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)	15
4.3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	15
4.3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)	15
4.3.4. Pretražnaelektronskamikroskopija (SEM)	16
5. REZULTATI I RASPRAVA	17
5.1. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)	17
5.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	20
5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)	24
5.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	25
6. ZAKLJUČAK	29
7. LITERATURA.....	30

1. UVOD

Inženjerstvo koštanog tkiva objedinjuje područja inženjerskih i biomedicinskih znanosti s ciljem razvoja 3D okosnica koje mogu obnoviti, popraviti ili zamijeniti oštećeno koštano tkivo, te posljednjih godina zauzima vrlo važnu ulogu u podizanju kvalitete života pacijenata s koštanim oštećenjima u odnosu na konvencionalne načine liječenja putem tkiva donora. Ključne odlike materijala kojise koriste u koštanom tkivnom inženjerstvu jesu biokompatibilnost, biorazgradivost, te odgovarajuća mehanička svojstva. Također, vrlo je važno da je materijal visokoporozan s međusobno povezanim porama, čime se omogućuje vaskularizacija, integracija tkiva te protok hranjivih tvari i metaboličkih otpada.¹

S obzirom da je prirodno koštano tkivo kompozit organske matrice, uglavnom kolagena, i neorganske mineralne faze, hidroksiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sve veće zanimanje u području razvoja materijala u inženjerstvu koštanog tkiva usmjereno je na organsko/anorganske kompozitne materijale koji oponašaju prirodnu kost. Unatoč neodgovarajućim mehaničkim svojstvima visokoporozne okosnice HA, njegova izrazita biokompatibilnost, posebice sintetiziranog iz bioloških izvora, te bioaktivnost, tj. sposobnost da potakne specifični biološki odgovor organizma, čine ga vrlo prikladnim za regeneraciju koštanog tkiva. HA u svoju strukturu može primiti široku lepezu iona čime se mogu unaprijediti njegove karakteristike važne za razvoj novog koštanog tkiva. Od svih kationa koji se mogu ugraditi u strukturu HA magnezij je, zbog svoga biološkog značaja, najviše proučavan. Tako npr. nedostatak magnezija u koštanoj masi bitno djeluje na sve faze razvoja kosti uzrokujući prestanak rasta kostiju, odnosno smanjenje aktivnosti koštanih stanica.

Druga grupa materijala koja se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva su biorazgradivi polimerni materijali i to ponajviše zbog biokompatibilnosti, biorazgradivosti i odgovarajućih mehaničkih svojstava. Prednost kombiniranja biokeramike i polimernih materijala u odnosu na metalne, keramičke i kompozitne materijale koji nisu biorazgradivi, je ta što se nakon početne mehaničke stabilnosti kompozitne okosnice, polimerna i keramička faza postepeno razgrađuju oslobađajući pritom mjesto novostvorenom koštanom tkivu, što znači da nakon potpune resorpcije kompozitne okosnice u organizmu ne zaostaje strano tijelo. Osim toga, polimerna faza može služiti kao nosač lijekova ili biomolekula kojima se dodatno povećava funkcionalnost i bioaktivnost okosnice.¹

2. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA

Inženjerstvo koštanog tkiva razvija okosnice putem nasađivanja, rasta i diferencijacije stanica koje stvaraju novo tkivo na bioaktivnom, poroznom materijalu koji s odgovarajućim fizikalnim, kemijskim, biološkim i mehaničkim svojstvima podržava obnavljanje oštećenog koštanog tkiva.

Idealna okosnica omogućava adheziju stanica, proliferaciju, diferencijaciju i depoziciju ekstrastanične matrice. Također, mora imati poroznu strukturu koja omogućava vaskularizaciju okosnice te osigurava dovod kisika i hranjivih tvari stanicama za rast i razvoj, te uklanjanje toksina odnosno produkata metaboličkih aktivnosti. Veličina pora je vrlo važan faktor u dizajniranju okosnice. Neadekvatna veličina pora može dovesti do začepjenja pora uslijed stvaranja ekstracelularne matrice te tako onemogućiti razvoj koštanog tkiva. Opće je prihvaćeno da bi veličina pora trebala biti u rasponu od 200 μm do 900 μm .^{1,2,3,4} Ugrađena okosnica također treba potaknuti mehanizme regeneracije te se postepeno razgraditi proporcionalno s brzinom rasta novog tkiva bez stvaranja toksičnih nusproizvoda koji mogu dovesti u alergijskih ili upalnih procesa.

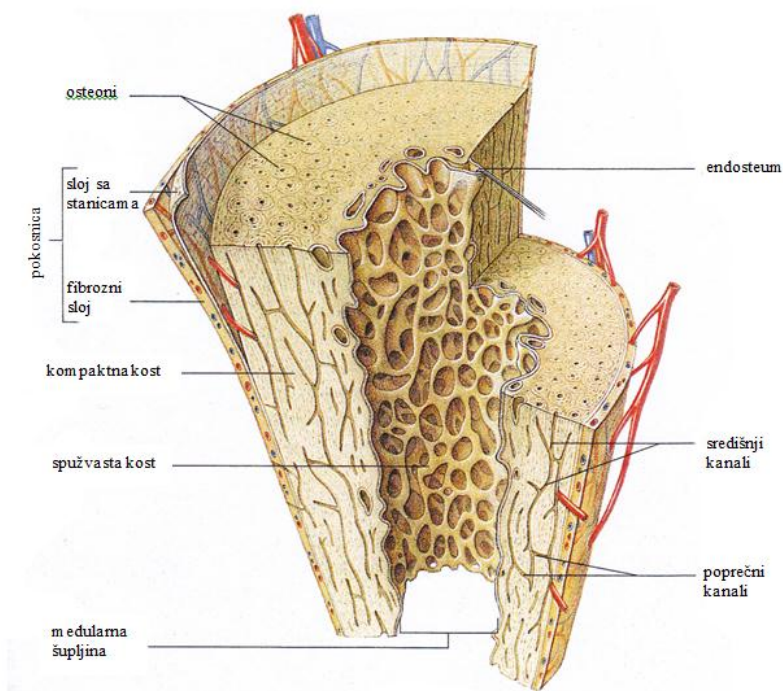
Proces kultiviranja stanica na okosnicu može biti izvršen u *in vitro* ili *in vivo* uvjetima. *In vivo* metoda uključuje izolaciju koštanih stanica, nasađivanje stanica na okosnicu i direktnu ugradnju u oštećeno tkivo pacijenta kako bi se potaknulo stvaranje novog tkiva *in situ*. *In vitro* uvjeti podrazumijevaju uzgoj koštanog tkiva u bioreaktoru, gdje se okosnice nasađuju s koštanim stanicama kojima se omogućuje kontrolirana ekspanzija i diferencijacija do konačnog stvaranja kosti. Nakon toga slijedi ugradnja okosnice u oštećeno tkivo pacijenta.⁵

2.1. KOŠTANO TKIVO

Glavne funkcije kosti u tijelu su potpora mekom tkivu, omogućavanje kretanja, prihvatite mišićima, zaštita unutarnjih organa, te rezervoar iona koji su neophodni za pravilno funkcioniranje metabolizma. Kost se sastoji od mineralne faze, kalcijeva fosfata u obliku karbonatnog hidroksiapatita, na koji otpada 2/3 mase kosti; organskog dijela, najvećim dijelom kolagenskih vlakana; i vode. Hidroksiapatitni pločati kristali, smješteni između kompaktno posloženih kolagenskih vlakana, kosti pružaju čvrstoću i tvrdoću, a kolagenska vlakna elastičnost i fleksibilnost.^{1,6}

Proces stvaranja kosti počinje s aktivnošću osteoblasta, koštanih stanica koje sintetiziraju i oslobađaju matricu kolagena u obliku želatinaste supstance, osteoida, koji se zatim mineralizira kontroliranom depozicijom kalcijeva fosfata. Osteoblasti ostaju zarobljeni unutar mineralne faze, napreduju prema osteocitima koji kontinuirano održavaju aktivnost formacije kosti. U međuvremenu, treći tip stanica, osteoklasti, kataboliziraju kost razarajući je. Dinamični proces formacije i razaranja kosti je uzrok njenog rasta tijekom stanja razvoja tijela, čuvajući njen oblik i sadržaj, i omogućava regeneraciju u slučaju loma.⁷

Kost se može podijeliti na dva dijela, vanjski (kompaktni) i unutarnji (porozni) dio (slika 1.). Kompaktni dio kosti je vrlo čvrst i ima zaštitnu, strukturalnu i mehaničku ulogu. Sastoji se od mineraliziranih kolagenskih vlakana umotanih u koncentrične lamele oko središnjeg kanala kroz koji prolaze krvne žile. Nasuprot tome, unutarnji dio kosti, trabekularnu kost, karakterizira visoka poroznost između 30% i 90% odnosno velika specifična površina.¹ Sastoji se od međusobno povezanih šupljina, te služi kao kompenzator iznenadnih naprezanja, raspoređuje sile na zglob, pridodaje tlačnoj čvrstoći kosti, no primarna uloga trabekularne kosti je homeostaza kalcija.



Slika 1. Shematski presjek kosti^{1,8}

Kristali hidroksiapatita su nanometarskih veličina s prosječnom duljinom od 50 nm, 25 nm širine i debljine od 2-5 nm, raspršenih u organskoj matrici. Njihova nanoveličina je veoma

važan faktor povezan sa topljivošću bioloških apatita u usporedbi s mineralnim apatitima. Male dimenzije i niska kristaličnost su dva izrazita svojstva bioloških apatita koja, kombinirana s njihovim nestehiometrijskim sadržajem, unutarnjom kristaličnom neuređenošću i prisutnosti karbonatnih iona u kristalnoj rešetci, objašnjavaju njihovo posebno ponašanje.⁷

2.1.1. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva

S obzirom na velik broj zahtjeva koje okosnica mora zadovoljavati, najčešće korišteni materijali koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva, odnosno biokeramika i biorazgradivi polimeri, pojedinačno ne mogu ispuniti sve ili većinu uvjeta koje idealna okosnica mora imati. Stoga, imajući na umu sastav prirodnog koštanog tkiva, posljednjih godina razvoj kompozitnih sustava na temelju bioaktivne keramike i biorazgradivih polimera poprima značajna dostignuća i konkretnu primjenu. Iako, i dalje je izuzetno zahtjevno sintetizirati materijal koji će imati adekvatan stanični odgovor nakon ugradnje u tijelo pacijenta.

