

# Sinteza visokoporozne kalcij silikatne keramike

---

**Prebeg, Teodora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:432700>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Teodora Prebeg**

# **DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, rujan 2021.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Teodora Prebeg

# SINTEZA VISOKOPOROZNE KALCIJ SILIKATNE KERAMIKE

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitne komisije:  
prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković  
dr. sc. Antonia Ressler  
dr. sc. Leonard Bauer

Zagreb, rujan 2021.

### *Zahvale*

*Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću na prihvaćenom mentorstvu. Također, zahvalu upućujem asistentici dr. sc. Antoniji Ressler na pomoći i strpljenju kako prilikom izrade ovoga rada, tako i proteklih godina studiranja.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima jer su bili uz mene, a time mi olakšali i uljepšali studiranje.*

*Na kraju, želim se zahvaliti svojim roditeljima, Ivanu i bratu Ivoru na neizmjerne podršci i razumijevanju koje su mi pružili.*

## SAŽETAK

Uočavanjem nedostataka do sada korištenih konvencionalnih metoda liječenja koštanih defekata te metoda priprava okosnica, nametnula se potreba razvoja novih materijala koji bi potaknuli samoobnovu, odnosno regeneraciju kosti. Cilj inženjerstva koštanog tkiva je pronaći biomaterijal strukturno i kemijski sličan prirodnom koštanom tkivu, te istražiti najpogodnije metode priprave okosnica na temelju takvoga materijala. Kako bi neka okosnica mogla biti korištena u inženjerstvu koštanog tkiva, mora biti pogodna za nasađivanje stanica, oponašati poroznu mikrostrukturu prirodne kosti, imati mogućnost razgradnje pri tjelesnim uvjetima i pri tome poticati regeneraciju tkiva te imati odgovarajuća mehanička svojstva kako bi služila kao potporanj okolnom tkivu.

Istraživanja su pokazala kako kalcij fosfati pripremljeni iz biogenog izvora (koralji, školjke, ljuske jaja, sipe i sl.) pokazuju svojstva slična prirodnoj kosti. Naime, anorganska faza prirodnog koštanog tkiva građena je od nestehiometrijskog hidroksiapatita supstituiranog karbonatnim ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ionima s manjkom kalcijevih ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iona. Nadalje, na mjestu  $\text{Ca}^{2+}$  iona prisutne su supstitucije stroncijem, magnezijem, cinkom, natrijem, kalijem i dr. Biogeni prekursori u svojoj strukturi sadrže navedene elemente u tragovima, te su stoga poželjni u sintezi materijala za obnovu koštanog tkiva jer potiču diferencijaciju matičnih stanica u osteoblaste i vaskularizaciju okosnice. Do danas su provedena mnoga istraživanja o ulozi silicija u regeneraciji koštanog tkiva. Uočena je njegova važna uloga u procesu osteogeneze te povezivanju lančanih molekula izvanstanične matrice.

U eksperimentalnom dijelu istraživanja, pripremljeni su uzorci hidroksiapatita (HAp) iz sipine kosti (aragonit,  $\text{CaCO}_3$ ) uz prisutnost fosfatnih iona ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidrotermalnom metodom. Potom su uzorci impregnirani (3-aminopropil)trietoksisilanom (APTES) kao izvorom silicija na dva različita načina; (i) uzastopna impregnacija te toplinska obrada pri 1000 °C, (ii) impregnacija te toplinska obrada pri 1000 °C nakon svake impregnacije. Pripremljeni uzorci karakterizirani su pomoću rendgenske difrakcijske analize, Rietveldove metode utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0., infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom te elektronske pretražne mikroskopije. Nakon sinteze HAp-a hidrotermalnom metodom, porozna mikrostruktura sipine kosti ostala je očuvana. Impregnacijom APTES-a u visokoporoznu strukturu

HAp-a te toplinskom obradom tako pripremljenih uzoraka, dolazi do nastajanja novih kalcij silikatnih faza, volastonita i larnita, te do nastajanja amorfne faze.

**Ključne riječi:** biomaterijali, okosnica, kalcij fosfati, kalcij silikati

## **SUMMARY**

### **Synthesis of highly porous calcium silicate ceramics**

It has been previously noticed that currently used conventional methods for bone defects regeneration and synthesis of scaffolds do not meet current needs in bone tissue engineering (BTE) applications. Therefore, there is a need for the development of new materials that could promote bone regeneration. The main goal of BTE is to find biomaterial that structurally and chemically resembles natural bone and to develop novel methods for its synthesis. If a biomaterial is to be used in BTE, it has to meet certain requirements; it must promote cell adhesion, resemble the microporous structure of natural bone tissue, biodegrade when immersed in body fluids, promote regeneration and have required mechanical properties in order to support surrounding tissue.

Research has shown that calcium phosphates synthesised from biological sources (corals, oysters, cuttlefish, etc.) better resemble natural bone tissue. Natural bone consists of nonstoichiometric carbonated hydroxyapatite that is calcium deficient, and materials from biological sources are a source of substitutional ions, essential for promotion osteogenesis and allowing normal function of the tissue. Numerous studies are focused on the investigation of silicon and silicate ion substitution due to its important role in extracellular matrix formation and osteogenesis.

In the experimental part, samples were prepared by cutting cuttlefish bone into small pieces and hydrothermally converting them into hydroxyapatite with the presence of phosphate ions. Afterward, samples were (i) continuously impregnated with (3-aminopropyl)triethoxysilane and finally heat-treated at 1000 °C and (ii) impregnated and heat-treated after each impregnation at 1000 °C. Further, samples were analysed by X-ray diffraction, Fourier transformed infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, while Rietveld's refinement was carried out in software DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0 to quantitatively analyse present phases. The results have shown that the hydrothermal method converted aragonite into hydroxyapatite while the microporous structure was preserved. Impregnation with (3-aminopropyl)triethoxysilane and thermal treatment caused the formation of silicate phases; larnite and wollastonite. A great amount of silicon was concentrated in form of an amorphous layer on the surface of samples.

**Keywords:** biomaterial, carrier, calcium phosphate, silicon, silicate ion



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	3
2.2. Struktura koštanog tkiva.....	5
2.3. Biogeni izvori.....	6
2.4. Hidroksiapatit .....	9
2.5. Trikalcijev fosfat .....	11
2.5.1. $\alpha$ -Trikalcij fosfat .....	12
2.5.2. $\beta$ -Trikalcij fosfat .....	13
2.6. Amorfni kalcijev fosfat .....	14
2.7. Silicij .....	16
2.7.1. Kalcij silikati.....	16
2.7.1.1. Volastonit.....	16
2.7.1.2. Larnit.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1. Materijali .....	20
3.2. Priprava hidroksiapatita iz sipe hidrotermalnom metodom .....	20
3.3. Impregnacija (3-aminopropil)trietoksisilanom .....	20
3.4. Karakterizacija matereijala.....	22
3.4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	22
3.4.2. Rendgenska difrakcijska analiza .....	22
3.4.3. Rietveldova metoda utočnjavanja.....	22
3.4.4. Elektronska pretražna mikroskopija .....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom .....	24
4.2. Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka .....	26
4.3. Elektronska pretražna mikroskopija.....	30
ZAKLJUČAK.....	33
POPIS SIMBOLA.....	34
LITERATURA .....	35
ŽIVOTOPIS.....	44

## 1. UVOD

Koštana oboljenja te oštećenja kosti jedna su od poteškoća koje najčešće prate osobe treće životne dobi, kao i sportaše. Primjeri najčešćih koštanih oboljenja su artritis, rahitis, prijelomi kostiju te osteoporoza, jedna od zastupljenijih bolesti treće dobi [1]. Za navedena oboljenja najčešće se upotrebljavaju autologne (presatke kosti samoga pacijenta) ili alogene presatke (presatke kosti drugoga pacijenta) koji su skupi, povećavaju rizik postoperativne infekcije, mogu izazvati imunološku reakciju te u slučaju alografta, prijenos bolesti. Kao alternativa autolognim i alogenim okosnicama smatrale su se inertne (metalne) okosnice koje pružaju samo mehaničku potporu. Stoga se pokušava pronaći biomaterijal koji bi mogao nadomjestiti oštećeno koštano tkivo, a zatim i potaknuti obnovu i rast novog koštanog tkiva [2,3].

Inženjerstvo koštanog tkiva interdisciplinarno je područje koje povezuje inženjerstvo i biomedicinske znanosti u cilju razvoja okosnica koje mogu obnoviti ili održati zdravu funkciju tkiva te su kemijski, strukturno i funkcijski slične prirodnom tkivu. Ova je interdisciplinarna grana razvijena još početku 20.-og stoljeća, dok su prve metode klinički primijenjene u 60-im godinama prošlog stoljeća [1].

Prekretnica u inženjerstvu koštanog tkiva bio je razvoj trodimenzionalnih okosnica na koje se mogu nasadivati stanice izolirane iz živog organizma koje će, potom, proliferirati, migrirati u strukturu okosnice i tvoriti vaskularizirano koštano tkivo. Visokoporozne okosnice pripravljanje su od sintetskih materijala koji omogućuju prilagodbu svojstava okosnice, no, u posljednje vrijeme sve su više poznate prednosti korištenja materijala dobivenih iz biogenih izvora (visokoporozna struktura, izvor kationa nužnih za normalnu funkciju koštanog tkiva) [1]. Svrha okosnice je imitacija izvanstanične matrice, ECM, (*engl. extracellular matrix*) koja je u dinamičnom odnosu sa stanicama te regulira važne procese poput adhezije stanica, njihove migracije, proliferacije i diferencijacije, pri čemu nasadene stanice koriste okosnicu kao predložak za stvaranje novog tkiva. Da bi okosnica bila pogodna za rast tkiva, mora biti biokompatibilna, bioaktivna, biorazgrađiva pri fiziološkim uvjetima, netoksična te mora imati odgovarajuća strukturna i mehanička svojstva. Također, brzina razgradnje okosnice *in vivo* mora odgovarati brzini nastajanja prirodnog koštanog tkiva kako ne bi došlo do nepotpune obnove i do dodatnih naprezanja u tkivu [4]. Prirodno koštano tkivo je kompozitni materijal koji se sastoji od anorganske komponente koja sačinjava oko 60-70

% ukupne mase kosti te organske komponente i vode koje čine preostali dio. Glavna sastavnica organske komponente je kolagen tipa I, a anorganske kalcijev fosfat u obliku nestehiometrijskog hidroksiapatita supstituiranog ionima;  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i dr. Navedeni ioni su poželjni u pripravi okosnica u inženjerstvu koštanog tkiva jer pokazuju pozitivan utjecaj na diferencijaciju matičnih stanica i obnovu koštanog tkiva [5]. Dodatno, istraživanja su potvrdila važnu ulogu silicija u nastajanju novog koštanog tkiva te mineralizaciji osteoida. Iz tog razloga, kalcij silikati se smatraju poželjnim fazama u okosnicama za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva [6].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje koje isprepliće kemiju, molekularnu i staničnu biologiju, kliničku medicinu, inženjerstvo i znanost o materijalima te koristi znanja o strukturi, svojstvima i metabolizmu koštanog tkiva kako bi se razvila pogodna okosnica za regeneraciju koštanog tkiva. Cilj inženjerstva koštanog tkiva je proizvesti trodimenzionalnu okosnicu izrađenu od sintetskog ili materijala iz prirodnog izvora koji će potaknuti stanični odgovor na molekularnoj razini što omogućuje obnavljanje i nastajanje novog koštanog tkiva [2, 7].

Okosnica je trodimenzionalni biomaterijal na kojega se nasađuju stanice. Željena svojstva okosnice su osteoindukcija i osteokondukcija. Osteoindukcija označava poticanje nastajanja novog koštanog tkiva, proliferaciju i diferencijaciju stanica nasađenih na okosnicu u koštane stanice, dok osteokondukcija opisuje svojstvo materijala okosnice da posluži kao pogodna podloga za stanice, njihovu adheziju, migraciju i vaskularizaciju (angiogenezu). Stanice, koje će se nasaditi na prethodno pripravljenu okosnicu, izoliraju se iz uzoraka tkiva donora dobivenih biopsijom. Svrha nasađivanja stanica na okosnicu je poticanje nastajanja novog koštanog tkiva (osteogeneza) [7]. Osnovna svrha okosnice je oponašati izvanstaničnu matricu, ECM, (*engl. extracellular matrix*) tkiva koje će se zamjenjivati i regenerirati. ECM je dinamična trodimenzionalna mrežasta struktura koju čine biomolekule. ECM prolazi kroz konstantne procese remodeliranja koje regulira enzimatska razgradnja, resorpcija koju provode osteoklasti te proizvodnja novog tkiva od strane osteoblasta. Poželjno je da sintetska okosnica ima svojstva što sličnija prirodnoj ECM-i kako bi nasađene stanice mogle ostvariti sve svoje vitalne funkcije [8]. Da bi se neka okosnica mogla koristiti u inženjerstvu koštanog tkiva, mora zadovoljavati;

- **Biokompatibilnost:** material ne smije imati negativan učinak na okolno tkivo niti organizam u cijelosti, ne smije izazivati imunološku reakciju te produkti njegove razgradnje ne smiju biti toksični. Stanice moraju ostvariti dobru adheziju na materijalu, migrirati kroz cijeli volumen okosnice, proliferirati i diferencirati [9].

- **Razgradnja:** cilj inženjerstva koštanog tkiva je da koštano tkivo kojega stanice proizvedu postepeno zamijeni ugrađenu okosnicu koja se s vremenom razgrađuje, pri čemu kinetika razgradnje okosnice mora odgovarati brzini kojom stanice proizvode novo tkivo [7, 9].
- **Mehanička svojstva:** ugrađena okosnica treba imati mehanička svojstva što sličnija onima tkivu koje zamjenjuje. Također, mora imati postojan oblik kako bi izdržala rukovanje i operativni zahvat ugradnje. Navedeni zahtjev je posebno važan za inženjerstvo koštanog tkiva budući da mehanička svojstva zdrave kosti variraju ovisno o spolu, dobi i tjelesnoj masi pacijenta. Vlačna čvrstoća iznosi od 50 do 150 MPa, a Youngov modul od 7 do 30 MPa [10]. Nadalje, istraživanja su pokazala kako se ista vrsta stanica ponaša drugačije ovisno o tome je li nasađena na meku ili tvrdu podlogu (okosnicu), pa je stoga od velike važnosti da okosnica što vjernije imitira mehanička svojstva tkiva [9, 11].
- **Mikrostruktura okosnice:** visoka poroznost okosnice nužna je kako bi se omogućila difuzija kisika, hranjivih tvari i faktora rasta do stanica te odvod metaboličkog otpada. Povezanost pora omogućava migraciju stanica u okosnicu, dobru vaskularizaciju te odvod produkata razgradnje materijala okosnice. Također, važna je veličina pora koje moraju biti dovoljno velike kako bi stanice mogle migrirati kroz materijal, ali i dovoljno male kako bi se omogućile interakcije između stanica. Optimalan interval veličina pora okosnice za koštane stanice (osteoblaste) iznose od 200 do 650  $\mu\text{m}$  [7, 9, 12].

