

# Kristalna struktura hidroksiapatita (literaturni pregled)

---

**Paun, Helena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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:149:700228>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Helena Paun**

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I  
INŽENJERSTVA MATERIJALA

Helena Paun

**KRISTALNA STRUKTURA HIDROKSIAPATITA**  
**(literaturni pregled)**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Dajana Milovac

dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2016.

## **SAŽETAK:**

Biološki hidroksiapatiti karakterizirani su slabom kristalnošću i nestehiometrijom jer u svojoj strukturi sadrže i ione koji imaju važnu ulogu u organizmu sisavaca. Zato su pojedinačno istraživane moguće supstitucije iona u kristalnoj rešetki hidroksiapatita te svojstva koje pojedini supstituent donosi.

U ovom radu objašnjena je kristalna struktura hidroksiapatita, karakteristike koje ga čine jedinstvenim materijalom te načini njegove sinteze u laboratoriju. Objašnjena je i Rietveldova metoda kao najčešće korištena difrakcijska metoda pri strukturnoj karakterizaciji dobivenih uzoraka. Pojašnjen je mehanizam moguće supstitucije pojedinih iona te njihova uloga u organizmu kao i doprinos najčešćih supstituenata.

**Ključne riječi:** Kristalna struktura, hidroksiapatit (HAp), supstitucije

**ABSTRACT:**

Crystal structure of hydroxyapatite, a review

Biological apatites are characterized by poor crystallinity and non-stoichiometry due to the presence of significant amount of foreign ions. Because of that, it is individually researched possible substitutions in crystal lattice of hydroxyapatite and properties of substituent..

This paper explains crystal lattice of hydroxyapatite, properties which makes him unique material and his synthesis methods. Rietvelds method is explained as the most commonly used diffraction method for the structural characterization of samples. Mechanism of possible substitution of certain ions and their role in the body is explained and their role in the body as well as the contribution of the most common substituents.

**Key words:** Crystal structure, hydroxyapatite (HAp), substitutions

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIDROKSIAPATIT I NJEGOVA SVOJSTVA</b> .....	<b>2</b>
<b>3. SINTEZA</b> .....	<b>3</b>
3.1. Mokre metode .....	3
3.2. Suhe metode .....	4
3.3. Sinteza nestehiometrijskog i supstituiranog HAp .....	4
<b>4. KARAKTERIZACIJA</b> .....	<b>5</b>
4.1. Rietveldova metoda .....	5
<b>5. KRISTALNA STRUKTURA HIDROKSIAPATITA</b> .....	<b>7</b>
5.1. Razlika stehiometrijskog i nestehiometrijskog HAp .....	8
<b>6. SUPSTITUCIJE HIDROKSIAPATITA</b> .....	<b>9</b>
6.1. Kationske izmjene .....	9
6.1.1. Cinkov ion .....	10
6.1.2. Srebrov ion .....	11
6.1.3. Stroncijev ion .....	12
6.1.4. Magnezijev ion .....	12
6.1.5. Žaljezov i manganov ion .....	13
6.1.6. Kobaltov ion .....	14
6.2. Anionske izmjene .....	15
6.2.1. Karbonatni ion .....	15
6.2.2. Silicijev ion .....	16
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>18</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>19</b>

## 1. UVOD

Kosti ili koštano tkivo vezivno je tkivo koje podupire tjelesnu strukturu većine životinja, omogućava pokretljivost organizma te štiti unutrašnje organe. Uz ove mehaničke funkcije imaju i metaboličku ulogu u organizmu kao izvor minerala tako što omogućavaju apsorpciju i otpuštanje iona. Kemijski sastav i kristalna struktura utječu na biološku i strukturnu funkciju kostiju.

Koštano tkivo je kompozit organske matrice (koja je većinski sastavljena od kolagena) i anorganske mineralne faze koju čine minerali kalcijevih fosfata. Mineral iz grupe kalcijevih fosfata koji po kemijskim, strukturnim i morfološkim karakteristikama najviše odgovara prirodnom koštanom tkivu je hidroksiapatit,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  ili skraćeno HAp. [1]

Tijekom života dolazi do kontinuirane remodelacije kosti kao metabolički aktivnog tkiva za što su zaslužne koštane stanice: osteoklasti i osteoblasti. Osteoklasti razaraju postojeće koštano tkivo praveći šupljine u kosti u koje se onda zahvaljujući osteoblastima luči novi koštani matriks koji sadrži kolagen, osteokalcin, osteonektin te druge proteine i citokine. Nakon toga dolazi do mineralizacije kosti. Ravnotežu između količine razgrađene kosti i količine novoformirane kosti održavaju različiti hormoni i lokalni medijatori, međutim ona se starenjem organizma, određenim načinom života ili oboljenjem može narušiti što rezultira gubitkom koštanog tkiva. [2]

Detaljnim istraživanjem i analizom hidroksiapatita opisana je njegova struktura što je omogućilo njegovu primjenu u medicini, stomatologiji i katalizi.

Pri sintezi cilj je dobiti hidroksiapatit koji se što manje razlikuje od onog koji se javlja u organizmu te koji u svojoj strukturi sadrži i druge ione kao što su magnezijev, stroncijev, manganov, cinkov, karbonatni te brojni drugi od kojih svaki od njih ima bitnu ulogu u biokemiji organizma.

Uz brojne različite sinteze supstituiranog HAp pojašnjen je mehanizam mogućih izmjena, a novija istraživanja usmjerena su na kosupstituiranje iona što omogućava dodatnu modifikaciju biomaterijala.

## 2. HIDROKSIAPATIT I NJEGOVA SVOJSTVA

Kalcijevi fosfati su soli fosforne kiseline čiji spojevi u strukturi sadrže ione  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ . U biološkim organizmima prisutni su samo  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  ioni u mineralima kostiju i caklini zuba te kao dio različitih patoloških kalcifikacija. Svi kalcijevi fosfati su bijele boje i u čvrstom stanju, slabo su topljivi u vodi, ali se otapaju u kiselinama. Prema strukturi i molarnom odnosu kalcija i fosfora (u rasponu od 0,5 do 1,667) dijele se u pet kategorija:

1. Kalcijevi fosfati s apatitskim tipom strukture  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$  koji ovisno o X uključuje hidroksiapatit ( $\text{X}=\text{OH}$ ), klorapatit ( $\text{X}=\text{Cl}$ ) i fluorapatit ( $\text{X}=\text{F}$ ); molarni odnos  $\text{Ca/P} = 1.667$ .
2. Kalcijevi fosfati sa strukturom sličnom apatitskoj gdje spadaju i oktakalcijev-bis(hidrogenfosfat)-tetrakis(fosfat)-pentahidrat  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (OCP) i tetrakalcijev-bis(fosfat)-oksid,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  (TTCP).
3. Spojevi koji sadrže Ca- $\text{PO}_4$  slojeve kao što je kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD)  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , kalcijev dihidrogenfosfat hidrat (MCPM)  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i kalcijev hidrogenfosfat (MCPA),  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ .
4. Kalcijevi fosfati s glaseritskim tipom strukture obuhvaća sve polimorfne modifikacije trikalcijskih bisfosfata (TCP),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .
5. Amorfni kalcijev fosfat (ACP) povezan je s jednom ili više spomenutih strukturnih tipova [1].