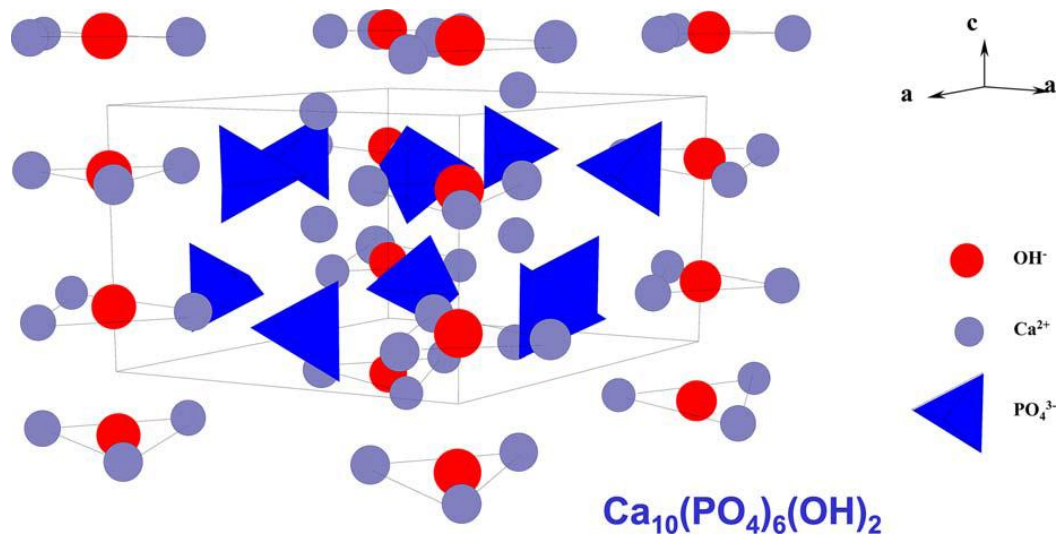
2.1.2. BIOKERAMIKA

Keramički materijali mogu biti klasificirani u dvije velike skupine: bioinertni i bioaktivni. Bioinertna keramika nema gotovo nikakvog utjecaja u živom tkivu koje je okružuje, a najbolji primjer je alumijev oksid. Nasuprot tome, bioaktivna keramika je sposobna vezati se sa živim koštanim tkivom; nekoliko kalcijevih fosfata i staklokeramike pokazuju to svojstvo. Fenomen bioaktivnosti je pokazatelj kemijske reaktivnosti keramičkih materijala sa njihovim okolišem.⁷

Najvažniji biokeramički materijali u inženjerstvu koštanog su hidroksiapatiti njemu slični kalcijevi fosfati, kao npr. trikalcijevi fosfati (β -TCP), oktakalcijev fosfat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), i dr. Zbog svoje sličnosti prirodnom koštanom tkivu, bioaktivnosti i izvrsne biokompatibilnosti, hidroksiapatit je među najistraživanijim materijalima za biomedicinske nadomjestke.

2.1.2.1. Hidroksiapatit

Stehiometrijski hidroksiapatit (HA), čija stehiometrijska formula glasi $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, s molarnim omjerom $\text{Ca}/\text{P}=1.67$, kristalizira u specifičnoj $\text{P6}_3/\text{m}$ kristalnoj rešetki, kemijski je i toplinski vrlo stabilan spoj. Kristalna struktura hidroksiapatita opisuje se kao kompleksna heksagonska slagalina kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u slagalini (slika 2.).¹



Slika 2. Kristalna struktura hidroksiapatita⁹

Mehanička svojstva HA slična su onima anorganske, najotpornije, komponente kosti. Modul elastičnosti hidroksiapatita iznosi 40-100 GPa, zubne cakline = 74 GPa, dentina (komponente zuba)= 21 GPa te kosti = 12-18 GPa. Ipak, gusto nakupljene umjetne tvorevine HA imaju mehaničku izdržljivost reda veličine 100 MPa naprema 300 MPa koju ima ljudska kost. Ovo je dakako drastično manje kad se govori o poroznim umjetnim tvorevinama. Gustoća hidroksiapatita iznosi 3.16 gcm^{-3} .

Hidroksiapatit posjeduje mogućnost supstitucije određenih kationa (Mg^{2+} , Na^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) i aniona (HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^-) unutar kristalne rešetke, a supstitucija iona utječe na njegova konačna kemijska i fizikalna svojstva. Vrsta i količina supstituiraćeg iona utječe na mehanizam zauzimanja mjesta u rešetki. Tako je na primjer, uz poštivanje neutralnosti naboja, moguća supstitucija karbonatnih iona na mjestu OH^- iona (A supstitucija) ili PO_4^{3-} iona (B supstitucija), a Mg^{2+} iona na mjestu Ca^{2+} iona (C supstitucija).¹⁰

Biološki apatiti se po stehiometriji, sastavu, kristaličnosti te ostalim fizičkim i mehaničkim svojstvima mogu poprilično razlikovati od čistog stehiometrijskog hidroksiapatita. Biološki apatiti imaju manjak kalcija, dakle njihov omjer Ca/P je uvijek niži od 1.67, koji odgovara stehiometrijskom apatitu. Nijedan biološki apatit nema takvu vrijednost omjera Ca/P, ali kod svih se sa starenjem taj omjer približava teoretskom što je povezano sa sve većom kristaličnošću. Ovakvo ponašanje ima iznimno fiziološko značenje stoga jer se mlađe, manje kristalično tkivo, može razviti i rasti brže, dok se u njega skladište drugi elementi koje tijelo treba tijekom njegova rasta.¹¹

Kako za sve kalcijeve fosfate, tako i za hidroksiapatit, postoji odnos između omjera Ca/P i pojedinih svojstava; što je omjer Ca/P niži to je veća kiselost i topivost smjese.⁹ Uočeno je i da s porastom omjera Ca/P dolazi do poboljšanja mehaničkih svojstava, najveća tlačna čvrstoća postiže se pri vrijednostima Ca/P \approx 1.67 (stehiometrijski HA), nakon čega slijedi nagli pad pri vrijednostima Ca/P $>$ 1.67.¹²

Dopirani hidroksiapatit zaokupio je pažnju mnogih istraživačkih grupa^{13, 14, 15} te se pokazao kao materijal s velikim potencijalom za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva gdje otvara mogućnost modifikacije i dobivanja željenih svojstava biomimetičkog koštanog implatanta.

Sinteze hidroksiapatita mogu se podijeliti u tri skupine¹⁶

- 1) metode u suhom stanju (engl. *dry methods*)
- 2) metode u mokrom stanju (engl. *wet methods*)
- 3) visokotemperaturne procese (engl. *high temperature processes*).

Klasična kemijska precipitacija najjednostavnija je metoda sinteze nanometarskog hidroksiapatita i temelji se na kritičnoj pH vrijednosti od 4.2 (pri sobnoj temperaturi) pri kojoj je HA najmanje topljiva kalcijeva fosfatna faza.⁷ Metoda precipitacije omogućuje sintezu u rasponu temperatura od sobne do vrelišta otapala (najčešće vode) te u širokom spektru pH vrijednosti vodenog medija od 4.2 do 13. Time je također omogućen veliki izbor prekursora kalcija, poput kalcijeva hidroksida, kalcijeva nitrata, kalcijeva karbonata, kalcijeva acetata ili kalcijeva klorida, odnosno, fosforne kiseline ili diamonijeva hidrogenfosfata kao izvora PO_4^{3-} iona. Tipična procedura precipitacije temelji se na dokapavanju otopine jednog prekursora u drugi pri stehiometrijskom omjeru kalcija i fosfora (Ca/P = 1.67), uz kontinuirano miješanje i

regulaciju pH vrijednosti otopine. Dobivena suspenzija se neposredno nakon završetka sinteze ispire, filtrira i suši, ili se prethodno ostavlja da stari pri atmosferskim uvjetima.¹⁷

Hidrotermalna sinteza je postupak u kojem se odvijaju jednofazne ili višefazne reakcije u vodenom mediju pri povišenim temperaturama ($T > 25^\circ\text{C}$) i tlakovima ($p > 100 \text{ kPa}$) u cilju dobivanja kristaličnog HA direktno iz otopine. Sinteze HA su uglavnom vođene pri autogenim tlakovima, a što odgovara tlaku zasićene pare iznad otopine pri određenoj temperaturi. Najviše se koristi za prevođenje Ca-karbonatnih prirodnih bioloških struktura u HA jer pruža mogućnost očuvanja originalne karbonatne arhitekture.¹¹

2.1.2.2. Hidroksiapatit dopiran magnezijem

Ugradnja magnezija u hidroksiapatit bitno je istraživačko područje zbog uloge magnezija u ljudskom tijelu.¹⁸ Magnezij je jedan od esencijalnih elemenata svih živih organizama 60–65 % ukupnog magnezija u ljudskom tijelu nalazi se u kostima i zubima, dok je preostalih 35–40 % u mišićnim vlaknima, živcima, tjelesnim tekućinama i ostalim tkivima.¹⁹ Zubna caklina, dentin (komponenta zuba) i kost redom prosječno sadrže 0,44, 1,23 i 0,72 mas.% magnezija.²⁰ Magnezij je neophodan za razvoj kosti i poznato je da starenjem kosti sadrže sve manji udio magnezija, a sve veći kalcija. Ova pojava ima velik utjecaj na metabolizam kostiju; uzrokuje prestanak rast kosti, smanjuje aktivnost osteoblasta i osteoklasta te povećava vjerojatnost loma kosti i pojavu osteoporoze.^{21, 22}

Najuspješnije i najčešće metode pripreme hidroksiapatita dopiranog magnezijem jesu one u mokrom stanju – od toga najčešće klasična kemijska precipitacija. Supstitucija Ca^{2+} magnezijem često se provodi korištenjem anorganskih izvora magnezija, poput $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ²³, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ²⁴ i $\text{Mg}(\text{OH})_2$.²⁵ Manji atomski radijus magnezija (0.86Å naprema 0.96Å kalcija) i veći afinitet prema molekulama vode ograničavaju njegovu ugradnju u apatitnu rešetku. S povećanjem količine ugrađenog magnezija lagano se smanjuje veličina elementarne ćelije sve do koncentracijske granice od 0.15 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ kada dolazi do raspada apatitne strukture istvaranja drugih faza (najčešće TCP ili amornog kalcijско-magnezijskog fosfata). Ugradnja magnezija u sintetski hidroksiapatit ograničena je ako drugi ioni, poput karbonata, fluorida nisu istovremeno substituirani u strukturu.²⁰

U većini slučajeva pripreme Mg-HA metodom precipitacija Mg^{2+} i Ca^{2+} ioni istovremeno su dodavani u reakciju s HPO_4^{2-} . Pojedina istraživanja pokazala su da je

precipitacijom i metodama hidrolize u strukturu hidroksiapatita moguće ugraditi do 1 mas.% magnezija.^{20, 26} Mayer i sur.²⁷ precipitacijom su dobili prah hidroksiapatita koji sadrži 1,5 mas.% magnezija bez da je došlo do ugradnje karbonata u strukturu. Golden i sur.²⁸ uspjeli su iz vodene otopine sintetizirati prah Mg-HA s 2 mas.% magnezija. Okazaki i sur.²⁹ substituirali su i do 5 mas.% magnezija u hidroksiapatit korištenjem metode precipitacije.

U odnosu na sintezu metodom precipitacije znatno je manje radova u kojima se hidrotermalnim postupkom sintetizira hidroksiapatit dopiran ionima (fluorom³⁰, klorom³¹, silicijem³², i stroncijem³³). Bigi i sur.²¹ sintetizirali su prah hidroksiapatita koji sadrži i do 5 mas.% magnezija pri hidrotermalnim uvjetima na 120 °C.

