

# Strukturalna karakterizacija selenijem dopiranih kalcijevih fosfata Rietveldovom metodom utočnjavanja

---

Ivanković, Klaudija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:149:757198>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**KLAUDIJA IVANKOVIĆ**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, srpanj 2020.**

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

**KLAUDIJA IVANKOVIĆ**

**STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA SELENIJEM DOPIRANIH**  
**KALCIJEVIH FOSFATA RIETVELDOVOM METODOM**  
**UTOČNJAVANJA**  
**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković

izv.prof.dr.sc. Stjepan Milardović

prof.dr.sc. Marica Ivanković

Zagreb, srpanj 2020.

Istraživanja ovog diplomskog rada provedena su u okviru istraživačkog projekta "Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva", IP-2014-09-3752, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost.

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Hrvoju Ivankoviću i asistentici Antonii Ressler, mag.ing.cheming. na prilici, trudu, prenesenom znanju te posvećenom vremenu.*

*Hvala svim kolegama i profesorima koji su često uz lijepe i tople riječi potpore znali podignuti moj duh. Naročito hvala najdivnijim asistentima, Dariu Dabiću, dr.sc. i Katarini Mužini, mag.ing.cheming. koji su mi kroz školovanje postali veoma dragi prijatelji. Dario, riječima se ne može opisati koliko mi naše prijateljstvo znači niti moju zahvalnost na svim našim razgovorima, na tvojoj podršci i prijateljstvu.*

*Hvala svim prijateljima koji su imali vremena za kave i duge razgovore, te tako indirektno bili potpora. Marko Jagetić i Petra Ćurković, vi zaslužujete to hvala više nego itko. Hvala i mojim kolegicama Patricii Debović i Mariji Kos koje su mi uljepšale i olakšale stresan prijelaz na PK. Nadam se da završetak faksa neće značiti i kraj našeg druženja.*

*Veeliku zahvalu zaslužuje moja obitelj, moji roditelji Josipa i Brano te braća Anto i Bruno. Mama, tata, hvala vam od srca na podršci, mogućnostima, čeličnim živicima i suzama, neovisno o tome jesu li se pokušale skrivati. Znam da nisam bila uvijek najlakša osoba, ali ne bih bila danas ovo što jesam da nije vas. Nikada se neću moći odužiti, stoga ću se nastaviti truditi iz dana u dan činiti vas ponosnima. Volim vas! Anto i Bruno, i vama hvala... divno je gledati vas kako odrastate te učiti od vas. Niste ni svjesni koliko ste me oblikovali te mi bili vjetar u leđa sve ove godine, pa i dan danas. Voli vas Keli!*

*Za kraj, najveće hvala najvažnijoj osobi na svijetu, mom Marku. Hvala ti od srca na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, vjeri, razumijevanju, vremenu, suzama i osmijesima... Nitko ne zna moje bitke, uspone i padove, bolje od tebe koji si uvijek bio uz mene i izvlačio ono najbolje. Naročito kada ni sama u sebe nisam vjerovala. Žrtvovao si se, a da nikada nisi tražio ništa zauzvat. Nijedno hvala nikada neće biti dovoljno za ono koliko si me zadužio, ali znaj da u jednoj zajedničkoj vječnosti nikada neću prestati pokušavati.*

## SAŽETAK

Lomovi, oštećenja i razne deformacije kostiju uslijed bolesti ili traume, mogu rezultirati sporim oporavkom, višegodišnjim zdravstvenim problemima i financijskim izdacima. Stoga, zadaća inženjerstva koštanog tkiva jest ponuditi nova rješenja u zacjeljivanju kostiju, potičući prirodni nastanak nove kosti. Zbog svoje biokompatibilnosti, mogućnosti biorazgradnje, osteoinduktivnosti i sličnosti s biološkim apatitom, hidroksiapatit je najkorišteniji materijal u inženjerstvu koštanog tkiva. Kako selenij pokazuje antibakterijska i protutumorska svojstva te je važan u održavanju mineralne gustoće kostiju, cilj je sintetizirati kalcijev fosfatni sustav koji sadrži hidroksiapatit dopiran selenitnim ionima. Metodom precipitacije, iz vodene otopine sintetizirani su uzorci kalcijevih fosfata dopirani s 0, 1, 5 i 10 % selenitnih iona, gdje je korišten kalcit biogenog izvora. Uzorci su karakterizirani rendgenskom difrakcijskom analizom, Rietveldovom metodom utočnjavanja, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom te induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrom masa. Morfologija je praćena uz pomoć pretražnog elektronskog mikroskopa.

Rezultati pokazuju uspješno dopiranje kalcijevog fosfatnog sustava selenitom. Dopiranje ovim ionima dovodi do formiranja aglomerata, gubitka prvobitne pločaste strukture hidroksiapatita i smanjenja kristalnosti uzorka. Sintetizirani uzorci su toplinski nestabilni. Kod toplinske obrade pri 1200 °C, selenij ne zaostaje u uzorku, kristalnost sustava je veća nego kod tek sintetiziranih uzorka, a stabilnost HAp faze raste povećanjem udjela dopiranja.

**Ključne riječi:** inženjerstvo koštanog tkiva, kalcijevi fosfati, hidroksiapatit, selenij

## SUMMARY

### *Structural characterization of selenium substituted calcium phosphates by Rietveld refinement method*

Fractures, lesions and various bone deformations due to illness or trauma can result in slow recovery, years of health problems and great financial costs. Therefore, the task of bone tissue engineering is to offer new solutions in bone healing process by promoting the natural formation of new bone. Due to its biocompatibility, biodegradability, osteoinductivity and similarity to biological apatite, hydroxyapatite is considered the gold standard in the bone tissue engineering. Selenium shows antibacterial and anticancer properties and is an essential component in maintaining bone mineral density, so the aim of the research is to synthesize a calcium phosphate system that contains hydroxyapatite doped with selenite. With precipitation method from aquatic solution, calcium phosphate samples doped with 0, 1, 5 and 10 % selenite were synthesized, in which the used calcite was biomimetic. The samples were characterized by X-ray powder diffraction, Rietveld refinement, Fourier transform infrared spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. The morphology was determined by scanning electron microscope.

The results show successful doping of the calcium phosphate systems with selenite. The doping of this system with selenite ions leads to the formation of agglomerates, the loss of the original plate-like structure and decrease in crystallinity. Synthesized samples show lack of thermal stability. When thermally annealed at 1200 °C, selenium does not lag behind, crystallinity is improved compared to as-prepared samples, and stability of HAp correlates positively with the selenite content.

**Keywords:** bone tissue engineering, calcium phosphates, hydroxyapatite, selenium

# SAŽETAK

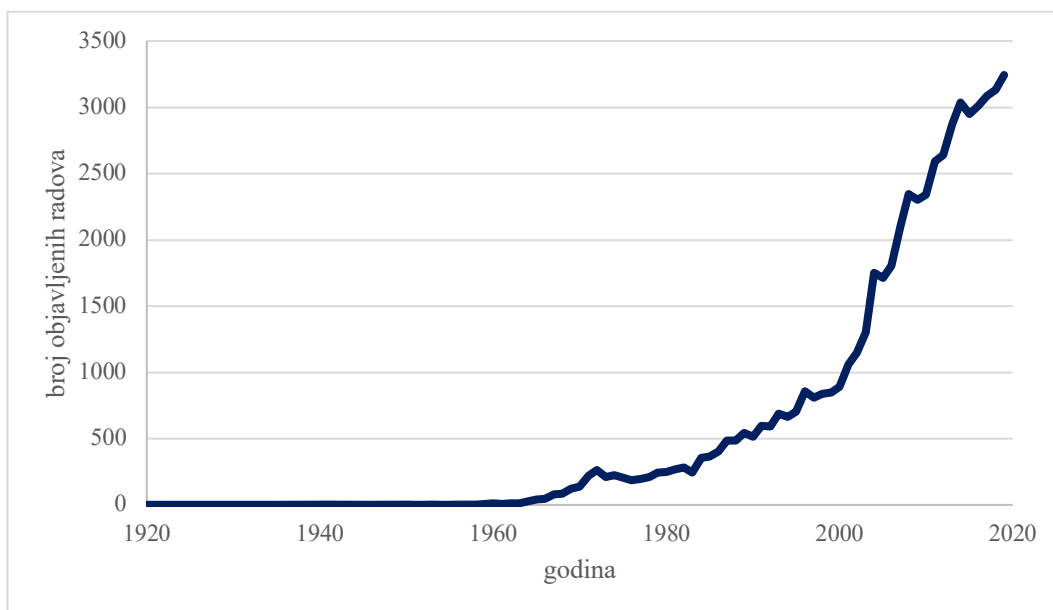
1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1	<b>LOKOMOTORNI SUSTAV</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Kosti i koštano tkivo – građa i uloga.....	3
2.1.2	Struktura kosti .....	4
2.1.3	Prirodni apatit .....	5
2.2	<b>BOLESTI KOŠTANOG TKIVA</b> .....	<b>8</b>
2.3	<b>REGENERATIVNA MEDICINA</b> .....	<b>9</b>
2.3.1	Inženjerstvo koštanog tkiva.....	10
2.3.2	Biokeramika .....	12
2.4	<b>HIDROKSIAPATIT</b> .....	<b>12</b>
2.5	<b>SELENIJ – ESENCIJALNI ELEMENT U TRAGOVIMA</b> .....	<b>15</b>
2.5.1	Selenij u koštanom tkivu .....	16
2.6	<b>HIDROKSIAPATIT DOPIRAN SELENIJEM</b> .....	<b>17</b>
3	EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1	<b>DOBIVANJE KALCITA IZ SIPINE KOSTI</b> .....	<b>20</b>
3.2	<b>SINTEZA SELENIJEM DOPIRANIH KALCIJEVIH FOSFATA</b> .....	<b>20</b>
3.3	<b>KARAKTERIZACIJA</b> .....	<b>21</b>
3.3.1	pH metar .....	21
3.3.2	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	21
3.3.3	Rendgenska difrakcijska analiza i Rietveldova metoda utočnjavanja.....	21
3.3.4	Pretražni elektronski mikroskop.....	22
3.3.5	Induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa.....	22
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1	<b>VRIJEDNOST pH OTOPINE</b> .....	<b>23</b>
4.2	<b>INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM</b> .....	<b>24</b>
4.3	<b>KEMIJSKI SASTAV</b> .....	<b>25</b>
4.4	<b>MINERALOŠKI SASTAV</b> .....	<b>26</b>
4.5	<b>MORFOLOŠKA STRUKTURA</b> .....	<b>32</b>
4.6	<b>INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM NAKON TOPLINSKE OBRADE</b> .....	<b>34</b>
4.7	<b>MINERALOŠKI SASTAV NAKON TOPLINSKE OBRADE</b> .....	<b>35</b>
5	ZAKLJUČAK.....	39
6	LITERATURA .....	40
7	ŽIVOTOPIS.....	52



## 1 UVOD

Zemlju nastanjuje sve starija populacija ljudi. Prema popisu stanovništva iz 2011. godine, 38,8 % stanovništva Republike Hrvatske starije je od 50 godina, točnije oko 1,66 milijuna, a nešto više od polovine čine žene, oko 55,8 % [1]. Starije stanovništvo zahtijeva određenu prilagodbu javnog zdravstva te često u tom smislu predstavlja veliki financijski izdatak države. U 2012. godini najčešće ozljede i razlozi hospitalizacije, neovisno o dobi, bili su različiti prijelomi. Ipak, vidljivo je kako je zbog prijeloma primljeno daleko više osoba starijih od 40 godina. Čak 94,2 % zaprimljenih pacijenata s prijelomom bedrene kosti, 87,1 % s prijelomom rebara ili prsne kosti te 83,4 % s prijelomom zdjelice bilo je starije od 40 godina [2]. Može se zaključiti kako su prijelomima podložnije osobe starije od 40 godina, a u Hrvatskoj one čine oko 40 % stanovništva. Razlog tome je biološko starenje kostiju kojim dolazi do gubitka koštane mase što dovodi do razvitka osteoporoze. Osteoporoza se dijeli na onu uzrokovanu starenjem, kojom su jednako pogođeni muškarci i žene, te osteoporozu uzrokovanu nedostatkom estrogena koja pogađa žene u postmenopauzi [3]. Može se zaključiti kako će žene biti jače pogođene osteoporozom što se vidi i iz statističkih podataka. Prosječno svaka treća žena te svaki peti muškarac pati ili će patiti od osteoporoze [4,5]. U 2000. godini procijenjeno je oko 3,8 milijuna lomova u svijetu uzrokovanih osteoporozom, što znači trošak od oko 31,7 milijardi eura. S obzirom na trend starenja stanovništva, procjenjuje se da će taj iznos do 2050. godine prijeći 76 milijardi eura [4]. Osim lomova uslijed trauma ili smanjenja mineralne gustoće kostiju, sve su učestaliji i tumori koji metastaziraju na kostima, a mogu uzrokovati deformacije i oštećenja koštanog tkiva [6].

Iz spomenutog, jasne su potrebe i zahtjevi stanovništva prema medicini i znanosti. Na pitanje kako poboljšati, pojednostaviti te ubrzati rast i zacjeljivanja koštanog tkiva, regenerativna medicina uz pomoć inženjerstva koštanog tkiva nudi odgovor. Kost je iznimni organ velike samoregeneracijske sposobnosti, kojem je uslijed bolesti ili većih oštećenja potrebna medicinska pomoć. Interdisciplinarnim pristupom moguće je izgraditi usadak specifičnim materijalima te rekreirati regeneracijski okoliš, tvoreći idealne uvjete za prirodnu regeneraciju koštanog tkiva. U inženjerstvu koštanog tkiva najviše se koristi hidroksiapatit (HAp) zbog svojih dobrih svojstava te velike sličnosti s anorganskim dijelom koštanog tkiva. *Scopus* baza podataka u zadnjih 20 godina pokazuje sve veće zanimanje znanstvenika za HAp i njegove potencijalne medicinske namjene [7]. Na slici 1. grafički je prikazan broj objavljenih radova koji se bave istraživanjem HAp-a u razdoblju od 1917. do 2019. godine.



Slika 1. Grafički prikaz podataka iz *Scopus* baze o broju objavljenih radova na temu HAp za razdoblje od 1917. do 2019. godine

Anorganski dio, osim apatita, sadrži brojne elemente u tragovima koji su bitni za normalnu funkciju kostiju, zbog čega čisti HAp nije dovoljan za uspješnu regeneraciju [8]. Stoga su mnoga istraživanja usmjerena prema sintezi i karakterizaciji HAp-a dopiranog raznim ionima koji se prirodno nalaze u strukturi kosti. Svrha ovog rada je sintetizirati kalcijev fosfatni sustav koji će sadržavati HAp-a dopiran selenijem te pratiti promjene nastale uslijed dopiranja. Selenij je esencijalni mikronutrijent zaslužan za održavanje homeostaze i mineralne ravnoteže, a eksperimentalno je potvrđeno njegovo antibakterijsko, antivirusno i protutumorsko djelovanje [9–11]. Selenij se prema mnogim istraživanjima pokazao kao dobar protivnik osteoporoze, tumora i drugih oboljenja koštanog tkiva što bi u kombinaciji s osteoinduktivnim svojstvima HAp-a moglo biti od pomoći pacijentima, ponajviše onima starije životne dobi [12–14]. Koštani usadak bi pružao potporu na mjestu loma i omogućio prirodne regenerativne uvjete za brže zacjeljivanje. S vremenom se nadomjestak postepeno razgrađuje te se na njegovom mjestu razvija novo koštano tkivo. Osteoinduktivna svojstva HAp-a ubrzala bi zacjeljivanje dok bi selenij omogućio smanjenje oksidativnog stresa te vratio i održao mineralni balans, čuvajući time novo koštano i okolno tkivo od degenerativnog propadanja uslijed starenja ili bolesti.

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 LOKOMOTORNI SUSTAV

Sustav organa odgovoran za strukturu i stabilnost tijela, zaštitu unutarnjih organa te sposobnost kretanja naziva se mišićno-koštani ili lokomotorni sustav. Lokomotorni sustav sastoji se od mišića i kostura, koji podrazumijeva kosti, ligamente, tetive, hrskavice i zglobove. Mišići djeluju kao kontraktilne poluge vezane za kosti pomoću tetiva. Kosti su u tom smislu krute poluge koje se međusobno povezuju zglobovima, a učvršćene su ligamentima koji održavaju stabilnost cijelog kostura. Hrskavice su glatko, elastično tkivo koje može imati zaštitnu i građevnu ulogu. Nalaze se na krajevima kostiju čime smanjuju mehanička oštećenja u zglobovima te izgrađuju neke dijelove tijela kao što su nos, uška, dušnice i dr. [15].

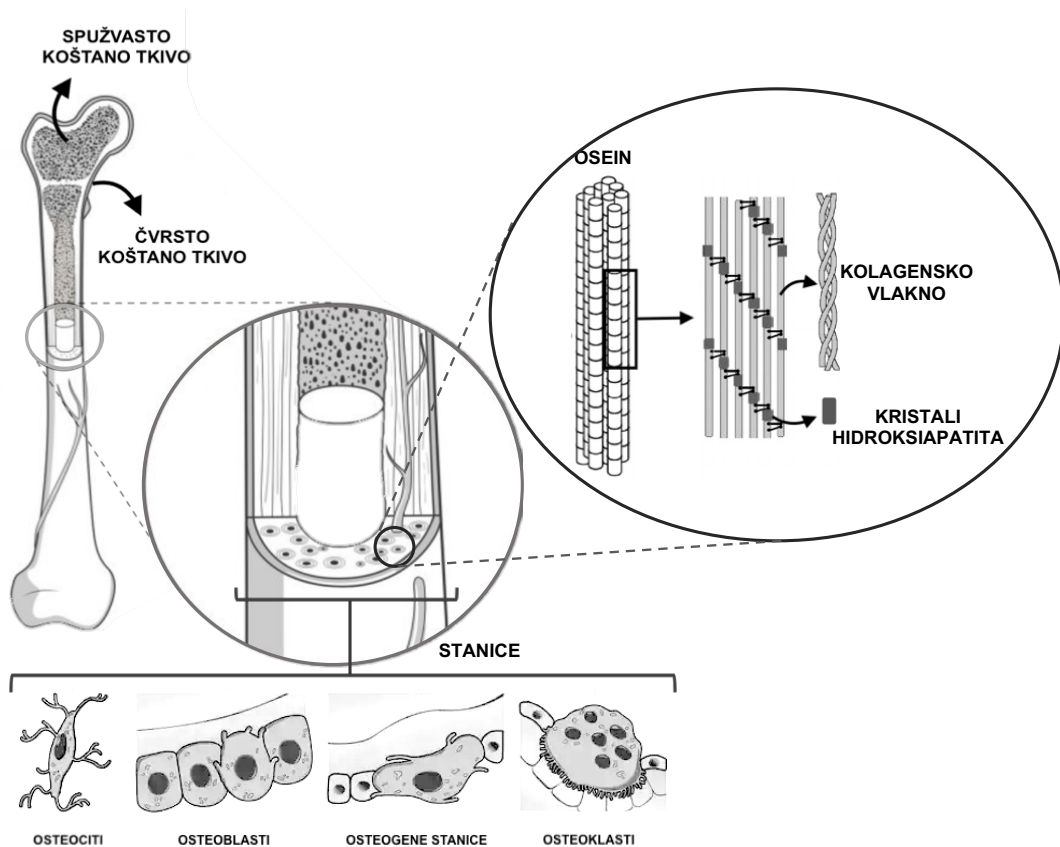
#### 2.1.1 Kosti i koštano tkivo – građa i uloga

Kosti, neovisno od ostatka kostura, imaju druge važne uloge. Velike kosti sadrže koštanu srž koja omogućuje proizvodnju crvenih i bijelih krvnih stanica, a zbog svog mineralnog sastava i morfologije, imaju važnu ulogu u skladištenju minerala te regulaciji mineralnog balansa u krvožilnom sustavu [15,16].

Kost je građena iz dvije morfološki različite vrste tkiva, čvrstog niskoporoznog (kortikalnog) i spužvastog visokoporoznog (trabekularnog) koštanog tkiva. Na slici 2. može se vidjeti kako kortikalno tkivo izgrađuje vanjski, dok trabekularno unutarnji dio kostiju. Visokoporozna unutrašnjost kosti važna je za nesmetano odvijanje dinamičkih bioloških procesa nastajanja, rasta te obavljanja funkcije koštanih stanica. Složeni sustav koštanog tkiva izgrađuje nekoliko vrsta koštanih stanica koje su distribuirane u matrici kolagenskih vlakana (oseina) na čijoj se površini nalaze kristali anorganskih soli [15,17].

Poznate su četiri vrste koštanih stanica: osteociti, osteoblasti, osteoklasti i osteogene stanice (slika 2.). Osteoblasti su koštane stanice odgovorne za rast i razvoj kosti. Stvaraju matricu kolagena i anorganske soli koji se naposljetku kalcificira oko stanice. Zarobljeni osteoblast mijenja strukturu i postaje osteocit, stanica zrele kosti koja je ujedno i najčešći tip koštane stanice. Osteociti su zaslužni za održavanje mineralnog balansa pomoću raznih enzima. Jedine koštane stanice koje se mogu dijeliti su osteogene stanice. Osteogene stanice su nediferencirane s visokom mitotičkom aktivnošću koje diferenciranjem postaju osteoblasti.