Hidroksiapatit je prirodni te komercijalno najzanimljiviji mineral kalcijevog apatita formule  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  koja se obično piše  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  kako bi se istaknulo da se jedinična ćelija sastoji od dva strukturna entiteta. Neotrovna bioaktivna keramika koja prema sastavu odgovara anorganskoj komponenti tvrdog tkiva u ljudskom organizmu najveću primjenu nalazi u ortopediji te stomatologiji. Koristi se i kao punilo za kompozite i keramike, u katalizi, te za izradu bioreaktora. Svoju šaroliku primjenu te velik interes znanstvenika zadobio je zbog sljedećih svojstava:

- Bioaktivan – stvara snažnu kemijsku vezu s kosti; integrira se u strukturu kosti i podržava njezin daljnji rast
- Biokompatibilan – površina HAp biokompatibilna je s nekoliko različitih stanica organizma (fibroblast, osteoklast, osteoblast), neotrovan je i ne oštećuje okolno tkivo
- Osteokonduktivan – na površini HA moguće je razviti kost
- Termički nestabilan – dolazi do fazne transformacije hidroksiapatita u  $\beta$ -trikalcijski fosfat na temperaturama od 800 do 1000°C (ovisno o stehiometriji)
- Gusti HAp nema dovoljna mehanička svojstva koja mu omogućavaju primjenu kao dugotrajnog nosioca [3].



### 3. SINTEZA

Niz postupaka koji se koriste za dobivanje HAp mogu se svrstati u tri grupe: mokre metode, suhe metode te metode kondenzacije reaktanta u plinovitoj fazi. Važni parametri kod sinteze hidroksiapatita su omjer Ca/P, čistoća, veličina zrna te tvari koje često kontroliraju njegovu bioaktivnost.

#### 3.1. Mokre metode

One omogućavaju kontrolu veličine kristala, morfologiju te veličinu pora, a njihova najveća prednost je korištenje vodenih otopina što smanjuje vjerojatnost kontaminacije produkta.

Kemijsko taloženje ili metoda precipitacije je najjednostavnija te najčešće primjenjivana mokra metoda zbog relativno velike količine dobivenog produkta, odsutnosti organskih otapala te ekonomičnosti same sinteze. Različite varijacije ove metode, pri temperaturama od 40°C do 100°C te uz pripadajuću atmosferu uglavnom se temelje na reakciji kalcijevog i fosfatnog iona iz odgovarajućih reagensa, uz surfaktante i pH regulatore. Kao izvor kalcijevih iona najčešće se koristi kalcijev nitrat tetrahidrat, dok se za fosfatne ione najčešće koriste amonijev hidrogenfosfat i kalijev hidrogenfosfat trihidrat. Reagensi se polagano dodaju u reaktor uz kontinuirano miješanje. Važan korak u ovoj sintezi je „starenje“ otopine koje se provodi nekoliko sati uz stalno miješanje da bi se omogućila spora ugradnja kalcija u apatitnu strukturu i postizanje stehiometrijskog omjera Ca/P od 1,667. Uzorak se ostavlja u kupelji kontrolirane temperature nakon čega se bijeli talog ispere, profiltrira, isuši, kalcinira te melje u prašak. Pri višim temperaturama treba paziti jer može doći do dehidracije odnosno uklanjanja OH funkcionalnih skupina što će uzrokovati dekompoziciju HAp strukture te stvaranja osnovnih kalcijevih fosfata. [3]

Kristaličnost (morfologija i veličina kristalita) sintetiziranog HAp jako ovisi o uvjetima sinteze. Sinteze provedene kod 90°C dati će čisti HAp većeg stupnja kristaličnosti nego sinteze provedene na sobnoj temperaturi. [4]

Sol-gel metoda metoda je sinteze kojom se dobivaju nanokristalni prašci i filmovi. Prednost metode je homogen sastav i čvrstoća produkta dobivenog pri niskim temperaturama. [3]

Hidrotermalna metoda ima sličan postupak kao kemijsko taloženje uz surfaktante te je druga najkorištenija metoda za pripremu HAp. Razlika je u temperaturi, koja je za ovaj postupak obično iznad vrelišta vode te pri kontroliranom tlaku. Efektivnost ove metode poboljšava se povišenjem temperature – produktu se povećava kristalnost i smanjuje veličina pora koje se mogu regulirati različitim surfaktantima. [3]

Prednost metode je što se radi u blagim uvjetima, pogonski troškovi su niski, a aparatura je jednostavna. Najviše se koristi za prevođenje kalcijevih karbonatnih prirodnih bioloških struktura u HAp jer pruža mogućnost očuvanja originalne karbonatne arhitekture.

Nova saznanja oko procesa biomineralizacije potaknula su velik napredak u razvoju metoda

biomimetičke sinteze i proizvodnje nove generacije hidroksiapatitnih implantatnih materijala. Uporaba bioloških struktura i materijala, poput koralja, morskih školjkaša, životinjskih skeleta i sl. u medicinske svrhe, motivirana je ograničenjima kod pripreme sintetskih materijala odgovarajućih strukturnih i mehaničkih svojstava. [4]

Emulzijska metoda uobičajena je metoda sinteze kojom se dobivaju mezoporozne nanočestice hidroksiapatita. Uz različite uvjete te kalcijev nitrat tetrahidrat i fosfornu kiselinu kao izvore  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  iona dobivene su nanočestice igličastog, sferičnog i štapičastog oblika. Mana ovih procesa je što se produkt dobiva iz otopina pa ga je potrebno isprati vodom ili drugim otapalom za uklanjanje nečistoća ili nepotrebnih sastojaka pri čemu se mijenjaju površinska svojstva.