2.1.2.3. Biološki izvori za sintezu hidroksiapatita – sipina kost

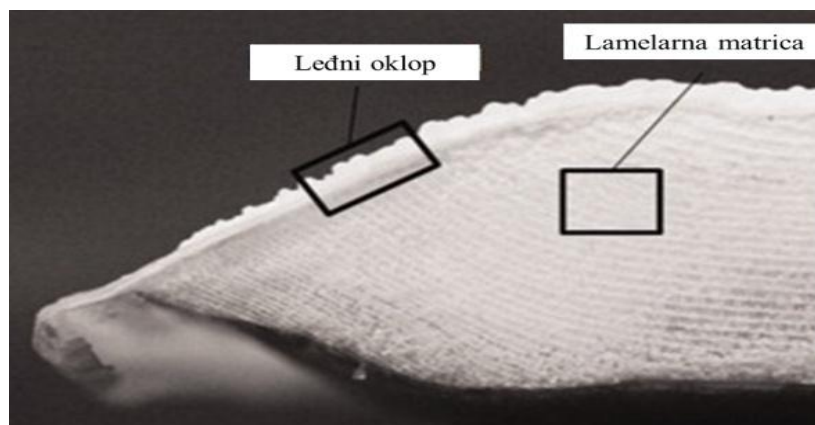
Sinteza poroznih materijala koji oponašaju izvanstaničnu matricu prirodne kosti velik je izazov za inženjerstvo koštanog tkiva. Uporaba bioloških struktura i materijala poput koralja³⁴, morskih školjkaša³⁵, algi³⁶, životinjskih skeleta³⁷ i sličnog u medicinske svrhe jedan je od pristupa gdje se koristi sličnost sastava i mikrostrukture s anorganskom strukturom kosti. Hidrotermalna transformacija prirodnih aragonitnih struktura započela je još 70-ih godina prošlog stoljeća, a jednostavan način pripreme HA i visokoporozna struktura i dalje čine ovo znanstveno područje atraktivnim. Među biološkim strukturama i materijalima sipina kost se zbog svoje dostupnosti širom svijeta i niske cijene nalaže se kao jedan od najboljih prirodnih bioloških izvora.³⁸

Sipa (*Sepia officinalis L.*) je morska životinja koja spada u red glavonožaca. Njezin plašt se sastoji od tri mišićna sloja. Vanjski i unutarnji su kružne građe i protežu se oko cijelog organizma, dok je srednji sloj građen od poprečnih vlakana okomitih na okolna dva. Unutar tijela nalazi se kost koja se još naziva sipina kost ili sipovina (slika 3.). To je ostatak vanjske ljuštore njenih predaka mekušaca.



Slika 3. Sipina kost³⁹

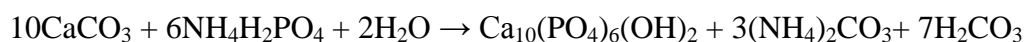
Sipina kost ima izrazito poroznu strukturu (oko 90%) i zauzima 9% volumena sipe. Kost se sastoji od dva dijela: leđnog oklopa, plašta i unutarnje lamelarne matrice. Lamelle su međusobno odvojene potpornim stupićima (slika 4).



Slika 4. Uvećani prikaz sipine kosti koji prikazuje leđni oklop i lamelarnu matricu kosti¹

Lamele ili paralelni listovi izgrađeni su od aragonitne modifikacije kalcij karbonata (CaCO_3) te tvore odjeljke koji su međusobno izolirani. Unutar svakog odjeljka se nalazi tekućina i plin koji se mogu slobodno kretati. Razmak između lamela je različit i uglavnom iznosi od 200 do 600 μm . Sipina kost se koristi kao nadomjestak za tvrda koštana tkiva zbog svoje strukture jer ima poroznost sličnu ljudskoj kosti. Sipina kost se sastoji od aragonita, a to je nestabilna modifikacija kalcijevog karbonata te je kao takva neupotrebljiva. Potrebno ju je prevesti u hidroksiapatit, a da se pri tome ne naruši njezina struktura.¹

Uspješnu sintezu HA iz anorganske komponente sipine kosti hidrotermalnom konverzijom proveli su Ivanković i suradnici⁴⁰ utvrdivši da je aragonit u potpunosti moguće prevesti u AB-supstitucijski tip karbonatnog HA, a da se pritom potpuno očuva originalna mikrostrukura i arhitektura sipine kosti. Kao polazne komponente koristili su sipinu kost i amonijev dihidrogenfosfat, a reakcija hidrotermalne sinteze dana je jednadžbom:



3. BIORAZGRADIVI POLIMERI

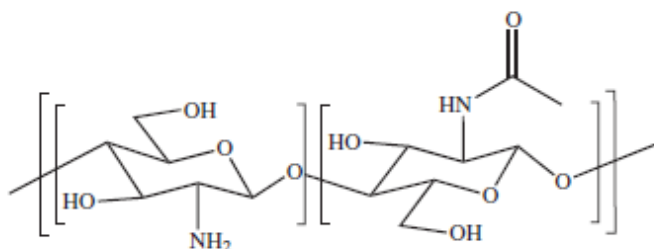
Biorazgradivi polimeri primjenjivi u inženjerstvu koštanog tkiva dijele se u dvije skupine:

- *sintetske* kao što su poli(mliječna kiselina) (PLA, poli(glikolna kiselina) (PGA), kopolimeri laktida i glikola (PLGA), poli(ϵ -kapolakton) (PCL).
- *prirodne*, među kojima su kolagen, hijaluronska kiselina i njeni derivati, škrob, želatina, alginati, hitin te kitozan i njegovi derivati.

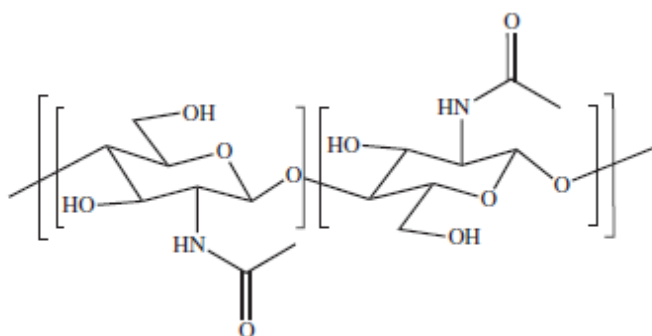
Proces biorazgradnje polimera podrazumijeva cijepanje polimernih makromolekula na manje molekulske jedinice reakcijama hidrolize ili uz pomoć enzima. Prirodni i sintetski biorazgradivi polimeri imaju svoje prednosti i nedostatke. Jedna od prednosti sintetskih polimera je mogućnost dobivanja jednolikog materijala pri svakoj šarži sinteze te veća žilavost i bolja mehanička svojstva. Pored toga, razlike u brzini razgradnje s obzirom na mjesto razgradnje *in vivo* su vrlo male te su svojstva polimera lako predvidljiva. Međutim, sintetski polimeri su općenito biološki inertni i njihova se razgradnja odvija hidrolitičkim reakcijama u dužem vremenu što može ograničiti primjenu za regeneraciju određenih dijelova koštanog tkiva. Prirodni polimeri primjenjivi su upravo zbog svoje sličnosti s biološkim molekulama izvanstanične matrice i proteinima što olakšava prepoznavanje materijala od strane koštanih stanica koje se nasađuju. Ključni nedostatak prirodnih polimera su ograničena mehanička svojstva koja je moguće modificirati primjenom umreživala, kemijskim cijepanjem ili fizikalnim umješavanjem odgovarajućih sintetskih polimera.¹⁷

3.1. KITOZAN

Kitozan je linearan, semikristalični polisaharid sastavljen od jedinica 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukana (N-acetil D-glukozamin) i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukana (D-glukozamin) (slika 5.). Kitozan nije raširen u prirodi, ali se može lako dobiti djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina (slika 6.). Hitin je polisaharid sastavljen od 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukoze. Najčešće se nalazi u egzoskeletu rakova, škampi i jastoga. Hitin je kemijski inertan i nije topiv u vodi i organskim otapalima.⁴¹



Slika 5. Kemijska struktura kitozana⁴²



Slika 6. Kemijska struktura hitina⁴²

Stupanj deacetilacije kitozana, koji indicira broj amino skupina u lancu, se računa kao omjer D-glukozamina prema sumi D-glukozamina i N-acetil D-glukozamina. Da bi se nazvao „kitozan“, deacetilirani hitin treba sadržavati barem 60 % ostataka D-glukozamina (što odgovara stupnju deacetilacije od 60%).^{43, 44} Deacetilacija hitina se provodi kemijskom hidrolizom uz izrazito alkalne uvjete ili se provodi enzimskom hidrolizom u prisutnosti određenih enzima.⁴²

Tokom proizvodnje kitozana teško je predvidjeti njegove karakteristike. Zato današnji pristup u proizvodnji kitozana preferira analizu sadržaja i svojstava konačnog produkta, umjesto ciljanog pretpostavljanja karakteristika produkta predefiniranjem parametara procesa proizvodnje. Kako kitozan potječe iz prirodnog polimera, on može biti kontaminiran organskim i anorganskim nečistoćama, i može imati široku polidisperznost, zbog čega se često karakterizira prema viskoznosti, a ne prema raspodjeli molarnih masa. Kitozan je slabo topljiv, izuzev kiselih medija, što analizu čini teško izvodivom.⁴²

Prisutnost amino skupina D-glukozamina koje se mogu protonirati objašnjavaju većinu svojstava kitozana. Hemostatska aktivnost kitozana je povezana sa prisutnošću pozitivnog naboja na lancu kitozana. Kako su membrane krvnih stanica negativno nabijene, dolazi do interakcije sa pozitivno nabijenim kitozonom.⁴²

Polikationska struktura kitozana objašnjava njegova analgetska svojstva. Amino skupine se mogu protonirati u prisustvu protonskih iona koji se oslobađaju u upaljenom području, što rezultira analgetskim efektom.⁴²

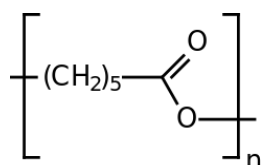
Kitozan se može razgraditi *in vivo* djelovanjem nekoliko proteaza, i uglavnom lizozimima.¹⁵ Biorazgradnja kitozana vodi do formiranja netoksičnih oligosaharida različitih duljina. Oligosaharidi mogu biti uključeni u metabolizam ili se mogu dalje izlučivati. Brzina degradacije kitozana je uglavnom povezana stupnjem deacetilacije, ali također i raspodjelom produkta N-acetil D-glukozamina i molekulskom masom kitozana.⁴⁶

Veza između biorazgradivosti kitozana i stupnja deacetilacije ogleda se preko njegove kristaličnosti. Kitozan je semikristaličan polimer; kristalnost je maksimalna (100%) za stupanj deacetilacije 0%. Kristaličnost je obrnuto proporcionalna kinetici biorazgradnje, međutim kada stupanj deacetilacije padne ispod 60%, njegova kristaličnost se počinje smanjivati, što rezultira povećanjem brzine biorazgradnje. Može se pretpostaviti da se kraći lanci kitozana brže razgrađuju u oligosaharide nego kitozan s većom molekulskom masom.⁴²

Ako se uzmu u obzir sva navedena svojstva, ne iznenađuje to što se kitozan primjenjuje u biomedicini i farmaciji, kao implantatni materijal za kosti i umjetnu kožu.⁴² Istraživanjem kitozana razvijene su razne metode za fino oblikovanje kitozanskih hidrogelova i pjena (spužva) kao primjerene trodimenzionalne skelete u inženjerstvu tkiva.⁴⁷

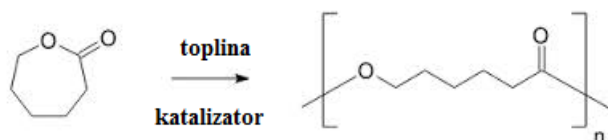
3.2. POLIKAPROLAKTON (PCL)

Polikaprolakton je sintetski alifatski, biorazgradivi poliester koji se proizvodi iz sirove nafte. Hidrofoban je i semikristalan polimer što znači da mu se kristalnost smanjuje s povećanjem molekulske mase. Dobro svojstvo PCL-a je niska temperatura taljenja (59-64°C) te velika moć umješavanja čime se proširuje područje primjene. Staklište polikaprolaktona je -60°C. Polikaprolakton se lako oblikuje na nižim temperaturama. Prosječna molekulska masa polikaprolaktona je između 3000-80000 g/mol.