Posljednja vrsta stanica su osteoklasti koji se nalaze na površini kostiju. Osteoklasti su višenuklearne stanice koje potječu od bijelih krvnih stanica, a u dinamičkoj su ravnoteži s osteoblastima. Služe resorpciji koja se događa uslijed oštećenja, ozljeda, potrebe za mineralima ili starosti [16,17].



Slika 2. Shematski prikaz građe kostiju

### 2.1.2 Struktura kosti

Koštano tkivo složena je matrica unutar koje se nalaze koštane stanice. Matricu čini kompozitni materijal sačinjen od organskog i anorganskog dijela. Organski dio matrice većinski čini kolagen, vlaknasti protein prosječne dužine 300 nm, koji sadrži oko 1000 aminokiselina. Vlakno se sastoji od dva  $\alpha_1$  i jednog  $\alpha_2$  polipeptidnog lanca koji se sintetiziraju unutar osteoblasta, stvarajući trostruku heliksnu strukturu prokolagenske molekule. Sintetizirane prokolagenske molekule izlučuju se i grupiraju, tvoreći kolagensko vlakno. Organski dio izgrađuje nekoliko vrsta kolagena od kojih je većinski kolagen tipa I, koji čini oko 90 % ukupnog kolagena. Osim kolagena, kosti sadrže i druge proteine poput fibronektina, osteopontina, osteokalcina i koštanog sialoproteina (BSP) te proteoglikane. Iako nekolagenski

proteini i proteoglikani čine svega 10 % ukupne organske mase, imaju važnu funkciju pri diferencijaciji osteoblasta, mineralizaciji, vezanju stanica i reoblikovanju kosti [17,18].

Anorganski dio koštanog tkiva, prirodni apatit, sastoji se od mnogih anorganskih soli te doprinosi ukupnoj masi i čvrstoći kosti. Zahvaljujući velikoj koncentraciji soli, matrica služi kao ionski rezervoar tijela u kojem je smješteno oko 99 % kalcija, 85 % fosfora te između 40 i 60 % natrija i magnezija ukupnih tjelesnih zaliha. Na vlaknima i u šupljinama kolagenskog vlakna ioni formiraju kristalne strukture, najčešće u obliku kalcijevih fosfata, a mogu sadržavati i druge kemijske vrste poput magnezijeva hidroksida, fluorida i sulfata, ako su isti prisutni prilikom kristalizacije [18–20].

### 2.1.3 Prirodni apatit

Prirodni apatit smjesa je različitih kristalnih struktura od kojih je glavni mineral hidroksiapatit (HAp) koji čini preko 60 % anorganskog dijela te vitlokit ( $\text{WH}$ ,  $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$ ) koji čini oko 20 % [20,21]. HAp koji izgrađuje koštano tkivo razlikuje se od stehiometrijskog HAp-a ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) koji se može pronaći u prirodi ili sintetizirati. Veličina kristala prirodnog HAp-a može varirati između 30 i 300 Å, dok je stehiometrijski geološki HAp daleko veći. Pomoću mikroskopa atomskih sila, Eppell i suradnici odredili su prosječne dimenzije kristala prirodnog apatita u kosti goveda: 12 nm x 10 nm x 0.61 nm, gdje je oko 98 % kristala bilo tanje od 2 nm [22]. Površinski atomi u nanometarskom kristalu HAp-a nemaju zadovoljen broj veza što ih čini kemijski reaktivnijima nego HAp mikro i makro dimenzija. Njihova reaktivnost neophodna je za interakciju s organskim dijelom matrice, naročito u ranom razvoju i regeneraciji koštanog tkiva [8,23].

Značajna je i razlika u njihovom kemijskom sastavu. Za razliku od stehiometrijskog, HAp koji izgrađuje kosti sadrži veliku količinu karbonatnih i hidrogenfosfatnih aniona te mnoge katione supstituirane na mjesto kalcija, dok je količina hidroksilnih iona niska. Zbog tih razlika, ispravnije je koristiti naziv karbonatni hidroksiapatit s manjkom kalcija ili jednostavno apatit. Naziv apatit odnosi se na skupinu spojeva čija kemijska formula ima izgled  $\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2$ , gdje je M bilo koji, najčešće dvovalentni kation. Na mjestu  $\text{ZO}_4$  najčešće se nalaze fosfati, karbonati ili sulfati, a  $\text{X}_2$  predstavlja karbonate, fluoride, kloride ili hidroksilne ione [24].

Udio hidroksilnih iona varira s obzirom na uređenost i kristalnost nanočestica apatita. Pasteris i suradnici pokazali su kako životinjski organizam ima sposobnost proizvodnje nanočestice

apatita koje su bogate hidroksilnim ionima, ali i apatita s manje ili nimalo hidroksilnih iona [25]. Udio hidroksilnih iona, a posljedično i kristalnost, kontrolirana je ugradnjom karbonatnih iona. Nanokristalinični apatit s manjkom hidroksilnih iona pronalazi se u dentinu i kostima, dok se kristali apatita s većom količinom hidroksilnih iona nalaze u zubnoj caklini [23,25]. Udio karbonatnih iona varira između 3 i 9 %, gdje je koncentracija karbonata u kostima gotovo dvostruko veća nego u zubnoj caklini [8,25–28]. Elliott i suradnici pokazali su kako koncentracija karbonata pozitivno korelira s topljivošću, što objašnjava njegovu veću koncentraciju u apatitu koštanog tkiva koje ima sposobnost resorpcije, kao i nisku koncentraciju u apatitu cakline koja je kemijski otporna [29]. Osim karbonata i hidroksilne skupine, prirodni apatit sadrži značajan udio fosfata i hidrogenfosfata. Prisustvo hidrogenfosfata u apatitu nedvojbeno je dokazano, ali njihov položaj i udio u apatitu ljudskog koštanog tkiva i dalje nije jednoznačno objašnjen. Voneuw i suradnici pokazali su kako se hidrogenfosfatni ioni u kortikalnoj kosti zdrave dvogodišnje ovce formiraju na površini kristala u amorfnom površinskom sloju debljine između 0,8 i 4 nm [30]. Određeni udio hidrogenfosfatnih iona gotovo je jednak udjelu fosfatnih iona što se vidi iz određene kemijske formule:  $\text{Ca}_{7,5}(\text{PO}_4)_{2,8}(\text{HPO}_4)_{2,6}(\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH})_{0,2}$ . Tim radom potvrđena su prijašnja ispitivanja među kojima je P-31 NMR-om određeno da je većinski udio hidrogenfosfata smješten na površini nanokristala, dok se fosfatni ioni nalaze u unutrašnjosti kristalne strukture [31]. U istom radu otkriveno je kako se udio fosfatnih i hidrogenfosfatnih iona smanjuje sa starosti kristala apatita, odnosno starosti životinje, što može objasniti složenost određivanja točnog sastava kostiju. Osim starošću, sastav i kristalnost apatita mijenja se s biološkim zahtjevima tkiva kojeg izgrađuje. Detektirani hidrogenfosfatni ioni mogu odgovarati i fazi oktakalcijevog fosfata (OCP),  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  koji je prekursor u sintezi biološkog apatita [30,32,33].

Nadalje, zbog spomenutih razlika u strukturi, prirodni apatit u odnosu na stehiometrijski HAp ima nedostatak kalcijevih iona što će se odraziti i na Ca/P omjer. Ca/P omjer prirodnog apatita iznosi 1,55, dok je taj omjer za stehiometrijski HAp 1,67 [29]. Uslijed starosti i bolesti kao što je osteoporoza, dolazi do smanjenja omjera Ca/P u prirodnom apatitu što odgovara gubitku mineralne gustoće kostiju, naročito kalcija [34,35].

Prirodni apatit ima sposobnost supstitucije elemenata, stoga je velika pažnja usmjerena prema identifikaciji i kvantifikaciji stranih iona, odnosno mikro elemenata i elemenata u tragovima. Kako se radi o elementima koji čine manje od 0,1 % sustava, potrebno je dati poseban naglasak na odabir metode analize koja ima odgovarajuće granice kvantifikacije i detekcije za

dani element. Zbog niskih udjela, ali ponajviše zbog različitosti dostupnih uzoraka koštanog tkiva, koncentracije elemenata u literaturi nerijetko značajnije variraju [36–40]. Spomenuto je kako sastav varira sa starosti uzorka, stoga nije neobična razlika u vrijednostima elemenata kod mladog, starog ili posthumno prikupljenog koštanog tkiva. Potrebno je uzeti u obzir i geografsko područje s kojeg je uzorak tkiva prikupljen. Primjerice, neki elementi u tragovima koji se mogu pronaći u koštanom tkivu, kao što je živa, nisu esencijalni te je njihovo podrijetlo iz okoliša, najčešće uneseno hranom i pićem. Za aluminij i olovo smatra se kako se godinama talože u koštanom tkivu što će također utjecati na ishod analize [38].

Makro elementi koštanog tkiva su kalcij (oko 37 %), ugljik (oko 4,8 %), fosfor (oko 17 %) te kisik i vodik, a njihova glavna uloga je izgradnja koštanog tkiva tvorbom mineralne okosnice [29]. Iako malih udjela (> 1 %), bitnu funkciju imaju i mikro elementi te elementi u tragovima koji sudjeluju u razvoju, metabolizmu te održavanju homeostaze koštanog tkiva. Neki od mikro elemenata i elemenata u tragovima koji se nalaze u koštanom tkivu su: natrij, kalij, željezo, bakar, magnezij, cink, bor, selenij, stroncij i mangan [39,41–45]. Natrij je ekstracelularni element koji sudjeluje u mnogim metaboličkim procesima u ljudskom tijelu pa tako i u koštanom tkivu. Prema istraživanjima, povećani unos soli korelira s resorpcijom koštanog tkiva kod žena u postmenopauzi. Suprotno tome, kalij koji je intracelularni element - protuteža natriju, pokazuje smanjenje resorpcije koštanog tkiva [46,47] te poboljšanje apsorpcije kalcija u koštanom tkivu [48]. Magnezij je jedan od bitnih mikro elemenata s ulogom kofaktora mnogih enzima povezanih sa sintezom ATP-a, lipida, proteina, nukleinskih kiselina i dr. Nedostatak magnezija nepovoljno utječe na cjelokupni organizam, naročito na koštano tkivo gdje dolazi do stimulacije aktivnosti citokina, povećavanja broja osteoklasta, te smanjenja broja osteoblasta. Rezultat je povećana resorpcija koštanog tkiva te usporen rast i razvoj koštanog tkiva [49]. Za stroncij nije sigurno radi li se o esencijalnom elementu, no istraživanja pokazuju njegov pozitivan učinak na rast koštanog tkiva inhibicijom osteoklastogeneze i resorpcije [50]. Sličan učinak na održavanje mineralnog balansa koštanog tkiva pokazuje i selenij čiji će utjecaj biti potanko objašnjen nešto kasnije. Cink je također jedan od izrazito važnih esencijalnih elemenata koji stimulira rast, razvoj i mineralizaciju koštanog tkiva. Njegov nedostatak uzrokuje deformacije u rastu koštanog tkiva, slaba biomehanička svojstva kostiju, smanjenje mineralne gustoće te razvoj osteopenije [51]. Sličan učinak ima nedostatak bakra koji uzrokuje metaboličke bolesti i defekte koštanog tkiva [52]. Nedostatak željeza ne samo da uzrokuje anemičnost te česte upale, već i smanjene količine prokolagena tipa I, što pospješuje resorpciju koštanog tkiva [53]. Bor se ne smatra

esencijalnim elementom, ali utječe na aktivnost mnogih enzima, a njegov nedostatak smanjuje sposobnost regeneracije koštanog tkiva [54]. Istraživanja pokazuju sličan utjecaj mangana, čiji nedostatak rezultira poremećajem u radu koštanih regulatornih hormona i enzima [55]. Svi spomenuti izvori literature ukazuju na to da i male oscilacije u udjelima mikro elemenata i elemenata u tragovima mogu narušiti homeostazu i imati velike posljedice za zdravlje koštanog tkiva.

## 2.2 BOLESTI KOŠTANOG TKIVA

Kost, kao i svaki drugi organ, može podleći različitim oboljenjima i traumama. Ortopedija je grana medicine koja se bavi dijagnozom, korekcijom, prevencijom i liječenjem skeletnih deformacija, tj. poremećaja cijelog lokomotornog sustava. Kada govorimo o bolesti kostiju, možemo ih ugrubo podijeliti na skoliozu, lomove, metaboličke bolesti te rak kostiju.

Skolioza je bolest koja uzrokuje bočnu zakrivljenost kralježnice, najčešće uz rotaciju kralježaka, a pojavljuje se tijekom rasta u ranijoj adolescentskoj dobi [17].

S obzirom na to da je kost relativno čvrst materijal, do lomova može doći uslijed velikog pritiska izazvanim traumom, ali i kod relativno malog pritiska ako se radi o oslabljenoj kosti zbog metaboličkog poremećaja ili stresa. Potonji se često javlja kod sportaša, najčešće kao posljedica istrošenosti zglobova [56].

Metabolički poremećaji ili bolesti kostiju, degenerativne su bolesti koje se najčešće javljaju kod starije populacije. Radi se o poremećaju čvrstoće kostiju, obično uzrokovanog nedostatkom vitamina D i minerala (kalcij i fosfor) ili nepravilnostima kod koštane mase ili strukture. Gubitak mase kostiju dio je normalnog procesa starenja, no bolesti i lijekovi mogu ubrzati taj proces. Najpoznatija bolest ovog spektra jest osteoporoza, koja, ako se ne liječi, dovodi do lomova i deformacije kostiju, invalidnosti te smrti. U današnje vrijeme, statistike ukazuju kako gotovo ne postoji osoba starija od 40 godina koja nema neki oblik poremećaja metabolizma kostiju. Statistike za Europu kažu kako je u samo deset godina broj pacijenata sa slomljenim kukom zbog osteoporoze skočio za 70 %, a godišnji troškovi liječenja iznose oko 150 milijuna eura. Nakon 50. godine života, svaka druga žena te svaki šesti muškarac imat će prijelom kosti zbog metaboličkog poremećaja. Osim načina života, na razvoj bolesti utječe dob i spol. Ovoj bolesti podložnije su žene u postmenopauzi nego djeca, muškarci ili žene u reproduktivnoj dobi [4,17,57]. Od ostalih sličnih oboljenja valja spomenuti osteomalaciju i



rahitis, bolesti omekšavanja kostiju koje su uzrokovane poremećajem u primarnoj mineralizaciji koštanog tkiva. Osteopenija, slično kao osteoporoza, ukazuje na smanjenu gustoću koštanog tkiva, no može biti urođena pa se ne smatra bolešću. Tu su i osteonekroza, odumiranje koštanog tkiva zbog nedovoljne vaskularizacije, Pagetova kronična bolest koja se manifestira kao pretjerana resorpcija koštanih stanica i mnoge druge [17,58].

Tumori koštanog tkiva dijele se na benigne i maligne. Neki od benignih tumora su osteoid osteom i osteoblastom koji se mogu ukloniti kirurški. Kod malignih tumora razlikuju se tzv. primarni i sekundarni tumori. Pod sekundarne tumore ubrajaju se metastaze koje se šire na kosti iz tumora ostalih organa. Takve tumorske stanice na kostima izgledaju i ponašaju se kao stanice organa iz kojeg su potekle. Primarni tumor ili sarkom je tumor koji je nastao u koštanim stanicama. Tumori nastali u koštanoj srži, kao što su leukemija, mijelom i limfom ne smatraju se sarkomima već krvnim tumorima. Najpoznatiji i najučestaliji sarkomi su osteosarkom i hondrosarkom. Osteosarkom javlja se češće kod mlađe populacije te nešto učestalije kod muškaraca, dok je svega oko 10 % bolesnika u starije životne dobi. S druge strane, hondrosarkom je najčešća vrsta sarkoma koja se javlja kod starije populacije, a rizik od obolijevanja raste nakon 40. godine života [59]. Sarkomi čine svega 1 % ukupnog broja slučajeva tumora, dok je taj postotak daleko veći za sekundarne tumore [6].

### 2.3 REGENERATIVNA MEDICINA

Kost je jedan od rijetkih organa, uz jetru i kožu, koji ima sposobnost potpune spontane regeneracije kod manjih oštećenja. Koštano tkivo je jedino tkivo koje prilikom regeneracije ne mijenja svoj prvobitni oblik niti ostavlja ožiljke [60]. Unatoč izuzetnoj sposobnosti samoregeneracije koštanog tkiva, veće traume i metabolička oboljenja narušavaju regeneracijski potencijal. Regenerativna medicina nastaje kao odgovor na spomenuti problem te joj je cilj kombinacijom biologije, kemije, inženjerstva materijala i kliničke medicine ponovo stvoriti i održati prirodne regenerativne procese koji će dovesti do prirodnog oporavka oštećenog ili oboljelog tkiva. Zamisao regenerativne medicine podrazumijeva tri temeljne komponente koje se međusobno preklapaju. Komponente, tzv. regenerativne trijade su: stanice, terapija i biomaterijali, a prilagođavaju se tkivu koje se želi regenerirati [61–63].

Za potrebu regeneracije tkiva mogu se koristiti diferencirane stanice istog tipa kao i ciljano tkivo ili matične stanice. Kod diferenciranih stanica nema bojazni o diferenciranju u neželjenu vrstu, a mogućnost malignih transformacija je smanjena zbog čega se smatraju sigurnijima.

Međutim, diferencirane stanice presađivanjem prolaze fenotipske modulacije te je za njihovo prikupljanje neophodno oštećenje zdravog tkiva. Prednost matičnih i progenitornih stanica je njihova dostupnost i varijabilnost, što je ujedno i mana zbog spomenutog rizika od malignih transformacija [62].

Druga temeljna komponenta regenerativne medicine je okoliš, odnosno terapija koja će ciljano stvoriti regenerativno okruženje. Kada je regeneracija prirodno potaknuta, obnova tkiva podrazumijeva kompliciranu kaskadu preklapajućih događaja koji su kontrolirani lokalnim podražajima na oštećenom mjestu. Signali podražaja započinju okupljanje progenitornih stanica koje kroz niz koraka diferencijacije na kontrolirani način sazrijevaju. Progenitorne stanice se dijele te izlučuju izvanstaničnu matricu koja stvara povoljan uvjet za početak regeneracijskog procesa. Regeneracijska medicina pokušava imitirati te uvjete stvaranjem umjetnog okoliša raznim faktorima rasta [62].

Posljednja komponenta regenerativne medicine su biomaterijali. S ciljem stvaranja uvjeta što sličnijih prirodnom okruženju, regenerativna medicina osmišljava i izgrađuje trodimenzionalne okosnice koje imitiraju građu organa kombinacijom različitih materijala. Većina novijih istraživanja usmjerena je prema resorbilnim okosnicama čija je funkcija privremeno ponuditi trodimenzionalni predložak za stanice koje se mogu smjestiti u porama i sintetizirati izvanstaničnu matricu, a resorpcijom predložka dolazi do postepenog zamjenjivanja mladim funkcionalnim tkivom [62,63].

### 2.3.1 Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva (BTE, *engl.* bone tissue engineering) grana je regenerativne medicine koja zahtijeva poznavanje i razumijevanje strukture i mehanizama kostiju. Uloga BTE jest razviti strategiju zaštite i liječenja oštećenog koštanog tkiva, čije oštećenje je veće od kritične veličine pa ju tkivo ne može samostalno regenerirati. Strategije BTE moguće je ugrubo podijeliti na: a) zamjenu oštećenog koštanog tkiva kompozitnom okosnicom, b) korištenje kombinacije različitih matičnih stanica, c) nanomedicinsko liječenje defekata i infekcije, te d) korištenje nanookosnica i magnetskog polja [64]. Ukratko, zamjena oštećenog koštanog tkiva okosnicom zahtjeva sintezu biokompatibilne kompozitne okosnice koja će biti osnova za razvoj novog koštanog tkiva. Matične stanice na mjestu oštećenja koštanog tkiva pomažu u regeneraciji, no mogu se koristiti samo za manja oštećenja pa se češće koriste u kombinaciji s okosnicama. Nanomedicinsko liječenje uključuje nanočestice, najčešće s

antibakterijskim svojstvima, koje služe kao nosači za protuupalne lijekove. Cilj je liječenje infekcija koje su nastale zbog oštećenja, a mogu usporiti ili spriječiti regeneraciju tkiva. Inovativna metode koja koristi magnetske nanočestice i magnetsko polje za cilj ima stvaranje koridora za stanice, okosnice i faktore rasta koji će pod utjecajem magnetskog polja omogućiti minimalno invazivnu i bržu regeneraciju oštećenja, a glavna je prednost bolja vaskularizacija nego u slučaju velikih kompozitnih okosnica [65]. Zajedničko svim nabrojanim BTE strategijama jest: a) biokompatibilna okosnica koja je što sličnija prirodnoj kosti, b) osteogene stanice koje će sintetizirati matricu koštanog tkiva, c) morfogeni signali koji usmjeravaju diferencijaciju stanice prema poželjnom fenotipu te d) dobra vaskularizacija koja će omogućiti potrebnu opskrbu mladog tkiva nutrijentima [61].