### 3.2. Suhe metode

Izvode se mehano-kemijskim reakcijama te reakcijama u čvrstom stanju. Oba načina kemijski su neopasni i jednostavni procesi koji mogu dati velike količine produkta. Sinteza reakcijom u čvrstom stanju rezultirati će velikim kristalima dok mehano-kemijske reakcije daju produkt loše čistoće. Zbog toga se ove metode sve rjeđe prakticiraju.

### 3.3. Sinteza nestehiometrijskog i supstituiranog HAp

Nestehiometrijski HAp je relativno lako sintetizirati nekom od opisanih precipitacijskih postupaka mijenjanjem pH, temperature i koncentracije reaktanata u širokom vrijednosnom području. Tako će npr. snižavanjem vrijednosti pH vrlo vjerojatno precipitirati kalcijem siromašan HAp. Međutim znatno je teže kontrolirati sastav i kristalne karakteristike stehiometrijskog HAp.

Osim na stehiometriju hidroksiapatita pH precipitacijske otopine određuje i udio  $\text{HPO}_4^{2-}$  ugrađenog u strukturu. Stehiometrijski HAp se u pravilu taloži iz vrućih alkalnih otopina, ali taloženje stehiometrijskog HAp iz jako zasićenih otopina nije spontano. Njemu prethodi precipitacija amorfne faze s Ca/P omjerom znatno nižim od stehiometrijskog HAp. Tek starenjem talog se transformira u HAp i progresivno približava stehiometrijskom omjeru.

Površina čestica taloga igra također važnu ulogu u sintezi HAp. Ona se uglavnom kreće od 50-90  $\text{m}^2/\text{g}$  i na sebe može vezati različite ione ili konstituente koji se tijekom starenja taloga i rasta kristala HA ugrađuju u njegovu kristalnu rešetku. Adsorbirani ioni također usporavaju proces starenja i postizanje stehiometrijskog sastava. Taloženje HAp može se provoditi pri različitim uvjetima, međutim, bolji rezultati se postižu ako se radi s kalcijem bogatim otopinama nego s otopinama bogatim fosfatnim ionima.

## 4. KARAKTERIZACIJA

Nakon sinteze produkta potrebno ga je okarakterizirati različitim metodama. Uz klasične metode analize spektroskopije (FTIR) i mikroskopa (SEM i TEM) kojima se dobiva informacija o funkcionalnim grupama te morfologiji uzorka, za kristalinične uzorke bitna je rendgenska difrakcijska analiza koja daje glavne informacije o kristalnoj strukturi uzorka.

### 4.1. Rietveldova metoda

Nekada se rendgenska difrakcijska analiza polikristalnog materijala koristila samo kao metoda identifikacije faza zbog preklapanja difrakcijskih maksimuma te nemogućnosti preciznog određivanja položaja refleksije. Ovaj problem riješen je razvojem Rietveldove metode koja za razliku od klasičnih metoda koje u obzir uzimaju samo integrirani intenzitet (refleksiju) kao eksperimentalni podatak ona uzima cijeli difraktogram. Rietveldova metoda utočnjava odabrane parametre da bi se minimizirala razlika između ekperimentalne difrakcijske slike i izračunate slike – modela koji se temelji na hipotetskoj kristalnoj strukturi i instrumentalnim parametrima. Moguće je utočniti parametre rešetke, atomske položaje, zaposjednutost položaja, termičke parametre te preferiranu orijentaciju. Njome možemo potvrditi hipotetsku kristalnu strukturu, odrediti relativne udjele faza u višefaznom sustavu te veličinu kristalita i zaostala naprezanja i deformacije u kristalima. [5]

Veličina koja se minimizira definirana je jednadžbom:

$$S_y = \sum_i w_i (y_{oi} - y_{ci})^2$$

gdje je:

$w_i = 1/y_{oi}$  – težinska funkcija

$y_{oi}$  – izmjereni intenzitet na  $i$ -tom koraku difraktograma

$y_{ci}$  – izračunati intenzitet na  $i$ -tom koraku difraktograma

Na vrijednost izračunatog intenziteta  $y_{ci}$ , na  $i$  – tom koraku, osim kvadrata strukturne amplitude koja se izračunava na osnovu pretpostavljenog strukturnog modela utječu i izabrana profilna funkcija i intenzitet bazne linije što proizlazi iz činjenice da pik na realnom difraktogramu ima intenzitet raspoređen u nekom opsegu kuta  $2\theta$  oko izračunatog položaja refleksije.

Izračunati intenzitet u točki  $i$ ,  $y_{ci}$  dat je izrazom :

$$y_{ci} = S \sum L_p M |F_{hkl}|^2 \Omega(2\theta_i - 2\theta_k) P_{hkl} A + y_{bi}$$

gdje je:

$S$  – faktor skale,

$L_p$  – Lorencov polarizacijski faktor

$F_{hkl}$  – strukturni faktor Braggove refleksije

$A$  – korekcija za asimetriju

$P_{hkl}$  – korekcija za preferentnu orijentaciju

$\Omega(2\theta_i - 2\theta_k)$  – izabrana profilna funkcija

$y_{bi}$  – intenzitet bazne linije ili šuma u točki  $i$

Dobro slaganje eksperimentalnog i izračunatog strukturnog modela moguće je dobiti uz kvalitetne ulazne difrakcijske i strukturne podatke. Faktor slaganja,  $R$  brojčano opisuje kvalitetu utočnjavanja. Najčešće korišteni faktor slaganja je  $R_{wp}$  definiran jednadžbom:

$$R_{wp} = 100 \times \left[ \frac{\sum_i w_i (y_{oi} - y_{ci})^2}{\sum_i w_i y_{oi}^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Faktor slaganja  $R_{wp}$  trebao bi biti što sličnije vrijednosti očekivanog faktora.  $R_{exp}$ :

$$R_{exp} = 100 \times \left[ \frac{N - P + C}{\sum_i w_i y_{oi}^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$w_i$  – težinska funkcija

$N - P + C$  – broj stupnjeva slobode

$N$  – broj izmjerenih intenziteta

$P$  – broj parametara koji se utočnjavaju

$C$  – broj ograničenja koji se u metodi najmanjih kvadrata

Vrijednost faktora slaganja  $R_{wp}$  kod rendgenskih difrakcijskih podataka ovise o broju prikupljenih impulsa u svakoj točki, broju parametara koji se utočnjavaju te preferiranoj orijentaciji. [1]