Visoki broj materijala zadovoljava preduvjete za uporabu u inženjerstvu koštanog tkiva, te se mogu podijeliti na biokeramiku, polimere iz prirodnog i sintetskog izvora te kompozitne materijale. Polimeri iz prirodnih izvora su kitozan, alginat, kolagen, derivati hijaluronske kiseline, svila i dr. Biokompatibilni su, bioaktivni te u kliničkim studijama pokazuju minimalnu reakciju imunološkog sustava pacijenta. Sintetskim polimerima moguće je prilagoditi svojstva okosnice. Modifikacijom strukture sintetskih polimera i funkcionalnih skupina na površini utječe se na kinetiku degradacije te adheziju stanica. Neki od najčešćih su poli(etilen-glikol), polimlječna

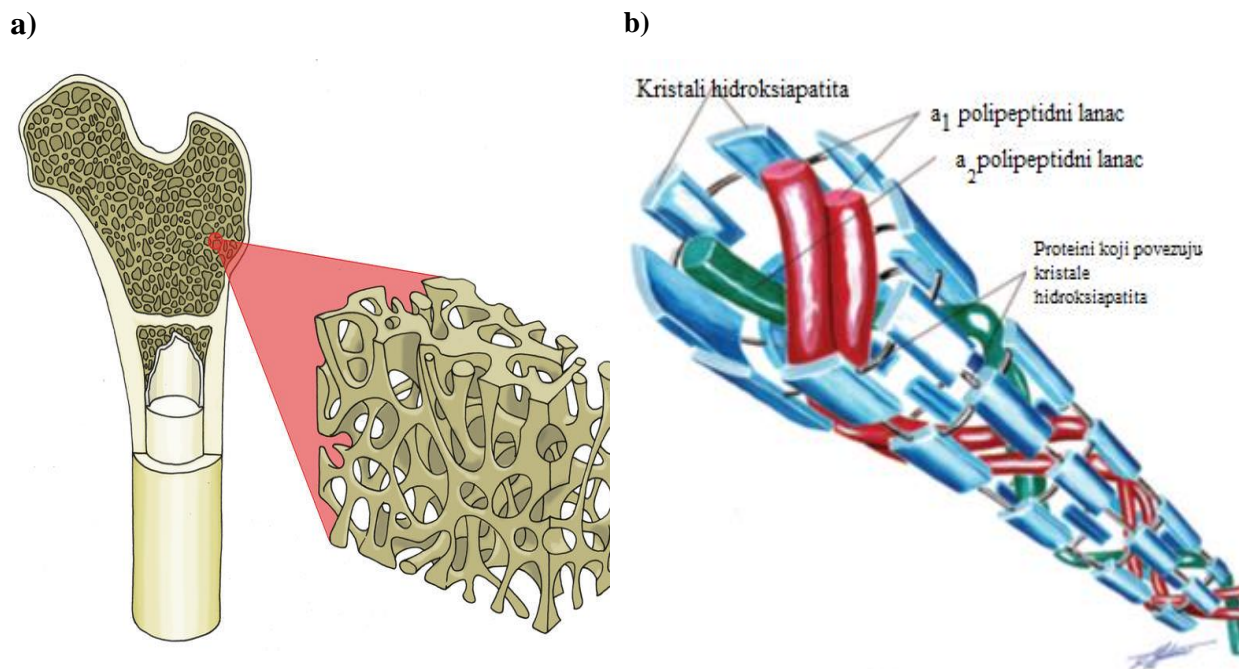
kiselina, poli( $\epsilon$ -kaprolakton) i dr. Najčešće korišteni biokeramički materijali su kalcijevi fosfati, tj. HAp i trikalcij fosfati (TCP, *engl. tricalcium phosphate*) koji pokazuju bioaktivnost i biokompatibilni su zbog kemijske i strukturne sličnosti mineralnoj fazi koštanog tkiva [7, 9, 11].

## 2.2. Struktura koštanog tkiva

Kako bi se razumjeli zahtjevi koje okosnica mora ispunjavati da bi se mogla koristiti u inženjerstvu koštanog tkiva, nužno je razumjeti građu i funkciju toga tkiva.

Koštano tkivo ima višestruke funkcije u organizmu poput omogućavanja kretanja, zaštite organa, pružanja mehaničke čvrstoće, skladištenja i održavanja homeostaze minerala te sadrži hematopoetsko tkivo koje proizvodi krvne stanice [2]. Koštano tkivo čine stanice osteoblasti, osteociti te osteoklasti. Osteoblastima je uloga proizvodnja i mineralizacija ECM-e, dok osteociti nastaju ugradnjom osteoblasta u matricu te omogućavaju prijenos mehanoreceptorskih signala. Osteoklasti su stanice čija je biološka uloga razgradnja koštanog tkiva, odnosno resorpcija [5]. Koštano tkivo je dinamično, sklono stalnim strukturnim promjenama koje su odgovor na metaboličke, mehaničke ili endokrine podražaje u organizmu. Prolazi kroz konstantne cikluse resorpcije i regeneracije koje dovode do kemijske i strukturne promjene shodno biomehaničkim zahtjevima prema Wolfovom zakonu. Wolfov zakon ukazuje na prilagodbu kosti iznosu i smjeru opterećenja koje je na njega primijenjeno, i to tako da dolazi do promjene strukture preslagivanjem bez promjene mase koštanog tkiva. Prestankom djelovanja opterećenja, ponovno dolazi do promjene strukture i smanjenja mehaničke čvrstoće kosti [13]. Navedeni su procesi sinergistički te održavaju homeostazu tkiva i organizma [2,5]. Mehaničke karakteristike koštanog tkiva su visoka čvrstoća i elastičnost, dok specifična porozna mikrostruktura omogućuje veliku mehaničku čvrstoću uz što manju masu. Mikroporoznu strukturu prirodnog koštanog tkiva karakterizira povezanost pora te široka raspodjela veličina, prosječne vrijednosti 300 nm (*Slika 2a*). S kemijskog stajališta, kost se može promatrati kao kompozitni materijal kojeg sačinjava organski i anorganski, odnosno mineralni dio. Pored kolagena tipa I, organski dio prirodne kosti čine proteoglikani, glikoproteini, elastin, fibronektin, laminin, faktori rasta i dr. Kolagen je molekula koja se sastoji od tri peptidna lanca koja se povezuju u trostruku uzvojnici ostavljajući šupljine u koje se smještaju minerali HAp-a nanometarskih dimenzija (*Slika 2b*). Kolagen daje elastičnost te

otpornost na tlačno i vlačno opterećenje, dok HAp čini strukturu rigidnom i daje joj mehaničku čvrstoću. Nestehiometrijski HAp niske kristalnosti glavni je mineral anorganske komponente kosti; supstituiran je kationima i anionima, čija prisutnost i omjer varira ovisno o vrsti koštanog tkiva i starosti organizma[5].



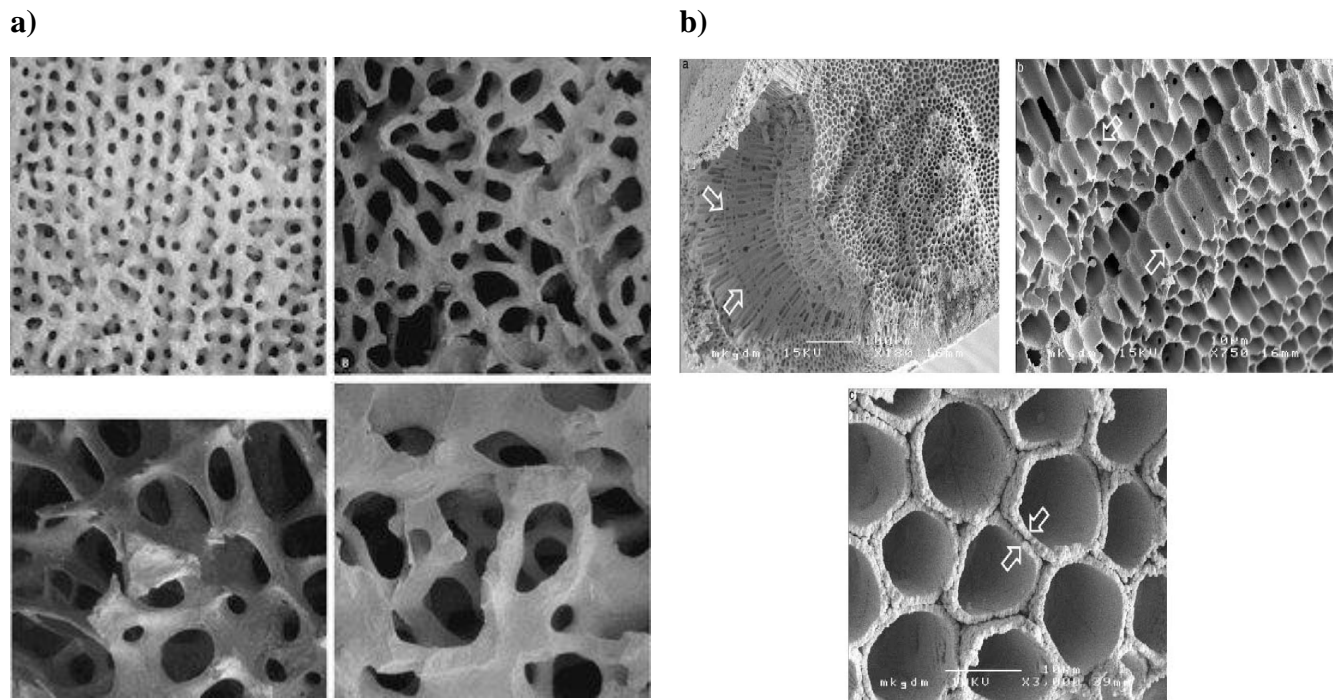
Slika 2. a) Prikaz porozne strukture prirodne kosti [14] i b) Shema ugradnje kristala hidroksiapatita u trostruku uzvojnici kolagena tipa I [5].

### 2.3. Biogeni izvori

Iako su do sada razvijeni mnogi biomaterijali zadovoljavajućih svojstava, u kliničkim studijama i dalje ne pokazuju dovoljno dobre rezultate da bi u potpunosti zamijenili uporabu autogenih i alogenih presađaka. Stoga se sve veća pozornost pridaje istraživanju mineralnih struktura drugih živih organizama, posebice morskih. Još 1997. godine White je uočio kako koralji posjeduju trodimenzionalnu strukturu koja bi mogla poslužiti u ortopediji [15]. Najveća je prednost morskih organizama što presađnjom mineralne faze njihova tkiva nema opasnosti od prijenosa bolesti, kao što je to slučaj sa sisavcima. Mineralnu fazu tkiva morskih organizama čini kalcij karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) u obliku kalcita ili aragonita koje ljudsko tkivo dobro prihvaća, no najčešće se prevode u kalcij fosfatnu biokeramiku pomoću metode precipitacije [16] ili hidrotermalne sinteze

[17]. Posjeduju visokouređenu nanostrukturu mineralne faze koju je vrlo teško dobiti laboratorijskim postupcima (*Slika 1*). Iako mnogi morski organizmi proizvode biominerale, najčešće istraživane mineraloške strukture su one rakova, školjkaša, koralja, algi, sipe i dr. Do sada je razvijeno nekoliko komercijalno dostupnih okosnica na temelju morskih organizama što je dokaz njihove važnosti u inženjerstvu koštanog tkiva. Ewers [16] je ugradio preko 200 okosnica dobivenih iz algi (Algipore®) i uočio osteoindukciju te rast nove kosti u razdoblju od 6 mjeseci. Tran i suradnici [18, 19] dugi niz godina provode klinička ispitivanja okosnica pripremljenih od koralja (ProOsteon®) koji je ugrađen nešto manje od stotinu pacijenata radi rekonstrukcije lomova kosti te pacijentima koji su bolovali od tumora kostiju. Uočeno je da potiče osteogenezu i resorpciju tumorskog tkiva. Iako se komercijalno još ne koriste, okosnice temeljene na sipinoj kosti privlače veliku pozornost. Sipina kost je građena od aragonita, jedne od tri polimorfne modifikacije  $\text{CaCO}_3$ , kojega je moguće prevesti u HAp različitim laboratorijskim postupcima. Sipina kost je visokoporozan materijal s veličinom pora od 200 do 600  $\mu\text{m}$ , biokompatibilna je, osteokonduktivna te dostupna u cijelom svijetu. Uočeno je da HAp dobiven konverzijom iz  $\text{CaCO}_3$ , sadrži zaostale  $\text{CO}_3^{2-}$  ione kao supstitucije u strukturi te takav materijal pokazuje bolju biokompatibilnost u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima u odnosu na stehiometrijski HAp [12].



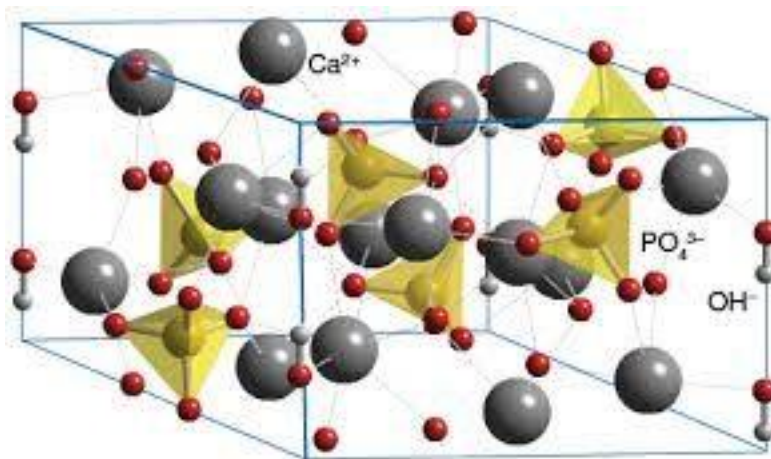


Slika 1. SEM mikrografi komercijalno dostupnih okosnica pripremljenih iz biogenog izvora  
 a) ProOsteon® temeljen na koraljima [20], b) Algipore® temeljen na algama [21].