Budući da funkcionalnost kosti ovisi o strukturi koštanog tkiva, biokompatibilne okosnice se sintetiziraju s nanometarskim komponentama. Svojstva poput hidrofилности i hidrofobnosti materijala od velike su važnosti jer utječu na adsorpciju proteina i stanica, a u konačnici diktiraju proliferaciju i diferencijaciju. Okosnica bi trebala imitirati spužvasto koštano tkivo, što unosi dodatni zahtjev pri izboru materijala. Velika poroznost spužvastog tkiva ne samo da omogućava distribuciju stanica, već pospješuje vaskularizaciju i opskrbu mladog tkiva nutrijentima. Korišteni materijali za okosnicu ne smiju izazivati imunološku reakciju, a kako se radi o dijelu potpornog sustava, neophodna je mehanička stabilnost i kontrolirana razgradnja. Idealna brzina razgradnje odgovarala bi brzini rasta novog koštanog tkiva, što ovisi o brojnim parametrima, kao što su svojstva nosača, vrijednosti pH okoline, mjestu ugradnje i dr. [61–63,66,67].

Prema podrijetlu materijala okosnice se mogu podijeliti na prirodne, umjetne i kombinirane. Umjetni materijali koji se koriste za okosnice najčešće su alfa-hidroksilni esteri (PLA i PGA) ili keramike (HAp i  $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\beta$ -TCP)). Okosnice načinjene od umjetnih materijala pokazuju dobra mehanička svojstva koja je jednostavno kontrolirati, ali predstavljaju izazov pri nižim vrijednostima pH zbog pada stabilnosti te slabe biokompatibilnosti. Okosnice načinjene od prirodnog materijala, kao što su fibrin, kolagen, alginat, koralj i kitozan, biokompatibilne su, no kod njih često izostaju potrebna mehanička svojstva, a postoji i bojazan o prijenosu bolesti zbog izvora materijala i njegove obrade [62,63]. Zbog sinergijskog učinka, najčešće korišteni biomaterijali su kombinirani materijali: osteoinduktivni i hibridni materijali, kopolimeri, mješavine polimera, kompoziti polimera i keramike, napredni hidrogelovi te imunomodulatori [61,62].

### 2.3.2 Biokeramika

Keramički materijali ciljano razvijeni za upotrebu kao medicinski i dentalni implantati, zajedničkim imenom nazivaju se biokeramika. Najčešće korištena biokeramika jest aluminijev i cirkonijev oksid te kalcijevi fosfati (CaP). Neki CaP su posebno zanimljivi materijali u BTE jer imaju veliku sličnost s anorganskim dijelom dentalnog i koštanog tkiva. Njihova biokompatibilnost očituje se u interakciji s osteogenim stanicama. Naime, većinom su to osteoinduktivni materijali, što znači da će prilikom interakcije s osteogenim stanicama doći do pojačavanja njihovog diferencijacijskog te proliferacijskog potencijala osteoblasta, što će rezultirati bržom regeneracijom oštećenog tkiva [61,63].

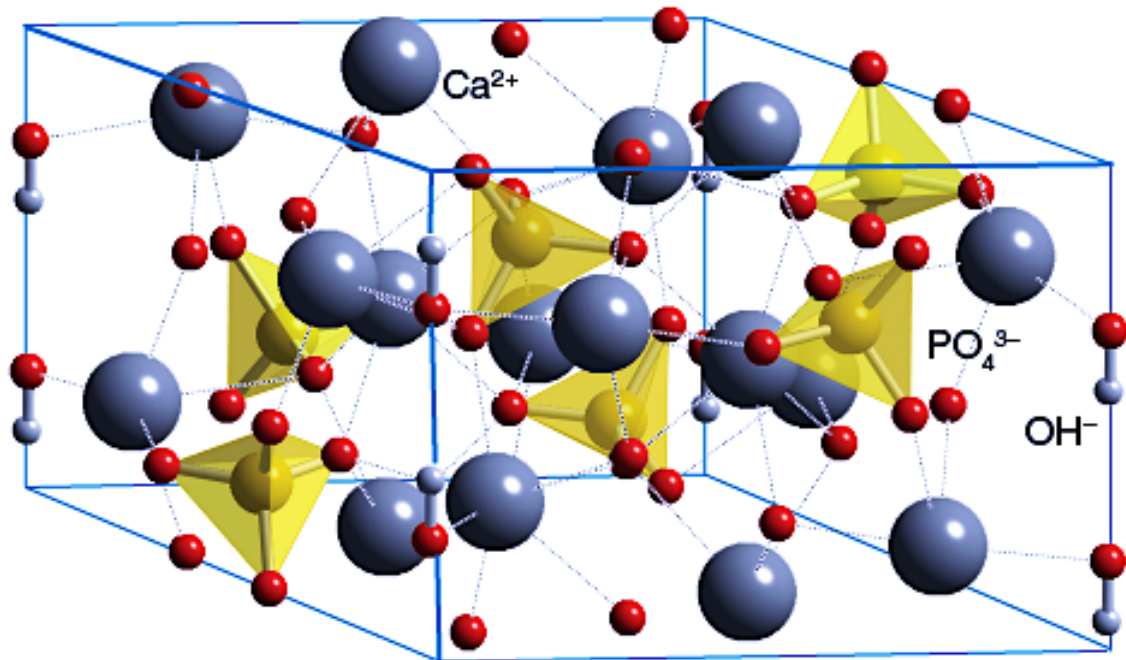
Cijeli proces ovisi o vrsti CaP-a, odnosno omjeru kalcija i fosfata, njihovoj kristalnosti te čistoći faza. Hidroksiapatit s nedostatkom kalcija (CDHAp) predstavlja bioaktivni CaP složene strukture. Njegov omjer kalcija i fosfata nalazi se između 1,50 i 1,67, no vrijednosti mogu varirati. CDHAp je zanimljiv materijal za BTE jer je izuzetno sličan prirodnom apatitu koji se nalazi u kostima. Ključna razlika što kost sadrži mnogobrojne elemente u tragovima, a koje sintetski CDHAp ne sadrži. Osim CDHAp-a, razlikujemo i amorfni kalcijev fosfat (ACP) koji je sličan CDHAp-u te oktakalcijev fosfat (OCP) i tetrakalcijev fosfat (TTCP). Važno je spomenuti i HAp te  $\beta$ -TCP koji pokazuju osteoinduktivna svojstva uz afinitet prema vezanju za prirodno koštano tkivo [61,63,68–70].

## 2.4 HIDROKSIAPATIT

Prirodni apatit u prethodnom dijelu definiran je kao visoko supstituirani karbonatni HAp s manjkom kalcija, nanometarske veličine i niske kristalnosti [8,28]. Kako sintetski HAp ima dobra osteoinduktivna svojstva, biokompatibilan je, netoksičan, stabilan te sličan prirodnom apatitu, mnoga istraživanja u BTE usmjerena su upravo prema sintezi, karakterizaciji i biološkim ispitivanjima modificiranog HAp-a kojim se nastoji imitirati prirodni apatit [70].

Stehiometrijski HAp ima kemijsku formulu  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , a njegova kristalna rešetka je prikazana na slici 3. Kristalna rešetka pripada heksagonalnoj  $P6_3/m$  prostornoj grupi s dimenzijama rešetke:  $a = 9,432 \text{ \AA}$  i  $c = 6,881 \text{ \AA}$ . Kao što je vidljivo na slici 3., ukupno deset kalcijevih iona zauzima dvije vrste položaja,  $x = 1/3$   $y = 2/3$ ,  $z = 0$  te  $x = 1/4$ ,  $y = 1$ ,  $z = 1/4$ , dok atom fosfora zauzima položaj  $x = 2/5$ ,  $y = 1/3$  i  $z = 1/4$ . Kalcijevi ioni smješteni su tako da formiraju kanal čije je središte  $c$  os, tzv. anionski kanal. Unutar tog kanala može se smjestiti klor, fluor ili hidroksilna skupina. HAp unutar anionskog kanala sadrži hidroksilne skupine na

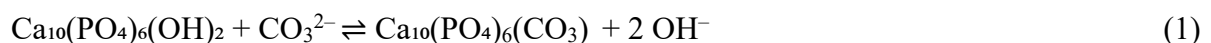
položaju  $z = 1/4$  i  $z = 3/4$ . Zbog relativno male udaljenosti O–H veze i radijusa vodika, pojedinačni položaji kisika i vodika neznatno variraju od položaja skupine. Preostali atomi kisika koji pripadaju fosfatnoj skupini zauzimaju tri položaja;  $x = 1/3, y = 1/2, z = 1/4$ , zatim  $x = 3/5, y = 1/2, z = 1/4$ , i  $x = 1/3, y = 1/4, z = 0$  [23,71–73].



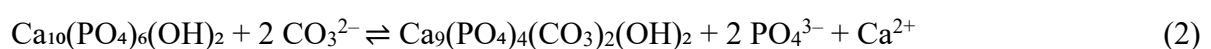
Slika 3. Shematski prikaz kristalne rešetke HAP

(●-kalcij, ●-kisik, ●-vodik, ●-fosfor)

Proces supstitucije stranih iona u kristalnu rešetku izvor je vakancija, distorzije kristalne rešetke, defekata, promjene sastava, a posljedično i promjene svojstva HAP-a. Stoga, kontroliranom supstitucijom stranih iona moguće je sintetizirati HAP sličnog sastava i svojstava biološkom apatitu [8,28,70]. Prvi zahtjev u takvoj sintezi jest supstitucija karbonata u rešetku HAP-a. Kod A tipa supstitucije, karbonatni ion supstituira se na mjesto hidroksilnog iona u kristalnoj rešetci, stvarajući kristalnu strukturu s manjkom  $\text{OH}^-$  iona:



Ako karbonatni ion supstituira na položaj fosfatnih iona, supstitucija se naziva B tipom [28]:



Koji mehanizam supstitucije će se dogoditi, ovisi o vrsti i količini supstituiraćeg iona. Jedini uvjet je poštivanje neutralnosti naboja kristalne strukture [8,23,28]. Kako se ulaskom

dvovalentnog karbonatnog iona u kristalnu rešetku apatita na mjesto fosfata generira pozitivni naboj, potrebno je otpustiti jedan kalcijev i hidroksilni ion koji će omogućiti neutralnost. B tip supstitucije zastupljeniji je, a tim mehanizmom često se supstituiraju i drugi ioni, primjerice hidrogenfosfati i seleniti. B tipom supstitucije karbonatnih i hidrogenfosfatnih iona formira se CDHAp kemijske formule  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4/\text{CO}_3)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$  koji je kemijski sličan prirodnom apatitu.

Ovisno o uvjetima sinteze (temperatura, vrijednost pH), iz istih prekursora moguće je sintetizirati razne faze CaP-a. Mehanizam nastanka prirodnog apatita nije u potpunosti razjašnjen, no mnoga istraživanja ukazuju kako ona nije direktna, već proizlazi iz dva prekursora: OCP i ACP faze. OCP je metastabilna faza vrlo slične strukture HAp-u, a čija je sinteza, naročito u fiziološkom mediju, brža od sinteze HAp-a. Nakon sinteze OCP-a, dolazi do njegove termodinamički povoljne transformacije u krutom stanju sporom ireverzibilnom *in situ* hidrolizom. Zbog reakcije u krutom stanju, za vrijeme hidrolize dolazi do ugradnje defekata i stranih iona čime se mijenjaju kemijski sastav, struktura, kristalnost i specifična površina. U posljednjem koraku nastali CDHAp niske kristalnosti starenjem kristala poprima sastav i strukturu prirodnog apatita [8,30,32,33]. Da amorfnu fazu ima ulogu u formiranju apatita, dokazali su Eanes i Meyer, čiji rezultati pokazuju da ACP faza prolaskom kroz proces starenja mijenja svoju strukturu, sastav i morfologiju, postajući sve sličnija OCP fazi koja na već opisani način prelazi u prirodni apatit [74]. Ipak, novija istraživanja pokazuju kako ACP u prisustvu vlage služi kao prekursor za nastanak nanokristaliničnog CDHAp-a, bez uočavanja OCP faze [75,76]. Ove razlike u rezultatima mogu se objasniti time da se ACP na pH vrijednostima iznad 9 transformira direktno u HAp, dok je u području  $7 < \text{pH} < 9$  prekursor OCP faze [77].

Svaka modifikacija kristalne strukture ima utjecaj na morfologiju kristala, a ona utječe na regeneraciju tkiva [78–81]. Izgled kristala može se modificirati uvjetima sinteze, odnosno podešavanjem koncentracije, temperature, disperzijskog sredstva, vrijednosti pH, prekursorima i sl. [33,78,79,82]. Prema literaturi, kristali HAp-a dobiveni precipitacijom opisuju se kao tanki pločasti kristali s tendencijom formiranja manjih aglomerata u obliku cvijeta ruže [83–86].

## 2.5 SELENIJ – ESENCIJALNI ELEMENT U TRAGOVIMA

Selenij je metaloidni element periodnog sustava elemenata, atomskog broja 34, koji pripada 16. skupini. Rijetko se pronalazi u osnovnom stanju, najčešće u obliku anorganskih soli (seleniti i selenati) te kao organski selenij. Selenij čini svega između  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  % Zemljine kore, što je prosječno oko 90  $\mu\text{g}$  po kilogramu zemlje [87].

Selenij je jedan od najvažnijih esencijalnih mikro nutrijenata u ljudskom organizmu, a nalazi se u obliku organskog selenija i mora se unositi hranom. Do sada je identificirano 25 proteina koji se prirodno nalaze u ljudskom organizmu, a u svojim aktivnim mjestima sadrže selenocistein. Na staničnoj razini, selenij je važan sudionik mnogih metaboličkih procesa, najčešće u ulogama antioksidansa, protein *chaperon-a*, enzima u metabolizmu hormona štitnjače te neutralizatora toksičnih tvari koje mogu biti unesene u organizam, primjerice kadmij, živa i arsen [10,88,89]. Profil koncentracije selenija i njegova djelovanja na organizam ima U oblik, što znači da je mala razlika između koncentracija selenija koje imaju pozitivni utjecaj na organizam i onih koje stvaraju zdravstvene probleme. Određene količine selenija neophodne su za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Visoke koncentracije su toksične, a niske su povezane sa smrtnosti, slabim imunitetom i smanjenjem kognitivnih sposobnosti [9–11,13,88].

Prema istraživanjima, osobe s koncentracijom selenija većom od 122  $\mu\text{g/L}$  nisu pokazivale nikakve prednosti od uzimanja dodataka prehrani koji su sadržavali selenij, stoga je zaključak da takve osobe niti ne bi trebale uzimati suplemente selenija [90,91]. Nasuprot tome, osobe s niskom razinom selenija (ispod 85  $\mu\text{g/L}$ ) najčešće su bili bolesnici s kroničnim, ponekad akutnim stanjima, koji su kontroliranim uzimanjem suplemenata selenija kroz određeno vrijeme pokazali pozitivne pomake, od podizanja imunološkog sustava te odgovora na zarazu polio virusom [92] i HIV-om [93], povećanja pokretljivosti spermatozoida kod muškaraca smanjene plodnosti [94], značajnog smanjenja bolova u zglobovima oboljelih od artritisa [95], do smanjenje ukupne smrtnosti od raznih vrsta tumora za oko 50 % te smanjenje obolijevanja od različitih vrsta karcinoma za do čak 63 % [90]. Druga istraživanja pokazuju pozitivne utjecaje u borbi protiv različitih virusnih i bakterijskih infekcija, naglih promjena raspoloženja, poremećaja u radu štitnjače, epilepsije te degenerativnih moždanih i kardiovaskularnih oboljenja [9,11,96–99].

### 2.5.1 Selenij u koštanom tkivu

Ljudske kosti sadrže prosječno između 0,1 i 0,6 mg selenija po kilogramu kosti, što čini oko 16 % ukupnog selenija u ljudskom tijelu [36,100]. Ključne uloge selenija u kostima su zaštita od oksidativnog stresa, očuvanje homeostaze kostiju i održavanje mineralne gustoće. Mnogi su molekularni mehanizmi kojima selenij to ostvaruje, a glavni su putem selenoproteina, redoks ciklusa, oponašanja metionina selenometioninom te modifikacijom tiolnih proteina. Fiziološki efekti ovih mehanizama najčešće su stanična signalizacija, angiogeneza, proliferacija, antioksidacijska zaštita, apoptoza uzrokovana kaspazom, smanjenje upalnih procesa, deaktivacija osteoklasta, poboljšana imunološka funkcija stanice i dr. [12]. Dvije glavne grupe enzima kojima selenij djeluje u kostima su glutation peroksidaza (GP) i tioredoksin reduktaza (TrxR). Enzim GPx1 glavni je antioksidativni enzim u osteoklastima reguliran estrogenom, inhibitorom osteoklastogeneze, dok TrxR1 enzim s vitaminom D3 sinergijskim učinkom pokazuje izuzetna diferencirajuća svojstva osteoblasta [12,101].

Zhang i suradnici pokazali su kako postoji pozitivna korelacija između umetanja selenocisteina u selenoprotein i razvoja kostiju, a sam transport selenija u kosti ovisi o selenoproteinu P [101]. Selenoprotein P je u mnogim istraživanjima doveden u korelaciju s mineralnom gustoćom kostiju. Beukhof i suradnici otkrili su pozitivnu korelaciju između selenija, selenoproteina P i ukupne mineralne gustoće kostiju kod starijih muškaraca, a rezultati nisu varirali promjenom parametara kao što su tjelesni maseni indeks, tjelesna sprema kandidata, dob, jesu li ispitanici oboljeli od dijabetesa (i kojeg tipa), koriste li lijekove te jesu li pušači [102]. Slično su pokazali Hoeg i suradnici [14]. Koncentracija selenija negativno korelira s aktivnošću koštanih stanica, a pozitivno s mineralnom gustoćom kostiju kod zdravih žena u postmenopauzi.

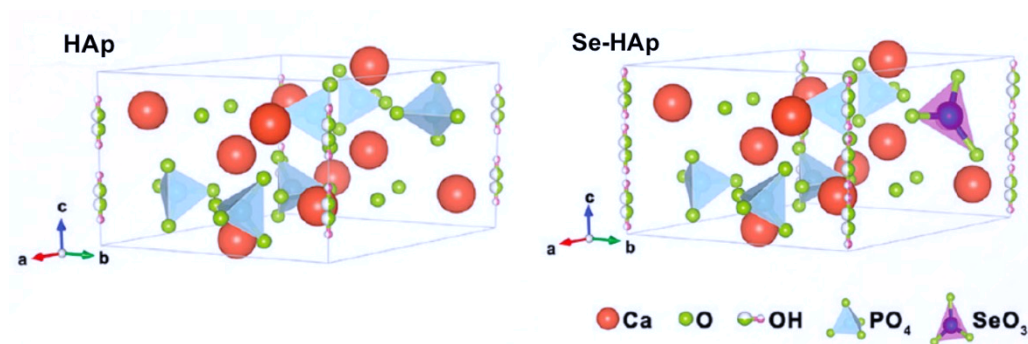
Prema literaturi i dostupnim podacima te pretpostavkama utemeljenim na njima, selenij može biti od velike pomoći u BTE. Mnoga postojeća ispitivanja pokazala su obećavajuće rezultate. Primjerice, Turan i suradnici pokazali su kako se heparinom izazvana osteoporoza kod kunića učinkovitije liječi kombinacijom natrijeva selenita i vitaminima C i E, nego liječenjem s vitaminima C i E, bez selenija [13]. Egrise i suradnici dokazali su da kod štakora nedostatak selenija rezultira slabijim razvojem jedinki druge generacije, što je povezano s poremećajem metabolizma kostiju te osteopenijom [103]. Slično istraživanje proveli su Montero i suradnici gdje su uočili kako suplementi selenija mogu usporiti osteopeniju nastalu uslijed nedostatka estrogena [104].



Neka istraživanja pokazuju povezanost tumora i razine selenija. Zachara i suradnici pokazali su kako pacijenti oboljeli od različitih tumora imaju smanjenu razinu selenija u organima odakle potječe tumor, ali i u kostima, neovisno o tipu tumora [100]. Primjerice, za tumor dojke poznato je kako često metastazira na kosti gdje dolazi do degradacije koštanog tkiva uslijed aktivacije osteoklasta. Metastaze djeluju inhibirajuće na osteoblaste, čime sprječavaju njihovu diferencijaciju i izgradnju kostiju. Istraživanje Chena i suradnika pokazalo je kako dodatkom selenija u prehranu, dolazi do blokiranja ključnih enzima, čime se sprječava upalni odgovor osteoblasta na metastazu te se ublažava degradacija koštanog tkiva [105].