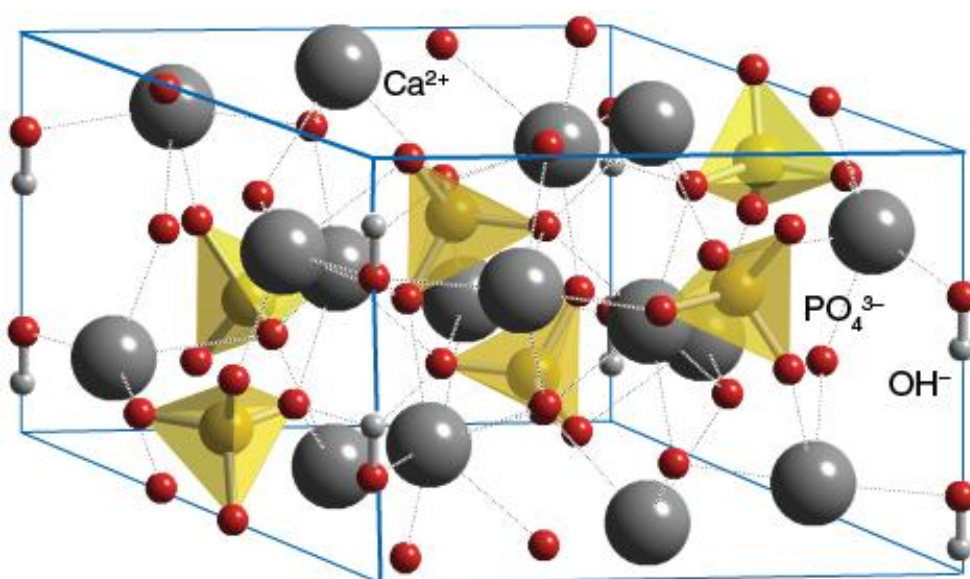
## 5. KRISTALNA STRUKTURA HIDROKSIAPATITA

Hidroksiapatit je mineral ionskog karaktera koji kristalizira u heksagonalnoj kristalnoj rešetci u prostornoj grupi  $P6_3/m$  s parametrima:

$$a = 9.418 \text{ \AA}, \quad c = 6.881 \text{ \AA}, \quad \beta = 120^\circ$$

Kristalna struktura se može opisati kao kompleksna heksagonska slagalina kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u slagalini (slika 1.) Jedinčna ćelija sastoji se od ukupno 44 atoma. U strukturi hidroksiapatita nalazi se deset atoma kalcija smještenih u dva simetrijski različita kristalografska položaja, Ca1 i Ca2. Četiri Ca atoma u položaju Ca1 povezani su u kolone paralelne kristalografskoj c-osi i svaki atom u tom položaju okružen je s devet atoma kisika koji pripadaju  $\text{PO}_4$  grupama i nalaze se aproksimativno na visini jedinične ćelije 0 i 1/2, dok se šest Ca2 atoma koji grade jednakostranične trokute oko osi  $6_3$  nalaze na visini jedinične ćelije  $\frac{1}{4}$  i  $\frac{3}{4}$ . U tom položaju atomi kalcija okruženi su sa ukupno sedam atoma kisika od kojih šest pripadaju  $\text{PO}_4^{3-}$  grupama, a jedan dolazi iz  $\text{OH}^-$  grupe smještene u kanalu. S obzirom na zrcalnu ravninu simetrije koja se nalazi na  $z=1/4$  i  $z=3/4$  svaki  $\text{OH}^-$  ion zauzima statistički neuređene položaje (iznad i ispod zrcalne ravnine).  $\text{OH}^-$  ioni mogu se pomaknuti otprilike 0,35 Å iznad ili ispod zrcalne ravnine.

Uz određene termodinamičke uvjete nastaje i monoklinska forma hidroksiapatita sa prostornom grupom  $P2_1/b$ . Kod takve strukture nema ograničenja koja nameće zrcalna simetrična ravnina dok su  $\text{OH}^-$  ioni smješteni u dvije različite kolone bez mogućnosti pomicanja. [1,4]



Slika 1. Kristalna struktura hidroksiapatita [6]

## 5.1. Razlika stehiometrijskog i nestehiometrijskog HAp

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

Mala veličina kristala apatita je također vrlo važan čimbenik kad se govori o topljivosti bioloških apatita u usporedbi s mineralnim apatitima. Male dimenzije i niska kristaličnost su dvije izražene značajke bioloških apatita koje u kombinaciji s nestehiometrijskim sastavom, unutrašnjom kristalnom neuređenošću i prisutnošću karbonatnih iona u rešetci objašnjavaju njegove posebne karakteristike.

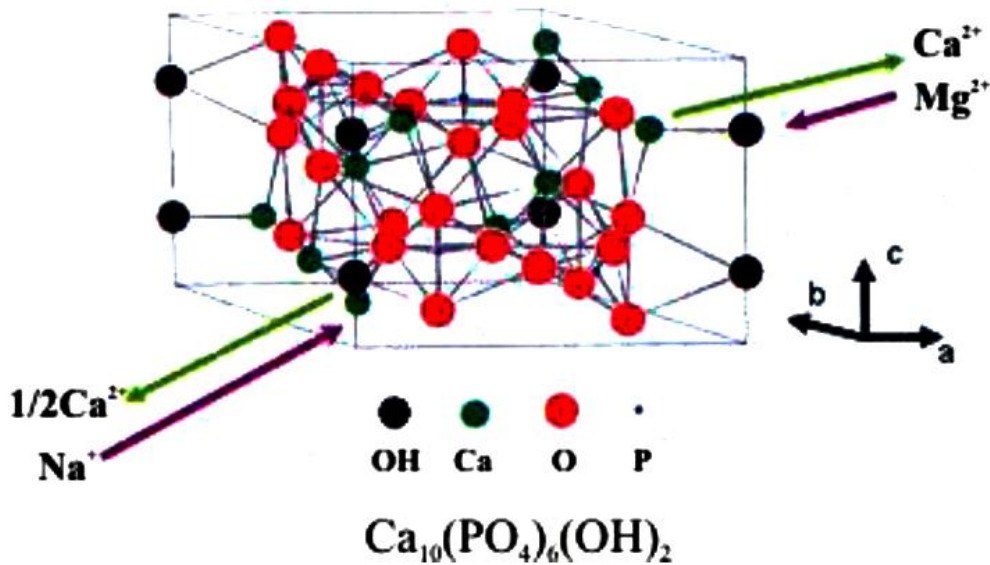
Apatitne strukture dozvoljavaju velika odstupanja u sastavu, sa sposobnošću prihvatanja velikog broja različitih iona u njihove tri podrešetke.