Leonapakul i suradnici [22] žarili su kućice puževa (*Pomacea canaliculata*) kako bi dobili  $\text{CaCO}_3$  i kalcij oksid (CaO) koji su služili kao prekursori za dobivanje TCP-a i HAp-a. Uočili su kako je navedena metoda pogodna za pripremu okosnice za uporabu u inženjerstvu koštanog tkiva. Gunduz i suradnici [23] pripravili su iz školjki morskog puža (*Cerithium vulgatum*) kalcij fosfate mehanokemijskom metodom pri temperaturama od 400 do 800 °C tijekom 4 h. U usporedbi s hidrotermalnom metodom koja se obično koristi za ovu svrhu, navedena metoda je jednostavna i ekonomična jer za nju nije potrebna skupa oprema te je sigurna za korištenje. Agaogullari i suradnici [24] pripravljali su kalcij fosfate na temelju morskih ježinaca (*Brissus latecarinatus*) na dva načina tražeći alternativu hidrotermalnoj metodi. U prvoj metodi se za provedbu reakcije koristila ultrasonična kupelj, dok se u drugoj koristio vrući pladanj pri atmosferskim uvjetima. Navedenim se metodama uspješno provela konverzija aragonita u kalcij fosfate, obje su se metode pokazale jednostavnije i ekonomičnije od hidrotermalne, a uporaba lako dostupnog morskog organizma kao izvora aragonita ekološki i ekonomski prihvatljiva [16].

## 2.4. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAp) je mineral iz skupine apatita te ima kompoziciju  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  koja se najčešće piše  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  kako bi se istaknulo da se jedinična ćelija sastoji od dvije strukturne jedinice (Slika 3). Hidroksiapatit je kalcijev fosfat, sol fosfatne kiseline čiji se ioni  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  mogu pronaći u živim organizmima. Stehiometrijski HAp ima heksagonsku jediničnu ćeliju s parametrima  $a = b = 9,418 \text{ \AA}$  i  $c = 6.884 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ , te pripada prostornoj skupini  $\text{P6}_3/m$  i ima molarni omjer  $\text{Ca/P} = 1,67$ .  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine su osnovna strukturna jedinica, dok se ioni kalcija i kisika mogu nalaziti na različitim položajima. Položaj iona  $\text{Ca}^{2+}$  koordiniran je atomima kisika te od ukupno deset  $\text{Ca}^{2+}$  iona, na položaju Ca1 nalazi se njih četiri, dok se preostalih šest nalazi na položaju Ca2. Atomi kisika nalaze se na tri različita položaja; jedan na položaju O1 te jedan u O2, dok se dva atoma kisika nalaze na položaju O3. Na Slici 3. prikazana je jedinična ćelija HAp-a [25, 26].



Slika 3. Jedinična ćelija hidroksiapatita [27].

Fleksibilna struktura HAp-a omogućava supstitucije  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  te  $\text{OH}^-$  iona. Dio fosfatnih ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) iona HAp-a prirodnog koštanog tkiva supstituirano je karbonatnim ionom ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) pri čemu se ovaj tip karbonatne supstitucije naziva tip B, dok tip A predstavlja supstitucija  $\text{OH}^-$  skupina  $\text{CO}_3^{2-}$  ionom. Moguća je AB supstitucija u kojoj su istovremeno skupine  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{OH}^-$  supstituirane  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima.  $\text{Ca}^{2+}$  ioni mogu se supstituirati drugim kationima ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i dr.) dok je  $\text{OH}^-$  skupinu moguće supstituirati kloridnim ( $\text{Cl}^-$ ) i fluoridnim ( $\text{F}^-$ ) ionima te se takve mineraloške faze nazivaju klorapatit i fluorapatit. Prisutne supstitucije uzrokuju promjene parametara jedinične

ćelije, morfologije kristala, topljivosti i termalne stabilnosti. Međutim, simetrija kristalne rešetke ostaje očuvana, što ukazuje na fleksibilnost strukture HAp-a. HAp supstituiran  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima pokazuje veću topljivost od stehiometrijskog, koji je pak topljiviji od fluorapatita [18, 19]. Navedene su supstitucije u strukturi prirodnog HAp-a neophodne za normalnu funkciju koštanog tkiva [28].

Zbog sličnosti prirodnom koštanom tkivu i dobrih mehaničkih svojstava, sintetski HAp koristi se i istražuje za uporabu u ortopediji i stomatologiji kako bi nadomjestio oštećenja i oboljenja kosti. HAp je biokompatibilan što je potvrđeno s nekoliko tipova stanica *in vitro* (osteoblasti, fibroblasti i dr.) koje su pokazale dobru adheziju na materijal te proliferaciju [25, 28, 29]. U istraživanju Cheung i Haaka [30] *in vitro* uzgojem osteoblasta na poroznom nosaču uočena je proliferacija stanica i nastajanje kolagena tipa I. Dodatno, uočena je prisutnost alkalne fosfataze (ALP, engl. *alkaline phosphatase*), metabolita koji ukazuje na aktivnost osteoblasta. Galgut i suradnici [31] proveli su histološko ispitivanje *in vivo* na pacijentima kojima su ugrađene zubne okosnice izrađene od HAp-a. Nakon 40 tjedana uočena je resorpcija materijala i nastajanje osteoida, a nakon 80 tjedana uočeno je novonastalo koštano tkivo. Osim navedenoga, HAp je netoksičan, ne izaziva imunološku reakciju organizma i pokazuje osteokonduktivna svojstva. No, uočeno je kako stehiometrijski HAp ima lošija osteokonduktivna svojstva od supstituiranog HAp-a *in vivo* prema istraživanju Habibović i suradnika [32], te lošija od nanostrukturiranog HAp-a prema istraživanju Kattimani-a i suradnika [33]. Također, Ducheyne i suradnici uočili su značajno sporiju resorpciju HAp-a u usporedbi s drugim kalcij silikatima [34].

Do sada je razvijeno nekoliko metoda pripreme HAp-a, koje se mogu podijeliti u mokre i suhe postupke. Suhi postupci ne koriste otapala, a u njih se svrstavaju reakcije u čvrstom stanju i mehanokemijske reakcije. Nedostatak navedenih metoda je loša difuzija u procesu i time nejednolika svojstva konačno dobivenog materijala. Mokri postupci pripreme su precipitacija, hidroliza, sol-gel metoda, hidrotermalna i emulzijska metoda. Prednosti mokrih postupaka su dobra kontrola morfologije konačnog produkta, a nedostatak je niska temperatura procesa čime se dobiva HAp niske kristalnosti [35].

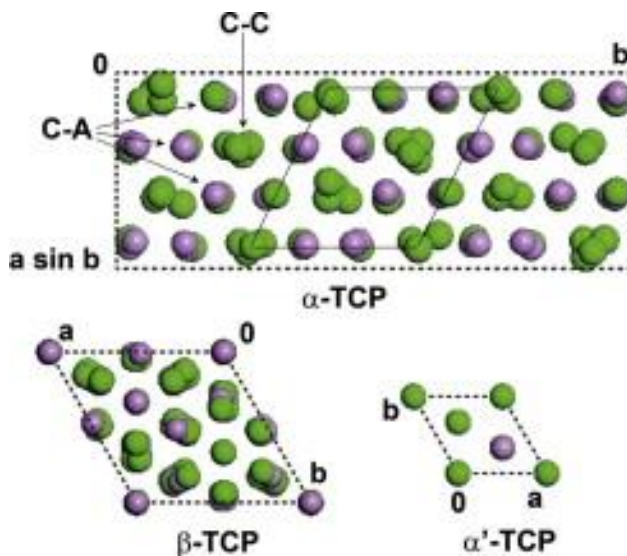
Hidrotermalna metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za pripremu HAp-a iz sintetskih i prirodnih izvora. Osnova metode je reakcija u vodenoj otopini pri povišenom tlaku i temperaturi. Regulacijom parametara, odnosno povišenjem temperature, smanjuje se udio drugih kalcij fosfata

u konačnom materijalu što poskupljuje proces u korist svojstava konačnog materijala [35]. Ova se metoda često koristi u prevođenju bioloških mineralnih struktura u HAp. Prirodne mineralne strukture (školjke, sipina kost, alge, koralji) sadrže kompleksnu mikrostrukturu i izvor su iona koji će služiti kao supstitucije u konačnom materijalu [17]. Jedan od biogenih izvora  $\text{CaCO}_3$  pogodan za prevođenje u kalcij fosfate hidrotermalnom metodom je sipina kost (*Sepia officinalis*). Sipina kost istražuje se kao potencijalni materijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva zbog visokoporozne strukture te je prirodan izvor iona u tragovima koji će se supstituirati u strukturu HAp-a. Milovac i suradnici [36] pripravili su visokoporoznu okosnicu HAp-a iz sipine kosti pomoću hidrotermalne metode te uočili potpunu konverziju aragonita u HAp nakon 72 h procesa. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR, *engl. Fourier-transform infrared spectroscopy*) ukazala je na supstituciju  $\text{PO}_4^{3-}$  iona s  $\text{CO}_3^{2-}$ , a elektronska pretražna mikroskopija (SEM, *engl. scanning electron microscopy*) očuvanost visokoporozne strukture nakon hidrotermalne sinteze te nastajanje pločastih i igličastih kristala HAp-a. Almukarrama i Yusuf [37] proveli su konverziju  $\text{CaCO}_3$  školjke kamenice (*Crassostrea gigas*) precipitacijskom metodom u HAp supstituiran  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima. Uočeno je da supstitucija  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima smanjuje veličinu kristalita te kristalnost strukture što je potvrđeno rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD, *engl. X-ray diffraction*). Naime, usporedivši maksimume stehiometrijskog HAp-a i HAp-a supstituiranog  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima, uočava se proširenje difrakcijskih maksimuma. Asadollahzadeh i suradnici [38] proveli su kalcinaciju kosti tune (*Thunnus thynnus*) toplinskom obradom pri temperaturama od 600 do 900°C kako bi se uklonila organska komponenta te kako bi se dobili kalcij fosfati. Uočeno je kako se većom temperaturom procesa dobivaju veći kristali dikalcij fosfata ( $\text{CaHPO}_4$ ). Dobiveni kristali izloženi su simuliranim tjelesnim tekućinama (SBF, *engl. simulated body fluid*). Nakon 14 dana inkubacije uočeni su kristali HAp-a u obliku iglica i cvjetače, dok je nakon 28 dana uočen deblji i gušći sloj kristala HAp-a na pripremljenim uzorcima.

## 2.5. Trikalcijev fosfat

Trikalcij fosfat (TCP, *engl. tricalcium phosphate*) je uz HAp najčešće istraživani kalcijev fosfat za potencijalne primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Pojavljuje se u tri polimorfne modifikacije;  $\beta$ -TCP stabilan pri sobnoj temperaturi,  $\alpha$ -TCP stabilan pri visokim temperaturama iznad 1125°C te  $\alpha'$ -TCP stabilan pri temperaturama iznad 1430 °C. Razlike u strukturama

navedenih polimorfne modifikacija prikazane su na *Slici 4*. Zbog svojih povoljnih svojstava kao što su resorpcija, biokompatibilnosti te osteoinduktivnosti,  $\beta$ -TCP i  $\alpha$ -TCP polimorfne modifikacije koriste u stomatologiji i ortopediji u obliku kompaktnih i poroznih blokova, granula i prašaka [9, 39, 40].



*Slika 4.* Razlika u strukturi polimorfnih modifikacija trikalcij fosfata [39].

### 2.5.1. $\alpha$ -trikalcij fosfat

Kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu s parametrima jedinične ćelije  $a = 12,86 \text{ \AA}$ ,  $b = 27,35 \text{ \AA}$ ,  $c = 15,22 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 126,35^\circ$  te pripada  $P2_1/a$  prostornoj grupi. Gustoća  $\alpha$ -TCP-a je manja nego  $\beta$ -TCP-a te je uočeno kako se  $\alpha$ -TCP brže resorbira pri fiziološkim uvjetima.  $\alpha$ -TCP je pet puta topljiviji pri sobnoj temperaturi, te gotovo dvostruko pri tjelesnoj temperaturi u usporedbi s  $\beta$ -TCP-om.  $\text{Ca}^{2+}$  ioni koordinirani su atomima kisika te zauzimaju 18 različitih položaja u kristalnoj rešetci. Položaji Ca6, Ca13 i Ca18 su pogodni za supstituciju divalentnim kationima manjih ionskih radijusa, dok je supstitucija kationima većeg radijusa moguća na položajima Ca5, Ca8, Ca14 [39, 41].

Kako bi se ispitala potencijalna primjena u inženjerstvu koštanog tkiva, svojstva  $\alpha$ -TCP-a se istražuju *in vitro* te *in vivo*. Kihara i suradnici [42] proučavali su brzinu resorpcije okosnica na temelju  $\alpha$ -TCP-a u koštanim defektima kunića, dok su koštani defekti bez usađenog materijala korišteni kao kontrola. Nakon 8 tjedana uočena je resorpcija materijala te nastajanje novog

koštanog tkiva. Ehara i suradnici [43] proučavali su utjecaj  $\alpha$ -TCP-a na nekoliko vrsta mišjih stanica te uočili da je proliferacija stanica, sinteza kolagena i mineralizacija potaknuta kada se koriste osteoblasti. Međutim, u istraživanju Tamai i suradnika [44] nasađivanjem plućnih fibroblasta zamoraca na HAp,  $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP uočeno je da od svih navedenih,  $\alpha$ -TCP pokazuje najveću toksičnost. Pretpostavlja se da je razlog toksičnosti povišenje pH vrijednosti koje izaziva hidroliza  $\alpha$ -TCP-a. U kliničkim studijama koje su do sada provedene  $\alpha$ -TCP je uglavnom korišten u injektabilnom obliku u smjesi s drugim fazama te ima primjenu u stomatologiji, maksilo-facijalnoj kirurgiji, ortopediji te kao nosač lijekova [39].