Slika 7. Strukturna formula polikaprolaktona⁴⁸

Polikaprolakton se dobiva ring-opening polimerizacijom (polimerizacija otvaranjem prstena) iz ϵ -kaprolaktona uz prisutnost raznovrsnih anionskih i kationskih katalizatora (slika 8.).¹⁹



Slika 8. Polimerizacija otvaranjem prstena

Alifatski poliesteri razgrađuju se jednim ili kombinacijom više mehanizama kao što su hidroliza, enzimski, mikroba ili termička razgradnja. Brzina razgradnje ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući stupanj kristalnosti, hidrofilnost, molekulska masu, oblik molekule, veličinu i geometriju uzorka, te o uvjetima i okruženju, poput pH i temperature, u kojem se odvija razgradnja. Hidroliza je najčešći mehanizam razgradnje sintetskih polimera u biološkom okruženju. Esterske, eterske i uretanske veze smanjuju osjetljivost hidrolize. Oni su odgovorni za cijepanje polimernih lanaca, smanjenje duljine lanaca i na kraju za veličinu lanaca koji difundiraju u medij kada su dovoljno mali. PCL se može razgraditi pomoću živih

organizama (npr. bakterija i gljivica), ali nije razgradiv u životinjskom i ljudskom tijelu zbog nedostatka odgovarajućih enzima.⁴⁹

PCL je pogodan za kontrolirani prijenos lijekova zbog svoje visoke propusnosti na mnoge lijekove, biokompatibilnosti i sposobnosti da se potpuno izluči iz tijela nakon biorazgradnje. Njegova razgradnja je spora (2-3 godine) u usporedbi sa drugim polimerima, pa je zbog toga najpogodniji za dugoročno otpuštanje lijekova (duže od godine dana). Kemijska struktura PCL-a čini ga hidrofobnim i visoko kristalastim što rezultira slabim upijanjem vode i zato je brzina razgradnje spora. PCL ima sposobnost stvaranja kompatibilnih mješavina s drugim polimerima, te se time može utjecati na kinetiku razgradnje i olakšano oblikovanje sukladno potrebama.⁵⁰ Zbog njegove niske temperature taljenja i visoke temperature razgradnje ima široku paletu za termoplastičnu obradu. Stoga je PCL također pogodan i kao materijal za izradu okosnica u inženjerstvu tkiva.⁵¹

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Priprava hidrokisapatita

Polazni materijal za sintezu hidroksiapatita korištena je aragonitna sipina kost. Plašt kosti na površini je mehanički uklonjen, a porozni dio izrezan cirkularnom pilom na komadiće debljine 5-6 mm. Izrezani komadići su stavljeni u otopinu natrijeva hipoklorita (NaClO , 13% aktivnog Cl_2) na 24 sata kako bi se uklonila sva organska komponenta kosti. Nakon što je uklonjena organska komponenta, komadići su isprani destiliranom vodom i sušeni na 105°C . Tako pripremljeni uzorci su stavljeni u teflonski lončić u tri metalna reaktora zajedno s 0.6M otopinom amonijeva dihidrogenfosfata ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Fisher Chemicals) i 1M otopinom magnezijeva perklorata ($\text{Mg}(\text{ClO})_4$, Fluka) na 200°C tijekom 48h. $\text{Mg}(\text{ClO})_4$ je dodan u koncentraciji 1,3 i 5 mol.% Mg u odnosu na Ca. Po završetku reakcije, uzorci su izvađeni, isprani destiliranom vodom i sušeni na 105°C . Dobiveni materijali označeni su kao 1%Mg-HA, 3%Mg-HA i 5%Mg-HA.

4.2. Impregnacija kitozonom i PCL-om

Pripravljena je otopina 10 mas.% PCL-a i 2 mas.% kitozana. 5g PCL-a otopljeno je u 50 mL kloroforma i miješano do potpunog otapanja. Uzorci 1%Mg-HA su postavljeni u uređaj za

impregnaciju (Citovac Struers) i nakon postignutog vakuuma, usisanaje otopina PCL-a u posudicu s uzorcima. Uzorci su izvađeni i kratko osušeni te impregnirani otopinom kitozana.

Za pripravu 2 mas.% otopine kitozana otopljeno je 1 g kitozana u 50 mL 0.2M octene kiseline na magnetskoj mješalici pri temperaturi 40°C. pH vrijednost otopine podešena je s 12M otopinom NaOH s 4.58 na 5.74. Otopina kitozana je zatim usisana u posudicu s uzorcima koji su nakon toga sušeni pri temperaturi od 40°C tijekom 24h.

Nakon sušenja uzorci su tretirani s 1M otopinom NaOH tijekom 2h te višestruko ispirani destiliranom vodom te sušeni radi daljnje karakterizacije. Dobiveni materijal označen je kao 1%Mg-HA/PCL/CS.

4.3. Karakterizacija materijala

4.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka određeni su rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) na Shimadzu XRD-6000 instrumentu s CuK α zračenjem pri 40 kVi 30 mA, u mjernom području kuteva $10^\circ < 2\theta < 65^\circ$ pri brzini snimanja od 0.2°/s. Uzorci su pomješani sa standardom Si (5 mas. %) (JCPDS 27-1402). Računanje parametara jedinične ćelije Mg-HA i kvantitativna rendgenska analiza mineralnih faza provedeni su softverskim programom TOPAS (Bruker).

4.3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

FTIR analiza je provedena pomoću ATR (*engl. attenuated total reflectance*) spektroskopije za krutine na kristalu dijamanta na uređaju ATR-FTIR Bruker VERTEX 70. Uzorci su analizirani u apsorpcijskom području od 400cm⁻¹ do 4000 cm⁻¹.

4.3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Uzorci su analizirani termogravimetrijskom analizom u platinskim lončićima na uređaju za TGA (TA Instruments Q500) u rasponu od 40°C do 1000°C, brzinom zagrijavanja 5°C/min.

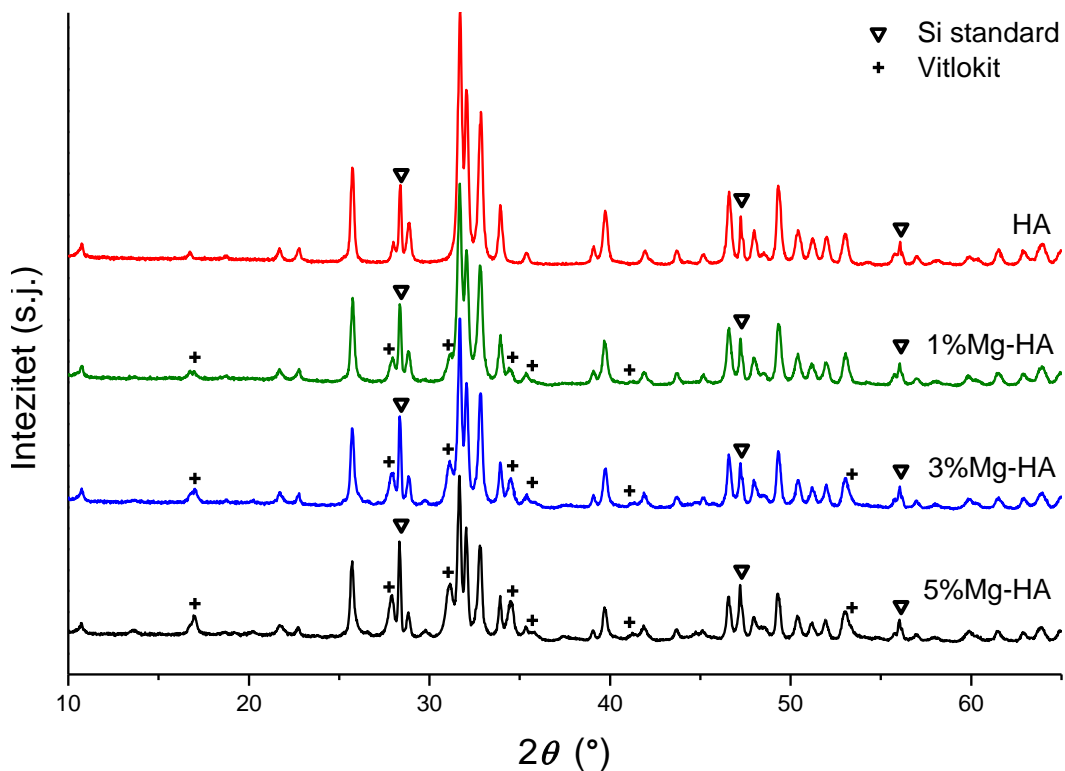
4.3.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija HA i kompozitnih uzoraka promatrana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM TESCAN VEGA TS5136LS). S obzirom da su uzorci nevodljivi, prethodno su napareni slojem zlata.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

Difrakcijski spektri HA i Mg-HA prikazani su na slici 9. Difrakcijski maksimumi koji se javljaju na $2\theta = 10.8^\circ, 16.8^\circ, 21.8^\circ, 22.8^\circ, 25.7^\circ, 27.9^\circ$ i 28.9° karakteristični su za hidroksiapatit (JCPDS 09-0432). Na difraktogramima uzoraka dopiranih s magnezijem javljaju se nove faze i to već pri najmanjoj koncentraciji magnezija.



Slika 9. Difrakcijski spektri HA i Mg-HA s različitim udjelom magnezija

Prema bazi podataka za difrakcijsku analizu prašaka, nova faza identificirana je kao vitlokit ($\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$, JCPDS 42-0578) ili β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, JCPDS 09-0169). Naime, u literaturi se često nailazi na podatak da se naziv vitlokit pripisuje β -TCP-u^{52, 53, 54, 55}, no, iako obje faze imaju istu romboedarsku strukturu, između njih postoji razlika kako u sastavu tako i u svojstvima. Objašnjenje zašto se β -TCP često naziva vitlokit, vjerojatno leži u činjenici da je β -TCP faza dobivena u opisanim istraživanjima nedovoljno, ili uopće nije

karakterizirana u obzirom na prisustvo drugih elemenata, odnosno kemijskog sastava ispitivanih uzoraka.⁵⁵

Prema literaturi, čisti β -TCP nastaje pri povišenim temperaturama (850-1125°C) i ne može nastati u sintezi iz vodenih otopina, primjerice hidrotermalno, pa se njegovo dobivanje u sintezama na nižim temperaturama (do 100°C) u području pH između 6 i 9, uvijek povezuje s prisutnošću Mg^{2+} iona koji promiču njegovo nastajanje^{56; 57} Stoga, u prisustvu magnezija, nastala faza β -TCP je zapravo Mg/ β -TCP ($Ca,Mg)_9(PO_4)_6$).

Vitlokit u svojoj strukturi sadrži HPO_4^{2-} ione za razliku od β -TCP-a koji u svojoj strukturi sadrži samo PO_4^{3-} ione, što ih razlikuje u topivosti i drugim svojstvima.⁵⁵

Iz difraktograma je vidljivo da što je veći udio dodanog magnezija to je intenzitet difrakcijskih maksimuma nove faze veći, dok su intenziteti difrakcijskih maksimuma karakteristični za hidroksiapatit manji.