Biološki apatiti imaju manjak kalcija, dakle njihov omjer Ca/P je uvijek niži od 1.667, koji odgovara stehiometrijskom apatitu.

Nijedan biološki apatit nema takvu vrijednost omjera Ca/P, ali kod svih se sa starenjem taj omjer približava teoretskom što je povezano sa sve većom kristaličnošću. Ovakvo ponašanje ima iznimno fiziološko značenje stoga jer se mlađe, manje kristalično tkivo, može razviti i rasti brže, dok se u njega skladište drugi elementi koje tijelo treba tijekom njegova rasta. To je moguće zbog iznimno nestehiometrijskog sastava HA koji je otvoren za supstitucijske ugradnje različitih količina iona. [4]

## 6. SUPSTITUCIJE HIDROOKSIAPATITA

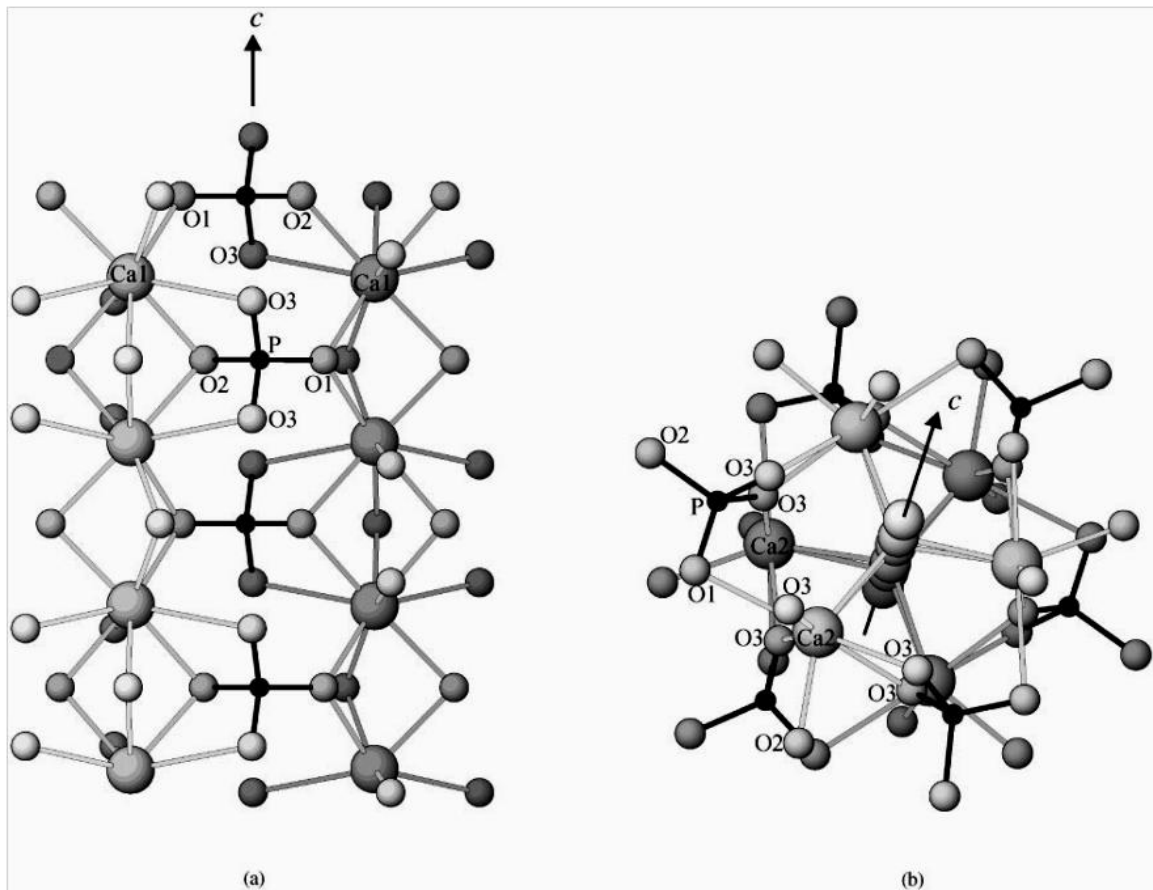
U strukturu HAp mogu se ugraditi različiti ioni. Te supstitucije se mogu odvijati na mjestima kalcijevih iona, fosfatnih ili hidroksilnih skupina. Posljedice ovih supstitucija su promjene u svojstvima, parametru kristalne rešetke, morfologiji, topivosti, ali bez značajne promjene u simetriji zahvaljujući fleksibilnosti HAp strukture.



Slika 2. Vjerojatne ionske izmjene u kationskim podreškama bioloških apatita [4]

### 6.1. Kationske izmjene

Kationska izmjena bitna je za hidroksiapatit prvenstveno kao biomaterijal, ali i u katalizi te regulaciji otpada. Uvođenjem kationa u strukturu hidroksiapatita utječemo na njegovu morfologiju, parametre rešetke, stabilnost, mehanička i magnetska svojstva. Unatoč brojnim eksperimentalnim podacima mehanizam ove supstitucije je i dalje ograničeno razjašnjen jer se deset kalcijevih iona mogu u rešetci javiti na dva simetrično različita kristalografska položaja: Ca1 i Ca2. [7]



Slika 3. a) Ca1 položaj; b) Ca2 položaj kalcija u HA [8]