### 2.5.2. $\beta$ -trikalcij fosfat

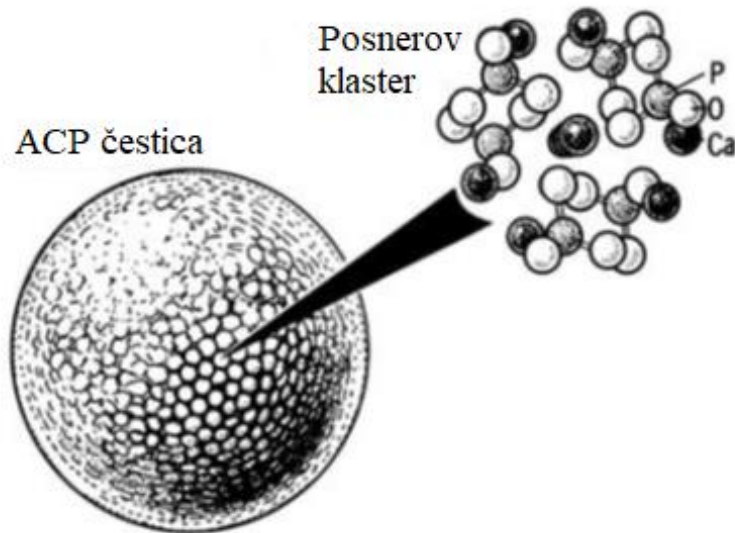
Kristalna struktura  $\beta$ -TCP-a pripada romboedarskom kristalnom sustavu s parametrima jedinične ćelije  $a = b = 10,44 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,40 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$  te pripada R3/c prostornoj grupi.  $\beta$ -TCP ima manju topljivost i brzinu resorpcije od  $\alpha$ -TCP-a, ali veću gustoću [39, 45]. Ioni  $\text{Ca}^{2+}$  zauzimaju 5 različitih položaja u strukturi i koordinirani su s atomima kisika, koji zauzimaju 10 različitih položaja. Zbog razlika u duljini Ca–O veza pojedinih Ca položaja, supstitucije su preferirane na položajima Ca4 i Ca5. Naime, ioni manjeg radijusa supstituiraju se na položaju Ca5, a većeg na položaju Ca4 zbog prisutnosti dužih Ca–O veza a time i većeg međuatomskog prostora u rešetci. Na položajima Ca1, Ca2 i Ca3 duljina veza Ca–O varira u intervalu od 2,3 do 3,1  $\text{\AA}$  što ukazuje na relativno deformiranu koordinaciju poliedara oko Ca položaja te manju mogućnost supstitucija. Nadalje, moguće su samo supstitucije divalentnim kationima zbog održanja elektroneutralnosti [39, 41].

Wiltfang i suradnici [46] istraživali su *in vivo* resorpciju  $\beta$ -TCP-a ugrađenog u defekte koljencične kosti patuljastih svinja. Nakon 86 tjedana od ugradnje, uočena je 95-97 % resorpcija materijala, a zaostali dio bio je u potpunosti integriran u novonastalo koštano tkivo. Kao kontrola, na svakoj kosti ostavljen je netretirani defekt. Na kontrolnim defektima uočena je značajno manja količina novonastalog koštanog tkiva što upućuje na regenerativni potencijal  $\beta$ -TCP-a. Yamada i suradnici [47] proveli su histološko i histomorfološko istraživanje  $\beta$ -TCP-a kao okosnice za povećanje alveolarnih grebena. Porozni  $\beta$ -TCP obujmljen je perforiranim titanijevim cilindrima i ugrađen u pluća kunića. Nakon 4 tjedna od ugradnje, uočen je početak degradacije koja je najveću brzinu

postigla nakon 8 tjedna od usađivanja. U istom istraživanju  $\alpha$ -TCP pokazao je značajno bržu resorpciju te bolja osteokonduktivna svojstva. Naime, okosnica na temelju  $\alpha$ -TCP-a je nakon 8 tjedana izgubila prvotni oblik te je nastao sloj novog koštanog tkiva deblji nego u slučaju  $\beta$ -TCP-a. Sohier i suradnici [48] pripravili su poroznu okosnicu  $\beta$ -TCP-a te ju impregnirali koštanim morfogenetskim proteinom i ugradili u koštane defekte kunića. Nakon 4 tjedna od ugradnje, uočeno je kako je  $\beta$ -TCP pogodan nosač za dostavu navedenog proteina te da je nastalo novo koštano tkivo. Tarafder i suradnici [49] pripravili su visokoporoznu okosnicu na temelju  $\beta$ -TCP-a metodom aditivne proizvodnje radi precizne kontrole mikrostrukture okosnice. Nasađivanjem ljudskih osteoblasta uočena je izraženija proliferacija *in vitro* smanjenjem veličine pora okosnice. Ugradnjom okosnice u koštane defekte štakora, uočena je prisutnost osteoida *in vivo* kako u mikro-tako i u makroporama.

## 2.6. Amorfni kalcijev fosfat

Amorfni kalcij fosfat (ACP, *engl. amorphous calcium phosphate*) kemijske formule  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , jedinstven je pored ostalih kalcij fosfata zbog izostanka uređenosti koja se proteže kroz čitavu strukturu. Na difraktogramima ACP-a uočavaju se dva vrlo široka maksimuma što ukazuje na amorfnost. Posner i Betts [50] proučavali su strukturu ACP-a te postavili hipotezu o nasumičnom nakupljanju  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  u klustere koji čine česticu ACP koja u strukturi obično sadržava od 15 do 20 % vode u intersticijama. Model čestice i klastera kojega su predložili Posner i Betts nalazi se na *Slici 5*. ACP se dobiva kao precipitat iz prezasićene otopine kalcij fosfata te se može prevesti u kristalnu fazu oktakalcij fosfata pentahidrata ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ili HAp-a. Molarni omjer Ca/P ovisi o pH prezasićene otopine iz koje se ACP dobiva te može iznositi Ca/P = 1,18-1,53 pri čemu udio kalcija raste s povećanjem pH otopine. Uočeni su slučajevi u kojima je Ca/P molarni omjer ACP-a iznosio do 2,5 [51]. Uočena je važna uloga ACP-a u procesu biomineralizacije novonastale izvanstanične matrice. Opisana struktura je uzrok reaktivnosti u dodiru s tjelesnim tekućinama i faznu transformaciju u HAp, te se smatra prekursorom HAp-a, tj. međuproduktom biomineralizacije [52, 53, 54].



Slika 5. Model Posnerovog klastera i čestice amornog kalcij fosfata [50].

Istraživanja provedena na ACP-u ukazuju na biokompatibilnost i osteoinduktivnost. U istraživanju Van den Vreken i suradnika [55] ACP je dodan drugim kalcij fosfatnim fazama te su provedena biološka ispitivanja. Uočeno je kako se dodatkom ACP mijenja struktura materijala, kristali postaju sve manji što poboljšava mehanička svojstva. Osim toga, uočena je dobra adhezija stanica na površinu materijala. Zbog navedenih svojstava ACP se smatra poželjnom fazom okosnice. Nagano i suradnici [56] ispitivali su prevlake ACP-a na okosnicama ugrađenim u kuniće i štakore, a kao kontrola korišten je HAp. Uočeno je kako su ACP prevlake resorbirale brže od HAp-a i pokazale bolja osteokonduktivna svojstva. Uysal i suradnici [57] proučavali su *in vivo* utjecaj ACP-a kao veziva za ortodonska pomagala na remineralizaciju cakline zuba. Polovini pacijenata ugrađena su ortodonska pomagala komercijalnim vezivom, dok je na drugoj polovici primijenjeno vezivo na bazi ACP-a. 30 dana nakon nanošenja veziva, ono je uklonjeno te su uzeti uzorci cakline. Uočena je značajna razlika u mineralnom sastavu cakline te pozitivan utjecaj ACP-a na usporavanje demineralizacije zuba. Sun i suradnici [58] sintetizirali su prevlake za bioaktivno staklo na temelju ACP-a i na njih nasadili stanice periodontalnog ligamenta kako bi ispitali adheziju i proliferaciju *in vitro*. Kao kontrola u istraživanju korišteno je bioaktivno staklo bez prevlake. Uočeno je poboljšanje adhezije te proliferacije stanica na prevlaci pripremljenoj od ACP-a za razliku od neprevučene bioaktivnog stakla.



## 2.7. Silicij

Mnoga su istraživanja pokazala pozitivan učinak elemenata u tragovima u strukturi kalcij fosfatnih keramika, na formaciju koštanog tkiva [59]. Jedan od elemenata koji ima ključnu ulogu u metabolizmu koštanog tkiva je silicij. Carlisle [60] je u 70.-im godinama prošlog stoljeća istaknuo kako je silicij esencijalni element u tragovima za razvoj koštanog tkiva. Uočio je kako kokoši, čija je prehrana suplementirana silicijem, pokazuju brži skeletni razvitak te povećanje tjelesne mase 49 % brže od kokoši čija prehrana nije suplementirana. Carlisle [61] je također uočio važnu ulogu silicija u ECM-u. Glikozaminoglikani se međusobno umrežavaju pomoću silanolatne veze (R–O–Si–O–R) koja regulira njihovu funkciju te sprječava enzimatsku razgradnju. Uočavanjem navedenih povoljnih svojstava silicija, rastao je broj istraživanja usmjerenih na silicijem supstituirane kalcij fosfate. No, u posljednje vrijeme sve se više istražuju kalcijevi silikati za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva jer pokazuju bolju bioaktivnost u usporedbi sa stehiometrijskim HAp-om te  $\beta$ -TCP-om [62].

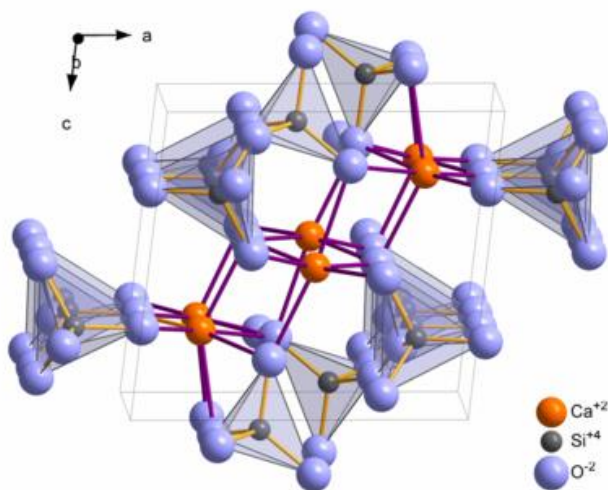
### 2.7.1. Kalcijevi silikati

Kalcijev silikat sol je ortosilikatne kiseline formule  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  te ima četiri polimorfne modifikacije;  $\gamma$  - stabilnu pri temperaturama do  $750\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\alpha$  i  $\alpha'$  - stabilne pri temperaturama iznad  $1450\text{ }^\circ\text{C}$  te metastabilni  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  [63]. Istraživanja su pokazala kako kalcij silikati imaju poželjan učinak na adheziju, proliferaciju te aktivnost osteoblasta. Lia i Changa [64] uočili su kako prisutnost kalcij silikata poboljšava vaskularizaciju tkiva utječući na faktore rasta, te je uočen utjecaj na aktivnost osteoklasta. Sun i suradnici [65] uočili su kako okosnice koje sadrže kalcij silikatnu fazu u doticaju s tjelesnim tekućinama otpuštaju  $\text{SiO}_4^{4-}$  ione u okolno tkivo koji reguliraju staničnu aktivnost.

#### 2.7.1.1. Volastonit

Volastonit ( $\text{CaSiO}_3$ ) je kalcij silikat koji se pojavljuje u tri polimorfne modifikacije; pseudovolastonit, volastonit 2M i volastonit TC. Pseudovolastonit je modifikacija stabilna pri

temperaturama iznad 1125 °C te pripada triklinskom kristalnom sustavu. Volastonit 2M i TC su modifikacije stabilne pri nižim temperaturama. TC označava pripadnost ove modifikacije triklinskom kristalnom sustavu s parametrima jedinične ćelije  $a = 7.0786 \text{ \AA}$ ,  $b = 7.3309 \text{ \AA}$ ,  $c = 7.938 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 103.4^\circ$ ,  $\beta = 95.30^\circ$ ,  $\gamma = 90.07^\circ$ . Struktura volastonita TC prikazana je na *Slici 6*. 2M označava pripadnost strukture monoklinskom kristalnom sustavu. Unatoč razlici u strukturi, volastonit 2M i TC imaju vrlo slična svojstva. Otkako je uočena bioaktivnost volastonita, njegova se svojstva i moguća primjena sve više istražuju. Uočeno je kako u dodiru s tjelesnim tekućinama uspješno potiče nastajanje HAp-a na površini okosnice. Ni i suradnici [66] ispitivali su utjecaj porozne okosnice na temelju volastonita te je uočeno kako potiče proliferaciju i staničnu aktivnost osteoblasta bolje nego li okosnica na temelju  $\beta$ -TCP-a. Uočeno je također da se volastonit ugradnjom u koštano tkivo kemijski dobro integrira u strukturu kosti te se zbog toga smatra obećavajućim kandidatom za uporabu u inženjerstvu koštanog tkiva [67].



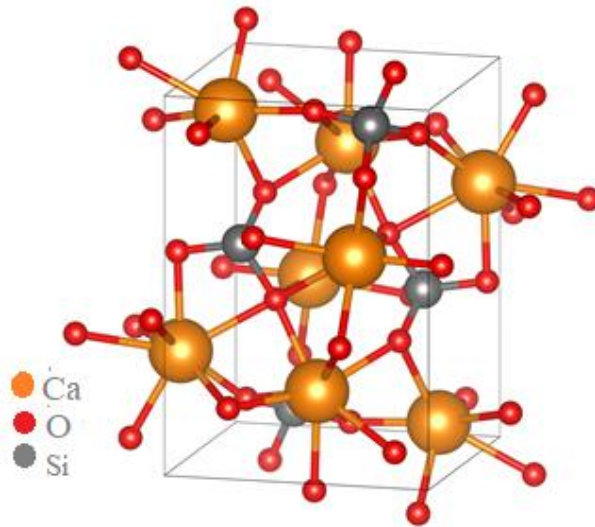
*Slika 6.* Prikaz strukture kristalne rešetke TC volastonita [68].

Xue i suradnici [69] pripravili su prevlake volastonita na titanu te ih ugradili u kosti pasa kako bi ispitali biološka svojstva *in vivo*. Nakon mjesec dana od ugradnje uočeno je novonastalo koštano tkivo na površini prevlake volastonita što je ukazalo na biokompatibilnost i osteoinduktivnost. Kontrola u istraživanju bile su okosnice izrađene od titana bez prevlake. Uočena je bolja integracija okosnice s volastonitnom prevlakom u koštano tkivo. Ge i suradnici [70] pripravili su okosnice na temelju volastonita te kompozita volastonita i HAp-a koje su ugradili na mjesto defekata kosti

lubanje štakora. Kod prve skupine štakora kojima je ugrađena volastonitna okosnica, nakon 6 tjedana od ugradnje, uočeno je nastajanje novog koštanog tkiva, ali u značajno manjoj količini u usporedbi s novonastalim koštanim tkivom štakora druge skupine kojima je ugrađen kompozit volastonita i HAp-a. 12 tjedana nakon ugradnje uočena je dobra integracija okosnice u obje skupine, ali je koštano tkivo nastalo na kompozitu volastonita i HAp-a bilo bolje vaskularizirano. Barbosa i suradnici [71] sintetizirali su visokoporoznu okosnicu na temelju volastonita i  $\beta$ -TCP-a te ga ugradili u desne koljenične kosti kunića kako bi se ispitala biokompatibilnost *in vivo*, dok su lijeve, netretirane koljenične kosti, poslužile kao kontrola. Nakon 30 i 60 dana od ugradnje uočena je integracija okosnice u koštano tkivo te nastajanje novog tkiva.