Točan udio pojedinih faza izračunat je Rietveldovom metodom i prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Udio faza uzoraka HA supstituiranog magnezijem

Udio faza / %	HA	1%Mg-HA	3%Mg-HA	5%Mg-HA
Hidroksiapatit	95.02	84.48	67.1	54.64
Vitlokit i/ili Mg/β-TCP*	-	10.18	27.6	39.7
Silicij (standard)	4.98	5.34	5.3	5.66

*Sastav faze prikazan je kao vitlokit ili Mg/ β -TCP s obzirom da ih zbog identične strukture softverski program Topasne može razlikovati

Iz izračunatih udjela faza u tablici 1. može se vidjeti kako se uzorak čistog HA sastoji isključivo od jedne faze, dok se povećanjem udjela magnezija udio novonastale faze vitlokitai/ili Mg/ β -TCP-a povećava s 10.18 mas.% u uzorku 1%Mg-HA do 39.7 mas.% u uzorku 5%Mg-HA.

Tablica 2. Parametri i veličina kristalita HA izračunati na temelju snimljenih difraktograma

		HA	1%Mg-HA	3%Mg-HA	5%Mg-HA
Parametri rešetke hidroksiapatita	a (Å)	9.4293	9.4409	9.4354	9.4363
	c (Å)	6.9025	6.9039	6.9076	6.9088
Velicina kristalita (nm)		56	47.9	62.3	71.2

Tablica 2. prikazuje parametre i veličinu kristalita HA iz koje se vidi da parametar a kristalne rešetke raste povećanjem udjela dodanog magnezija, kao i parametar c . Iako prema literaturi, oba parametra rešetke bi se zbog manjeg radijusa Mg^{2+} iona (0.69Å) u odnosu na Ca^{2+} iona (0.96Å) trebala smanjivati, dobiveni rezultati pokazuju suprotno. Blagi porast parametra a kristalne rešetke HA nađen je u literaturi u sličnim istraživanjima.⁵⁸ Veličina kristalita HA izračunata Scherrerovom jednadžbom, opada u uzorku 1%Mg-HA, a zatim raste daljnim povećanjem udjela magnezija.

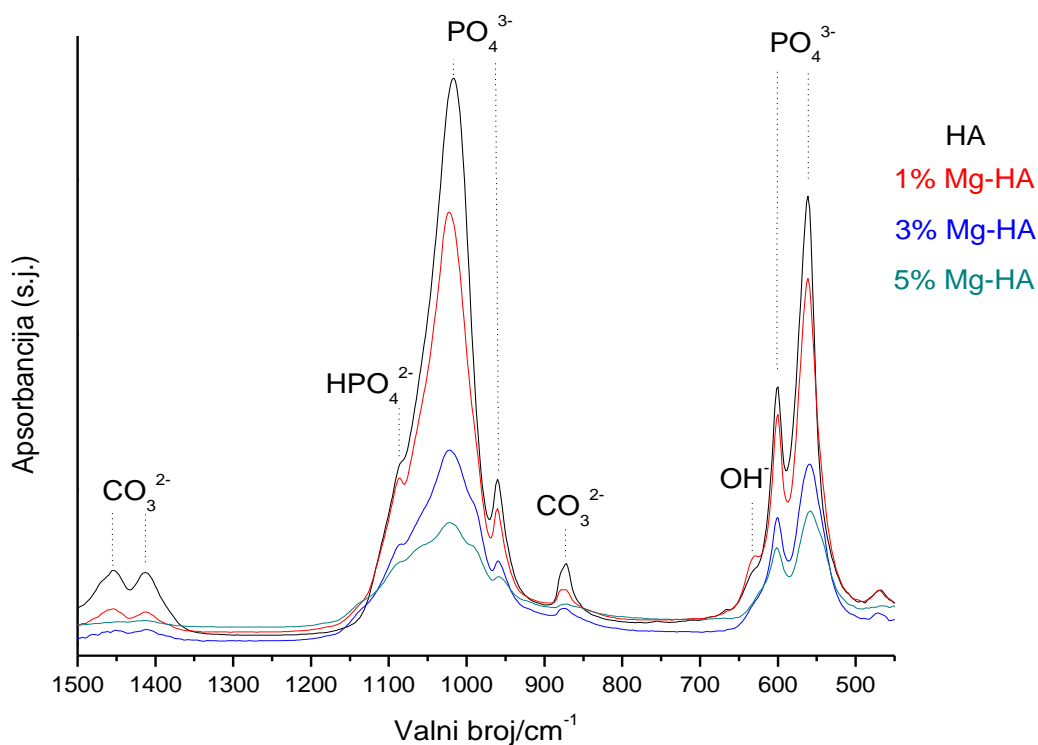
Tablica 3. prikazuje parametre i veličinu kristalita Mg/β-TCP-a iz koje se vidi da se parametar a kristalne rešetke smanjuje kako raste udio dodanog magnezija, kao i parametar c . Radijus Mg^{2+} ionamanji je od radijusa Ca^{2+} iona što dovodi do smanjenja parametara kristalne rešetke ako se Mg^{2+} ugradi na mjesto Ca^{2+} . Veličina kristalita također opada porastom udjela magnezija što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima.^{59, 60, 61}

Tablica 3. Parametri i veličina kristalita Mg/β-TCP-a izračunati na temelju snimljenih difraktograma

		1%Mg-HA	3%Mg-HA	5%Mg-HA
Parametri rešetke Mg/β-TCP	a (Å)	10,3914	10,3841	10,3792
	c (Å)	37,2813	37,2587	37,2567
Velicina kristalita (nm)		42,6	28,2	26,7

5.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

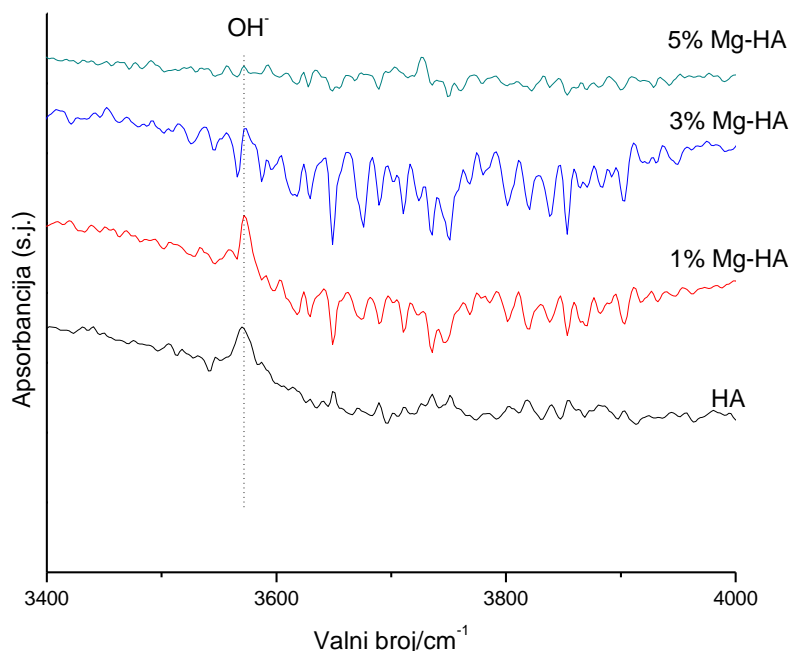
FTIR spektri HA i Mg-HA za različite udjela magnezija prikazani su na slici 10. i 11. Spektar HA pokazuje karakteristične vrpce PO_4^{2-} skupina na valnim brojevima 562, 600, 960 i 1016 cm^{-1} , CO_3^{2-} skupine na valnim brojevima 872, 1413 i 1452 cm^{-1} , te OH^- skupine na pri 630 cm^{-1} i 3750 cm^{-1} . HA u svoju strukturu može primiti supstituente kao što je CO_3^{2-} skupina, pa tako postoje dva tipa karbonatnih supstitucija: supstitucija CO_3^{2-} skupina na mjesto OH^- skupina (tip A) i CO_3^{2-} skupina na mjesto PO_4^{3-} skupina (tip B). Iz spektra HA vidljivo je da HA sadrži B-tip supstitucije karbonatnih iona čija se vrpca javlja pri 872 cm^{-1} . B-tip supstitucije dominira u sastavu anorganske faze prirodne kosti (2-8 mas.%) te povećava bioaktivnost i biokompatibilnost materijala. Vrpca koja se javlja pri 872 cm^{-1} pripisuje se i vibraciji HPO_4^{2-} skupine, no zbog međusobnog preklapanja teško ih je razlikovati u FTIR spektru.⁶² Međutim, uočeno je da se ta vrpca smanjuje i širi prema višim valnim brojevima (876 cm^{-1}) s porastom udjela magnezija tako da se može pretpostaviti da je prisutna u uzorcima Mg-HA, odnosno upućuje na magnezijem supstituirani HA, vitlokit.



Slika 10. Grafički prikaz spektra HA i Mg-HA s različitim udjelom magnezija u području valnih brojeva $1500 - 450\text{ cm}^{-1}$

Vrpca koja se javlja na 1087 cm^{-1} odgovara vibraciji HPO_4^{2-} skupine prisutna je u uzorku HA što znači da je riječ o nestehiometrijskom $\text{HA}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ s karbonatnim supstitucijama. Pri istom valnom broju, HPO_4^{2-} vrpca javlja se i u Mg-HA uzorcima (najviše izražena u uzorku 1%Mg-HA), i gubi intenzitet porastom udjela magnezija. Prema literaturi, prisutnost ove skupine upućuje da je došlo do ugradnje Mg^{2+} iona u strukturu HA.⁶³ PO_4^{3-} skupine pokazuju značajno smanjenje intenziteta povećanjem udjela magnezija u odnosu na čisti HA. Na FTIR spektru uzorka s najvećim udjelom magnezija, 5%Mg-HA, vidljivo je širenje i cijepanje intenziteta PO_4^{3-} vrpci pri 993cm^{-1} i oko 1062 cm^{-1} što upućuje na stvaranje Mg/ β -TCP faze.⁶⁴

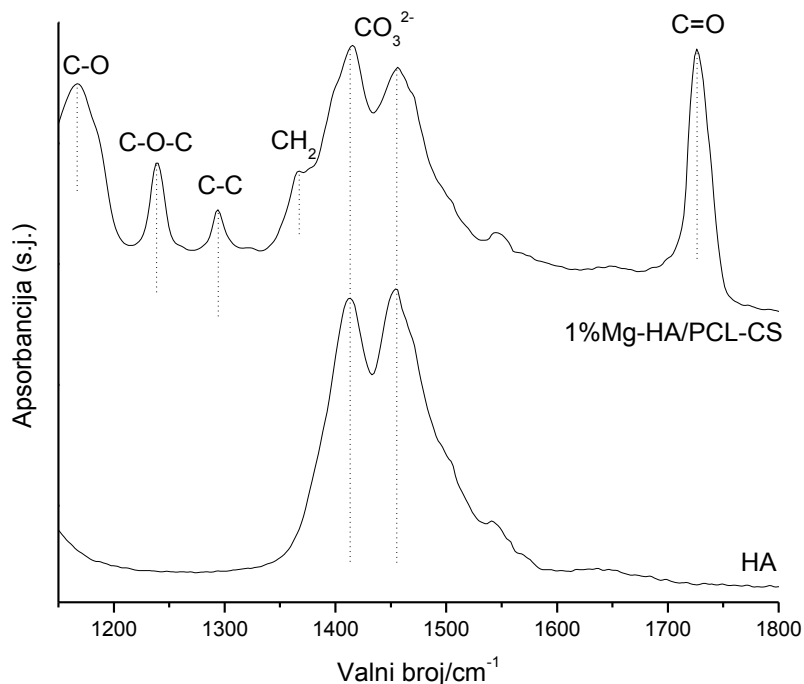
Iz grafičkog prikaza također je vidljivo da porast koncentracije magnezija dovodi do smanjenja intenziteta CO_3^{2-} i OH^- skupina (slika 10. i 11.).