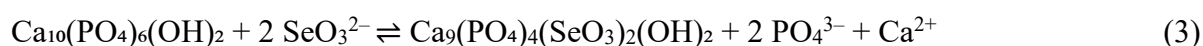
## 2.6 HIDROKSIAPATIT DOPIRAN SELENIJEM

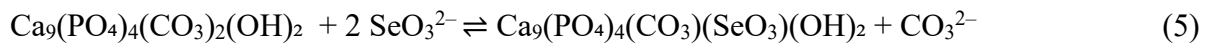
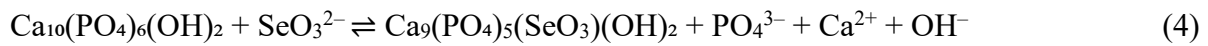
Prednosti supstituiranog HAp-a u BTE te važnost selenija i prednosti njegove suplementacije, nameću ideju o kombinaciji selenija i HAp-a s ciljem dobivanja aktivne biokeramike koja posjeduje antibakterijska, antivirusna i protutumorska svojstva, poboljšanu osteoinduktivnost, proliferacijsko i diferencijacijsko djelovanje te sposobnost održavanja mineralne gustoće kostiju. Dvije su mogućnosti sinteze HAp-a dopiranog ionima selenija: taloženjem iz otopine i ionskom izmjenom [86]. Kao izvor selenijevih iona najčešće se koriste selenijeve soli: seleniti ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) i selenati ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ). Već je spomenuto kako se dopiranjem HAp-a mogu dogoditi dvije vrste supstitucija, što znači da u teoriji postoje dvije opcije za supstituciju  $\text{SeO}_3^{2-}$ , odnosno  $\text{SeO}_4^{2-}$ . Istraživanja pokazuju kako se obje vrste uspješno supstituiraju B tipom, odnosno na položaj fosfata, kao što je to prikazano na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz dopiranja HAp-a selenitnim ionom na položaj fosfatnog iona

Supstitucija  $\text{SeO}_3^{2-}$  može se prikazati kemijskim jednadžbama na više načina [83,106,107]:





Mogućnost supstitucije na položaj fosfata, umjesto na položaj hidroksilne skupine je u samoj prirodi skupina. Obje skupine su veličinom i geometrijom sličnije fosfatima nego hidroksilnoj skupini. Selenati i fosfati imaju tetraedarsku geometriju, dok je selenit trigonske piramidalne geometrije. Supstitucijom može doći do promjena u parametrima jedinične ćelije koji se mogu pratiti putem rendgenske difrakcijske analize praha (XRD), gdje će pomak pikova faza biti usko povezan sa supstitucijom stranog iona. Kako je u ovom radu provedena supstitucija fosfata selenitnim ionima, osim XRD, korištena je i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR). U FTIR spektrima supstituiranih CaP faza moguće je vidjeti vrpcu na oko  $770 \text{ cm}^{-1}$  koja pripada asimetričnom istezanju Se–O veze u  $\text{SeO}_3^{2-}$  skupini [83,108]. Taj se podatak, uz podatak o promjeni parametara ćelije, često u literaturi koristi kao potvrda o uspješnom dopiranju HAp-a selenitnim ionima. Zbog spomenutog narušavanja kristalne strukture uslijed supstitucije, dolazi do gubitka klasične kristalne morfologije HAp-a, a dopirani sustav okarakteriziran je mnogobrojnim velikim aglomeratima sferičnih čestica amornog izgleda [83–86,109].

Uskoković i suradnici u svom istraživanju ispitali su antibakterijska, protutumorska i osteoinduktivna svojstva takvog sustava [86]. HAp dopiran selenijem pokazao se vrlo učinkovitim u borbi protiv više vrsta bakterija (*E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*), a njegovo djelovanje ovisilo je o količini selenija. Dokazano je smanjenje broja stanica osteosarkoma koje korelira s povećanjem količine selenija, a rezultati su pokazivali značajnu razliku u odnosu na kontrolne grupe i grupe koje su tretirane isključivo HAp-om. Funkcija zdravih stanica nije ni na koji način bila poremećena, što sugerira potencijalno selektivno protutumorsko djelovanje. Isto istraživanje pokazuje i povećano osteoinduktivno djelovanje. Ekspresija mRNA BGLAP3 proteina bila je veća u diferenciranim MC3T3-E1 osteoblastima koji su tretirani HAp-om dopiranim selenijem nego u stanicama koje su tretirane čistim HAp-om. Antibakterijska svojstva potvrđena su i drugim istraživanjima [107,110]. Wang i suradnici dali su potvrdu protutumorskog svojstva svojim istraživanjem u kojem HAp dopiran selenijem, po ugrađivanju na oštećeno mjesto nakon kirurškog odstranjivanja osteosarkoma, inducira apoptozu preostalih tumorskih stanica [111]. Istraživanje je provedeno *in vitro* i *in vivo*, a pretpostavljaju da izlaskom selenija iz kristalne rešetke dolazi do generiranja reaktivnog kisika te aktivacije apoptoze ovisne o kaspazi, što dovodi do inhibicije rasta

tumora uz minimalnu toksičnost okolnog tkiva. Yanhua i suradnici dobili su slične rezultate kod liječenja tumora jetre, gdje je uočena nekroza tumorskog tkiva nakon tretiranja s nanočesticama HAp dopiranog selenijem [112].

Oledzka i suradnici ispitivali su kompozitne okosnice polimernog materijala sa selenijem dopiranim HAp-om, koje bi se mogle koristiti kao nadomjesci kod pacijenata s tumorom kostiju lica [113]. Rezultati ukazuju na nisku toksičnost, mogućnost kontroliranog otpuštanja lijeka, kao i dobra fizikalna svojstva te odgovarajuću brzinu razgradnje okosnice. Također se istražuju i nanočestice selenijem dopiranog HAp-a u svrhu dostave lijekova, gdje rezultati pokazuju netoksičnost te precizno i kontrolirano otpuštanje lijeka [109,114].

### 3 EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 DOBIVANJE KALCITA IZ SIPINE KOSTI

Izvor kalcijeva karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) potrebnog za sintezu CaP sustava je sipina kost (*Sepia Officinalis* L.) iz Jadranskog mora. Sipina kost očisti se od svih organskih ostataka i nečistoća tako da se manji komadi kosti ( $1\text{--}2\text{ cm}^2$ ) tretiraju 24 h vodenom otopinom natrijeva hipoklorita. Kost se ispiru vrelom destiliranom vodom te suše na  $105\text{ }^\circ\text{C}$  [115]. Kako bi se dobiveni aragonit preveo u kalцит, uzorak se toplinski obrađuje na  $400\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 2 h, brzinom zagrijavanja  $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ .

#### 3.2 SINTEZA SELENIJEM DOPIRANIH KALCIJEVIH FOSFATA

Sintetizirana su četiri uzorka CaP-a dopiranih različitim udjelima selenija (0, 1, 5 i 10 %). Sinteza započinje otapanjem određene mase natrijeva selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 99,0 %, Sigma-Aldrich) u destiliranoj vodi, uz konstantno miješanje pri  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon otapanja  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dodaje se odgovarajuća količina  $\text{CaCO}_3$  pri  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon jednog sata i dobre disperzije  $\text{CaCO}_3$ , dodaje se urea fosfat ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich) pri  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Korištene mase prekursora za sintezu CaP-Se prikazane su u tablici 1., gdje je količina korištenih prekursora izračunata uz uvjet zadovoljavanja omjera  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Se}) = 1,67$ . Sinteza se provodi četiri dana, a nakon završetka, otopina se hladi na sobnu temperaturu ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) i filtrira. Istaloženi CaP-Se uzorci suše se na sobnoj temperaturi preko noći. Uzorci se karakteriziraju te toplinski obrađuju pri  $1200\text{ }^\circ\text{C}$ .

Tablica 1. Mase prekursora korištene u sintezama CaP-Se

<i>prekursori</i>	<i>CaP-Se0</i>	<i>CaP-Se1</i>	<i>CaP-Se5</i>	<i>CaP-Se10</i>
$m(\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})/\text{g}$	-	0,0079	0,0393	0,0785
$m(\text{CaCO}_3)/\text{g}$	0,4981	0,4981	0,4981	0,4981
$m(\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4)/\text{g}$	0,4718	0,4671	0,4482	0,4246

### 3.3 KARAKTERIZACIJA

#### 3.3.1 pH metar

Vrijednosti pH otopina za vrijeme sinteze mjerene su pH metrom Schott CG 842, Blue Line 14 elektroda, pH raspona 0-14, preciznosti 0,01. Vrijednost pH mjerene su 1 h nakon svakog dodatka prekursora, svakih 24 h od dodatka posljednjeg prekursora te nakon završetka sinteze i hlađenja otopina na 25 °C.

#### 3.3.2 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Sintetizirani uzorci prije i nakon toplinske obrade karakterizirani su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR). Spektri su snimani instrumentom ATR-FTIR Bruker Vertex 70 s dijamantnim kristalom. Analiza je provedena pri 20 °C u mjernom području od 400 do 4 000  $\text{cm}^{-1}$  s 32 očitavanja i rezolucijom 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.3 Rendgenska difrakcijska analiza i Rietveldova metoda utočnjavanja

Za analizu mineraloškog sastava, uzorci se miješaju s polikristaliničnim silicijevim standardom NIST SRM 640e u masenom udjelu od 5 %. Određivanje sastava pripremljenih uzoraka, prije i nakon toplinske obrade, provedeno je rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) na Shimadzu XRD-6000 instrumentu s  $\text{CuK}\alpha$  zračenjem pri 40 kV i 30 mA. Sintetizirani uzorci analizirani su u mjernom području  $3^\circ < 2\theta > 60^\circ$ , dok su toplinski obrađeni uzorci analizirani u mjernom području  $20^\circ < 2\theta > 70^\circ$ , oba pri brzini snimanja od  $0,2^\circ / 10 \text{ s}$ . Za obradu podataka Rietveldovom metodom utočnjavanja korišten je softverski paket DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. pomoću kojeg je određen udio pojedinih faza u ukupnom uzorku te parametri jediničnih ćelija. Za obradu rezultata, korišteni su strukturalni parametri HAp koje su opisali Veselinović i suradnici [116], strukturalni parametri OCP koje su opisali Espanol i suradnici [117] te strukturalni parametri  $\beta$ -TCP koje su opisali Yashima i suradnici [118]. Položaji Ca, P, O i H održavani su fiksnima za sva utočnjavanja. Težinski profilni R faktor ( $R_{\text{wp}}$ ) i očekivani R faktor ( $R_{\text{exp}}$ ) korišteni su kako bi se odredila uspješnost poklapanja eksperimentalnih podataka i izračunatih vrijednosti. Rezultati su prihvaćeni uz uvjet  $R_{\text{wp}} < 10 \%$  i  $R_{\text{exp}} < 3 \%$ .

### 3.3.4 Pretražni elektronski mikroskop

Utjecaj dopiranja selenitnih iona na morfologiju CaP-a ispitan je analizom uzoraka pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), instrumentom TESCAN Vega 3 SEM Easyprobe, s energijom elektronskog snopa od 10 keV. Uzorak za analizu izlagao se plazmi zlata i paladija u trajanju od 60 s.

### 3.3.5 Induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa

Elementarna analiza sintetiziranog CaP-Se sustava provedena je induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrom masa na Perkin Elmer ICP-MS ELAN DRC instrumentu. Uzorak za analizu pripremio se tako da se 100 mg sintetiziranog praha otapa u 1 mL vodene otopine  $\text{HNO}_3$ . Dobivena otopina prije analize razrjeđuje se ultračistom vodom na 10 mL.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 VRIJEDNOST pH OTOPINE

U tablici 2. prikazane su vrijednosti pH otopina izmjerene za vrijeme pripreme reakcijske smjese i sinteze.  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  i  $\text{CaCO}_3$  reakcijsku smjesu postavljaju u bazno područje. Veća količina  $\text{SeO}_3^{2-}$  daje lužnatiju otopinu. Dodatkom  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$  dolazi do snižavanja vrijednosti pH za 3 do 5 pH jedinica. Već prvog dana sinteze, vrijednost pH raste u neutralno ili blago bazno područje. S odmakom vremena, vrijednost pH sve se manje mijenja.

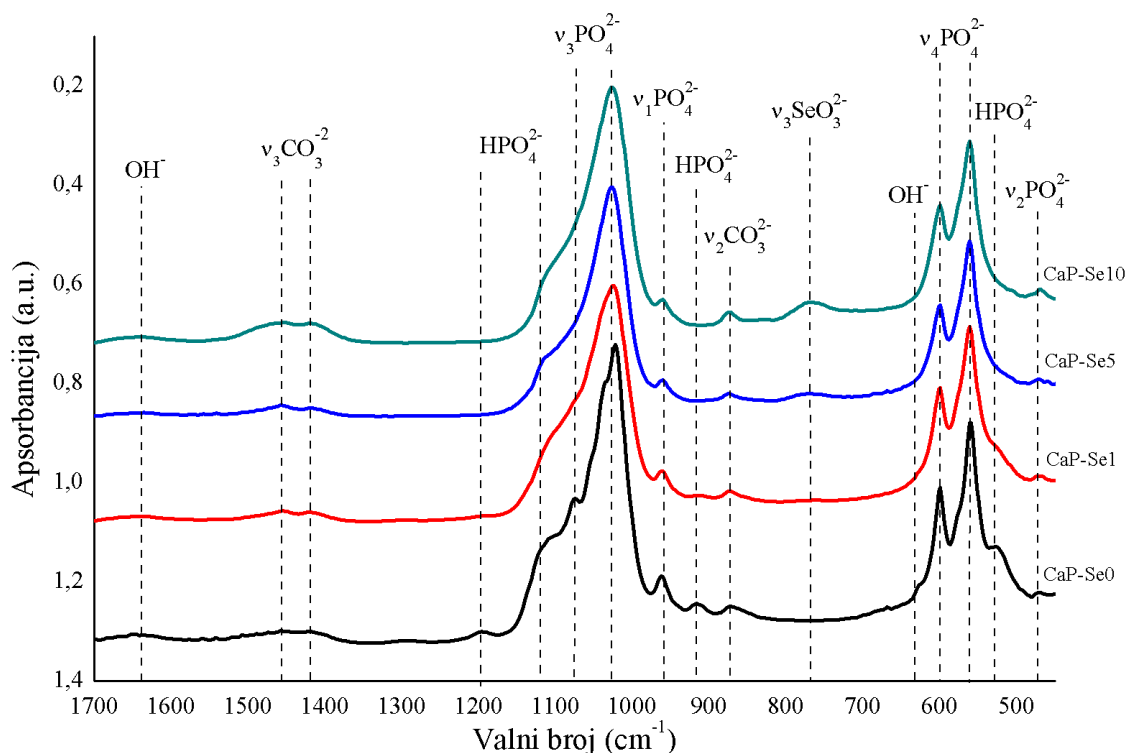
Tablica 2. Vrijednosti pH otopina za vrijeme sinteze CaP-Se

	<i>1h nakon dodatka <math>\text{SeO}_3^{2-}</math> (30 °C)</i>	<i>1h nakon dodatka <math>\text{CaCO}_3</math> (40 °C)</i>	<i>1h nakon dodatka <math>\text{PO}_4^{3-}</math> (50 °C)</i>	<i>1. dan (50 °C)</i>	<i>2. dan (50 °C)</i>	<i>3. dan (50 °C)</i>	<i>4. dan (50 °C)</i>	<i>4. dan (25 °C)</i>
<i>CaP-Se0</i>	-	9,86	5,20	7,51	7,78	7,99	7,97	8,08
<i>CaP-Se1</i>	7,80	9,04	5,40	7,70	7,89	7,75	7,19	7,33
<i>CaP-Se5</i>	8,64	9,18	4,60	6,95	7,82	7,94	8,01	8,00
<i>CaP-Se10</i>	9,30	9,37	6,24	8,16	8,46	8,60	8,63	8,63

Fosfati se dodaju u otopinu čija je vrijednost pH oko 9. Nakon dodatka  $\text{PO}_4^{3-}$  vidljiv je pad vrijednosti pH u blago kiselo područje, što je povoljan uvjet za sintezu dikalcijevog fosfata dihidrata (DCPD). Osim pH vrijednosti, prisustvo „stranih“ iona može dodatno potaknuti transformaciju ACP faze u DCPD. U blago kiselim uvjetima ( $5 < \text{pH} < 6$ ) DCDP hidrolizira u OCP fazu ili direktno u HAp [77,119]. S obzirom na uočene promjene vrijednosti pH, pretpostavlja se da će već prvog dana sinteze doći do sinteze ACP, DCPD i OCP. Kako je sinteza podešena da količina prekursora odgovara omjeru  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Se}) = 1,67$ , a HAp je termodinamički stabilniji produkt, kroz period od 4 dana očekuje se da će dio sintetiziranog ACP-a, OCP-a i DCDP-a biti transformiran u HAp fazu. Odmicanjem sinteze, vrijednost pH raste u neutralno do blago bazno područje, između 7,33 i 8,63, u kojem HAp ima slabu topljivost [119]. Kako je DCPD relativno nestabilan u odnosu na OCP i HAp fazu, očekuje se njegova potpuna transformacija. Zbog porasta vrijednosti pH i nestabilnosti OCP-a na pH višem od 7, očekuje se kako će se nastali OCP u potpunosti transformirati u HAp fazu [120]. S druge strane, prisustvo stranih iona može utjecati na stabilnost OCP-a, što će i utjecati na konačni mineraloški sastav produkta. U precipitiranim uzorcima očekuju se HAp i ACP faze.

## 4.2 INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM

Na slici 5. prikazan je FTIR spektar dobiven analizom sintetiziranih uzoraka CaP-Se. Iz spektara je vidljivo da se sve četiri krivulje, neovisno o dopiranju, ne razlikuju značajno. Svi uzorci pokazuju karakteristične vrpce za  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine koje se mogu pripisati HAp-u (simetrično istežanje:  $963\text{ cm}^{-1}$ , asimetrično istežanje:  $1036$  i  $1095\text{ cm}^{-1}$ , asimetrično savijanje:  $568$  i  $600\text{ cm}^{-1}$  te simetrično savijanje:  $475\text{ cm}^{-1}$ ) [121]. Na prikazanim spektrima vidljive su karakteristične vrpce za  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupine pri  $1200$ ,  $1130$ ,  $920$  i  $540\text{ cm}^{-1}$ , koje se mogu pripadati drugim CaP fazama kao što su OCP i ACP [21,122,123]. Vrpca  $\text{HPO}_4^{2-}$  na  $920\text{ cm}^{-1}$  često se pripisuje isključivo OCP fazi [124]. Karakteristična vrpca na  $630\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati  $\text{OH}^-$  skupini HAp-a [78,84,121], dok vrpca na oko  $1640\text{ cm}^{-1}$  pripada apsorbiranoj vodi [78,109]. Sve krivulje posjeduju karakterističnu vrpcu za asimetrično istežanje  $\text{CO}_3^{2-}$  skupine na oko  $1415$  i  $1450\text{ cm}^{-1}$  te simetrično savijanje na oko  $870\text{ cm}^{-1}$ . Ti položaji ukazuju na B tip supstitucije, što je tipično za biološki apatit [21,121].



Slika 5. FTIR spektar sintetiziranih CaP-Se uzoraka

Karakteristična vrpca na oko  $770\text{ cm}^{-1}$  pripada asimetričnom istežanju  $\text{SeO}_3^{2-}$  skupine te izostaje kod CaP-Se0 sustava. Dobiveni rezultat potvrđuje uspješno dopiranje CaP-a



selenitnim ionima [83,108]. Vidljivo je da porastom količine  $\text{SeO}_3^{2-}$ , raste intenzitet pripadajuće karakteristične vrpce. S druge strane, porastom udjela  $\text{SeO}_3^{2-}$ , smanjuje se intenzitet karakterističnih vrpca  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina. S obzirom na to da  $\text{SeO}_3^{2-}$  supstituira na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina, smanjenje intenziteta njegovih vrpca je očekivano. Dodatno, karakteristične vrpce  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupine pri 1200, 920 i 540  $\text{cm}^{-1}$  dopiranjem se smanjuju te u konačnici u potpunosti izostaju. Smanjenje intenziteta vrpca  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupine može ukazivati na njihovu supstituciju sa  $\text{SeO}_3^{2-}$  ionima.

### 4.3 KEMIJSKI SASTAV

Kemijski sastav pripremljenih uzoraka određen je ICP-MS metodom. U tablici 3. prikazani su rezultati ICP-MS analize gdje je vidljivo kako Ca/(P+Se) omjer u svim uzorcima, osim kod CaP-Se1, iznosi 1,67. Omjer Ca/(P+Se) uzorka CaP-Se1 iznosi 1,80. Kolmas i suradnici navode kako povećanje Ca/P omjera prilikom supstitucije može ukazivati na neuspješnu supstituciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  u kristalnu rešetku, odnosno njihovu sorpciju na površinu kristala [125]. S obzirom na to da je povećanje omjera vidljivo samo kod uzorka s najmanjom količinom dodanog  $\text{SeO}_3^{2-}$ , ovo objašnjenje nije najvjerojatnije. S obzirom na to da mnogi izvori literature navode da Ca/P omjer CDHAp-a može varirati čak i izvan područja od 1,50 do 1,67, pretpostavka je da nije došlo do sorpcije niti pogreške pri mjerenju [43,83,84,106].