### 2.7.1.2. Larnit

Larnit ( $\beta$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) pripada skupini kalcijevih silikata te kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu s parametrima jedinične ćelije  $a = 6.76 \text{ \AA}$ ,  $b = 5.51 \text{ \AA}$ ,  $c = 9.31 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 94.51^\circ$ . Larnit je metastabilna faza od 725 °C do 1450 °C, te se pri nižim temperaturama fazno transformira u  $\alpha$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, a pri višim u  $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> [72]. Jedinična ćelija larnita prikazana je na *Slici 7*. Fu i suradnici [73] ugradnjom larnita u tumorsko tkivo kostiju miševa uočili su njegov potencijal za uporabu u fototermalnoj terapiji tumora, odnosno usporavanju proliferacije i odumiranju (apoptozi) tumorskih stanica. Ugrađena okosnica na temelju larnita nije pokazala toksičan učinak na zdrave koštane stanice, okosnica je resorbirala te potaknula nastajanje novog koštanog tkiva. Međutim, larnit se nadalje istražuje kako bi se ispitala pogodnost korištenja u liječenju tumora kostiju.



Slika 7. Prikaz strukture kristalne rešetke larnita [74].

Dai i suradnici [75] pripravili su visokoporoznu okosnicu na temelju larnitna pripravljenu sinteriranjem  $\text{CaCO}_3$  i silicij oksida ( $\text{SiO}_2$ ) pri  $1300\text{ }^\circ\text{C}$ . *In vitro* istraživanja provedena su na mezenhimskim matičnim stanicama koža, dok je *in vivo* istraživanje provedeno na miševima. Uočeno je kako su matične stanice proliferirale na uzorku materijala te je nakon 7 dana uočeno nastajanje HAp-a na površini okosnice. To ukazuje da je materijal biokompatibilan i potiče osteogenezu. Slične rezultate pokazalo je *in vivo* istraživanje Daia i suradnika. Nakon 9 tjedana od ugradnje okosnice, većina njegove mase se resorbirala te je potvrđena prisutnost vlakana kolagena. Osim toga, dobiveni visokoporozni materijal pokazao je mehanička svojstva slična onima prirodnog koštanog tkiva. Zhao i suradnici [76] sintetizirali su larnitni injektabilni cement za popunjavanje koštanih defekata s potencijalnim utjecajem na regeneraciju kosti, kako bi ispitali njegovu *in vitro* bioaktivnost. Na dobiveni cement nasadene su stanice fibroblasta te promatrane tijekom 28 dana. Uočena je dobra adhezija stanica, resorpcija materijala te nastajanje karbonatom supstituiranog HAp-a. Ionski produkti resorpcije,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{SiO}_4^{4-}$ , potaknuli su proliferaciju stanica te je njihova koncentracija u mediju rasla s vremenom izloženosti.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

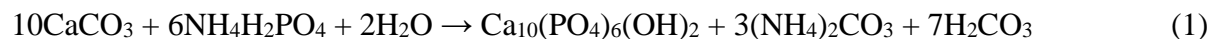
#### 3.1. Materijali

Kako bi se pripremila visokoporozna kalcij silikatna keramika u ovom radu, korišteni su:

- (3-aminopropil)trietoksisilan,  $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, SAD)
- Silicij (Si, NIST, SAD)
- Sipina kost
- Amonijev dihidrogenfosfat ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 99 %, Fisher Scientific, SAD)

#### 3.2. Priprava hidroksiapatita iz sipe hidrotermalnom metodom

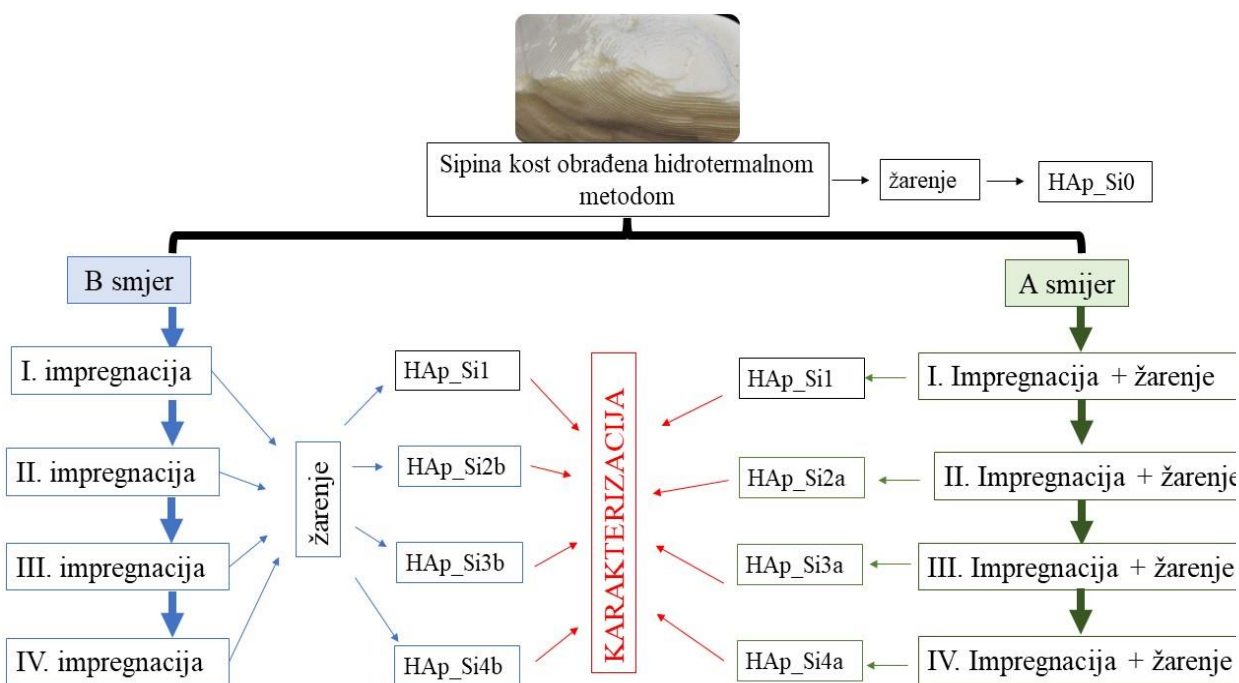
Sipina kost (aragonit,  $\text{CaCO}_3$ ) korištena je kao prekursor  $\text{Ca}^{2+}$  iona za sintezu visokoporoznog HAp-a hidrotermalnom metodom [36]. Suha kost sipe (*Sepia officinalis*) iz Jadranskog mora izrezana je u komade veličine približno  $2\text{ cm}^3$  te obrađena vodenom otopinom natrijevog hipoklorita ( $\text{NaClO}$ , 13% aktivnog klora, Gram-mol) pri sobnoj temperaturi tijekom 12 h kako bi se uklonila organska komponenta. Nakon toga, sipina kost ispirana je kipućom demineraliziranom vodom te sušena pri  $110\text{ }^\circ\text{C}$  24 h. Obrađena sipina kost i 15 mL vodena otopina amonijevog dihidrogenfosfata ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) koncentracije za postizanje molarnog omjera  $\text{Ca/P} = 1,67$  stavljeni su u teflonom obloženu čeličnu tlačnu posudu. Hidrotermalna sinteza se vodila pri  $200\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 72 h te je tlak u posudi iznosio je 18 bar. Dobiveni HAp ispiran je kipućom demineraliziranom vodom te sušen pri  $105\text{ }^\circ\text{C}$ . Sinteza HAp-a može se prikazati prema jednadžbi 1:



#### 3.3. Impregnacija (3-aminopropil)trietoksisilanom

Visokoporozni uzorci HAp-a pripremljeni iz sipine kosti impregnirani su (3-aminopropil)trietoksisilanom (APTES), kao izvorom silicija, pod vakuumom 20 minuta. Impregnirani uzorci su sušeni pri  $110\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 24 h te potom toplinski obrađeni pri  $1000\text{ }^\circ\text{C}$

tijekom 3 h. Impregnacija uzoraka provedena je na dva načina: (A) uzorci su se sušili pri 110 °C (24 h) i toplinski obradili pri 1000 °C (3 h) nakon svake impregnacije koje su ponavljane od 1 do 4 puta i (B) uzastopnom impregnacijom uzoraka od 1 do 4 puta, nakon čega su se uzorci sušili pri 110 °C (24 h) i toplinski obradili pri 1000 °C (3 h) (Slika 7). Kao kontrola korišten je uzorak HAp-a pripremljen hidrotermalnom metodom iz sipine kosti koji je toplinski obrađen pri 1000 °C. Nakon toplinske obrade uzorci su karakterizirani FTIR spektroskopijom, XRD analizom, Rietveldovom metodom utočnjavanja te SEM mikroskopijom.



Slika 7. Shematski prikaz tijeka eksperimentalnog dijela rada.

### 3.4. Karakterizacija materijala

#### 3.4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Pripravljene uzorci karakterizirani infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Korišten je ATR-FTIR Brucker Vertex 70 spektrometar s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani u apsorpcijskom režimu u rasponu od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  32 puta s rezolucijom 4  $\text{cm}^{-1}$  te pri temperaturi od 20 °C.

#### 3.4.2. Rendgenska difrakcijska analiza

Mineralni sastav sintetiziranih uzoraka određen je rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD), pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000 s  $\text{CuK}\alpha$  (1,5406 Å) zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva 20°–60° i brzinom snimanja 0,02°/3s. Kako bi se omogućilo određivanje udjela amorfnе faze, u praške pripremljenih uzoraka umiješano je 5,0, wt% silicija koji je korišten kao standard.

#### 3.4.3. Rietveldova metoda utočnjavanja

Pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0 određeni su udjeli pojedinih kristalnih te amorfnе faze Rietveldovom metodom utočnjavanja. Polazni strukturni modeli koji su služili za izračun udjela preuzeti su iz radova kako je navedeno u *Tablici 1*.

*Tablica 1.* Polazni strukturni modeli korišteni za određivanje kvantitativnog faznog sastava pripremljenih uzoraka.

Hidroksiapatit	Veselinovic i sur. [77]
Vitlokit	Tait i sur. [78]
$\alpha$ -trikalcijev fosfat	Mathew i sur. [79]
Larnit	Tsurumi i suradnika [80]
Kalcij oksid	Primak i sur. [81]
Volastonit	Tsurumi i suradnika [80]

#### **3.4.4. Elektronska pretražna mikroskopija**

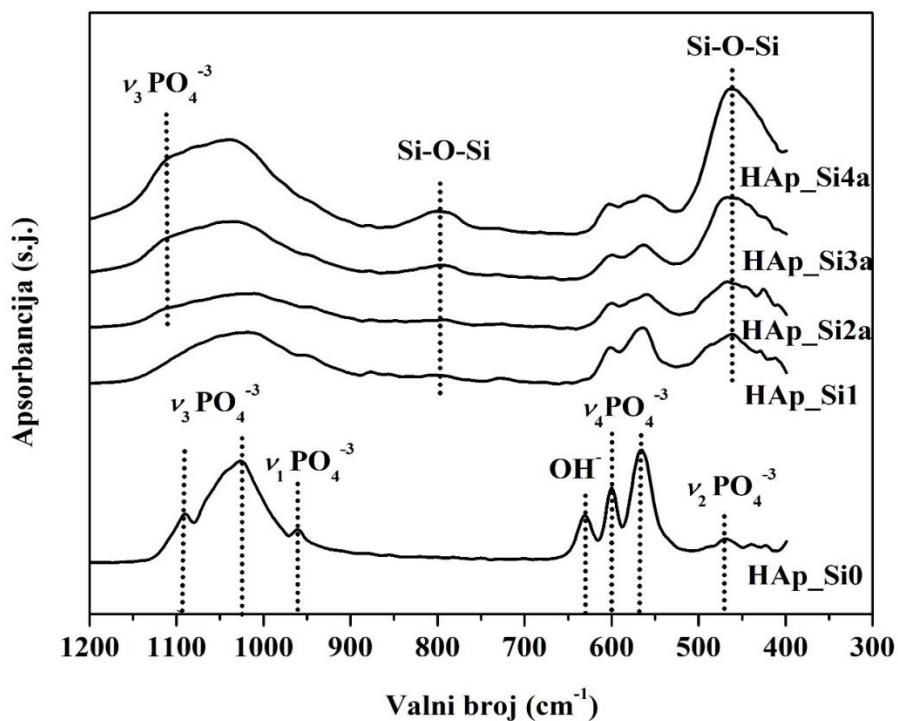
Morfologija pripremljenih uzoraka karakterizirana je pretražnom elektronskom mikroskopijom pomoću mikroskopa TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 kV. Uzorci su napareni zlatom i paladijem u vremenu od 180 sekundi neposredno prije karakterizacije.



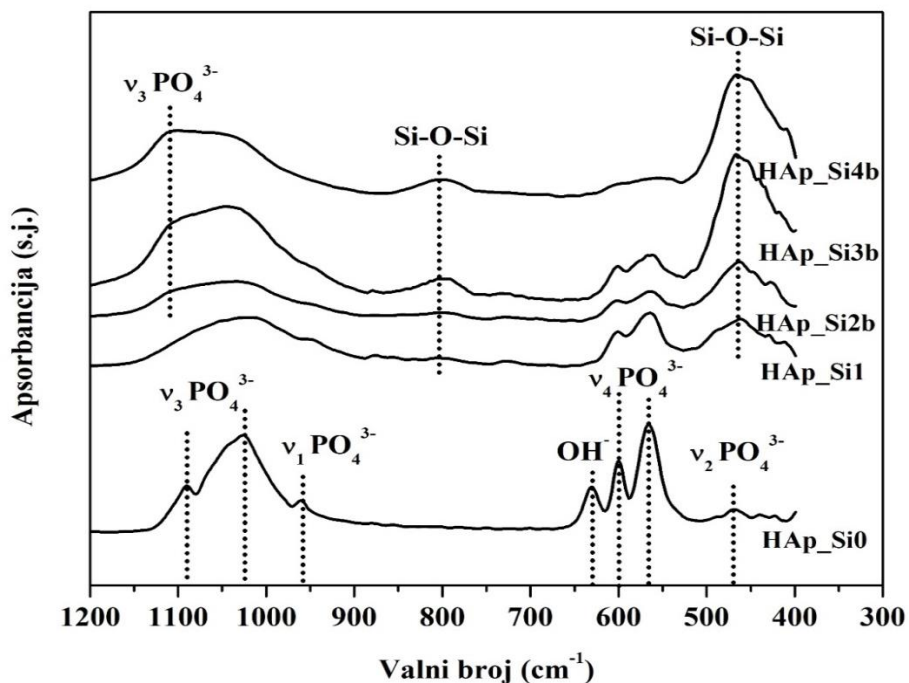
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Pripremljeni uzorci smjera A (HAp\_Si0, HAp\_Si1, HAp\_Si2a, HAp\_Si3a i HAp\_Si4a) i B (HAp\_Si0, HAp\_Si1, HAp\_Si2b, HAp\_Si3b i HAp\_Si4b) karakterizirani su FTIR spektroskopijom te su rezultati prikazani na *slici 9* (A smjer) i *10* (B smjer).