Slika 11. Grafički prikaz spektra HA i Mg-HA s različitim udjelom magnezija u području valnih brojeva $4000 - 3400\text{ cm}^{-1}$

Analiza FTIR spektra ukazuje na destabilizaciju strukture HA ugradnjom Mg^{2+} , odnosno veće koncentracije magnezija inhibiraju nastajanje HA, time i vitlokita, potičući stvaranje Mg/ β -TCP faze. Mg/ β -TCP se inače nalazi u biološkim sustavima^{65 66} i istraživana je

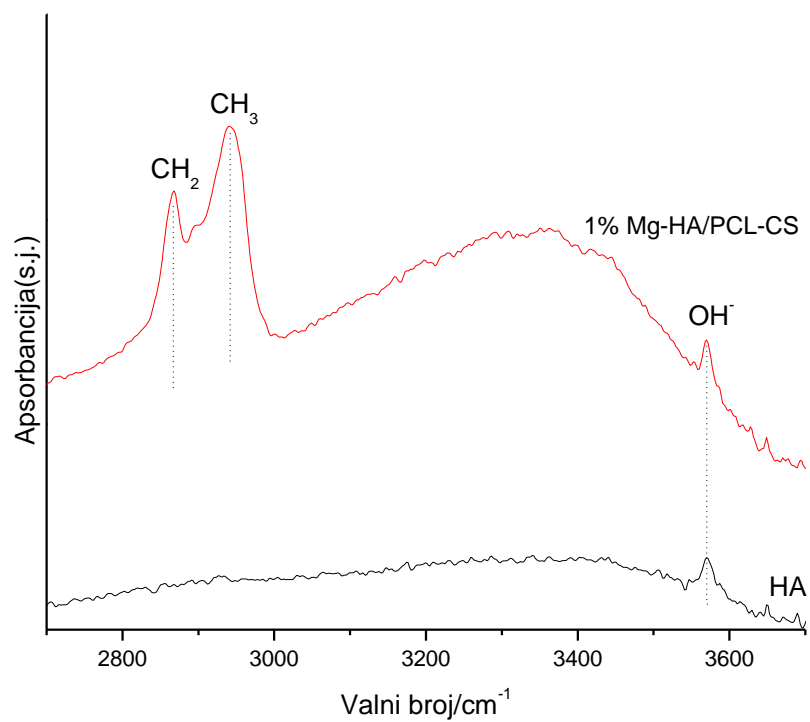
za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, primjerice u liječenju osteoporoznosti, zbog svoje biokompatibilnosti, bioaktivnosti i drugih svojstava koji ga čine izvrsnim kandidatom za liječenje koštanih defekata.⁶⁷



Slika 12. Grafički prikaz spektra hidroksiapatita i kompozitnih materijala 1% Mg-HA/PCL-CS u području valnih brojeva 1150 – 1800 cm⁻¹

Slika 12. i 13. prikazuju FTIR spektre čistog HA i pripremljenih kompozitnih materijala. Dodatkom polimera uočava se pojava novih vrpca na valnim brojevima 1160 cm⁻¹ karakteristična za C-O skupinu, 1290 cm⁻¹ za C-C skupinu, 1233 cm⁻¹ za C-O-C skupinu, 1361 cm⁻¹ za CH₂ skupinu, te 1726 cm⁻¹ za C=O skupinu. Analizirane vrpce, prema literaturi, karakteristične su za PCL⁵ međutim neke od vrpca koje se pripisuju PCL-u karakteristične su i za kitozan (primjerice CH₂ skupina). Široka vrpca u području valnih brojeva 3500-3000 cm⁻¹ karakteristična je za asimetrično rastezanje OH- skupina.

Vrpce karakteristične isključivo za kitozan koje se javljaju pri 1652, 1575 i 1542 cm⁻¹ su izostale, vjerojatno zbog male količine kitozana u kompozitnom uzorku.

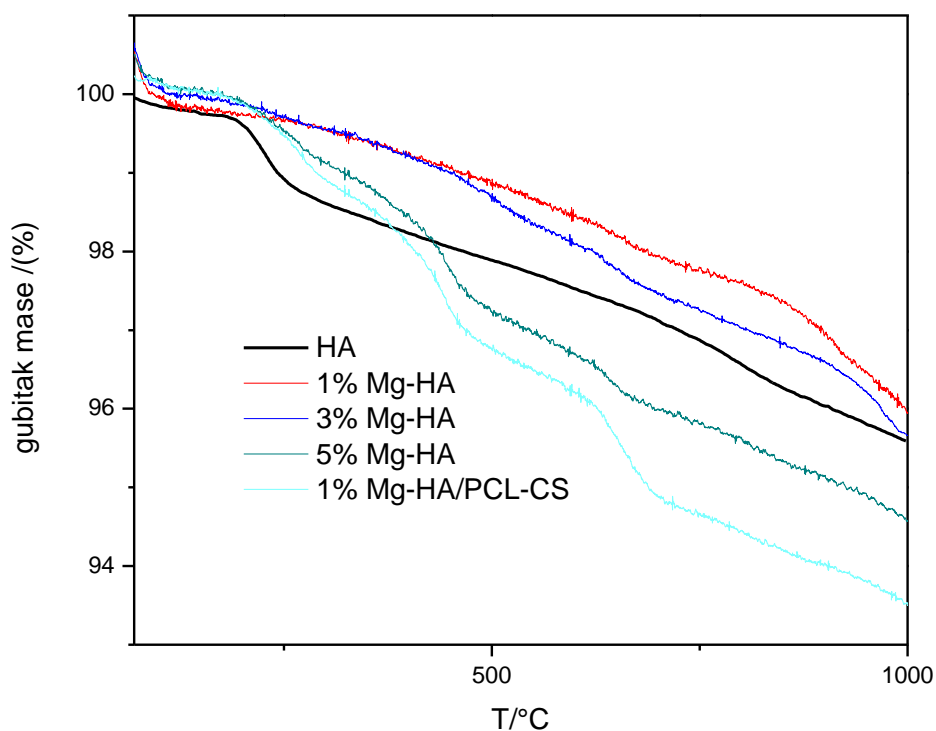


Slika 13. Grafički prikaz spektra hidroksiapatita i kompozitnih materijala 1% Mg-HA/PCL-CS u području valnih brojeva 2700 – 3700 cm⁻¹

5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijskom analizom istražena je termička stabilnost sintetiziranih kompozitnih materijala te određen udio kitozana i PCL-a impregniranog u 1% Mg-HA uzorak (slika 14.). Termogravimetrijska krivulja čistog HA ukazuje na njegovu termičku stabilnost. Gubitak mase čistog HA iznosi 4.41%. Povećanjem udjela magnezija, Mg-HA uzorci ne pokazuju značajnu promjenu termičke stabilnosti, s gubitkom mase od 4.05% i 4.34% te 5.46% za uzorke s 1%, 3% Mg-HA. Tek uzorak s 5% Mg pokazuje blagi pad termičke stabilnosti, sa gubitkom mase 5.46%.

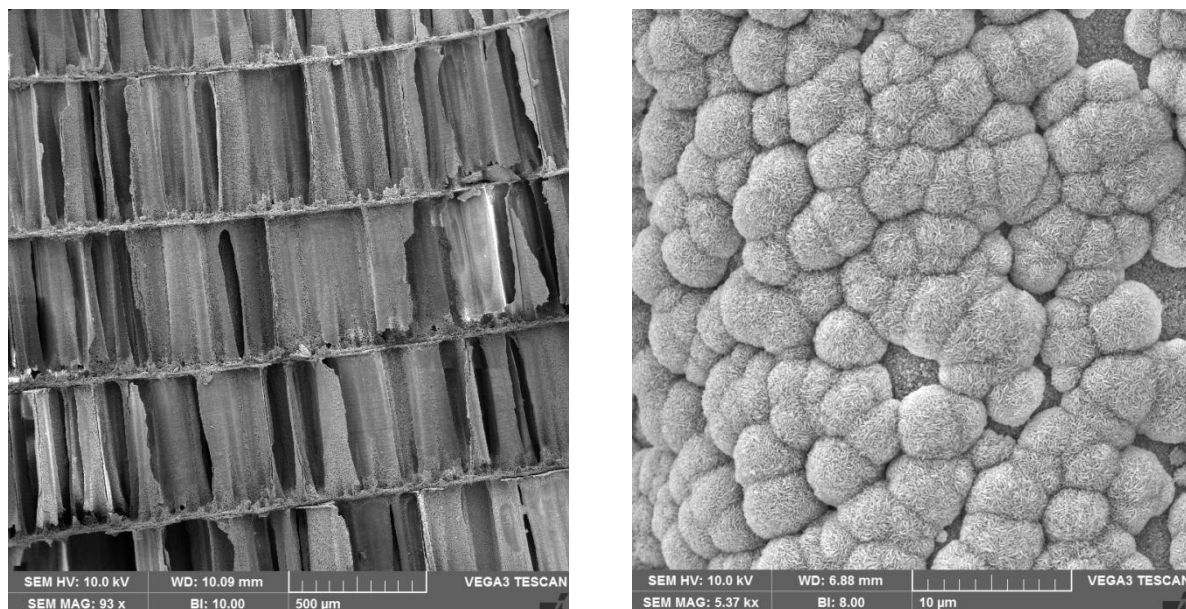
Gubitak mase kompozitnog materijala 1% Mg-HA/PCL-CS iznosi 6.54%, što znači da udio polimera u uzorku iznosi 2.49%.



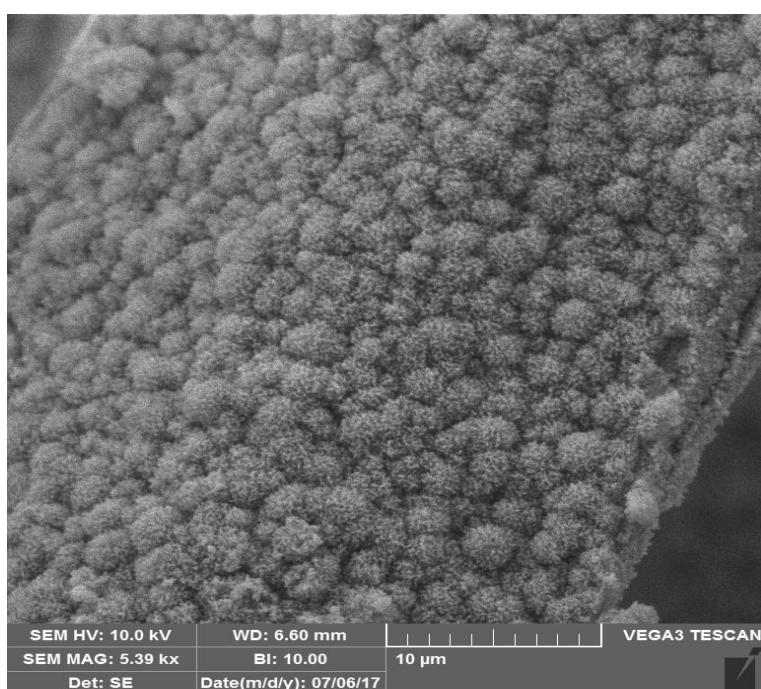
Slika 14. TGA krivulje Mg-HA sa različitim udjelom Mg i uzorak s impregniranim polimerima PCL i CS