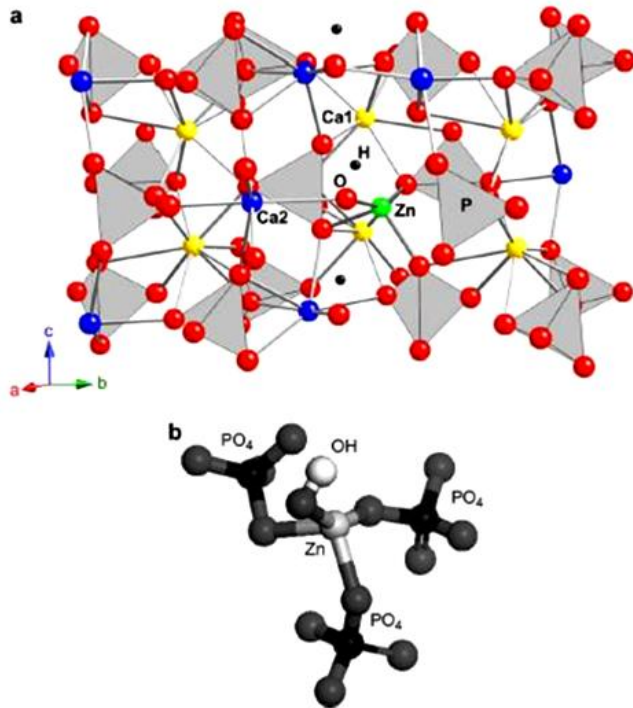
### 6.1.1. Cinkov ion

Hidroksiapatit ne inhibira bakterije od njihovog adsorbiranja na površinu što može utjecati na zacjeljivanje kosti pri oporavku zbog opasnosti infekcije koja može ugroziti kirurški zahvat. U strukturu je moguće ugraditi koštane morfogenetske proteine (devet poznatih proteina koji predstavljaju čimbenike rasta i diferencijacije s mogućnosti indukcije nove kosti) i antibiotike, međutim pokazalo se da aktivnost ovih bioloških agensa opada prilikom postupka skladištenja i/ili sterilizacije. Ideja je bila sintetizirati HAp poboljšane bioaktivnosti koji posjeduje antibakterijska svojstva. Cink, kao najzastupljeniji metal u tragovima u strukturi kostiju ima esencijalnu ulogu biokemije kosti i tkiva. ZnHAp s udjelom cinka 1,6% sintetiziran je reakcijom taloženja pri sobnoj temperaturi. Ugradnjom cinka u strukturu parametri ćelije su se neznatno smanjili pri čemu je dobiveni materijal zadržao svojstvene karakteristike hidroksiapatita. Staphylococcus aureus je bakterija koja se koristila pri istraživanju antibakterijskog učinka. Pokazalo se da ZnHA ima inhibirajući učinak na daljnji razvoj bakterija u odnosu na sam hidroksiapatit, odnosno nakon određenog vremena kultura se prestaje razvijati. Moguće je da se ion cinka vezao na membranu bakterije te tako uzrokovao njezine strukturne promjene čime je utjecao i na transport nutritienta kojima se bakterija hrani. Također, ovim in vitro eksperimentom pokazalo se i da sintetizirani ZnHAp ima



poboljšanu bioaktivnost.

Iako je utvrđeno da je Ca2 položaj energetski povoljniji za supstituciju cinkovog iona, oba položaja supstitucije su energetski endotermni procesi. [7,9.]



**Slika 4.** a) Ugradnja cinka u Ca2 položaj jedinične ćelije b) Lokalna koordinacija cinka u strukturi HAp [7]

### 6.1.2. Srebrov ion

Površina hidroksiapatita lako adsorbira proteine, aminokiseline i druge organske supstance, ali zbog toga je sklona i adsorpciji te replikaciji bakterija u strukturi. Najbolji način da se izbjegne infekcija biomaterijala je da mu se daju antibakterijska svojstva.

Srebro i spojevi srebra su antimikrobni agensi (imaju antivirusna, antibakterijska i/ili antifungalna svojstva). Posjeduju antiseptička svojstva na čak 16 vrsta bakterija uključujući E. coli i Staphylococcus aureus. Osim toga, pokazalo se da je srebro biokompatibilno te stabilno.

Povećanjem udjela srebra u materijalu povećava mu se antimikrobni efekt ali se istovremeno povećava toksičnost. Potrebno je optimizirati dovoljan udio srebra koji rezultira odličnim antibakterijskim i citokompatibilnim svojstvima.

Rajendran i sur. [10] istraživali su stabilnost srebrovog hidroksiapatita pri različitim pH i temperaturama. Uzorci različite koncentracije srebra pripremljeni su kemijskim taloženjem pri temperaturama 800-1200°C. Dobivena hidroksiapatitna keramika pokazala se stabilnom

do 1200°C uz povećanu kristalnost u otopinama pri različitim pH (10-12).

Morfološka analiza TEM-om pokazala je da dobiveni igličasti nanokristali nakon 800°C počinju aglomerirati. Pri koncentraciji srebra od 3% kompozit posjeduje dobra antibakterijska svojstva te citokompatibilnost. Pri studiji je korištena *Staphylococcus aureus* bakterija. Dobiveni prah pokazao je potencijalnu primjenu za ispunjavanje kostiju te prevlačenje metalnih implantata.

### 6.1.3. Stroncijev ion

Stroncij je posebno zanimljiv dvovalentni atom koji može zamijenit kalcij u strukturi sintetiziranog hidroksiapatita, a nalazi u mineralnoj fazi kosti. Pokazalo se da *in vitro* stroncij povećava broj osteoblasta te smanjuje broj i aktivnost osteoklasta čime se smanjuje resorpcija i potiče obnovu kostiju. Također se utvrdilo da stroncij ima sličan kemizam kao i kalcij te pokazuje učinkovitost pri liječenju osteoporoze.

Stroncijevi atomi zauzimaju Ca1 i Ca2 mjesta u apatitskoj strukturi. Pri nižim koncentracijama stroncij popunjava Ca1 položaj, dok pri većim popunjava Ca2. Rezultati pokazuju da uzorci s udjelom Sr>10% preferiraju strukturu sa Ca2 položajem dok pri udjelu Sr<10% stroncijev ion zauzima Ca1 položaj. Razlog ovakve raspodjele vjerojatno je prilagodba interakcija metala i kisika. Ca1 položaj omogućava smještaj većeg kationa zbog dulje veze tog položaja metala i kisika. Međutim, povećanjem metalnih iona odbijanje između atoma u Ca1 položaju uzrokovat će proširenje c-osi koja je opet djelomično ograničena stroncijevim atomima u Ca2 položaju. U sistemu Ca-Sr HAp vrijednosti parametara jedinične ćelije a i c linearno se mijenjaju sa sadržajem stroncija što znači da kalcij i stroncij grade kontinuiranu seriju čvrstih otopina. Zamjena kalcija stroncijem uzrokuje porast vrijednosti parametara jedinične ćelije u skladu s većim ionskim radijusom stroncija [ $r(\text{Sr}^{2+}) = 1,13\text{Å}$ ;  $r(\text{Ca}^{2+}) = 0,99\text{Å}$ ]. Slično se mijenja i morfologija te kristalnost sintetiziranog stroncijevog hidroksiapatita sa sastavom. Pri niskim koncentracijama stroncija smanjuje se koherentna duljina i narušava oblik kristala dok se pri višim koncentracijama povećava prosječna veličina kristala kao i kristalnost. [7, 11.]