Slika 9. FTIR spektri pripremljenih uzoraka smjera A.



Slika 10. FTIR spektri pripravljenih uzoraka smjera B.

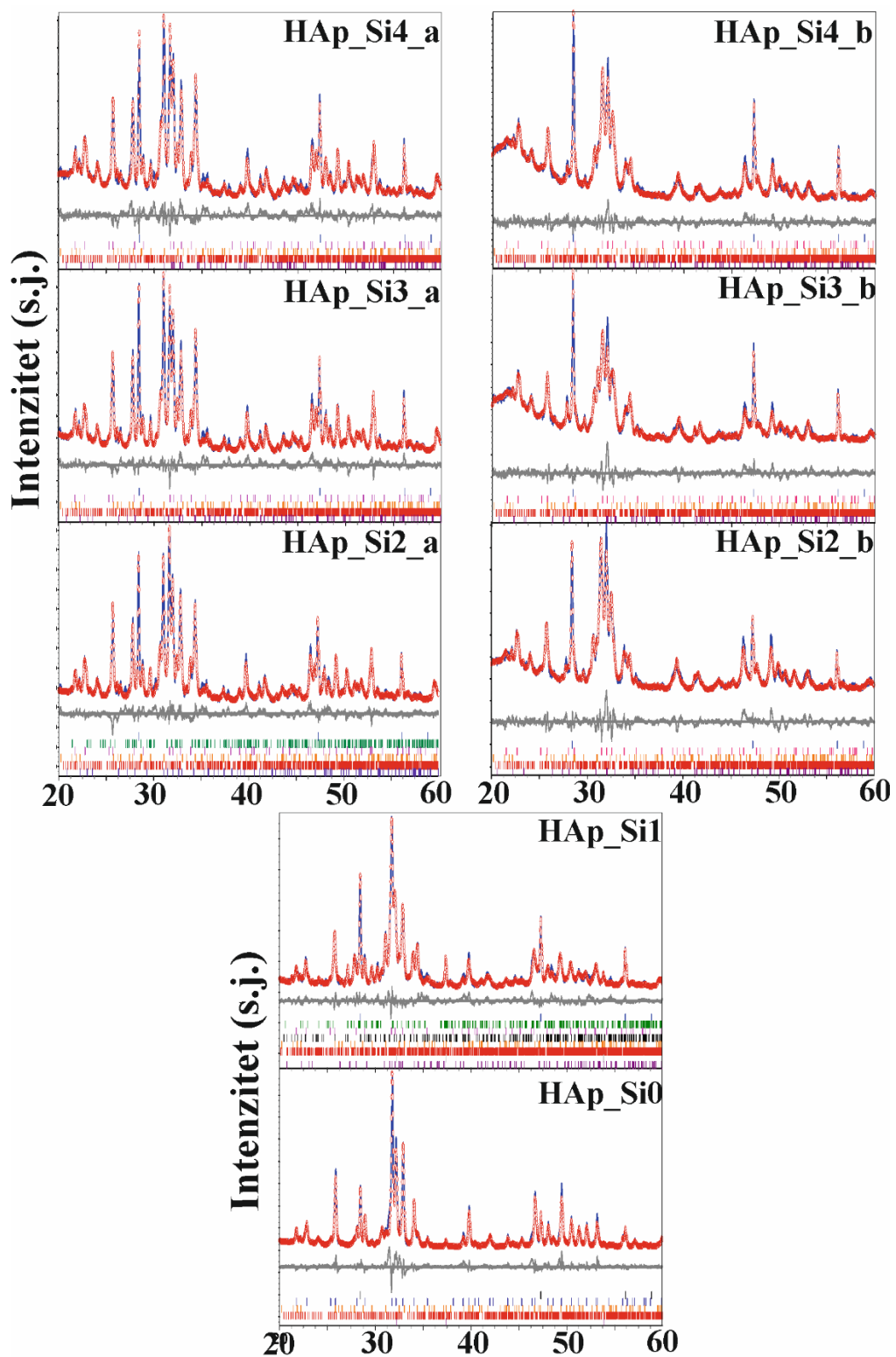
Na spektru uzorka HAp\_Si0 mogu se uočiti apsorpcijske vrpce karakteristične za  $\text{PO}_4^{3-}$  skupinu HAp-a. Apсорpcijske vrpce pri 1086 i 1022  $\text{cm}^{-1}$  pripisuju se asimetričnom istezanju ( $\nu_3$ ) P–O veze, dok se vrpce pri 963  $\text{cm}^{-1}$  pripisuje simetričnom istezanju ( $\nu_1$ ) P–O veze. Simetrično istezanje O–P–O veza ( $\nu_4$ ) uočava se iz apсорpcijskih vrpce pri 598 i 563  $\text{cm}^{-1}$ , dok se vibracije ( $\nu_2$ ) pripisuju vrpceama pri 473  $\text{cm}^{-1}$  [29]. Osim navedenih, mogu se uočiti i apсорpcijske vrpce pri 626  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju savijanju veze  $\text{OH}^-$  skupine HAp-a [82]. Na spektrima impregniranih uzoraka (HAp\_Si1, HAp\_Si2a, HAp\_Si3a, HAp\_Si4a, HAp\_Si2b, HAp\_Si3b, HAp\_Si4b) uočavaju se apсорpcijske vrpce karakteristične za veze Si–O–Si pri valnim brojevima 472 i 798  $\text{cm}^{-1}$  [82] te ( $\nu_3$ ) apсорpcijske vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  pri 1086  $\text{cm}^{-1}$ . Dodatkom silicija, odnosno impregnacijom APTES-om, dolazi do smanjenja intenziteta maksimuma vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine. Na spektrima impregniranih uzoraka može se uočiti izostanak apсорpcijskih vrpce  $\text{OH}^-$  skupine, što upućuje na smanjenje udjela HAp-a u uzorcima te se može pretpostaviti da nastaju druge kalcij fosfatne faze stabilne pri 1000 °C. Apсорpcijske vrpce pri 472 i 798  $\text{cm}^{-1}$ , koje pripadaju amorfnoj mreži (Si–O–Si veze), imaju sve veći intenzitet s povećanjem broja impregnacija. Može se pretpostaviti da se daljnjim impregnacijama, APTES veže kao amorfni sloj na površini uzorka. Izostanak karakterističnih vrpce

CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> skupine koja se javlja kod uzoraka HAp-a pripremljenog iz sipine kosti hidrotermalnom sintezom rezultat je toplinske obrade uzoraka pri 1000 °C.

#### 4.2. Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka

Utjecaj APTES-a na mineraloški sastav pripremljenih uzoraka određen je pomoću XRD analize, dok je kvantitativni fazni sastav određen dodatkom 5 wt% silicija (ICDD 27-1402) kao standarda pomoću Rietveldove metode utočnjavanja dobivenih difraktograma prikazanih na *Slici 8*. Difraktogram uzorka HAp\_Si0 pokazuje karakteristične maksimume za hidroksiapatit (ICDD 09-432), vitlokit (Ca<sub>9</sub>Mg(HPO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>, ICDD 70-2064), α-trikalcij fosfat (ICDD 09-348) te kalcij oksid (ICDD 37-1497). Na difraktogramima impregniranih uzoraka uz već navedene karakteristične maksimume kristalnih faza dodatno se pojavljuju maksimumi karakteristični za dikalcij silikat (Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>), (ICDD 05-0586), volastonit (CaSiO<sub>3</sub>), (ICDD 42-550) i larnit (β-Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>), (ICDD 9-351) kao rezultat dodatka APTES-a. Udjeli navedenih faza u uzorcima određeni su pomoću Rietveldove metode utočnjavanja i prikazani u *Tablici 2. i 3.*

Na grafičkom prikazu Rietveldove metode utočnjavanja dobivenih difraktograma eksperimentalno dobiveni podaci prikazani su crveno, a računski, koji predstavljaju najbolje moguće slaganje profila, plavo. Razlika između računskog i eksperimentalno dobivenog difraktograma prikazana je krivuljom ispod difraktograma ( $R_{wp} < 10 \%$ ,  $R_{exp} < 3 \%$ ). Na dnu grafičkih prikaza vidljivi su markeri koji označavaju ICDD (*engl.* International centre for diffraction data) podatke HAp-a, vitlokita, α-TCP-a, β-Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, CaSiO<sub>3</sub> i CaO koji odgovaraju modelima navedenim u *Tablici 1.*



Slika 8. Rietveldova metoda utočnjavanja difraktograma pripremljenih uzoraka smjera A i B.

Tablica 2. Kvantitativni fazni sastav (wt%) uzoraka smjera A određen pomoću Rietveldove metode utočnjavanja dobivenih difraktograma.

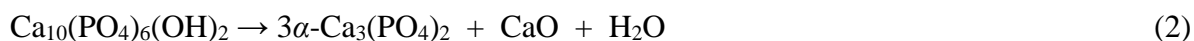
	HAp_Si_0	HAp_Si_1	HAp_Si_2a	HAp_Si_3a	HAp_Si_4a
HAp	73,41	42,94	28,88	24,29	24,34
Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	-	2,49	-	-	-
Vitlokit	8,10	16,41	21,01	24,03	23,71
CaSiO <sub>3</sub>	-	4,76	0,81	-	-
$\alpha$ -TCP	11,92	3,81	11,17	10,11	14,04
$\beta$ -Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	-	0,78	2,80	2,64	2,96
CaO	0,61	1,10	-	-	-
Amorfna faza	5,96	27,98	35,33	38,93	34,96

Tablica 3. Kvantitativni fazni sastav (wt%) uzoraka smjera B određen pomoću Rietveldove metode utočnjavanja dobivenih difraktograma.

	HAp_Si_0	HAp_Si_1	HAp_Si_2b	HAp_Si_3b	HAp_Si_4b
HAp	73,41	42,94	50,01	31,08	33,34
Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	-	2,49	-	-	-
Vitlokit	8,10	16,41	2,99	7,37	3,13
CaSiO <sub>3</sub>	-	4,76	-	-	-
$\alpha$ -TCP	11,92	3,81	11,97	10,71	8,99
$\beta$ -Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	-	0,78	4,31	2,43	3,19
CaO	0,61	1,10	-	-	-
Amorfna faza	5,96	27,98	30,73	48,51	51,36

Kvantitativnom faznom analizom dobiveni su udjeli faza u uzorku HAp\_Si0. Najveći udio u masi uzorka pripada HAp-u te iznosi 73 %, dok su druge faze prisutne u niskim udjelima. Prema radu Milovac i suradnika [36] primjenom hidrotermalne metode aragonit je u potpunosti preveden u

HAp bez zaostajanja prekursora  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{PO}_4^{3-}$  iona. Ostale kristalne faze u uzorku (vitlokit,  $\alpha$ -TCP, CaO) posljedica su toplinske obrade, odnosno konverzije dijela HAp-a u  $\alpha$ -TCP i CaO pri temperaturi od 1000 °C. Cihlar i suradnici [83] proučavali su kinetiku toplinskog raspada HAp-a u  $\alpha$ -TCP i CaO. Uočili su da se konverzija odvija u dva stupnja pri čemu se ukupna reakcija može prikazati prema jednadžbi 2:



Cihlar i suradnici opisuju navedenu reakciju pri višim temperaturama od korištene u ovom radu, no ističu kako temperatura konverzije može varirati ovisno o kemijskoj čistoći HAp-a. Nadalje, prisutna faza u uzorku HAp\_Si0 je vitlokit, kalcijev fosfat koji sadrži magnezij. Prisutnost magnezija, a time i vitlokita, može se objasniti time što je kao prekursor za sintezu uzoraka korišten materijal iz biogenog izvora (sipina kost) koji sadrži metalne ione u tragovima [17]. U istraživanju Ressler i suradnika [84] ispitan je kemijski sastav kalcijevih fosfata dobivenih iz sipine kosti pripremljenih metodom precipitacije, te je potvrđena prisutnost stroncija, natrija i magnezija.