5.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

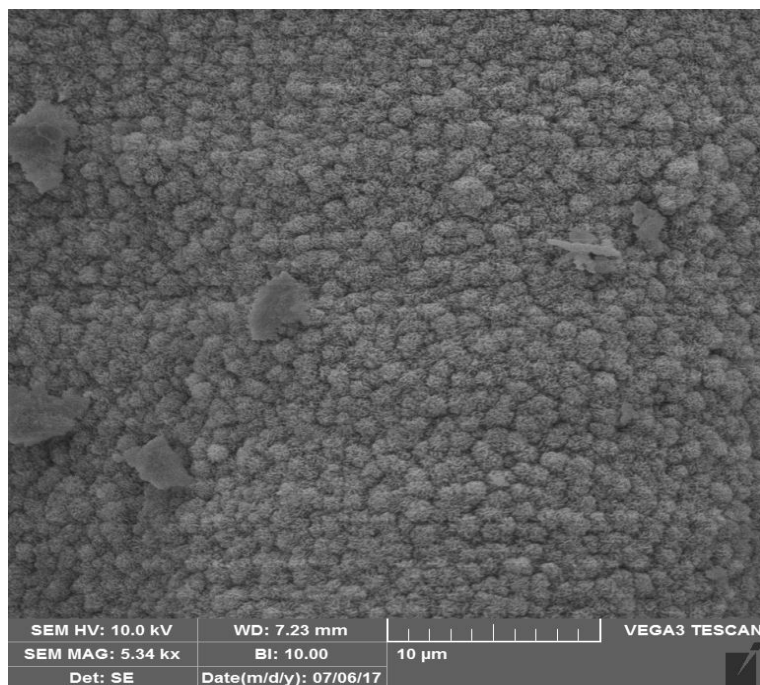
Mikrostruktura pripremljenih materijala istražena je SEM analizom. Sve mikrografske snimke prikazuju unutarnju površinu materijala. SEM mikrograf hidroksiapatita pokazuje da je originalna arhitektura sipine kosti u potpunosti očuvana i nakon hidrotermalne reakcije (slika 15a)). Kod većeg povećanja može se vidjeti kako kristali HA tvore sferične forme, nalik maslačku, koje ravnomjerno prekrivaju površinu (slika 15b)).



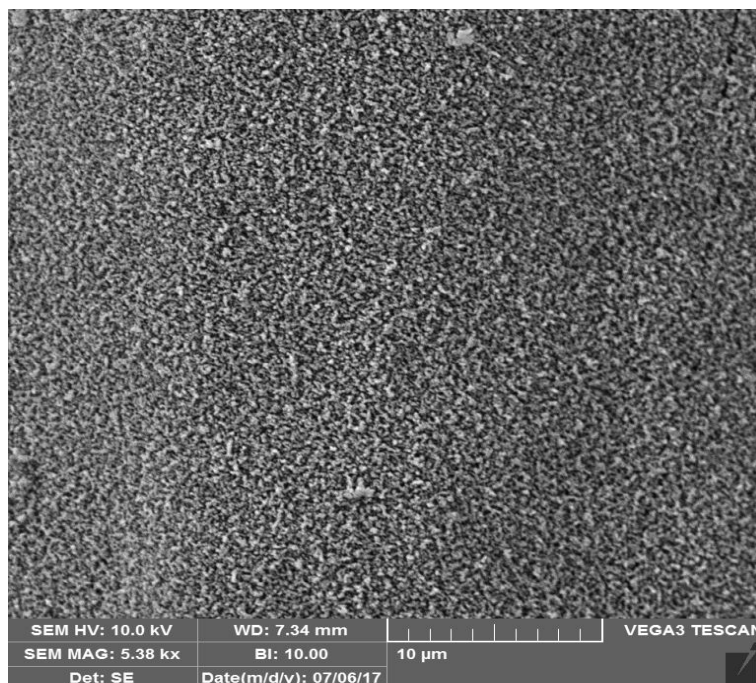
Slika 15. SEM mikrograf a) HA i b) sferičnih čestica HA



Slika 16. SEM mikrograf uzorka 1% Mg-HA



Slika 17. SEM mikrograf uzorka 3% Mg-HA

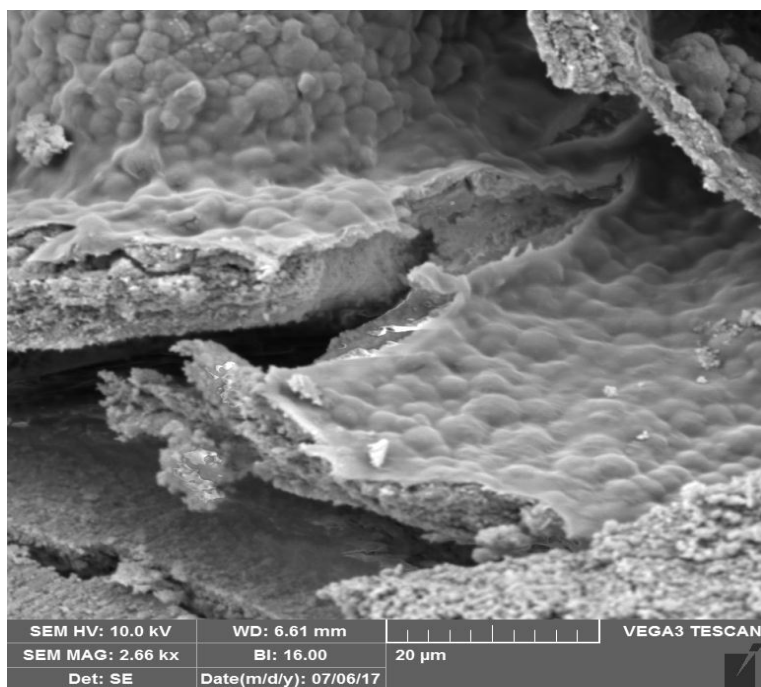


Slika 18. SEM mikrograf uzorka 5% Mg-HA

SEM mikrografi uzoraka hidroksiapatita sa različitim udjelima magnezija prikazuju da dodavanje magnezija u hidrotermalnu reakciju mijenja morfologiju površine u odnosu na čisti HA. Naime, s porastom udjela magnezija, HA kristalizira u obliku sfera ali su te sfere manje

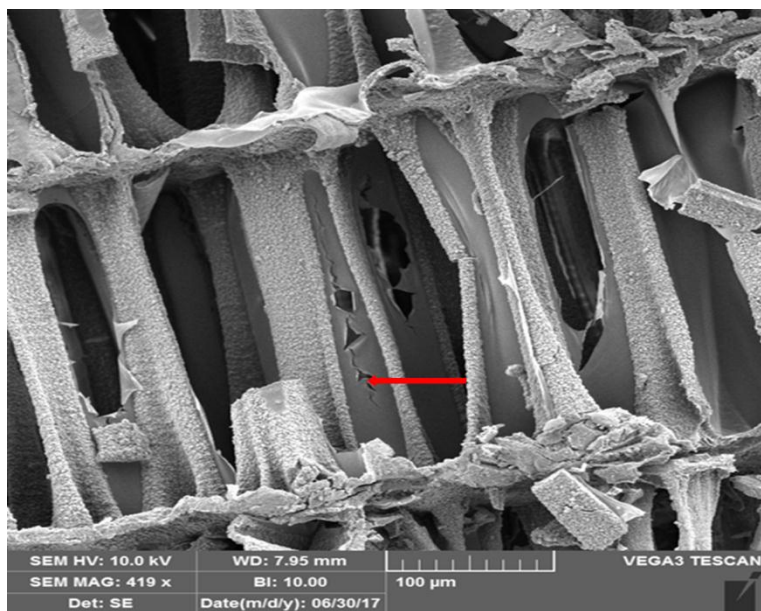
nego u slučaju čistog HA (slika 16-18.). Daljim povećanjem udjela magnezija čestice HA potpuno gube svoju početnu sferičnu formu i tvore aglomerate. Slični rezultati nađeni su i u literaturi.^{68, 69}

Mikrografi kompozitnih uzoraka, odnosno polikaprolaktona i kitozana impregniranih u porozni HA s 1 mol.% magnezija, pokazuju da na površini materijala postoji tanki polimerni film. Slika 19. prikazuje sloj kitozana kako se rasprostire po sferičnim česticama HA.



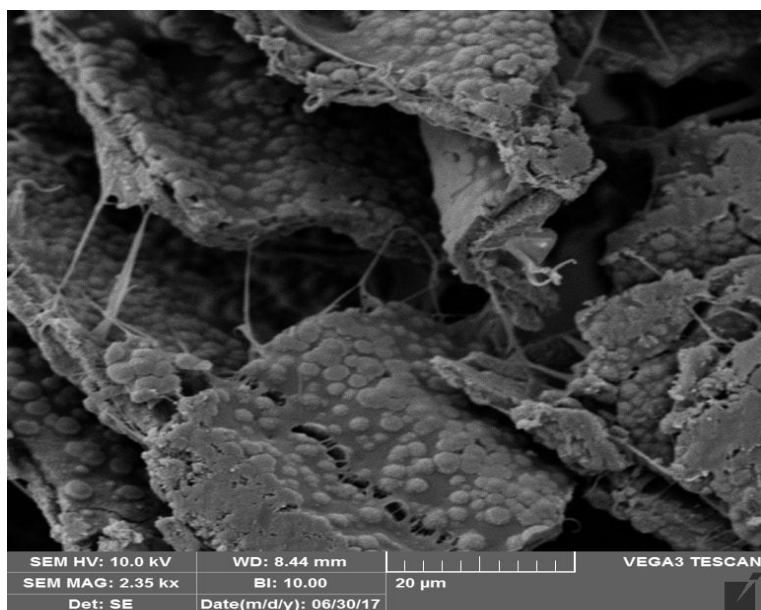
Slika 19. SEM mikrograf uzorka 1% Mg-HA/PCL-CS

Prisutnost kitozana u obliku tankog filma vidljiva je i u porama materijala što znači da je njegova viskoznost bila prikladna da proдре kroz porozni HA (slika 20.).



Slika 20. SEM mikrograf uzorka 1% Mg-HA/PCL-CS

Na slici 21. može se vidjeti sloj PCL-a koji prekriva čestice HA, a kojeg se vrlo lako može identificirati na mikrografima i razlikovati od kitozana obzirom da PCL film uslijed pripreme materijala za SEM analizu pokazuje istegnute niti karakteristične za takve elastične polimere.



Slika 21. SEM mikrograf uzorka 1% Mg-HA/PCL-CS

6. ZAKLJUČAK

- Provedena je ugradnja Mg^{2+} iona u strukturu hidroksiapatita hidrotermalnom konverzijom sipine kosti, pri čemu je kao izvor magnezijevih iona korišten magnezijev perklorat – $Mg(ClO_4)_2$.
- Pripravljene su kompozitni materijali Mg-HA i PCL/CS metodom vakuumske impregnacije za uzorke s udjelom magnezija od 1 mol.%.
- XRD analiza potvrđuje nastanak nove faze koja je identificirana kao vitlokit i/ili Mg/ β -TCP kao posljedica supstitucije kalcija magnezijem u strukturi HA. Zaključeno je da je hidrotermalnom sintezom dobiven dvofazni sustav kojeg čine HA i vitlokit pri nižim koncentracijama magnezija (1 i 3 mol.%), dok pri većoj koncentraciji (5 mol.%) koegzistiraju HA i Mg/ β -TCP.
- FTIR spektri uzoraka s različitim udjelom magnezija pokazuju smanjenje intenziteta fosfatnih, karbonatnih i hidroksilnih skupina. U uzorku s najvećom koncentracijom magnezija, nađene su vrpce karakteristične za Mg/ β -TCP fazu.
- TGA metodom pokazano je blago smanjenje termičke stabilnosti HA za uzorak s 5% magnezija, a udio PCL-a i kitozana u kompozitu iznosi 2.49 mas. %.
- SEM mikrofotografiji hidroksiapatita pokazuje da je originalna arhitektura sipine kosti u potpunosti očuvana i nakon hidrotermalne reakcije. Povećanjem udjela magnezija početne sferične čestice čistog HA se smanjuju. Daljim povećanjem udjela magnezija, čestice HA potpuno gube svoju početnu sferičnu formu i tvore aglomerate zajedno s novonastalom fazom. Mikrofotografiji kompozitnih uzoraka pokazuju da na površini materijala postoji tanki polimerni film koji prekriva HA čestice.