Tablica 3. Rezultati ICP-MS analize sintetiziranih uzoraka CaP-Se

	<i>Ca/(P+Se)</i> (mol/mol)		<i>Se/(Se+P)</i> (mol%)	<i>M/(M+Ca)</i> (mol%)		
	teo	exp	exp	Sr	Mg	Na
<i>CaP-Se0</i>	1,67	1,67	0,00	0,46	0,44	1,45
<i>CaP-Se1</i>	1,67	1,80	0,66	0,43	0,44	1,97
<i>CaP-Se5</i>	1,67	1,67	2,95	0,48	0,46	3,23
<i>CaP-Se10</i>	1,67	1,68	5,78	0,50	0,44	3,49

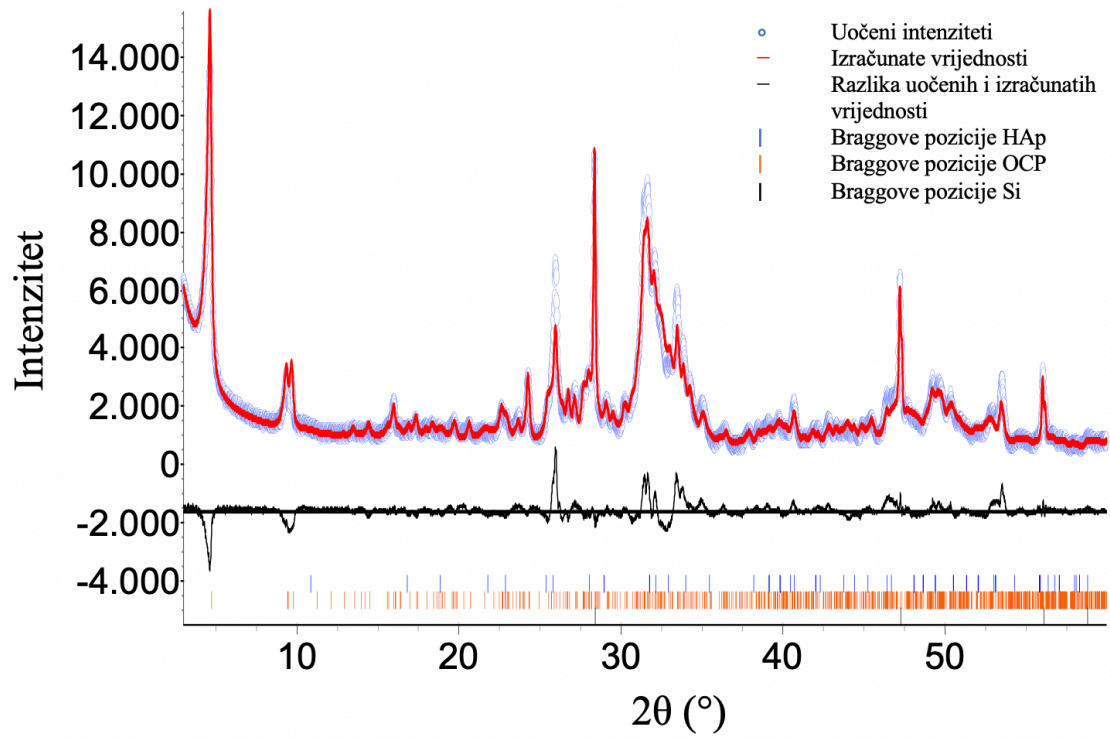
Niti jedno dopiranje CaP-a selenitnim ionima nije bilo u potpunost uspješno, a iskorištenja variraju između 57 i 66 %. Mogući razlog tome su ograničenja kristalne rešetke da supstituira velike količine  $\text{SeO}_3^{2-}$ , što se pregledom literature može i potvrditi. Kolmas i suradnici supstituirali su HAp selenitnim ionima daleko nižim udjela; 0,1, 0,4, 0,8, 1,2 i 1,6 % [125].

Njihova uspješnost dopiranja varirala je između 75 i 98%. Slična iskorištenja za dopiranje sustava s manje od 1%  $\text{SeO}_3^{2-}$  dobili su Wei i suradnici [126]. Ipak, uz udjele  $\text{SeO}_3^{2-}$ , uvjeti u oba eksperimenta su drugačiji, korišteni su bazični uvjeti te amonijev hidrogenfosfat i kalcijev nitrat kao izvori fosfata i kalcija. Poznavajući vezu između sinteze određenih CaP faza i vrijednosti pH, uspješnost sinteze i dopiranja zasigurno ovisi o prekursorima te uvjetima sinteze. Prema pregledu literature, spomenuti uvjeti pokazuju bolje dopiranje s većim iskorištenjem i kod većih udjela supstitucije. Lui i suradnici sintetizirali su HAp supstituiran s 1, 2, 3, 5 i 10 %  $\text{SeO}_3^{2-}$  uz uspješnosti između 63 i 84 % [83], što je između 6 i 24 % uspješnija supstitucija nego što je to dobiveno u ovom radu. Bitno je napomenuti da za vrijeme sinteze HAp-a s kalcijevim nitratom dolazi do razvijanja toksičnih plinova  $\text{NO}_x$ , zbog čega treba biti posebno oprezan [66], ali i da nisu korišteni biogeni izvori koji već u početku sadrže strane ione tj. elemente u tragovima.

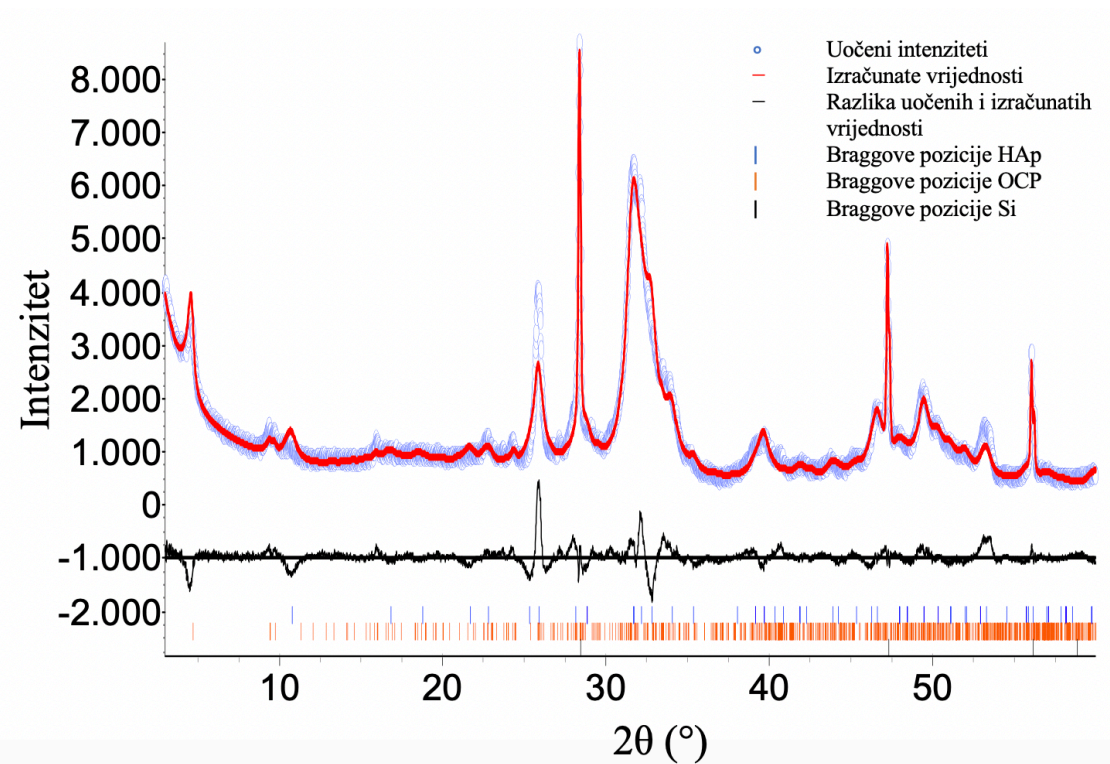
U tablici 3. su, uz selenij, prikazana druga tri glavna elementa u tragovima, koji se pojavljuju u CaP-Se uzorcima s većim udjelima od svih ostalih elemenata u tragovima. Stroncij, magnezij i natrij supstituiraju se na mjesto kalcija, stoga se njihov udio supstitucije računa u odnosu na kalcij. Udjeli supstitucije  $\text{Na}^+$  iona rastu povećanjem udjela supstitucije  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona, što je očekivano zbog korištenja natrijevog selenita.

#### 4.4 MINERALOŠKI SASTAV

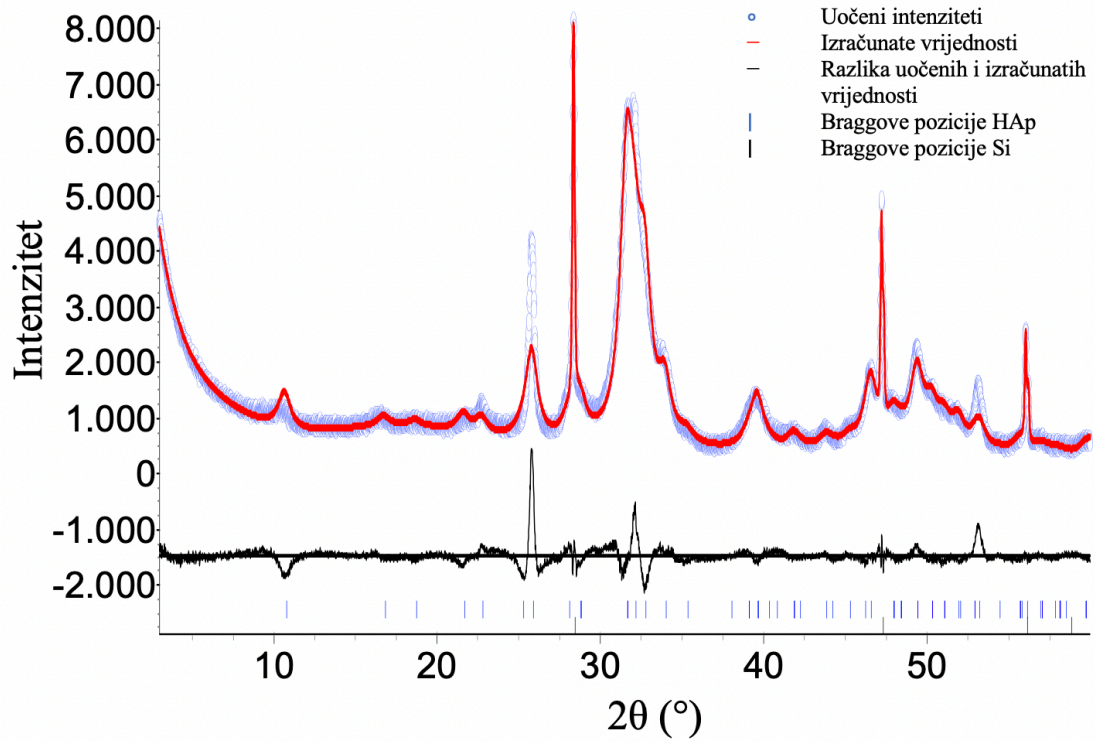
Provedbom rendgenske difrakcijske analize sintetiziranih uzoraka te analizom dobivenih difraktograma Rietveldovom metodom utočnjavanja, utvrđen je točan mineraloški sastav sintetiziranih CaP-Se uzoraka. Za identifikaciju pojedinih faza korištene su JCPDS (*International Centre for Diffraction*) kartice za HAp (No. 09-0432), OCP (No. 79-0423) i Si (No. 27-1402). Na slikama 6., 7., 8. i 9. prikazani su dobiveni difraktogrami sintetiziranih uzoraka CaP-Se0, CaP-Se1, CaP-Se5 i CaP-Se10 s Braggovim pozicijama za HAp i OCP faze te silicij (standard).



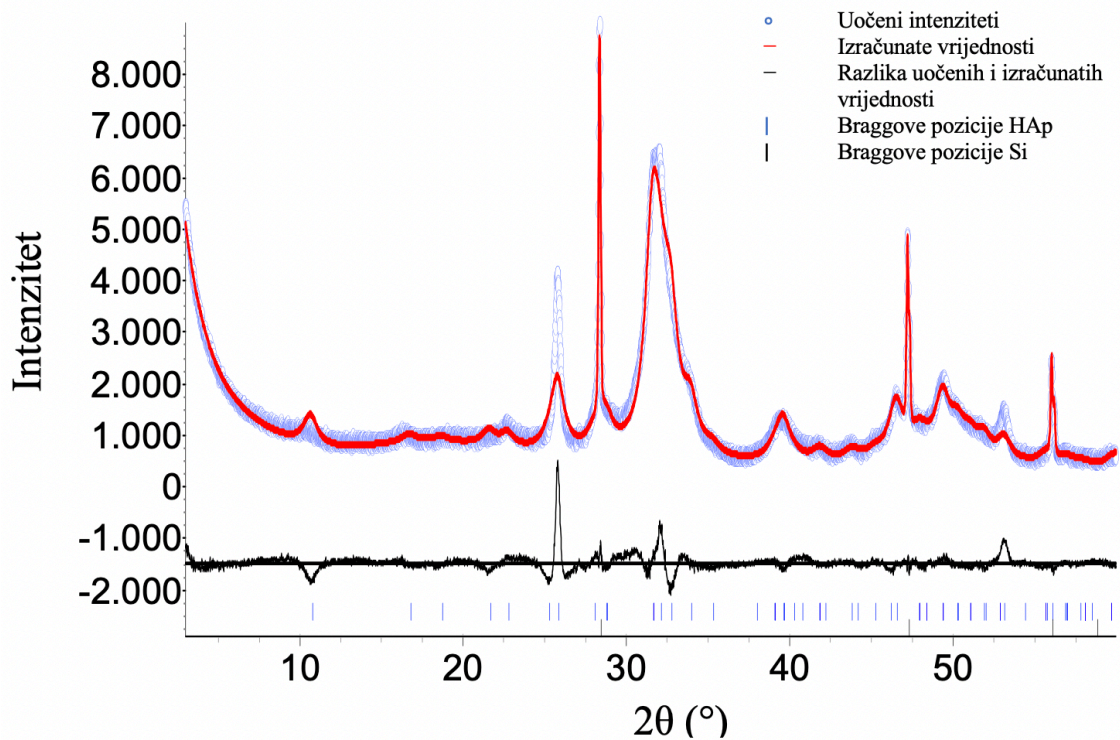
Slika 6. Difraktogram sintetiziranog CaP-Se0 sustava



Slika 7. Difraktogram sintetiziranog CaP-Se1 sustava



Slika 8. Difraktogram sintetiziranog CaP-Se5 sustava



Slika 9. Difraktogram sintetiziranog CaP-Se10 sustava

Rezultati kvantitativne analize dobivenih difraktograma provedene Rietveldovom metodom utočnjavanja prikazani su u tablici 4. Dobiveni rezultati potvrđuju prisutnost HAp-a u svim pripremljenim uzorcima, dok je OCP faza prisutna u uzorcima CaP-Se0 i CaP-Se1, što se slaže s rezultatima FTIR spektara. Iako se pri ovim uvjetima sinteze ne očekuje stabilnost i precipitacija OCP, on nastaje zbog prisustva stranih iona. Naime, nestabilnost OCP-a raste porastom vrijednosti pH, ali prisustvo iona kao što su  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$  usporava transformaciju amorfne faze u kristalnu, što omogućuje formiranje manjeg udjela OCP-a uz smanjenu transformaciju u HAp [74,120]. Kako se porastom količine  $\text{SeO}_3^{2-}$  smanjuje konačni udio OCP faze, može se zaključiti kako  $\text{SeO}_3^{2-}$  smanjuje stabilnost OCP-a, uz vrijednosti pH, te pomiče ravnotežu prema nastanku HAp-a. S obzirom na to da se dodatkom  $\text{SeO}_3^{2-}$  smanjuju i nestaju vrpce  $\text{HPO}_4^{2-}$  na FTIR spektru, moguće je da  $\text{SeO}_3^{2-}$  favorizira upravo ta mjesta za supstituciju, što je dodatni razlog smanjenja udjela OCP faze. Mnogi izvori literature pokazuju da sintezom dopiranog CaP sustava  $\text{SeO}_3^{2-}$  ionom nastaje gotovo isključivo selenitom dopirani HAp, uz izostanak OCP faze [85,125,127–129]. U svim spomenutim istraživanjima uvjeti sinteze su drugačiji pa se, osim prisustva  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona, vrijednosti pH otopina za vrijeme sinteze održavaju na oko 10, što onemogućuje nastanak OCP faze, a prekursori su najčešće kalcijev nitrat te amonijev fosfat.

Tablica 4. Kvantitativni sastav CaP sintetiziranih sustava dopiranih selenitnim ionima

	<i>HAp (%)</i>	<i>OCP (%)</i>	<i>ACP (%)</i>
<i>CaP-Se0</i>	27,75	43,92	28,33
<i>CaP-Se1</i>	61,21	8,68	30,11
<i>CaP-Se5</i>	76,68	-	23,32
<i>CaP-Se10</i>	77,85	-	22,15

Osim kristalnih faza HAp-a i OCP-a, sustav sadrži i amorfnu fazu, ACP. Udio ACP-a u CaP-Se uzorcima, za razliku od ostalih faza, ne pokazuje značajne promjene. Veći udjeli selenita u CaP sustavu dovode do smanjenja ACP faze za 4 do 5 %. Spomenut je utjecaj porasta vrijednosti pH i prisutnost stranih iona na transformaciju ACP-a [77,119]. CaP-Se5 i CaP-Se10 sustavi imaju višu vrijednost pH otopine nego CaP-Se1 te veću količinu  $\text{SeO}_3^{2-}$ , zbog čega je ravnoteža pomaknuta prema transformaciji ACP-a u HAp, bilo direktno ili preko OCP faze. Utjecaj  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona u ovom slučaju nije toliko izražen kao kod OCP-a. Bitno je

napomenuti da pripremljeni sustav predstavlja dobar kompozitni materijal za BTE s obzirom na to da su ACP i OCP prekursori HAp-a pri fiziološkim uvjetima [32,74].

Difraktogrami pokazuju blagi pomak pikova prema nižim vrijednostima u odnosu na čiste faze, koji Zhang i suradnici objašnjavaju promjenom parametara ćelije, točnije povećanjem jedinične ćelije zbog supstitucije  $\text{PO}_4^{3-}$  većim  $\text{SeO}_3^{2-}$  ionima [127]. Ta tvrdnja potvrđena je Rietveldovom metodom utočnjavanja gdje su određene vrijednosti parametara jedinične ćelije za kristalne faze HAp-a i OCP-a te su prikazane u tablici 5. i tablici 6.

Tablica 5. Udjeli i parametri jedinične ćelije HAp-a dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja

<i>HAp</i>				
	$\omega/\%$	$V/\text{Å}^3$	$a/\text{Å}$	$c/\text{Å}$
<i>CaP-Se0</i>	27,75	529,6889	9,41369	6,90193
<i>CaP-Se1</i>	61,21	531,6985	9,45101	6,87351
<i>CaP-Se5</i>	76,68	532,5647	9,45430	6,87991
<i>CaP-Se10</i>	77,85	533,5591	9,45867	6,88640

U odnosu na CaP-Se0, CaP faze dopirane s 1, 5 i 10 %  $\text{SeO}_3^{2-}$  pokazuju kontinuirano povećanje parametra  $a$  i smanjenje parametra  $c$ , koji daljnjim porastom supstitucije raste. Prema literaturi, utvrđeno je kako je mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  jedino moguće mjesto za supstituciju  $\text{SeO}_3^{2-}$  skupine. Prosječna udaljenost P–O veze u  $\text{PO}_4^{3-}$  iznosi oko 1,52 Å [130] dok su udaljenosti Se–O veze u  $\text{SeO}_3^{2-}$  oko 1,70 Å [131]. S obzirom na to da su i geometrije slične, supstitucija je moguća, ali uz narušavanje kristalne strukture. Kolmas i suradnici pokazali su kako supstitucijom  $\text{SeO}_3^{2-}$  u strukturu HAp-a dolazi do narušavanja kristalne strukture uzrokovane značajnom distorzijom, stvaranjem vakancija i slabih vodikovih veza s hidroksilnom skupinom unutar anionskog kanala [132]. Drugim riječima, ulaskom  $\text{SeO}_3^{2-}$  u strukturu dolazi do distorzije zbog njegove veličine, a s obzirom na dužu Se–O vezu, dolazi do porasta parametra  $a$  i interakcije s okolnim ionima u strukturi, što će u konačnici uzrokovati dodatne distorzije strukture. Zbog održavanja neutralnosti, kristalna rešetka će biti u deficitu s kalcijevim i hidroksilnim ionima, što također uzrokuje određeno narušavanje kristalne strukture te smanjenje parametra  $c$  [84,125]. Smanjenje parametra  $c$  moguće je pojasniti smanjenjem utjecaja anionskog kanala, koji čine kalcijevi ioni, a smješten je oko osi

$z$  koja je ujedno i njegovo središte te je paralelan s parametrom  $c$ . Nedostatkom kalcijevih iona, smanjivat će se utjecaj kanala te će doći do poremećaja u ravnoteži elektrostatskih privlačenja i odbijanja, što rezultira smanjenjem vrijednost parametra  $c$ . Nastavi li se sustav dopirati  $\text{SeO}_3^{2-}$  ionom, zbog njegove visoke koncentracije u strukturi te odbojnih sila među  $\text{SeO}_3^{2-}$  i drugim prisutnim ionima, doći će do ponovnog rasta parametara  $c$ . Dosadašnji objavljeni radovi bavili su se sintezama selenitom dopiranog HAp-a s udjelima  $\text{SeO}_3^{2-}$  ispod 1 %, ali njihova istraživanja pokazuju isti trend te potvrđuju dobivene rezultate [84,85,106,129]. Ovakva promjena parametara zasigurno ima utjecaj i na morfologiju gdje će kristali selenitom dopiranog HAp-a vjerojatno biti kraći po  $z$  osi u odnosu na čistu fazu, ali i narušene kristalnosti, što su potvrdili Liu i suradnici [83].