### 6.1.4. Magnezijev ion

Iako element u tragovima, magnezij je u strukturi kostiju vrlo bitan. Bez dovoljno magnezija organizam ne može adekvatno adsorbirati kalcij, stimulirati kalcitonin (hormon koji regulira koncentraciju kalcija u krvi) te regulirati parateroid (hormon koji razgrađuje kost). Zaslužan je i za aktivaciju vitamina D te transport kalcija. Dakle, njegov nedostatak utječe na sve faze koštanog metabolizma.

Magnezijevi ioni inhibiraju kristalizaciju hidroksiapatita, reduciraju Ca/P molarni omjer i veličinu kristala te istovremeno povećavaju brzinu nukleacije. Magnezijev hidroksiapatit uspješno je sintetiziran metodom kemijskog taloženja uz  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  kao izvor magnezijevih iona. Usporedno se pratilo više uzoraka različite koncentracije magnezija. Rendgenska difrakcija je pokazala da se magnezij u strukturu primarno ugrađuje u Ca1 položaj. Povećanjem udjela magnezija smanjuju se oba parametra jedinične ćelije, postupno se smanjuje kristalnost, a pri udjelima magnezija 35-50% uzorci postaju gotovo u potpunosti amorfni. Zbog ovih doprinosa magnezija hidroksiapatitnoj strukturi često se koristi kao model za istraživanje bioloških apatita. [12]

Aina i suradnici [13] pokazali su doprinos magnezija i stroncija u strukturi hidroksiapatita. Većina istraživanja usmjerena je na supstituciju hidroksiapatitne strukture određenim ionom zbog jednostavnosti sinteze te strukturne karakterizacije, međutim kosupstituiranje različitih iona korisno je zbog mogućnosti balansiranja kontrastnih ionskih polumjera i/ili naboja te kako bi se olakšala ugradnja iona u strukturu čija je ugradnja inače otežana, kao što je to slučaj s magnezijevim ionima. Sintezu je moguće izvršiti metodom reakcije u čvrstom stanju ili metodom taloženja u otopini. Svi dobiveni uzorci sadržavali su molarni omjer  $(\text{Ca}+\text{X})/\text{P}=1,67$  pri čemu je  $\text{X}=\text{Mg}+\text{Sr}$ .

### 6.1.5. Željezov i manganov ion

Ioni željeza prisutni su u tragovima u tvrdom tkivu organizma. Poznato je da je njegova koncentracija u caklini varira od 0 do 157 ppm. Vezanje, strukturna uloga te funkcije željeza u kostima i dalje su nerazjašnjeni, no zbog poznatih magnetskih svojstava koja donose u materijal pokušana je te uspješno izvedena njegova supstitucija. Magnetske nanočestice pokazuju dobru biokompatibilnost što im omogućuje primjenu pri separaciji i obilježavanju stanica organizma za visokorezolutnu magnetsku rezonanciju, kontroliranu dostavu lijekova te hipertermijske tretmane karcinoma.

Mangan je također metal u tragovima unutar strukture HAp i potreban je za metabolizam aminokiselina, lipida, proteina te ugljikohidrata. Ima ključnu ulogu u međustaničnoj komunikaciji, osobito u aktivaciji integrina (transmembranski proteini koji služe kao receptori za različite komponente ekstracelularnog matriksa). Mangan u strukturi HA povećava afinitet vezanja liganda integrina na površinu.

Li i suradnici [14] mokrom kemijskom metodom u kombinaciji s ionskom izmjenom sintetizirali su željezov (III) HAp i manganov HAp kako bi se dobile čestice nano dimenzija. Pritom su kombinirali metodu kemijskog taloženja s ionskom izmjenom kako bi se održao pH niži od 7 jer pri višim pH dolazi do oksidacije mangana. Dobiveni su produkti različitih koncentracija. Manganov hidroksiapatit ružičaste je boje, dok je željezov smeđe, a povećanjem koncentracije supstituenta povećava se intenzitet boje. Ugradnja manganovih iona u strukturu uzrokovala je smanjenje oba parametra ćelije dok su se

u slučaju ugradnje  $\text{Fe}^{3+}$  iona povećala. Željezovi i manganovi ioni imaju manji radijus od kalcijevih [ $r(\text{Fe}^{3+})=0,65 \text{ \AA}$ ,  $r(\text{Mn}^{2+})=0,67 \text{ \AA}$ ] pa je povećanje parametara neočekivano. Pretpostavlja se da je kod supstitucije željezom došlo do ugradnje  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  iona u HAp strukturu. Također, ugradnjom  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  smanjio se omjer Ca/P te povećao M/Ca (M predstavlja supstituent) što potvrđuje supstituciju kalcijevog iona u rešetci. Pokazalo se da su željezovi ioni aktivniji od manganovih u zamjeni kalcijevih iona u rešetci. Utvrdili su to usporedbom teorijski izračunatog omjera supstituiranog iona i kalcija i onog dobivenog eksperimentom. Omjer Mn/Ca bio je manji od očekivanog dok se Fe/Ca slagao s teorijskim. Ovo se može objasniti s različitom elektronskom gustoćom između  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  iona. Iako imaju slične radijuse, njihov različit naboj utjecao je na uspješnost supstitucije. Oba produkta nisu pokazala toksičan učinak na osteoblaste, a poboljšanje adhezije osteoblasta uočeno je samo kod željezovog hidroksiapatita. Ipak, VSM magnetometar utvrdio je da ovako dobiven FeHAp ne posjeduje dovoljna magnetska svojstva za biomedicinsku primjenu.