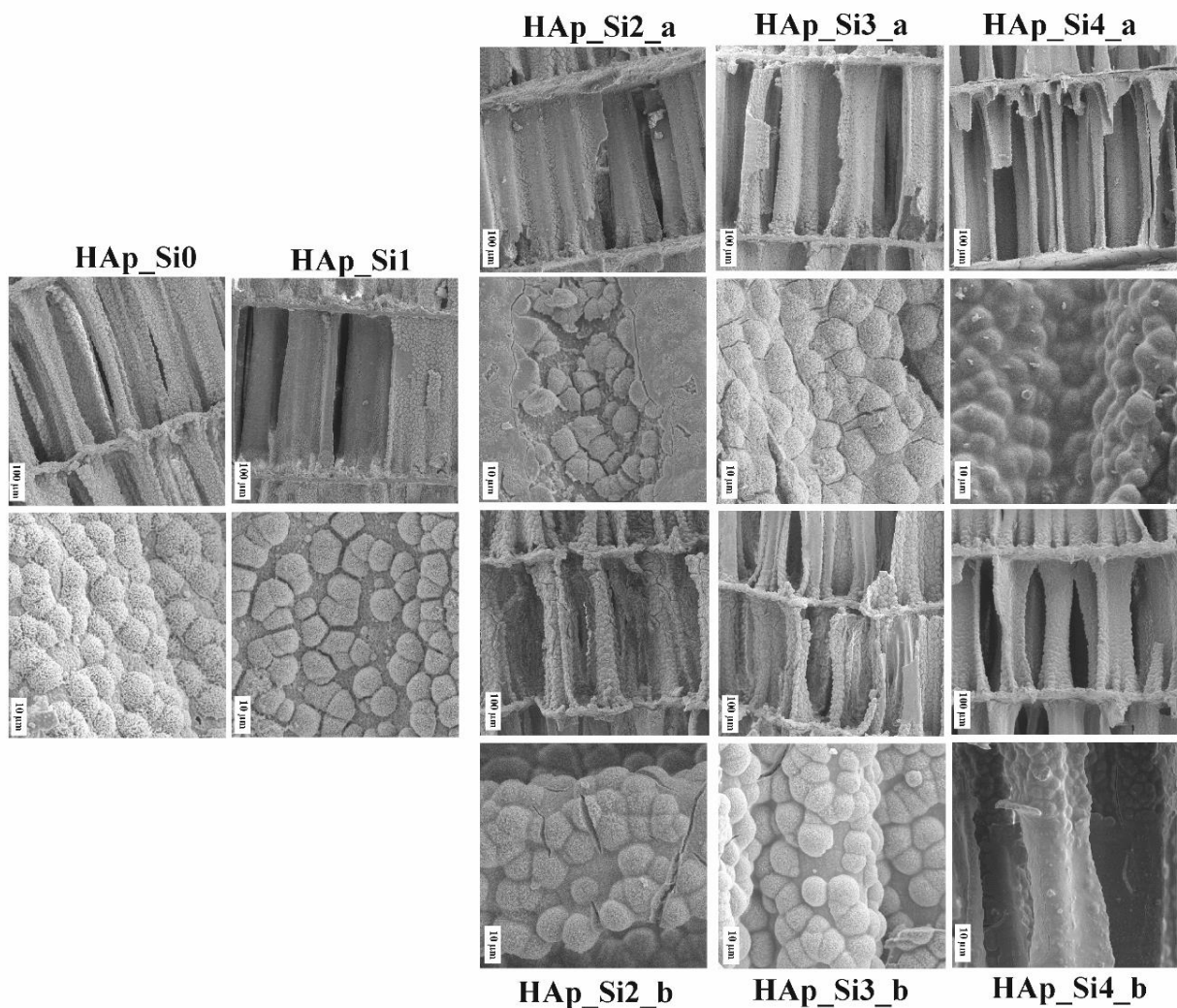
Na difraktogramima impregniranih uzoraka vidljivi su karakteristični maksimumi HAp-a, vitlokita,  $\alpha$ -TCP-a i CaO. Međutim, pojavljuju se karakteristični maksimumi  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ,  $\text{CaSiO}_3$  i  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ . Dakle, impregnacija APTES-om kao izvorom silicija te toplinska obrada uzrokuju nastajanje novih kalcij silikatnih kristalnih faza. Iz kvantitativnog faznog sastava dobivenog Rietveldovom metodom utočnjavanja uočava se porast masenog udjela  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  od HAp\_Si1 do HAp\_Si2a i HAp\_Si2b. Daljnjim impregnacijama ne dolazi do značajnog povećanja masenog udjela  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ , te se može uočiti izostanak karakterističnih maksimuma volastonita. To ukazuje da naknadne impregnacije nemaju utjecaj na porast masenog udjela kalcij silikatnih faza u uzorcima, jer APTES ne reagira s kalcijem. Može se pretpostaviti da prvom i drugom impregnacijom nastali amorfni sloj umreženog APTES-a na uzorcima prekriva površinu i onemogućuje kontakt molekula APTES-a i kalcija u uzorcima. Utrošeni APTES se tada koncentrira na površini uzoraka tvoreći sve deblji amorfni sloj, koji je potvrđen FTIR spektroskopijom, to jest pojavom karakterističnih apsorpcijskih vrpca Si–O–Si veza [85]. Povećanje masenog udjela amornog sloja povećanjem broja impregnacija potvrđeno je kvantitativnom analizom pomoću Rietveldove metode utočnjavanja. Navedeni trend porasta udjela amorfne faze je uočljiv u oba smjera pripreme uzoraka, no izraženiji je u slučaju smjera B, te je amorfna faza dominantna u uzorcima HAp\_Si3b i HAp\_Si4b. Može se pretpostaviti da je uzrok

tome jedna toplinska obrada uzoraka smjera B. Uočava se kako povećanjem broja provedenih impregnacija dolazi do smanjenja masenog udjela HAp-a. Navedeni trend uočljiv je u oba smjera istraživanja, no uzorci smjera B imaju veći udio HAp-a od uzoraka smjera A. Navedena se pojava može objasniti uzastopnom toplinskom obradom uzoraka smjera A prilikom koje dolazi do konverzije dijela HAp-a u  $\alpha$ -TCP i vitlokit. Kod uzoraka smjera A, povećanjem broja impregnacija i toplinske obrade dolazi do porasta udjela vitlokita, dok udjeli vitlokita u uzorcima smjera B imaju niže vrijednosti i nepravilan trend. Udjeli  $\alpha$ -TCP-a imaju nepravilan trend u oba smjera istraživanja, no vrijednosti se ne mijenjaju značajno, osim u slučaju uzorka HAp-Si1 kada vrijednost poprima minimum.

U novije se vrijeme sve više istražuju višefazni kalcij fosfatni sustavi za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Ne razlikuju se značajno od jednofaznih sustava po fizikalnim i mehaničkim svojstvima, no razlikuju se po brzini resorpcije *in vivo*. Stoga se brzina resorpcije okosnice može prilagoditi kombinacijom različitih faza i njihovih udjela [86]. HAp je, kao glavna mineralna komponenta kosti, poželjna faza jer je biokompatibilan, kemijski i strukturno odgovara prirodnoj kosti te potiče osteogenezu [38]. Nadalje, pozitivna svojstva na regeneraciju koštanog tkiva  $\alpha$ -TCP-a su višestruka pa se već neko vrijeme koristi u stomatologiji, maksilofacijalnoj kirurgiji te kao cement za ispunu defekata kosti [39]. Vitlokit je drugi najčešći mineral koštanog tkiva, biokompatibilan je te potiče osteogenezu, dok prisustvo magnezija u njegovoj strukturi igra važnu ulogu u nastajanju novog koštanog tkiva, posebno u ranom stadiju [29]. Silicij je prisutan u ECM, važan je u procesu osteogeneze te se sve više istražuje za uporabu u tkivnom inženjerstvu kako bi potaknuo regeneraciju tkiva. Larnit, mineral koji u svom sastavu sadrži silicij, pokazuje biokompatibilnost *in vivo* i *in vitro* te potiče nastajanje novog koštanog tkiva. Stoga smatra poželjnom fazom u pripravi okosnica za potencijalne primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Iako kalcij silikatne faze pokazuju pojedina željena svojstva, potrebno je provesti više istraživanja kako bi se ispitaio utjecaj na proliferaciju i diferencijaciju te mineralizaciju ECM-e. [87].

### **4.3. Elektronska pretražna mikroskopija**

Utjecaj toplinske obrade te APTES-a na mikrostrukturu pripremljenih uzoraka analiziran je pomoću elektronske pretražne mikroskopije (SEM-a). Dobiveni mikrogrami prikazani su na *Slici 11*.



Slika 11. SEM mikrografi pripravljene uzoraka i kontrolnog uzorka. Skala 100 i 10 µm.

Strukturu kosti sipe detaljno su opisali Birchall i suradnici [88] ukazujući na prisutnost dva dijela; deblji koštani zid vanjskog dijela koji služi kao štiti, te unutrašnji dio s horizontalnom lamelarnom strukturom koju povezuju vertikalni stupići. Od interesa za tkivno inženjerstvo je unutrašnji dio zbog visokoporozne strukture te se taj dio sipine kosti koristio za pripremu HAp-a pomoću hidrotermalne metode. Na mikrografiji uzorka HAp\_Si0, mogu se uočiti lamele koje povezuju stupići te to ukazuje da je struktura sipine kosti očuvana nakon provedbe hidrotermalne metode. Upravo prisutnost visokoporozne strukture s međusobno povezanim porama koje čine lamele i stupići od ključne su važnosti za stanice, njihovu migraciju kroz materijal, difuziju kisika i hranjivih tvari te odvod staničnih metabolita i produkata resorpcije okosnice. Visokoporozna



struktura ključna je za vaskularizaciju novonastalog tkiva unutar okosnice [9]. Površina stupića i lamela neobrađene sipine kosti je uglavnom glatka do valovita, dok je površina sipine kosti prevedene u HAp strukturirana kristalima HAp-a čime raste specifična površina materijala bez značajne promjene veličine pora [9,36].

SEM mikrografije pripremljenih uzoraka ukazuju kako impregnacija APTES-om utječe na morfologiju uzoraka. Uočava se da je mikroporozna struktura sipine kosti ostala očuvana nakon impregnacije, no vidljive pukotine i deformacije u strukturi koje su posljedica mikronaprezanja u materijalu tijekom toplinske obrade. Kristali HAp-a na površini materijala kristalizirali su u obliku prepoznatljive morfologije cvjetače (*engl. cauliflower morphology*). Može se uočiti kako se porastom broja impregnacija smanjuje gustoća kristala HAp-a u obliku cvjetače, što se slaže s prethodno opisanom kvantitativnom faznom analizom dobivenom Rietveldovom metodom utočnjavanja. U istom smjeru se povećava debljina amorfnog sloja prevučenog preko kristalne faze na površini uzoraka, značajnije za smjer B, što se slaže s rezultatima kvantitativne fazne analize.

Pore se prema veličini mogu podijeliti u dvije skupine; mikropore ( $< 100 \mu\text{m}$ ) i makropore ( $> 100 \mu\text{m}$ ). Mikro- i makroporoznost su važne za resorpciju okosnice te osteokonduktivnost. Istraživanja su pokazala kako optimalna veličina pora okosnice *in vivo* za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva iznosi od 200 do 650  $\mu\text{m}$  [89, 90]. U istraživanju Rogine i suradnika [91] u kojemu je ispitana mikrostruktura sipine kosti obrađene hidrotermalnom metodom, navodi se raspon veličine pora od 200 do 300  $\mu\text{m}$ , pri čemu širina pora iznosi između 40 i 60  $\mu\text{m}$ . Stoga se može tvrditi da visokoporozni uzorci HAp-a, pripremljeni hidrotermalnom metodom iz sipine kosti, imaju zadovoljavajuću veličinu pora za potencijalne primjene u inženjerstvu koštanog tkiva.

## ZAKLJUČAK

**Visokoporozni uzorci hidroksiapatita** pripremljeni su iz biogenog izvora (sipina kost) pomoću hidrotermalne metode. Tako pripremljeni uzorci hidroksiapatita impregnirani su (3-aminopropil)trietoksisilanom kao izvorom silicija te toplinski obrađeni pri 1000 °C i karakterizirani pomoću rendgenske difrakcijske analize, infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, elektronske pretražne mikroskopije te je na dobivenim difraktogramima provedena Rietveldova metoda utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

-Potvrđena je konverzija biogenog prekursora u hidroksiapatit pri čemu je očuvana mikroporozna struktura sipine kosti, što je potvrđeno SEM mikrografijama.

-Impregnacijom (3-aminopropil)trietoksisilanom te toplinskom obradom nastale su nove kalcij silikatne faze (larnit i volastonit) te je uočeno nastajanje amorfnog sloja na površini uzoraka.

-Uočeno je kako uzastopne impregnacije nemaju značajan utjecaj na povećanje masenog udjela kalcij silikatnih faza, već dolazi do umrežavanja (3-aminopropil)trietoksisilana na površini uzorka.

U daljnjim istraživanjima moguće je ispitati mehanička svojstva pripremljenih uzoraka, *in vitro* citotoksičnost pomoću ljudskih matičnih stanica, utjecaj pripremljenih višefaznih kalcij fosfatnih i kalcij silikatnih sustava na proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica u osteoblaste te ekspresiju gena karakterističnih za nastajanje novog koštanog tkiva.

## POPIS SIMBOLA

ACP- amorfni kalcij fosfat (ACP, *engl. amorphous calcium phosphate*)

ALP- alkalna fosfataza (ALP, *engl. alkaline phosphatase*)

APTES- (3-aminopropil)trietoksisilan

ECM- izvanstanična matrica (ECM, *engl. extracellular matrix*)

FTIR- Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR, *engl. Fourier-transform infrared spectroscopy*)

HAp- hidroksiapatit

ICDD- međunarodni kristalografska baza podataka (od *eng. International centre for diffraction data*)

SBF- simulirane tjelesne tekućine (SBF, *engl. simulated body fluid*)

SEM- elektronska pretražna mikroskopija (SEM, *engl. scanning electron microscopy*)

TCP- trikalcij fosfat (TCP, *engl. tricalcium phosphate*)

$\alpha$ -TCP- alfa- trikalcij fosfati (TCP, *engl. tricalcium phosphate*)

$\beta$ -TCP- beta-trikalcij fosfati (TCP, *engl. tricalcium phosphate*)

XRD- rendgenska difrakcijska analiza (XRD, *engl. X-ray diffraction*).

## LITERATURA

- [1] J.P. Vacanti, R. Langer, Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *The Lancet*, 354 (1999), 32-34
- [2] A. R. Amini, C. T. Laurencin, S. P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Crit. Rev. Biomed Eng.*, 40 (2012), 363–408
- [3] J.P. Vacanti, R. Langer, Tissue engineering: The obstacles to building new organs from cells and synthetic polymers are daunting but surmountable, *Scientific American*, 280 (1999), 86-89
- [4] M. Ivanković, L. Bauer, A. Ressler, A. Rogina, M. Antunović, H. Ivanković, Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva, *Kem. Ind.*, 68 (2019) 437–447
- [5] L. Đudarić, S. Zoričić Cvek, O. Cvijanović, A. Fužinac-Smojver, T. Čelić, D. Martinović, Osnove biologije koštanog tkiva, *Medicina fluminensis*, 50 2014, 21-38
- [6] G. Fielding, S. Bose, SiO<sub>2</sub> and ZnO Dopants in 3D Printed TCP Scaffolds Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in vivo, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 9137-9148
- [7] J.C. Reichert, D.W. Hutmacher, Bone Tissue Engineering. In: Pallua N., Suscheck C. (ur.) *Tissue Engineering*, Springer, Berlin, Heidelberg (2011), 431-456
- [8] D. L. Kusindarta, H. Wihadmadyatami, The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration, Hussein Abdel hay El-Sayed Kaoud (ur.), *Tissue Regeneration*, IntechOpen (2018) 65-75
- [9] F. J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials today*, 14 (2011) 88-95
- [10] N. Kamboj, M. Aghayan, C. S. Rodrigo-Vazquez, M. A. Rodriguez, I. Hussainova, Novel silicone-wollastonite based scaffolds for bone tissue engineering produced by selective laser melting, *Ceramics International*, 46 (2020) 1-9

- [11] C.R. Black, V. Goriainov, D.Gibbs, J. Kanczler, R.S.Tare, R.O.Oreffo, Bone Tissue Engineering, *Curr. Mol. Biol. Rep.*, 3 (2015) 132-140
- [12] P. Ouyang, H. Dong, X. He, X. Cai, Y. Wang, J. Li, H. Li, Z. Jin, Hydromechanical mechanism behind the effect of pore size of porous titanium scaffolds on osteoblast response and bone ingrowth, *Materials & Design*, 183 (2019) 108-151.
- [13] H. M. Frost, Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians, *Angle Orthod.*, 64 (1994) 175-188.
- [14] S.A. Clarke, P. Walsh ,C.A.Maggs, F. Buchanan, Designs from the deep: marine organisms for bone tissue engineering, *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 610-617
- [15] R. Ewers, Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results, *J. Oral Maxillofac Surg.* 63 (2005) 1712-1723
- [16] A. Ressler, A. Gudelj, K. Zadro, M. Antunović, M. Cvetnić, M. Ivanković, H. Ivanković, From Bio-waste to Bone Substitute: Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite and Its Use in Chitosan-based Composite Scaffold Preparation, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 34 (2020) 59–71.
- [17] D. Milovac, G. Gallego Ferrer, M. Ivankovic, H. Ivankovic, PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 34 (2014) 437-445.
- [18] C. T. Tran,C. Gargiulo, H. D. Thao, H. M. Tuan, L. Filgueira, D. Strong, Culture and differentiation of osteoblasts on coral scaffold from human bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Tiss Bank.* 12 (2011) 247-261
- [19] V. Čadež, Nove metode priprave bioimplantata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka, *Med Vjesn.* 43 (2011) 91-101
- [20] E. Truumees, H. N. Herkowitz, Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery, *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*, 12 (1999) 77-88.
- [21] C. Schopper, D. Moser, A. Sabbas, G. Lagogiannis, E. Spassova, F. König, K. Donath, R. Ewers, The fluorohydroxyapatite (FHA) FRIOS Algipore is a suitable biomaterial for the

reconstruction of severely atrophic human maxillae, *Clinical oral implants research*, 14 (2003) 743-749.