Tablica 6. Udjeli i parametri jedinične ćelije OCP-a dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja

	<i>OCP</i>				
	$\omega/\%$	$V/\text{Å}^3$	$a/\text{Å}$	$b/\text{Å}$	$c/\text{Å}$
<i>CaP-Se0</i>	43,92	1220,9609	19,69510	9,53534	6,85168
<i>CaP-Se1</i>	8,68	1226,8974	19,71471	9,50559	6,89568

Dodatkom  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona u CaP sustav, dolazi do promjena parametara jedinične ćelije OCP-a, što je pokazatelj dopiranja te faze (Tablica 6). Porastom udjela  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona, rastu parametri  $a$  i  $c$ , a smanjuje se parametar  $b$ . OCP je strukturno sličan HAp-u tako da je područje  $0 < x < 1/4$  gotovo identično strukturi HAp-a, a veće razlike se nalaze u ostatku jedinične ćelije. S obzirom na to da je građen od istih elemenata kao HAp, supstitucija  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona u OCP bit će moguća isključivo na položaju  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  [133]. Zbog mogućnosti supstitucije isključivo na položaj  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  te poklapanja strukture uzduž  $0 < x < 1/4$  područja jedinične ćelije, trend promjene parametara ćelije zbog supstitucije  $\text{SeO}_3^{2-}$  može se poistovjetiti s prethodno opisanom supstitucijom kod HAp-a. Prema trenutnom saznanju, nisu pronađeni radovi koji se bave supstitucijom  $\text{SeO}_3^{2-}$  u strukturu OCP-a.

Povećanje količine  $\text{SeO}_3^{2-}$  u CaP sustavu dovodi do širenja pikova difraktograma, odnosno smanjenja kristalnosti uzorka. S obzirom na to da se udio ACP faze ne mijenja značajno, ovakvo smanjenje kristalnosti rezultat je narušavanja kristalne rešetke zbog supstitucije fosfata  $\text{SeO}_3^{2-}$  ionom. Ista zapažanja u svojim istraživanjima pokazali su Ma i suradnici te

Zhang i suradnici [85,106]. Osim narušavanjem strukture zbog distorzije, Uskoković i suradnici navode kako se pad kristalnosti može pojasniti utjecajem  $\text{SeO}_3^{2-}$  na nukleaciju i rast kristala HAp-a. Naime, uočeno je kako iz otopine s većim udjelima  $\text{SeO}_3^{2-}$  dolazi do precipitacije HAp-a i bez dodatka baze, što sugerira ulogu  $\text{SeO}_3^{2-}$  kao promotora nukleacije. Promotor nukleacije povećat će broj nukleacijskih središta, što će u konačnici dovesti do smanjene veličine kristala i kristalnosti uzorka [86]. Smanjenje kristalnosti, neovisno od razloga, imat će utjecaj na morfologiju pripremljenih CaP-Se.

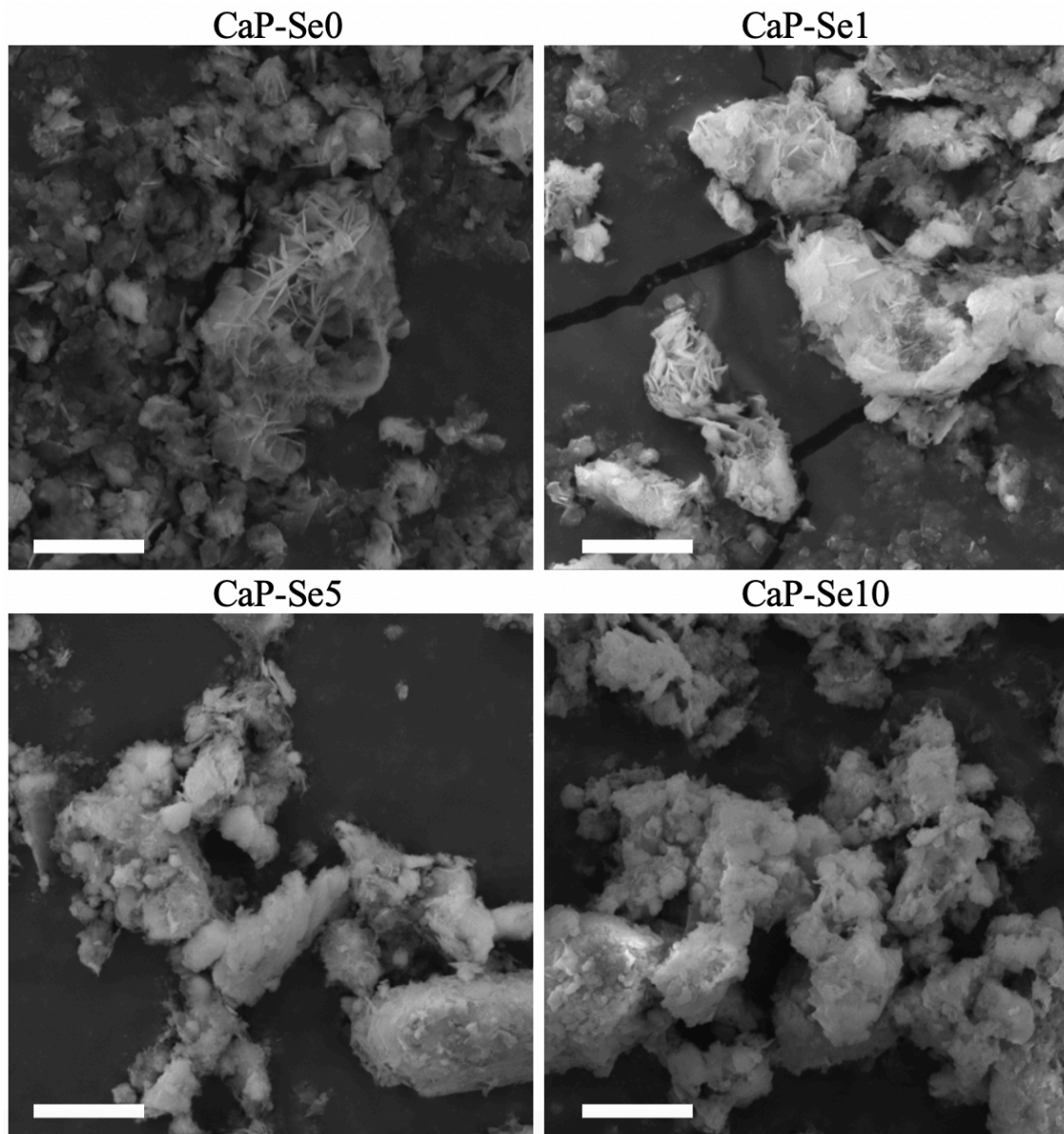
#### 4.5 MORFOLOŠKA STRUKTURA

Na izgled kristala utječu uvjeti sinteze kao što su koncentracija, temperatura, vrijednost pH, prekursori i sl. [33,78,79,82]. Kristali HAp-a dobiveni metodom precipitacije iz vodene otopine imaju pločasti oblik, izdužen u smjeru *c* osi te su skloni aglomeraciji. Sličnog oblika su kristali OCP-a, međutim, daleko manje veličine te s čestom promjenom orijentacije rasta [133]. U teorijskom uvodu spomenut je utjecaj supstitucije stranog iona na morfologiju kristala, a kroz rezultate XRD-a vidljivo je kako su sustavi s većim udjelima  $\text{SeO}_3^{2-}$  davali šire i niže pikove. Takvi pikovi ukazuju na narušavanje kristalnosti, a takva mikrostrukturna promjena posljedično ima promjenu na makro strukturi, odnosno morfologiji. Na slici 10. prikazane su SEM mikrografije pripremljenih CaP-Se uzoraka.

Na prvoj mikrografiji uzorka CaP-Se0 vidljiva je karakteristična pločasta struktura HAp-a kakvu opisuju mnogobrojni izvori literature [83–86], a vidljivi su i manji aglomerati u obliku cvijeta uz prisustvo amorfnе faze. Iduće tri mikrografije pokazuju da povećanjem udjela  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona u sustavu kristali postaju sve manji, malobrojniji su, a zbog sve amorfnije morfologije teže je uočiti pojedine kristale. Već na mikrografiji CaP-Se1 uzorka, iako je još uvijek prisutan karakteristični pločasti oblik HAp kristala te pokoji aglomerat u obliku cvijeta, ukupna morfologija je amorfnija. Povećanjem udjela  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona dolazi do povećanja broja aglomerata čije su dimenzije veće no kod CaP-Se0 uzorka, a dobivene kristalne strukture su sve slabije definirane. Kod uzorka CaP-Se10 prethodno spomenute karakteristične kristalne strukture su izrazito rijetke i teško uočljive. Morfologija supstituiranog CaP-Se sustava može se opisati kao sustav velikih aglomerata sferičnih čestica uz pokoju naznaku pločaste kristalne strukture. Kako se dodatkom  $\text{SeO}_3^{2-}$  nije uočilo povećanje udjela ACP-a u uzorcima, SEM mikrografije potvrđuju pretpostavku o promjeni morfologije uslijed gubitka kristalnosti zbog supstitucije  $\text{SeO}_3^{2-}$  na mjesto fosfata, a koja uzrokuje distorziju cjelokupne kristalne strukture.



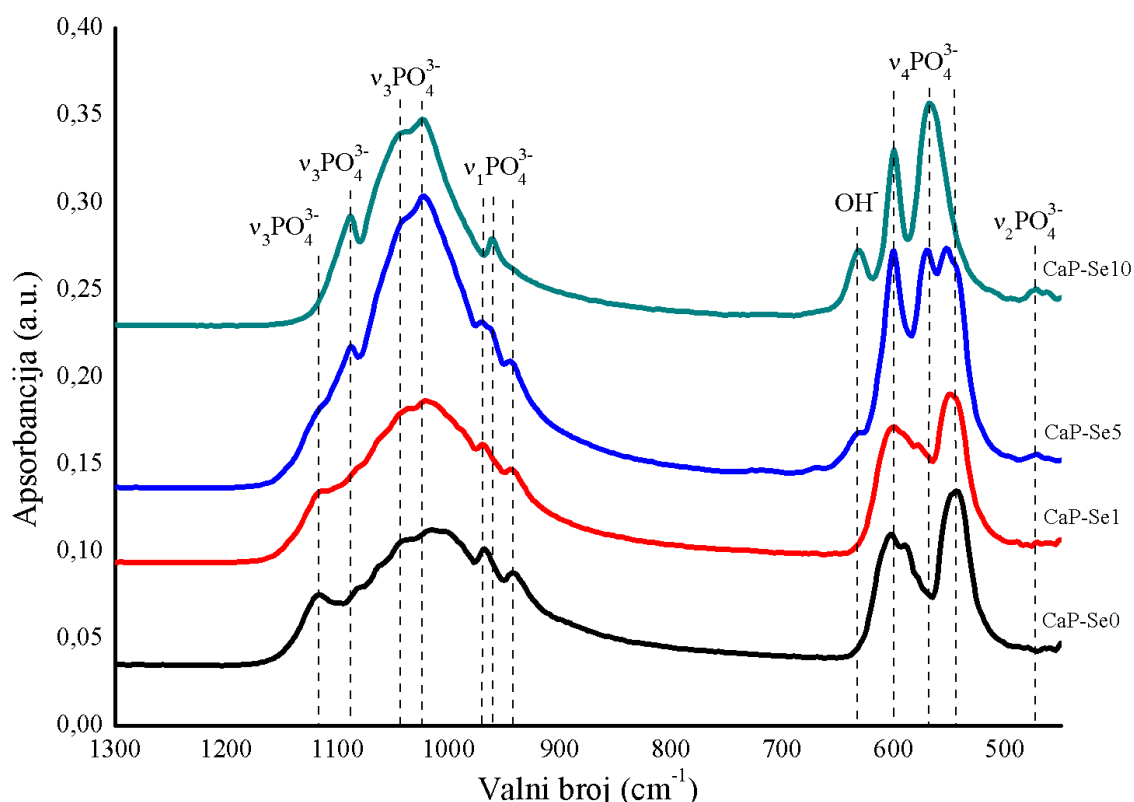
Dobivene rezultate potvrđuje literatura, gdje se morfologija selenijem supstituiranih CaP-a opisuje aglomeratima sferičnih čestica amornog izgleda [83–86,109].



*Slika 10.* SEM mikrografije sintetiziranih CaP-Se uzoraka (skala: 5  $\mu\text{m}$ )

#### 4.6 INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM NAKON TOPLINSKE OBRADJE

Kako bi se ispitala toplinska stabilnost pomoću FTIR spektroskopije, sintetizirani CaP-Se uzorci toplinski su obrađeni pri 1200 °C (slika 11.). S obzirom na drugačiji oblik i položaj vrpci, može se zaključiti da su tijekom toplinske obrade nastale nove CaP faze. Prema literaturi, toplinskom obradom na temperaturi višoj od 800 °C, HAp se raspada na stabilniji  $\beta$ -TCP [134].



Slika 11. FTIR spektar CaP uzoraka nakon toplinske obrade pri 1200 °C

Prilikom toplinske obrade dolazi do nastajanja tzv.  $\beta$ -TCP ramena, odnosno vrpci  $\text{PO}_4^{3-}$  na oko 947, 974 i 1120  $\text{cm}^{-1}$  [80,124,134]. Ono što je prije toplinske obrade bila intenzivna vrpca  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine HAp-a na oko 1000  $\text{cm}^{-1}$ , na višoj temperaturi postaje široki triplet daleko nižeg intenziteta i rezolucije s vrpcama na 1096, 1085 i 1056  $\text{cm}^{-1}$  [134]. Upravo ovaj prošireni multiplet predstavlja karakterističnu vrpcu  $\beta$ -TCP-a koja je produkt raznih savijanja i istezanja  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine [135]. Dodatno, toplinskom obradom dolazi do pomaka  $\text{PO}_4^{3-}$  vrpci  $\beta$ -TCP-a, točnije, vrpca s 568  $\text{cm}^{-1}$  ima pomak na 550  $\text{cm}^{-1}$ , dok vrpca sa 600  $\text{cm}^{-1}$  ima lagani

pomak na  $605\text{ cm}^{-1}$  i nastanak „ramena“ [80,134,135]. Identični pomaci događaju se i s vrpčama na oko  $1036$  i  $1095\text{ cm}^{-1}$  na  $1030$  i  $1090\text{ cm}^{-1}$  [80,134]. Nakon toplinske obrade ne uočavaju se karakteristične vrpce za  $\text{HPO}_4^{2-}$  skupine niti karakteristične vrpce  $\text{CO}_3^{2-}$  skupine na  $870$ ,  $1415$  i  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Potonje se objašnjava pucanjem veza te izlaskom  $\text{CO}_3^{2-}$  u obliku plinovitog  $\text{CO}_2$  iz kristalne rešetke [80,121].

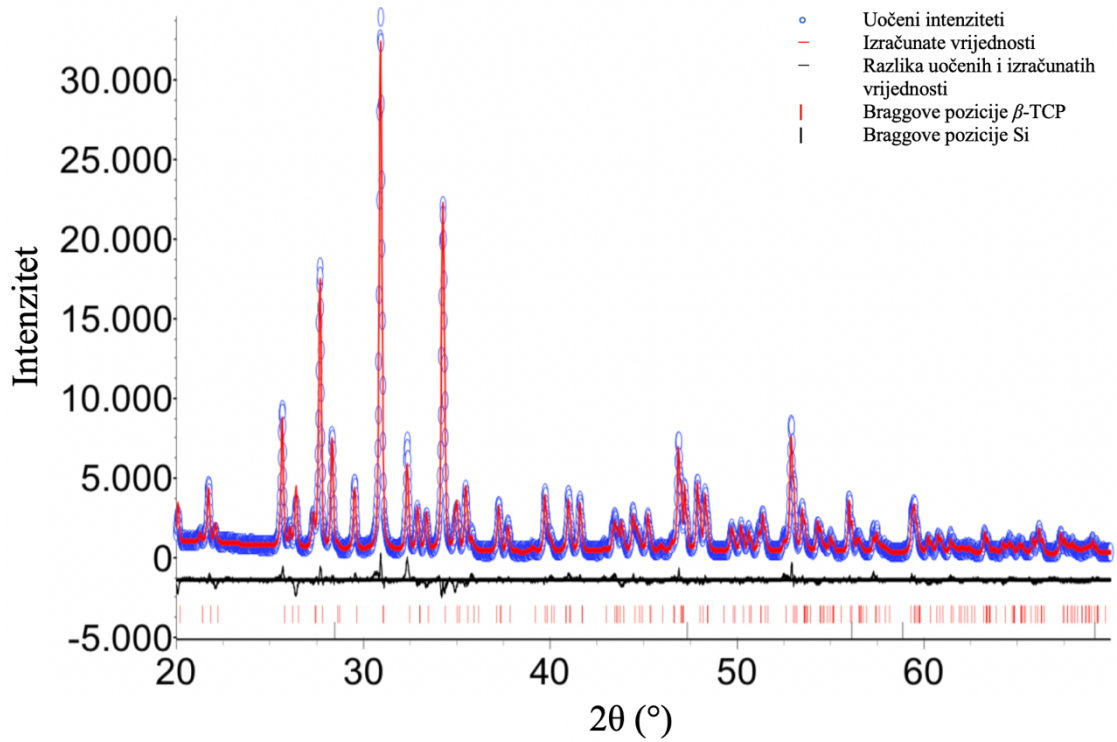
Prema navedenom, može se zaključiti da je  $\beta$ -TCP većinski produkt nakon toplinske obrade CaP-Se0 i CaP-Se1 uzoraka. Prema Meejoou i suradnicima, na temperaturama iznad  $1200\text{ }^\circ\text{C}$  dolazi do konverzije  $\beta$ -TCP u  $\alpha$ -TCP, što će se u FTIR spektru odraziti pojavljivanjem vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  na  $551$ ,  $585$ ,  $597$ ,  $613$ ,  $984$ ,  $1025$  te  $1055\text{ cm}^{-1}$  [80,134]. Neke od tih vrpce vidljive su na spektrima CaP-Se1 i CaP-Se5, zbog čega se može pretpostaviti da će  $\alpha$ -TCP biti zastupljena faza u ta dva uzorka. S obzirom na to da je u pitanju samo druga modifikacija, ali ne i razlika u kemijskim vezama, ne može se sa sigurnošću tvrditi razlika u udjelima TCP faza samo na osnovi FTIR spektara. Kako ne postoje naznake  $\alpha$ -TCP u CaP-Se0 uzorku, pretpostavlja se da prisustvo  $\text{SeO}_3^{2-}$  pridonosi konverziji  $\beta$ -TCP u  $\alpha$ -TCP.

Vrpca  $\text{OH}^-$  na  $630\text{ cm}^{-1}$ , karakteristična za HAp, vidljiva je na FTIR spektrima za CaP-Se5 i CaP-Se10 uzorke, zbog čega se može zaključiti da ta dva uzorka sadrže HAp fazu. Kako je intenzitet te vrpce veći kod CaP-Se10 nego CaP-Se5 uzorka, pretpostavlja se kako porastom supstitucije  $\text{SeO}_3^{2-}$  dolazi do povećanja udjela HAp-a u toplinski obrađenom uzorku.