7. LITERATURA

1. Žagar, D., - Priprava i karakterizacija kompozitnog materijala od visokoporozne hidroksiapatitne keramike i kitozana, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
2. Yang S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K., —The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Eng*, 7:6, (2001) 679-689,
3. Maquet V., Jerome R., —Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation, *Mat. Science Forum*, 250,(1997) 15- 42
4. Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F., —Biomaterial developments for bone tissue engineering *Biomaterials*, 21:23,(2000) 2347-2359
5. Milovac, D., – Synthesis and characterization of hydroxyapatite-biodegradable polymer composite material, Doctoral thesis, 2014
6. Hall S.,- Basic biomechanics, 5th Edition, p.88, McGraw-Hill, New York, 2007
7. Vallet- Regi, M., González-Calbet, J. M., - Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progres in Solid State Chemistry* (2004) 32 1-31,
8. Tate, P. - Seeley's principles of anatomy & physiology. McGraw-Hill,(2009) 124-140
9. Vallet-Regi, M., González-Calbet, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Chem.*, **32** (*1*) (2004) 1-31
10. A. Krajewski, A. Ravaglioli, *Bioceramics and biological glasses*, *Integrated biomaterials science*, Springer USA, New York, (2002) 189 – 255
11. Orlić, S., *Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike*, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012
12. Suchanek, W., Yoshimura, M., Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res.*, **13** (*1*) (1998) 94-117.
13. Yang, P., Quan, Z., Li, C., Kang, X., Lian, H., Lin, J., Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier, *Biomaterials*, **29** (**32**) (2008) 4341-4347

14. Kandori, K., Kuroda, T., Wakamura, M., Protein adsorption behaviors onto photocatalytic Ti (IV)-doped calcium hydroxyapatite particles, *Colloids Surf. B*, **87** (2) (2011) 472-479
15. Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F. N., Ferreira, J. M. F., Scaffolds for bone restoration from cuttlefish, *Bone*, **37** (6) (2005) 850-857
16. R.Z. LeGeros, A. Ito, K. Ishikawa, T. Sakae, J.P. LeGeros, Fundamentals of hydroxyapatite and related calcium phosphates, *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*, John Wiley & Sons, New York, (2010) 19 – 52
17. Rogina, A., *In situ* sinteza hidroksiapatitau matrici biorazgradivih polimera, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
18. Kim, S. R., Lee, J. H., Kim, Y. T., Riu, D. H., Jung, S. J., Lee, Y. J., Kim, Y. H., Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors, *Biomater.*, **24** (8) (2003) 1389-1398
19. Mróz, W., Bombalska, A., Burdyńska, S., Jedyński, M., Prokopiuk, A., Budner, B., Niedzielski, K., Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture, *J. Mol. Struct.*, **977** (1) (2010) 145-152
20. R. Z. LeGeros, Calcium phosphates in oral biology and medicine, Karger AG, Switzerland, Basel, 1991
21. Bigi, A., Falini, G., Foresti, E., Ripamonti, A., Gazzano, M., Roveri, N., Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization, *J. Inorg. Biochem.*, **49** (1) (1993) 69-78
22. Fadeev, I. V., Shvorneva, L. I., Barinov, S. M., Orlovskii, V. P., Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Inorg. Mater.*, **39** (9) (2003) 947-950
23. Landi, E., Logroscino, G., Proietti, L., Tampieri, A., Sandri, M., Sprio, S., Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.*, **19** (1) (2008) 239-247
24. Yuan, X., Zhu, B., Tong, G., Su, Y., Zhu, X., Wet-chemical synthesis of Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles by step reaction and ion exchange processes, *J. Mater. Chem. B*, **1** (47) (2013) 6551-6559

25. Suchanek, W. L., Byrappa, K., Shuk, P., Riman, R. E., Janas, V. F., TenHuisen, K. S., Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method, *Biomater.*, **25 (19)** (2004) 4647-4657
26. Bertoni, E., Bigi, A., Cojazzi, G., Gandolfi, M., Panzavolta, S., Roveri, N., Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite, *J. Inorg. Biochem.*, **72 (1)** (1998) 29-35
27. Mayer, I., Schlam, R., Featherstone, J. D. B., Magnesium-containing carbonate apatites, *J. Inorg. Biochem.*, **66 (1)** (1997) 1-6
28. Golden, D. C., Ming, D. W., Nutrient-substituted hydroxyapatites: Synthesis and characterization, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **63 (3)** (1999), 657-664
29. Okazaki, M., Takahashi, J., Kimura, H., Comparison of crystallographic properties of Mg, Fe, Na, CO₃, F and Cl-containing apatites, *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, **26** (1986) 79-89
30. Kannan, S., Rocha, J.H.G., Agathopoulos, S., Ferreira J.M.F., Flourine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones, *Acta. Mater.*, **3 (2)**(2007) 243-249
31. Roufosse, A., Harvill, M. L., Gilliam, O. R., Kostiner, E. The hydrothermal crystal growth of chlorapatite, *J. Cryst. Growth*, **19 (3)** (1973) 211-212
32. Tang, X. L., Xiao, X. F., Liu, R. F., Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method, *Mater. Lett.*, **59 (29)** (2005). 3841-3846
33. 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 (4)** (2006) 509-513
34. Xu, Y., Wang, D., Yang, L., Tang, H., Hydrothermal conversion of coral into hydroxyapatite, *Mater. Charact.*, **47 (2)** (2001) 83-87
35. Lemos, A. F., Rocha, J. H. G., Quaresma, S. S. F., Kannan, S., Oktar, F. N., Agathopoulos, S., Ferreira, J. M. F., Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **26 (16)** (2006) 3639-3646

36. Walsh, P. J., Buchanan, F. J., Dring, M., Maggs, C., Bell, S., & Walker, G. M., Low-pressure synthesis and characterisation of hydroxyapatite derived from mineralise red algae, *Chem. Eng. J.*, **137 (1)** (2008) 173-179
37. Murugan, R., Kumar, T. S., Rao, K. P., Fluorinated bovine hydroxyapatite: preparation and characterization, *Mater. Lett.*, **57 (2)** (2002) 429-433
38. Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Kannan, S., Agathopoulos, S., Ferreira, J. M. F., Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones, *J. Mater. Chem.*, **15 (47)** (2005) 5007-5011
39. <http://www.dominvrt.si/clanek/ljubljenski/oskrba-krempljev-in-kljuna-ptice.html> pristup 20. rujna 2017
40. Ivankovic, H., Ferrer, G.G., Tkalčec, E., Orlic, S., Ivankovic, M.- Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone, *20:5*,(2009), 1039-1046,
41. E. Landi, A. Tampieri, M. Mattioli-Belemonte, Biometric Mg- and Mg,CO₃-substitued hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour, *Journal of the European Ceramic Society* 26, 2006., 2593-2601
42. Florence Crosier, Christine Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal* 49 (2013) 780-792
43. Julie Nilsen-Nygaard, Sabina P. Strand, Chitosan: Gels and Interfacial Properties, *Polymers* (2015),7,522-579
44. Jayachandran Venkatesan, Se-Kwon-Kim, Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering- An Overview,*Mar.Drugs* (2010),8,2252-2266
45. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D, Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnol* (1992);6:257-72
46. Aliba S. Studies on chitosan:4. Lysozimidic hydrolysis of partialy N-acetylated chitosans, *Int Biol Macromol* (1992);14:225-8
47. F. Croisier, C. Jerome, *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*, *European Polymer Journal*, 49 (4) (2013) 780-792
48. Leja,K.,Lewandowicz,G.,*Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers-a Review*, *Polish J. of Environ.Stud.* Vol.19,2(2010),255-266

49. Stanojević M., Utjecaj celuloze na razgradnju PCL/PLA mješavina, Diplomski rad, Fakultet kemiskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
50. M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, The return of forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256
51. A. Höglund, Controllable degradation product migration from biomedical polyesterethers, Thesis, KTH Chemical Science and Engineering, 2007
52. Gomes S., Renaudin G., Jallot E., Nedelec J. M., Structural Characterization and Biological Fluid Interaction of Sol–Gel-Derived Mg-Substituted Biphasic Calcium Phosphate Ceramics, *Appl. Mater. Interfaces*, (2009), 1 (2), pp 505–513
53. Christoph Staehli et al. Hydrogen-substituted -tricalcium phosphate, *Acta Cryst.* (2016). B72, 875–884
54. Hae Lin Jang et al. Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (2015)
55. Duchaeayne P. *Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier (2017)
56. LeGeros, R.Z.; Klein, E.; and Miravite, M.A. (1974): Biological Whitlockites, Occurrence and Formation , *IADR Progr & Abst* 53: No. 199
57. S. Kannan, I.A.F. Lemos, J.H.G. Rocha, J.M.F. Ferreira, *J Solid State Chem.* 178, 3190–3196 (2005)
58. Farzadi A. et al., Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization, *Ceramics International* Volume 40, Issue 4,(2014), Pages 6021-6029
59. W. L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R. E. Riman, V. F. Janas, K. S. TenHuisen, *J Solid State Chem.* 177,(2004), 793–799
60. S. N. Danil'chenko, A. N. Kulik, A. N. Bugai, P. A. Pavlenko, T. G. Kalinichenko, N. V. Ul'yanchich, L. F. Sukhoduba, *J Appl Spectrosc*, 72,(2005) 821–826
61. S. Kannan, A. F. Lemos, J. H. G. Rocha, J. M. F. Ferreira, *J. Am. Ceram. Soc.* 89, (2006), 2757–2761
62. Liga Berzina-Cimdina and Natalija Borodajenko (2012). Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Infrared Spectroscopy - Materials Science*,

Engineering and Technology, Prof. Theophanides Theophile (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/36942

63. R. Z. LeGeros, Calcium phosphates in oral biology and medicine. Basel: Karger, 1991
64. Carmona P. et al. Infrared and Raman Spectroscopy of Urinary Calculi: A Review, Instituto de Estructura de la Materia (CSIC), Serrano 121, 280006- Madrid, Spain
65. R.Z. LeGeros, G. Daculsi, R. Kijkowska, B. Kerebel, The effect of magnesium on the formation of apatites and whitlockites
66. Y. Itokawa, J. Durlach(Eds.), Magnesium in Health and Disease, John Libbey, New York, 1989,pp. 11–19
67. .Z. LeGeros, D. Mijares, F. Yao, S. Tannous, G. Catig, Q. Xi, R. Dias, J.P. LeGeros, Synthetic bone mineral (SBM) for osteoporosis therapy: Part 1 - Prevention of bone loss from mineral deficiency, Key Engineering Materials. 361–363 (2008)43–46
68. Fuzeng Ren, Y Leng, Renchen Xin X Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, DOI: 10.1016/j.actbio.2009.12.044
69. PubMed; Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization A. Tampieri, G. Celotti, E. Landi and M. Sandridoi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.264-268.2051;