[22] T. Laonapakul, R. Sutthi, P. Chaikool, S. Talangkun, A. Boonma, P. Chindaprasirt, Calcium phosphate powders synthesized from  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{CaO}$  of natural origin using mechanical activation in different media combined with solid-state interaction, *Materials Science and Engineering: C*, 118 (2021) 1-11.

[23] O. Gunduz, Y. M. Sahin, S. Agathopoulos, B. Ben-Nissan, F. N. Oktar, A New Method for Fabrication of Nanohydroxyapatite and TCP from the Sea Snail *Cerithium vulgatum*, *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014) 1-6.

[24] D. Ağaogulları, D. Kel, Bioceramic Production from Sea Urchins, *Acta Physica Polonica A*, 121 (2012) 23-25.

[25] R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, Dense hydroxyapatite, Larry L Hench (ur.) *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific Publishing Company, (1993) 139-180

[26] B. T. Wopenka, J. D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Materials Science and Engineering* 25 (2005) 131–143

[27] <https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/> (Pristup 7.8.2021.)

[28] S. Mondal, S. V. Dorozhkin, U. Pal, Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10 (2018) 11-25

[29] L. Bauer, M. Antunovic, A. Rogina, M. Ivankovic, H. Ivanković, Bone-mimetic porous hydroxyapatite/whitlockite scaffolds: preparation, characterization and interactions with human mesenchymal stem cells, *Materials for life sciences*, 5 (2021) 3947-3969

[30] S. H. Chewung, M. H. Haak, Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vivo model on biocompatibility study, *Biomaterials* 10 (1989) 63-67.

[31] P. N. Galgut, I. M. Waite, S. M. Tinkler, Histological investigation of the tissue response to hydroxyapatite used as an implant material in periodontal treatment, *Clin Mater.* 6 (1990) 105-121.

- [32] P. Habibovic, M. C. Kruyt, M. V. Juhl, S. Clyens, R. Martinetti, L. Dolcini, N. Theilgaard, C. A. van Blitterswijk, Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes, *J Orthop Res.* 26 (2008) 1363-1370.
- [33] V. S. Kattimani, S. Kondaka, K. P. Lingamaneni, Hydroxyapatite-Past, Present, and Future in Bone Regeneration, *Bone and Tissue Regeneration Insights* 7 (2016) 9-19.
- [34] P. Ducheyne, S. Radin, L. King, The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior, *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 25-34.
- [35] M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591-7621.
- [36] D. Milovac, G. G. Ferrer, M. Ivankovic, H. Ivankovic, PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity, *Materials Science and Engineering C*, 34 (2014) 437–445.
- [37] Almukarrama, Y. Yusuf, Development Carbonated Hydroxyapatite Powders from Oyster Shells (*Crassostrea Gigas*) by Carbonate Content Variations, *Materials Science Forum* 975 (2020) 76–81
- [38] M. Asadollahzadeh, S. M. Rabiee, H. Salimi-Kenari, In vitro apatite formation of calcium phosphate composite synthesized from fish bone, *International Journal of Applied Ceramic Technology* 16 (2019) 1969-1978.
- [39] R. G. Carrodegua, S. De Aza,  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3536–3546.
- [40] A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, E. Laborde, Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate, *Materials Chemistry and Physics* 80 (2003) 269–277.
- [41] K. Matsunaga, T. Kubota, K. Toyoura, A. Nakamura, First-principles calculations of divalent substitution of  $\text{Ca}^{2+}$  in tricalcium phosphates, *Acta Biomater.* 23 (2015) 329-337.

- [42] H. Kihara, M. Shiota, Y. Yamashita, S. Kasugai, Biodegradation process of  $\alpha$ -TCP particles and new bone formation in a rabbit cranial defect model, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 79 (2006) 284-291.
- [43] K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara, S. Ebisu, Y. Kinomoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 72 (2005) 127-135.
- [44] M. Tamai, R. Nakaoka, T. Tsuchiya, Cytotoxicity of various calcium phosphate ceramics, *Key Engineering Materials*, 309 (2006) 263-266.
- [45] Y. Li, W. Weng, K.C. Tam, Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of  $\alpha$ -tricalcium phosphate and  $\beta$ -tricalcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 3 (2007) 251-254.
- [46] J. Wiltfang, H. A. Merten, K. A. Schlegel, S. Schultze-Mosgau, F. R. Kloss, S. Rupprecht, P. Kessler, Degradation characteristics of  $\alpha$  and  $\beta$  tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63 (2002) 115-121.
- [47] M. Yamada, M. Shiota, Y. Yamashita, S. Kasugai, Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tricalcium phosphate in block grafts, 28 (2007) 139-148.
- [48] J. Sohier, G. Daculsi, S. Sourice, K. de Groot K., P. Layrolle, Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 92 (2010) 1105-1114.
- [49] S. Tarafder, V. K. Balla, N. M. Davies, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, 7 (2013) 631-641.
- [50] S. A. Posner, F. Betts, N. C. Blumenthal, Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatites, *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 3 (1980) 49-64.
- [51] S. V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 17 (2002) 3130-3146.



- [52] J. Zhao, Y. Liu, W. B. Sun, H. Zhang, Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry, *Chemistry Central Journal*, 5 (2011) 1-7.
- [53] T. C. A. McGann, R. D. Kearney, W. Buchheim, Amorphous calcium phosphate in casein micelles of bovine milk, *Calcif. Tissue Int.* 35 (1983) 821–823.
- [54] L. Wang, G. H. Nancollas, Dynamics of Biomineralization and Biodemineralization, *Met. Ions. Life Sci.*, 4 (2010) 413-456.
- [55] M. V. Van den Vreken, I. Y. Pieters, H. A. Declercq, M. J. Cornelissen, R. M. H. Verbeeck, Characterization of calcium phosphate cements modified by addition of amorphous calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010) 617–625.
- [56] M. Nagano, T. Nakamura, T. Kokubo, M. Tanahashi, M. Ogawa, Differences of bone bonding ability and degradation behaviour in vivo between amorphous calcium phosphate and highly crystalline hydroxyapatite coating, *Biomaterials*, 17 (1996) 1771-1777.
- [57] T. Uysal, M. Amasyali., S. Ozcan, A. E. Koyuturk, M. Akyol, D. Sagdic, In vivo effects of amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite on enamel demineralization around orthodontic brackets, *Aust. Dent. J.*, 55 (2010) 285-91.
- [58] W. B. Sun, F. M. Zhang, J. Y. Guo, J. Wu, W. L. Wu, Effects of amorphous calcium phosphate on periodontal ligament cell adhesion and proliferation in vitro, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 28 (2008) 107-110.
- [59] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, H. Ivanković, Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review, *Open Ceramics* 6 (2021) 100122.
- [60] E. M. Carlisle, Silicon: An Essential Element for the Chick, *Science*, 178 (1972) 619–621.
- [61] E. M. Carlisle, Silicon as a trace nutrient, *Sci. Total. Environ.* 73 (1988) 95–106.
- [62] J. R. Henstock, L. T. Canham, S. I. Anderson, Silicon: the evolution of its use in biomaterials, *Acta Biomater.*, 11 (2015) 17-26.
- [63] N. Patel, S. M. Best, W. Bonfield, I. R. Gibson, K. A. Hing, E. Damien, P. A. Revell, A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 13 (2002) 1199-1206.

- [64] H. Lia, J. Changa, Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect, *Acta Biomater.*, 9 (2013) 6981–6991.
- [65] J. Sun, L. Wei, X. Liu, J. Li, B. Li, G. Wang, F. Meng, Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate coating on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1284-1293.
- [66] S. Ni, J. Chang, L. Chou, A novel bioactive porous CaSiO<sub>3</sub> scaffold for bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 76 (2006) 196-205.
- [67] X. Liu, M. Morra, A. Carpi, B. Li, Bioactive calcium silicate ceramics and coatings, *Biomed Pharmacother.*, 62 (2008) 526-529.
- [68] <https://www.wikiwand.com/en/Wollastonite-pristup> (21.8.2021.)
- [69] W. Xue, X. Liu, X. Zheng, C. Ding, In vivo evaluation of plasma-sprayed wollastonite coating, *Biomaterials*, 26 (2005) 3455-3460.
- [70] R. Ge, C. Xun, J. Yang, W. Jia, Y. Li, In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect, *Biomed. Mater.*, 14 (2019) 065013
- [71] W. T. Barbosa, K. V. de Almeida, G. G. de Lima, M. A. Rodriguez, M. V. Lia Fook, R. García-Carrodegua, Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$  TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108 (2020) 1107-1116.
- [72] A. E. Zadov, V. M. Gazeev, N. N. Pertsev, A. G. Gurbanov, Discovery and investigation of a natural analog of calcio-olivine ( $\gamma$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>), *Doklady Earth Sciences*, 423 (2008) 1431–1434.
- [73] S. Fu, H. Hu, J. Chen, Y. Zhu, Silicone Resin Derived Larnite/C Scaffolds via 3D Printing for Potential Tumor Therapy and Bone Regeneration, *Chemical Engineering Journal*, 382 (2019) 122928.
- [74] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Larnite\\_crystal\\_structure\\_\(Tsurumi-et-al\\_1994\)\\_crystallographic\\_standard\\_alignment.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Larnite_crystal_structure_(Tsurumi-et-al_1994)_crystallographic_standard_alignment.png)-pristup 21.8.2021.]

- [75] Y. Dai, H. Liu, B. Liu, W. Zhenxing, Porous  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> ceramic scaffolds for bone tissue engineering: In vitro and in vivo characterization, *Ceramics International*, 41 (2015) 5894-5902.
- [76] W. Zhao, J. Wang, W. Zhai, Z. Wang, J. Chang, The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate, *Biomaterials*, 26 (2005) 6113-6121.
- [77] LJ.Veselinović, LJ. Karanović, Z. Stojanović, I. Bračko, S. Marković, N. Ignjatović, D. Uskoković, Crystal structure of cobalt substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing, *Journal of Applied Crystallography* 43 (2010) 320 – 327.
- [78] K.T. Tait, M.C. Barkley, R.M. Thompson, M.J. Origlieri, S.H. Evans, C.T. Prewitt, H. Yang, Bobdownsite, a new mineral species from Big Fish River, Yukon, Canada, and its structural relationship with whitlockite-type compounds, *The Canadian Mineralogist*, 49 (2011) 1065 – 1078.
- [79] M. Mathew, W.E. Brown, L.W. Schroeder, B. Dickens,. The crystal structure of alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, *Acta Crystallographica B*, 33 (1977) 1325 – 1333.
- [80] Tsurumi, T., Hirano, Y., Kato, H., Kamiya, T., Daimon, M., Crystal structure and hydration of belite, *Ceramic Transactions*, 40 (1994) 19-25.
- [81] W. Primark, H. Kaufman, R. Ward, X-Ray Diffraction Studies of Systems Involved in the Preparation of Alkaline Earth Sulfide and Selenide Phosphors, *Journal of the American Chemical Society*, 70 (1948) 2043 – 2046.
- [82] J. Nakamura, G. Poologasundarampillai, J. R. Jonesb, T. Kasuga, Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (2013) 4446-4454.
- [83] J. Cihlář, A. Buchal, M. Trunec, Kinetics of thermal decomposition of hydroxyapatite bioceramics, *Journal of Materials Science*, 34 (1999) 6121–6131.
- [84] A. Ressler, M. Cvetnić, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone, *Journal of Biomedical Materials Research*, 108 (2020) 1697-1709.

- [85] C. S. Goonasekera, K. S. Jack, J. J. Cooper-White, L. Grøndahl, Attachment of poly (acrylic acid) to 3-aminopropyltriethoxysilane surface-modified hydroxyapatite, *Journal of Materials Chemistry B*, 42 (2013) 5842-5852.
- [86] S. V. Dorozhkin, Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates, *Acta Biomater.* 8 (2012) 963-977.
- [87] A. M. Pietak, J. W. Reid, M. J. Stott, M. Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials*, 28 (2007) 4023-4032.
- [88] J. D. Birchall, N. L. Thomas, On the architecture and function of cuttlefish bone, *Journal of Materials Science*, 18 (1983) 2081–2086.
- [89] A. R. Amini, D. J. Adams, C. T. Laurencin, S. P. Nukavarapu., Optimally Porous and Biomechanically Compatible Scaffolds for Large-Area Bone Regeneration, *Tissue Engineering Part A*. 18 (2012) 1376-1388.
- [90] G. Hanninka, J.J. C. Arts, Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?, *Injury*, 42 (2011) 22-25.
- [91] A. Rogina, M. Antunović, D. Milovac, Biomimetic design of bone substitutes based on cuttlefish bone-derived hydroxyapatite and biodegradable polymers, *Journal of biomedical materials research*, 107B (2019) 197-204.

## ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnu školu Vladimir Nazor i Gimnaziju Antuna Gustava Matoša općeg usmjerenja završila sam u Đakovu. 2015. godine sam se upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu na smjer Kemija i inženjerstvo materijala.

Završni rad izradila sam na Zavodu za fizikalnu kemiju na temu „Adsorpcija octene kiseline na aktivni ugljen u koloni” pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Dolara., koji sam obranila 2019. godine. Iste sam se godine upisala na diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala.

2019. godine sudjelovala sam na Festivalu znanosti pokusima na temu „ Boje u znanosti“.

Primila sam stipendiju za Erasmus+ stručnu praksu u akademskoj godini 2020./21. na Sveučilištu u Berlinu (Freie Universitat Berlin), gdje sam sudjelovala u istraživanju „Fabrication and characterisation of dECM-based crosslinked scaffolds for tissue engineering“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Merie Weinhart.

2020. godine primila sam stipendiju Grada Đakova za darovite studente.

Tijekom studija tri sam godine sudjelovala kao demonstrator na vježbama iz kolegija *Fizikalna kemija I* i *Fizikalna kemija II*.

Služim se engleskim jezikom na C1 razini te njemačkim na B1 razini.