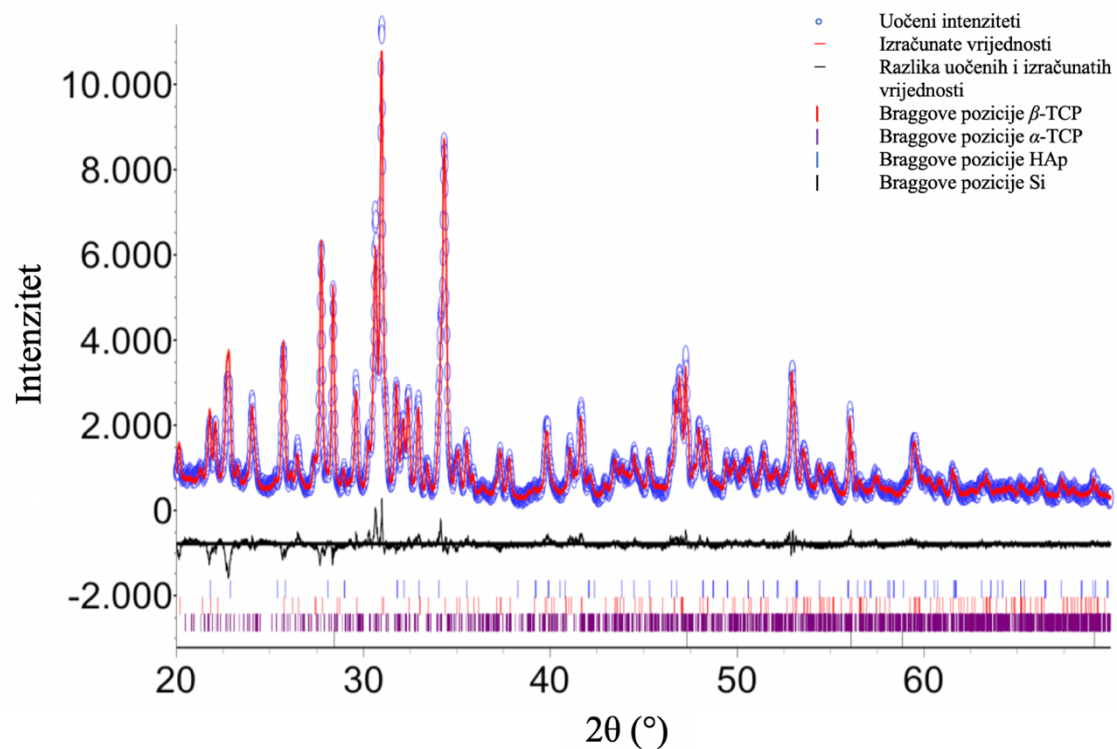
Ni u jednom uzorku, bez obzira na supstituciju, ne zaostaju  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Tvrdnja proizlazi iz FTIR spektra gdje izostaju karakteristične vrpce za  $\text{SeO}_3^{2-}$  skupinu. Wei i suradnici uočili su istu pojavu, koju su potvrdili i endotermnim pikom prilikom DSC analize pri temperaturama između  $900$  i  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ . Pik su pripisali raspadu  $\text{SeO}_3^{2-}$  skupine, a pretpostavljaju kako je selenij iz sustava izašao u obliku plinovitog  $\text{SeO}_2$  [84].

#### 4.7 MINERALOŠKI SASTAV NAKON TOPLINSKE OBRADE

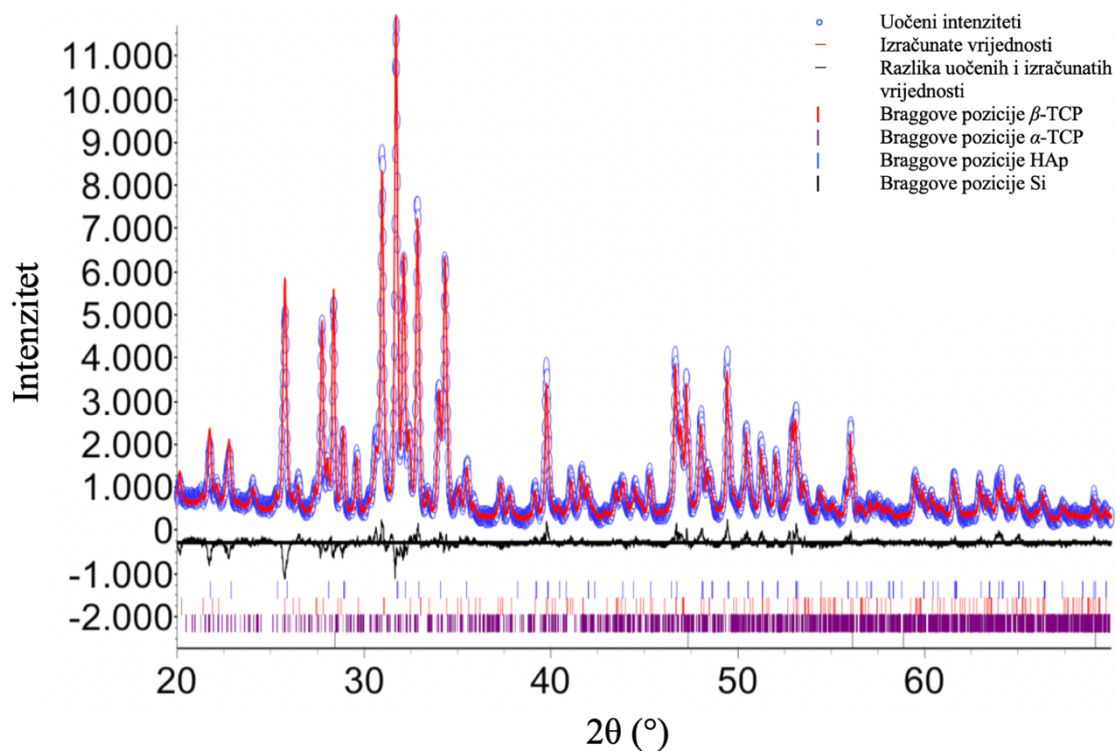
Mineraloški sastav toplinski obrađenih uzoraka određen je XRD analizom, a dobiveni difraktogrami analizirani su Rietveldovom metodom utočnjavanja. Za identifikaciju pojedinih faza korištene su JCPDS kartice za HAp (No. 09-0432),  $\beta$ -TCP (No. 09-0169),  $\alpha$ -TCP (No. 09-0348), CaO (No. 18-1467) i Si (No. 27-1402). Na slikama 12., 13., 14. i 15. prikazani su difraktogrami toplinski obrađenih uzoraka CaP-Se0, CaP-Se1, CaP-Se5 i CaP-Se10 s Braggovim pozicijama za mineraloške faze i silicij (standard).



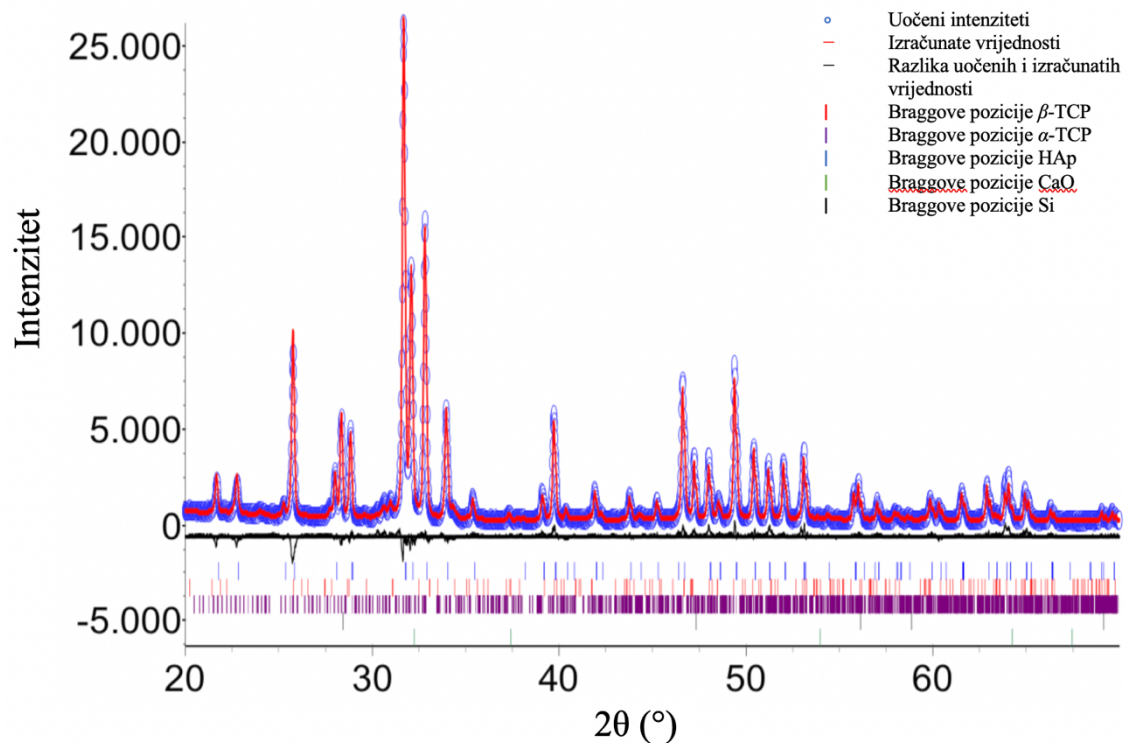
Slika 12. Difraktogram CaP-Se0 uzorka nakon toplinske obrade na 1200 °C



Slika 13. Difraktogram CaP-Se1 uzorka nakon toplinske obrade na 1200 °C



Slika 14. Difraktogram CaP-Se5 uzorka nakon toplinske obrade na 1200 °C



Slika 15. Difraktogram CaP-Se10 uzorka nakon toplinske obrade na 1200 °C

Kako bi se utvrdio stvarni mineraloški sastav CaP sustava nakon toplinske obrade, provedena je kvantitativna analiza difraktograma Rietveldovom metodom utočnjavanja (tablica 7).

Tablica 7. Kvantitativni sastav CaP sintetiziranog sustava

	$\beta$ -TCP (%)	$\alpha$ -TCP (%)	HAp (%)	ACP (%)	CaO (%)
CaP-Se0	88,64	-	-	11,36	-
CaP-Se1	50,40	32,45	10,66	6,49	-
CaP-Se5	36,61	9,78	45,77	7,84	-
CaP-Se10	3,08	4,11	87,88	4,69	0,24

Vidljivo je kako se CaP-Se0 uzorak, koji ne sadrži  $\text{SeO}_3^{2-}$  ione, za vrijeme toplinske obrade ponaša kao i čisti nestehiometrijski HAp, koji obradom prelazi u stabilniji  $\beta$ -TCP [80]. Kod dopiranih uzoraka, uz  $\beta$ -TCP fazu, dolazi do formiranja  $\alpha$ -TCP faze koja je stabilnija TCP faza iznad 1200 °C [134]. Dolazi do smanjenja udjela amorfne faze koja se pri povišenim temperaturama transformira u kristalnu HAp-u fazu, a što utječe na porast kristalnosti. Povećanje kristalnosti uzoraka nakon toplinske obrade vidljivo je u izraženim i uskim pikovima. Za razliku od CaP-Se0, uzorci dopirani  $\text{SeO}_3^{2-}$  pokazuju prisustvo HAp-a te se njegov udio povećava s povećanjem udjela dopiranja. S obzirom na dobivene rezultate, nameće se pretpostavka kako će se u CaP-Se sustavu veći dio energije trošiti na pucanje kemijskih veza  $\text{SeO}_3^{2-}$ , konverziju u  $\text{SeO}_2$  te reorganizaciju elemenata rešetke. Time se smanjuje raspoloživa energija za raspad HAp-a na  $\alpha$  i  $\beta$ -TCP koji su termodinamički stabilniji pri 1200 °C, a konačni rezultat je povećana stabilnost HAp-a te veća kristalnost uzoraka.

Liu i suradnici toplinskom obradom CaP-Se pri 1100 °C uočili su značajnu reorganizaciju u strukturi koja je dovela do povećanja kristalnosti sustava, stabilnosti HAp-a s povećanjem udjela  $\text{SeO}_3^{2-}$  te formiranje  $\text{CaSeO}_3$  [83]. Wei i suradnici pokazali su kako se  $\text{CaSeO}_3$  pri temperaturi iznad 1100 °C raspada u CaO uz gubitak selenita u obliku plinovitog  $\text{SeO}_2$ , ponovno uz značajnu reorganizaciju, ostvarivanje veće kristalnosti te stabilnosti HAp-a [126]. Prema literaturi, do nastajanja  $\text{CaSeO}_3$  faze može doći pri višim koncentracijama  $\text{SeO}_3^{2-}$  iona, koji se zbog nemogućnosti supstitucije apsorbiraju na površinu kristala formirajući  $\text{CaSeO}_3$ , a koji se toplinskom obradom raspada na plinoviti  $\text{SeO}_2$  i CaO [84,129,136]. 0,24 % CaO faze u CaP-Se10 uzorku rezultat je raspada  $\text{CaSeO}_3$  faze pri temperaturi od 1200 °C, a  $\text{CaSeO}_3$  faza nije detektirana prije toplinske obrade u uzorku CaP-Se10 vjerojatno zbog niskog udjela.

## 5 ZAKLJUČAK

Pripremljeni su CaP sustavi supstituirani selenitnim ionima molarnih udjela od 0, 1, 5 i 10 % iz biogenog izvora, sipine kosti.

- Moguće je pripremiti višefazni CaP sustav na temelju HAp-a, OCP-a i ACP-a metodom precipitacije iz biogenog izvora, pri blagim uvjetima sinteze.
- Korištenje sipine kosti, kao prekursora  $\text{Ca}^{2+}$  iona, rezultira multi-dopiranim CaP sustavom, kemijski sličnim mineraloškoj fazi prirodnog koštanog tkiva.
- Selenitni ioni uspješno su dopirani u kristalnu strukturu HAp-a i OCP-a.
- Dopiranje selenitnim ionima u strukturu HAp-a i OCP-a uzrokuje distorziju strukture i stvaranje vakancija što narušava kristalnost sustava.
- Pripremljeni CaP-Se uzorci nestabilni su pri 1200 °C, gdje selenitni ioni izlaze iz strukture u obliku plinovitog  $\text{SeO}_2$ .
- Kristalnost toplinski obrađenih uzoraka veća je u usporedbi s uzorcima prije toplinske obrade.
- $\beta$ -TCP stabilna je faza toplinski obrađenog CaP-Se0 uzorka, dok  $\alpha$ -TCP faza nastaje kao produkt konverzije  $\beta$ -TCP-a pri 1, 5 i 10 % supstitucije selenitnim ionima. Udjeli TCP faza smanjuju se povećanjem udjela supstitucije te dolazi do stabilizacije HAp faze.

Dobiveni biomimetički višefazni sustavi dopirani selenitnim ionima predstavljaju obećavajući sustav za poboljšanje kemijskih i bioloških karakteristika koštanih usadaka. Daljnja istraživanja uključivat će analizu selektivnih protutumorskih svojstava na zdravim i tumorskim ljudskim stanicama.

## 6 LITERATURA

- [1] URL: <https://ec.europa.eu/CensusHub2/query.do?step=selectHyperCube&qhc=false>, (pristup: 13.4.2020.).
- [2] I. Brkić Biloš, Ozljede u Republici Hrvatskoj, Hrvat. Zavod Za Javno Zdr. (2014) 44.
- [3] O. Demontiero, C. Vidal, G. Duque, Aging and bone loss: New insights for the clinician, *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **4** (2012) 61–76.
- [4] URL: <https://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics/calcium-studies-map>, (pristup: 30.3.2020.).
- [5] A. Svedbom, E. Hernlund, M. Ivergård, J. Compston, C. Cooper, J. Stenmark, E. V. McCloskey, B. Jönsson, J.A. Kanis, Osteoporosis in the European Union: A compendium of country-specific reports, *Arch. Osteoporos.* **8** (2013) 1–218.
- [6] URL: <https://www.cancer.net/cancer-types/bone-cancer/statistics>, (pristup: 2.4.2020.).
- [7] URL: <https://www.scopus.com/search/form.uri#basic>, (pristup: 13.4.2020.).
- [8] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M.J. Glimcher, Bone mineral: update on chemical composition and structure, *Osteoporos Int.* **20** (2009) 1013–1021.
- [9] M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique, Selenium in food and the human body: A review, *Sci. Total Environ.* **400** (2008) 115–141.
- [10] M. Kieliszek, S. Błazejak, Selenium: Significance, and outlook for supplementation, *Nutrition.* **29** (2013) 713–718.
- [11] M.P. Rayman, Selenium and human health, *Lancet.* **379** (2012) 1256–1268.
- [12] H. Zeng, J.J. Cao, G.F. Combs, Selenium in bone health: Roles in antioxidant protection and cell proliferation, *Nutrients.* **5** (2013) 97–110.
- [13] B. Turan, B. Can, E. Delilbasi, Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis, *Clin. Rheumatol.* **22** (2003) 432–436.
- [14] A. Hoeg, A. Gogakos, E. Murphy, S. Mueller, J. Köhrle, D.M. Reid, C.C. Glüer, D. Felsenberg, C. Roux, R. Eastell, L. Schomburg, G.R. Williams, Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97** (2012) 4061–4070.



- [15] J.S. Lowe, P.G. Anderson, Musculoskeletal System, in: Stevens Lowe's Hum. Histol., Fourth Edi, Elsevier, 2015.
- [16] URL: <https://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46290.html>, (pristup: 21.2.2020.).
- [17] T. Cundy, I.R. Reid., A. Grey, Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects, Third Edit, Churchill Livingstone/Elsevier, 2014.
- [18] R.K. Fuchs, W.R. Thompson, S.J. Warden, Bone biology; Organic and inorganic bone matrix, in: Bone Repair Biomater. Regen. Clin. Appl., Woodhead Publishing, 2019: pp. 15–52.
- [19] URL: <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/index.php>, (pristup: 21.2.2020.).
- [20] H. Chenga, R. Chaboka, X. Guana, A. Chawlaa, Y. Lia, A. Khademhosseinia, H.L. Jang, Synergistic interplay between the two major bone minerals, hydroxyapatite and whitlockite nanoparticles, for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, Acta Biomater. (2019) 1–21.
- [21] L. Bauer, Magnesium Substituted Hydroxyapatite Scaffolds Hydrothermally Synthesized From Cuttlefish Bone, in: Int. Conf. MATRIB 2018, 2018.
- [22] S.J. Eppell, W. Tong, J. Lawrence Katz, L. Kuhn, M.J. Glimcher, Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy, J. Orthop. Res. **19** (2001) 1027–1034.
- [23] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, Mater. Sci. Eng. C. **25** (2005) 131–143.
- [24] J.C. Elliott, ed., Structure and Chemistry of Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [25] J.D. Pasteris, B. Wopenka, J.J. Freeman, K. Rogers, E. Valsami-Jones, J.A.M. Van Der Houwen, M.J. Silva, Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials, Biomaterials. **25** (2004) 229–238.
- [26] C. Rey, J.L. Miquel, L. Facchini, A.P. Legrand, M.J. Glimcher, Hydroxyl groups in bone mineral, Bone. **16** (1995) 583–586.
- [27] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet,

- Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: A validated FTIR methodology, *J. Archaeol. Sci.* **49** (2014) 134–141.
- [28] J.D. Pasteris, B. Wopenka, E. Valsami-Jones, Bone and tooth mineralization: Why apatite?, *Elements*. **4** (2008) 97–104.
- [29] J.C. Elliott, Calcium phosphate biominerals, *Phosphates Geochemical, Geobiol. Mater. Importance*. **48** (2019) 427–454.
- [30] S. Von Euw, Y. Wang, G. Laurent, C. Drouet, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs, Bone mineral: new insights into its chemical composition, *Sci. Rep.* **9** (2019) 1–11.
- [31] Y. Wu, J.L. Ackerman, H.-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, M.J. Glimcher, Nuclear Magnetic Resonance Spin-Spin Relaxation of the Crystals of Bone, Dental Enamel, and Synthetic Hydroxyapatites, *J. Bone Miner. Res.* **17** (3) (2002) 472–480.
- [32] W.E. Brown, N. Eidelman, B. Tomazic, Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation, *Adv. Dent. Res.* **1** (1987) 306–313.
- [33] G.H. Nancollas, B. Tomažič, Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of supersaturation and ionic medium, *J. Phys. Chem.* **78** (1974) 2218–2225.
- [34] N. Kourkoumelis, I. Balatsoukas, M. Tzaphlidou, Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy, *J. Biol. Phys.* **38** (2012) 279–291.
- [35] V. Zaichick, M. Tzaphlidou, Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis, *Appl. Radiat. Isot.* **58** (2003) 623–627.
- [36] L. Tandon, G. V. Lyengar, Minor and Trace Elements in human bones and teeth, *Int. At. Energy Agency*. (1999) 101.
- [37] N.K. Aras, G. Yilmaz, S. Alkan, F. Korkusuz, Trace elements in human bone determined by neutron activation analysis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **239** (1999) 79–86.
- [38] J.S. Harkness, T.H. Darrah, From the crust to the cortical: The geochemistry of trace elements in human bone, *Geochim. Cosmochim. Acta.* **249** (2019) 76–94.
- [39] N.P. Zaksas, T.T. Sultangazieva, V.A. Gerasimov, Determination of trace elements in bone by two-jet plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **391**

- (2008) 687–693.
- [40] B. Langelier, X. Wang, K. Grandfield, Atomic scale chemical tomography of human bone, *Nature*. **7** (2017) 1–9.
- [41] M. Dermience, G. Lognay, F. Mathieu, P. Goyens, Effects of thirty elements on bone metabolism, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **32** (2015) 86–106.
- [42] K.D. Cashman, Milk minerals (including trace elements) and bone health, *Int. Dairy J.* **16** (2006) 1389–1398.
- [43] Y. Wang, J. Ma, L. Zhou, J. Chen, Y. Liu, Z. Qiu, S. Zhang, Dual functional selenium-substituted hydroxyapatite, *Interface Focus*. **2** (2012) 378–386.
- [44] S.A. Lanham-New, J.P. Bonjour, *Nutritional Aspects of Bone Health*, Royal Society of Chemistry, 2003.
- [45] G. Della Pepa, M.L. Brandi, Microelements for bone boost: The last but not the least, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **13** (2016) 181–185.
- [46] M. Marangella, M. Di Stefano, S. Casalis, S. Berutti, P. D’Amelio, G.C. Isaia, Effects of Potassium Citrate Supplementation on Bone Metabolism, *Calcif. Tissue Int.* **74** (2004) 330–335.
- [47] M. Harrington, K.D. Cashman, High salt intake appears to increase bone resorption in postmenopausal women but high potassium intake ameliorates this adverse effect, *Nutr. Rev.* **61** (2003) 179–183.
- [48] K. Sakhaee, N.M. Maalouf, S.A. Abrams, C.Y.C. Pak, Effects of potassium alkali and calcium supplementation on bone turnover in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90** (2005) 3528–3533.
- [49] R.K. Rude, H.E. Gruber, L.Y. Wei, A. Frausto, B.G. Mills, Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse, *Calcif. Tissue Int.* **72** (2003) 32–41.
- [50] S. Peng, X.S. Liu, G. Zhou, Z. Li, K.D.K. Luk, X.E. Guo, W.W. Lu, Osteoprotegerin deficiency attenuates strontium-mediated inhibition of osteoclastogenesis and bone resorption, *J. Bone Miner. Res.* **26** (2011) 1272–1282.
- [51] M. Yamaguchi, Role of zinc in bone formation and bone resorption, *J. Trace Elem. Exp. Med.* **11** (1998) 119–135.

- [52] M.L. Marquardt, S.L. Done, M. Sandrock, W.E. Berdon, K.W. Feldman, Copper deficiency presenting as metabolic bone disease in extremely low birth weight, short-gut infants, *Pediatrics*. **130** (2012) 695–698.
- [53] J. Díaz-Castro, M.R. López-Frías, M.S. Campos, M. López-Frías, M.J.M. Alférez, T. Nestares, M.L. Ojeda, I. López-Aliaga, Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats, *Eur. J. Nutr.* **51** (2012) 241–247.
- [54] A.A. Gorustovich, T. Steimetz, F.H. Nielsen, M.B. Guglielmotti, Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet, *Anat. Rec.* **291** (2008) 441–447.
- [55] W. Zhaojun, W. Lin, W. Zhenyong, W. Jian, L. Ran, Effects of manganese deficiency on serum hormones and biochemical markers of bone metabolism in chicks, *J. Bone Miner. Metab.* **31** (2013) 285–292.
- [56] URL: <https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/fractures-broken-bones/>, (pristup: 12.3.2020.).
- [57] URL: <https://www.rheumatology.org/Learning-Center/Statistics/Prevalence-Statistics>, (pristup: 12.3.2020.).
- [58] URL: <https://www.niams.nih.gov/health-topics/muscle-bone-diseases>, (pristup: 12.3.2020.).
- [59] URL: <https://www.cancer.org/cancer/bone-cancer/about/what-is-bone-cancer.html>, (pristup: 12.3.2020.).
- [60] J.A. Baddour, K. Sousounis, P.A. Tsonis, Organ repair and regeneration: An overview, *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **96** (2012) 1–29.
- [61] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **40** (2012) 363–408.
- [62] A. Ivković, I. Marijanović, D. Hudetz, R.M. Porter, M. Pecina, C.H. Evans, Regenerative medicine and tissue engineering in orthopaedic surgery, *Front. Biosci.* (2011) 923–944.
- [63] F.J. O’Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today*. **14** (2011) 88–95.

- [64] M. Ansari, Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies, *Prog. Biomater.* **8** (2019) 223–237.
- [65] S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, A. Russo, G. Giavaresi, M. Marcacci, C.T. Hung, A. Tampieri, Magnetic Hydroxyapatite bone substitutes to enhance tissue regeneration: Evaluation in vitro using osteoblast-like cells and in vivo in a bone defect, *PLoS One.* **7** (2012) 1–8.
- [66] A. Rogina, In situ sinteza hidroksiapatita u matrici biorazgradivih polimera, University of Zagreb, 2015.
- [67] R. Shi, Y. Huang, C. Ma, C. Wu, W. Tian, Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies, *Front. Med.* **13** (2019) 160–188.
- [68] S. Bose, S. Tarafder, Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review, *Acta Biomater.* **8** (2012) 1401–1421.
- [69] M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Today.* **11** (2008) 18–25.
- [70] K. Szurkowska, A. Laskus, J. Kolmas, K. Szurkowska, A. Laskus, Hydroxyapatite-Based Materials for Potential Use in Bone Tissue Infections, in: *Hydroxyapatite - Adv. Compos. Nanomater. Biomed. Appl. Its Technol. Facet.*, InTech Europe, 2018: pp. 109–135.
- [71] M.I. Kay, R.A. Young, Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature.* **204** (1964) 1050–1052.
- [72] R.A. Young, J.C. Elliott, Atomic-scale bases for several properties of apatites, *Arch. Oral Biol.* **11** (1966) 699–707.
- [73] A.S. Posner, A. Perloff, A.F. Diorio, Refinement of the hydroxyapatite structure, *Acta Crystallogr.* **11** (1958) 308–309.
- [74] E.D. Eanes, J.L. Meyer, The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH, *Calcif. Tissue Res.* **23** (1977) 259–269.
- [75] A. Lotsari, A.K. Rajasekharan, M. Halvarsson, M. Andersson, Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite, *Nat. Commun.* **9** (2018) 1–11.
- [76] K. Onuma, Recent research on pseudobiological hydroxyapatite crystal growth and phase transition mechanisms, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **52** (2006) 223–245.

- [77] Z. Amjad, *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Springer, Boston, 1998.
- [78] C. Viswanathan, N. Ponpandian, D. Mangalaraj, R. Subbiah, M. Manoj, K. Park, Influence of Growth Parameters on the Formation of Hydroxyapatite (HAp) Nanostructures and Their Cell Viability Studies, *Nanobiomedicine*. **2** (2015) 1–11.
- [79] L.A. Cyster, D.M. Grant, S.M. Howdle, F.R.A.J. Rose, D.J. Irvine, D. Freeman, C.A. Scotchford, K.M. Shakesheff, The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering, *Biomaterials*. **26** (2005) 697–702.
- [80] S. Meejoo, W. Maneeprakorn, P. Winotai, Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating, *Thermochim. Acta*. **447** (2006) 115–120.
- [81] J.K. Han, H.Y. Song, F. Saito, B.T. Lee, Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method, *Mater. Chem. Phys.* **99** (2006) 235–239.
- [82] P. Wang, C. Li, H. Gong, X. Jiang, H. Wang, K. Li, Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process, *Powder Technol.* **203** (2010) 315–321.
- [83] Y. Liu, J. Ma, S. Zhang, Synthesis and thermal stability of selenium-doped hydroxyapatite with different substitutions, *Front. Mater. Sci.* **9** (2015) 392–396.
- [84] L. Wei, D. Pang, L. He, C. Deng, Crystal structure analysis of selenium-doped hydroxyapatite samples and their thermal stability, *Ceram. Int.* **43** (2017) 1–8.
- [85] J. Ma, Y. Wang, L. Zhou, S. Zhang, Preparation and characterization of selenite substituted hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C*. **33** (2013) 440–445.
- [86] V. Uskoković, M.A. Iyer, V.M. Wu, One ion to rule them all: the combined antibacterial, osteoinductive and anticancer properties of selenite-incorporated hydroxyapatite, *J. Mater. Chem. B*. **5** (2017) 1430–1445.
- [87] URL: <https://www.britannica.com/science/selenium>, (pristup: 24.4.2020.).
- [88] R. Ebert, F. Jakob, Selenium deficiency as a putative risk factor for osteoporosis, *Int. Congr. Ser.* **1297** (2007) 158–164.

- [89] S.J. Fairweather-Tait, R. Collings, R. Hurst, Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements, *Am J Clin Nutr.* **91** (2010) 1484–1491.
- [90] L.C. Clark, G.F. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Krongrad, J.L. Lesher, H.K. Park, B.B. Sanders, C.L. Smith, J.R. Taylor, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* **276** (1996) 1957–1963.
- [91] J. Bleys, A. Navas-Acien, E. Guallar, Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults, *Arch. Intern. Med.* **168** (2008) 404–410.
- [92] C.S. Broome, F. McArdle, J.A.M. Kyle, F. Andrews, N.M. Lowe, C.A. Hart, J.R. Arthur, M.J. Jackson, An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status, *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (2004) 154–162.
- [93] B.E. Hurwitz, J.R. Klaus, M.M. Llabre, A. Gonzalez, P.J. Lawrence, K.J. Maher, J.M. Greeson, M.K. Baum, G. Shor-Posner, J.S. Skyler, N. Schneiderman, Suppression of human immunodeficiency virus type 1 viral load with selenium supplementation: A randomized controlled trial, *Arch. Intern. Med.* **167** (2007) 148–154.
- [94] R. Scott, A. MacPherson, Selenium supplementation in sub-fertile human males, *Br J Urol.* **82** (1998) 76–80.
- [95] A. Raman, N.T. Wheelwright, K.E. Limburg, S. Bulletin, E. Society, N. Sep, Adjuvant Treatment of Recent Onset Rheumatoid Arthritis by Selenium Supplementation: Preliminary Observations, *Br. J. Rheumatol.* **31** (1992) 281–286.
- [96] Q. Yu, X. Huang, J. Liu, D. Sun, Q. Chen, X. Chen, Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs, *Acta Biomater.* **30** (2016) 397–407.
- [97] N.V.C. Ralston, L.J. Raymond, Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, *Toxicology.* **278** (2010) 112–123.
- [98] S. Esmaili, R.S. Fazelifard, S. Ahmadzadeh, M. Shokouhi, The importance of selenium on human health, *Lancet.* **356** (2000) 233–241.
- [99] R. Boyne, J.R. Arthur, The Response of Selenium-Deficient Mice to *Candida albicans* Infection, *J. Nutr.* **116** (1989) 816–822.

- [100] B.A. Zachara, H. Pawluk, E. Bloch-boguslawska, K.M. Śliwka, J. Korenkiewicz, Ż. Skok, K. Ryć, Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland, *Arch. Environ. Health*. **56** (2001) 461–466.
- [101] Z. Zhang, J. Zhang, J. Xiao, Selenoproteins and selenium status in bone physiology and pathology, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840** (2014) 3246–3256.
- [102] C.M. Beukhof, M. Medici, A.W. Van Den Beld, B. Hollenbach, A. Hoeg, W.E. Visser, W.W. De Herder, T.J. Visser, L. Schomburg, R.P. Peeters, Selenium status is positively associated with bone mineral density in healthy aging European men, *PLoS One*. **11** (2016) 1–9.
- [103] D. Egrise, R. Moreno-Reyes, A. Schoutens, J. Nève, J.-L. Pasteels, Selenium Deficiency-Induced Growth Retardation Is Associated with an Impaired Bone Metabolism and Osteopenia, *J. Bone Miner. Res.* **16** (2001) 1556–1563.
- [104] M. Montero, M. Diaz-Curiel, J. Caeiro, C. De la Piedra, S. Dapia, Kalsis, a food supplement, decreases the ovariectomy-induced osteopenia in rats, *Bone*. **44** (2009) 437–438.
- [105] Y.C. Chen, D.M. Sosnoski, U.H. Gandhi, L.J. Novinger, K.S. Prabhu, A.M. Mastro, Selenium modifies the osteoblast inflammatory stress response to bone metastatic breast cancer, *Carcinogenesis*. **30** (2009) 1941–1948.
- [106] W. Zhang, Y. Chai, N. Cao, Y. Wang, Synthesis and characterization of selenium substituted hydroxyapatite via a hydrothermal procedure, *Mater. Lett.* **134** (2014) 123–125.
- [107] J. Kolmas, E. Groszyk, U. Piotrowska, Nanocrystalline hydroxyapatite enriched in selenite and manganese ions: physicochemical and antibacterial properties, *Nanoscale Res. Lett.* **10** (2015) 1–9.
- [108] W. Zhang, X. Xu, Y. Chai, Y. Wang, Synthesis and characterization of Zn<sup>2+</sup> and SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>- co-substituted nano-hydroxyapatite, *Adv. Powder Technol. J.* (2016) 1–5.
- [109] Y. Wang, W. He, H. Hao, J. Wu, N. Qin, Eggshell derived Se-doped HA nanorods for enhanced antitumor effect and curcumin delivery, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **87** (2018) 600–607.
- [110] C. Rodriguez-Valencia, M. Lopez-Alvarez, B. Cochon-Cores, I. Pereiro, J. Serra, P. Gonzalez, Novel selenium-doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications,



- J. Biomed. Mater. Res. **101** (2013) 853–861.
- [111] Y. Wang, J. Wang, H. Hao, M. Cai, S. Wang, J. Ma, Y. Li, C. Mao, S. Zhang, In Vitro and in Vivo Mechanism of Bone Tumor Inhibition by Selenium-Doped Bone Mineral Nanoparticles, ACS Nano. **10** (2016) 9927–9937.
- [112] W. Yanhua, H. Hao, Y. Li, S. Zhang, Selenium-substituted hydroxyapatite nanoparticles and their in vivo antitumor effect on hepatocellular carcinoma, Colloids Surfaces B Biointerfaces. (2016) 1–34.
- [113] E. Oledzka, M. Sobczak, J. Kolmas, G. Nalecz-Jawecki, Selenium-substituted hydroxyapatite/biodegradable polymer/pamidronate combined scaffold for the therapy of bone tumour, Int. J. Mol. Sci. **16** (2015) 22205–22222.
- [114] Y. Wang, H. Hao, S. Zhang, Lysozyme loading and release from Se doped hydroxyapatite nanoparticles, Mater. Sci. Eng. C. **61** (2016) 545–552.
- [115] D. Milovac, Synthesis and characterization of hydroxyapatite-biodegradable polymer composite material, University of Zagreb, 2014.
- [116] L. Veselinović, L. Karanović, Z. Stojanović, I. Bračko, S. Marković, N. Ignjatović, D. Uskoković, Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing, J. Appl. Crystallogr. **43** (2010) 320–327.
- [117] M. Espanol, J. Portillo, J.M. Manero, M.P. Ginebra, Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of  $\alpha$ -tricalcium phosphate by transmission electron microscopy, CrystEngComm. **12** (2010) 3318–3326.
- [118] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, A. Hoshikawa, Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction, J. Solid State Chem. **175** (2003) 272–277.
- [119] Z. Amjad, K.D. Demadis, Mineral Scales and Deposits: Scientific and Technological Approaches, Elsevier, 2015.
- [120] S. Graham, P.W. Brown, Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite, J. Cryst. Growth. **165** (1996) 106–115.
- [121] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz, FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, J. Mol. Struct. **744**–

- 747 (2005) 657–661.
- [122] Z. Huang, Q. Zhou, X. Wang, Z. Liu, A Biomimetic Synthesis Process for Sr<sup>2+</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> Substituted Nanohydroxyapatite, *Mater. Manuf. Process.* **31** (2016) 217–222.
- [123] A. Ressler, M. Cvetnić, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone, *J. Biomed. Mater. Res.* (2019) 1–13.
- [124] H. Zhang, M. Zhang, Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios, *Mater. Chem. Phys.* **126** (2011) 642–648.
- [125] J. Kolmas, E. Oledzka, M. Sobczak, G. Nałęcz-Jawecki, Nanocrystalline hydroxyapatite doped with selenium oxyanions: A new material for potential biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* **39** (2014) 134–142.
- [126] L. Wei, D. Pang, L. He, C. Deng, Crystal structure analysis of selenium-doped hydroxyapatite samples and their thermal stability, *Ceram. Int.* (2017) 1–8.
- [127] W. Zhang, Y. Chai, N. Cao, Y. Wang, Synthesis and characterization of selenium substituted hydroxyapatite via a hydrothermal procedure, *Mater. Lett.* **134** (2014) 123–125.
- [128] Y. Wang, H. Hao, S. Zhang, Biomimetic Coprecipitation of Silk Fibrin and Calcium Phosphate: Influence of Selenite Ions, *Biol. Trace Elem. Res.* (2017) 1–10.
- [129] D. Fan, H. Li, X. Zheng, J. Hui, X. Hua, H. Ma, Z. Song, J. Sun, Monodisperse selenium-substituted hydroxyapatite: Controllable synthesis and biocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C.* **73** (2017) 596–602.
- [130] B. Gamoke, D. Neff, J. Simons, Nature of PO bonds in phosphates, *J. Phys. Chem. A.* **113** (2009) 5677–5684.
- [131] L. Eklund, I. Persson, Structure and hydrogen bonding of the hydrated selenite and selenate ions in aqueous solution, *Dalt. Trans.* **43** (2014) 6315–6321.
- [132] J. Kolmas, M. Kuras, E. Oledzka, M. Sobczak, A solid-state NMR study of selenium substitution into nanocrystalline hydroxyapatite, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (2015) 11452–11464.

- [133] L.C. Chow, E.D. Eanes, Octacalcium Phosphate, *Monogr. Oral Sci.* **18** (2001) 1–16.
- [134] L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenko, Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in: T. Theophile (Ed.), *Infrared Spectrosc. – Mater. Sci. Eng. Technol.*, InTech Europe, 2012: pp. 123–149.
- [135] I. Manjubal, M. Sivakumar, In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation, *Mater. Chem. Phys.* **71** (2001) 272–278.
- [136] F. Monteil-Rivera, S. Masset, J. Dumonceau, M. Fedoroff, J. Jeanjean, Sorption of selenite ions on hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Lett.* **18** (1999) 1143–1145.

## 7 ŽIVOTOPIS

Klaudija Ivanković [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje pohađala je u Zagrebu u OŠ Stenjevec. Odličnim uspjehom završava V. Gimnaziju u Zagrebu, polaganjem Državne mature 2013. godine. Visokoškolsko obrazovanje nastavlja 2015. godine upisom sveučilišnog preddiplomskog studija Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, u Laboratoriju za molekulska spektroskopiju. U sklopu stručne prakse radila je na dva projekta, pod vodstvom Marka Rožmana, dr.sc. s Instituta Ruđer Bošković i prof.dr.sc. Sandre Babić s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Za rad *Adsorpcija farmaceutski aktivnih spojeva na ugljikove nanomaterijale* osvojila je Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad 2018. godine. Preddiplomski sveučilišni studij Kemije i inženjerstva materijala završava iste godine i stječe titulu prvostupnice kemijskog inženjerstva uz pohvalu *Cum Laude* s kategorizacijom 10 % najboljih studenata generacije, na temu završnog rada *Proučavanje sudbine peptidnih lijekova u okolišu*. U akademskoj godini 2018./2019. upisuje diplomski studij Primijenjene organske kemije na istom fakultetu. Iste godine započinje istraživanje i izradu diplomskog rada pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Hrvoja Ivankovića na temu *Strukturna karakterizacija selenijem dopiranih kalcijevih fosfata Rietveldovom metodom utočnjavanja*. 2020. godine obavlja stručnu praksu u sklopu Erasmus+ programa. Mjesto rada je Interdisciplinary Nanoscience Center u Aarhusu (Danska), gdje pod vodstvom prof.dr.sc. Jørgena Kjemsu u sklopu Nucleic Acid Nanotechnology grupe radi na temi modifikacije RNA strukture. Iste godine, primila je stipendiju Grada Zagreba u kategoriji izvrsnosti.

Za vrijeme studiranja radila je kao demonstrator na četiri zavoda; Zavodu za termodinamiku, strojarstvo i energetiku, Zavodu za organsku kemiju, Zavodu za fizikalnu kemiju i Zavodu za analitičku kemiju. U svrhu popularizacije znanosti i Fakulteta, sudjelovala je u organizaciji i izvedbi kemijskih radionica na Danima otvorenih vrata FKIT-a (2017. i 2018.) na Zavodu za analitičku kemiju, radionicama pod projektom „Prirodoslovna lepeza za mlade znanstvenike“ (2017.) te na Festivalu znanosti (2018.), sve pod vodstvom Daria Dabića, dr.sc.. Aktivno je sudjelovala na 5. Simpoziju studenata kemije (PMF 2018.), Sajamu Ideja (FKIT 2018.) i XII Međunarodnom susretu mladih kemijskih inženjera (FKIT 2018), te na brojnim drugim konferencijama kao pasivni sudionik. Član je Studentske organizacije inženjerstva materijala (SOME) te Hrvatskog društva kemijskih inženjera (HDKI). Uz hrvatski jezik, aktivno se služi engleskim, a pasivno njemačkim jezikom.