#### 6.1.6. Kobaltov ion

Kobalt je feromagnetičan element pa je zanimljiv iz istog razloga kao i željezo. Na Sveučilištu u Beogradu uspješno je sintetiziran hidroksiapatit s različitim koncentracijama  $\text{Co}^{2+}$  iona hidrotermalnom sintezom. Ioni kobalta lakše se smještaju u kristalografski položaj Ca2 nego u Ca1 što može biti posljedica veće elektronegativnosti kobalta i njegovoj sklonosti građenju kovalentnih veza. Povećanjem koncentracije kobalta u strukturi dolazi do smanjenja parametara jediničnih ćelija  $a$  i  $c$  i smanjenja srednjih vrijednosti veličina kristalita kao rezultat ulaska kationa s manjim radijusom od kalcijevog. Povećanjem postotka kobalta u strukturi dolazi do opadanja anizotropnosti kristalita što rezultira promjenom morfologije – od štapičastih prema kapljičastim formama. [1]

## 6.2. Anionske izmjene

Osim kationskih struktura hidroksiapatita omogućava i brojne anionske zamjene. Osobito su bitne supstitucije na mjestu OH<sup>-</sup> iona koje značajno utječu na kiselost samog hidroksiapatita. [15]

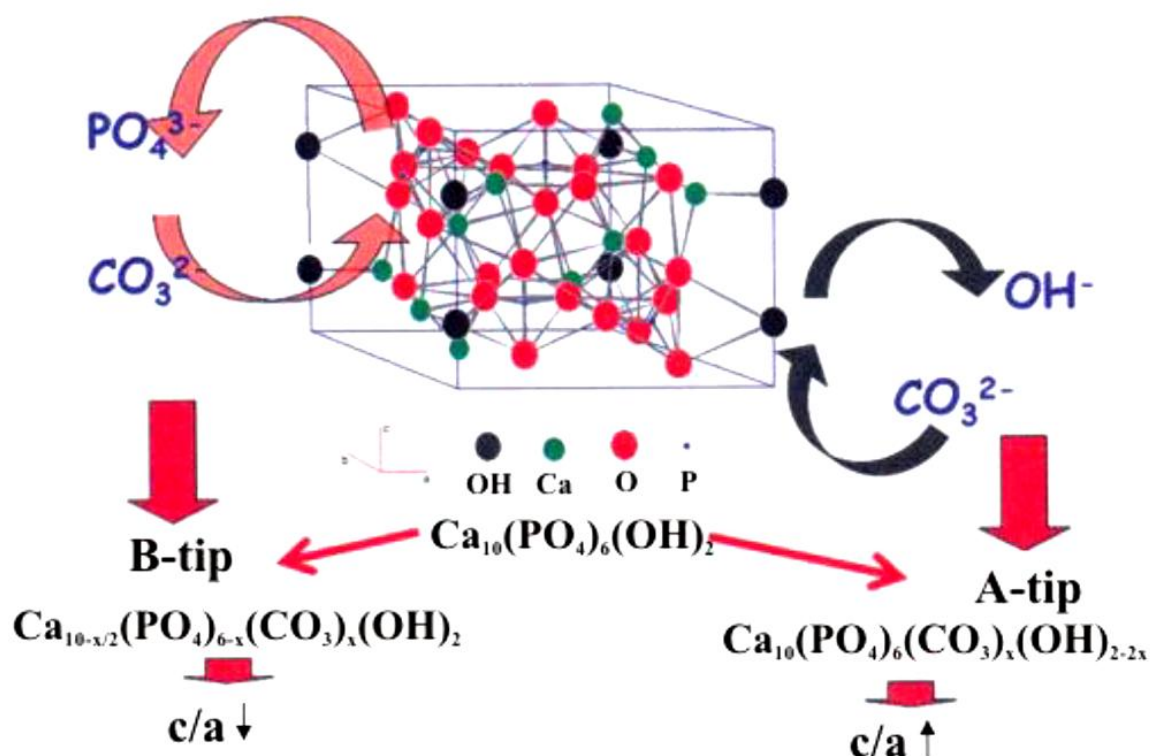
### 6.2.1. Karbonatni ion

Karbonatni (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) ion glavni je sporedni supstituent bioloških apatita (masenog udjela 2-8%). Zbog toga su karbonatni hidroksiapatiti detaljnije ispitivani. Obzirom na promjenu parametra jedinične ćelije koja je rezultat ugradnje CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> iona na određeni položaj u strukturi postoji A i B tip karbonatnog hidroksiapatita (slika 5.)

Kod A-tipa karbonatnog hidroksiapatita karbonatni ion zamjenjuje hidroksilni te dolazi do povećanja vrijednosti parametra ćelije *a*, dok kod B-tipa zamjenjuje fosfatni te dolazi do smanjenja vrijednosti parametra jedinične ćelije *a*. Međutim, do povećanja parametra *a* u B-tipu strukture može doći i zbog zamjene vakancija ili tetraedarskih kisika molekulama vode. Vakancije neutraliziraju manjak negativnog naboja. Omjer tipa A i B u biološkim apatitima je 0,7-0,9, ovisno o starosti kosti. Moguća je i istovremena supstitucija hidroksilnog i fosfatnog iona karbonatnim (AB-tip).

In vitro i in vivo analize pokazale su da supstitucija fosfatnog iona karbonatnim (B-tip strukture) uzrokuje smanjenje kristalnosti te povećanje topljivosti što doprinosi boljoj mogućnosti biorazgradnje i osteointegraciji, dok je A-tip strukture pokazao smanjen afinitet za osteoblaste. Dakle, učinak karbonata na HAp ovisi i o vrsti supstitucije ali i o koncentraciji CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> iona.

Obzirom da CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> i F<sup>-</sup> u apatitu imaju suprotan učinak na kristalnost i topivost, uz manipulaciju njihove koncentracije može se dobiti CFHAp željene topivosti. S obzirom na veličine radijusa fluorov ion pritom zauzima poziciju OH<sup>-</sup> iona dok CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ion ostvaruje svoj B-tip strukture. [16]



**Slika 5.** Kristalna struktura i moguće ionske zamjene u karbonatnim apatitima [4]

### 6.2.2. Silicijev ion

Zamjena fosfatnog iona silicijevim u strukturi HAp zahtjevat će kompenzaciju negativnog naboja koja se najčešće ostvaruje formiranjem anionskih vakancija.

*In vivo* i *in vitro* analize potvrdile su pozitivan utjecaj silicija na rast kostiju i proces kalcifikacije. Ugradnjom silicija u strukturu HAp postiže se bolja bioaktivnost te visoka aktivnost površine koja se objašnjava formiranjem silanolnih grupa Si-OH na površinu materijala. Zbog razlike u veličini ortosilikatnog i fosfatnog iona supstitucija uzrokuje mikronaprezanja apatitne strukture zbog čega dolazi do segregacije silicijevih iona na površinu. [1]

Među mnogobrojnim prisutnim elementima u mineralnoj komponenti kosti silicij ima presudnu ulogu za normalan rast i razvoj hrskavičnog i koštanog tkiva. Sadržaj silicija u različitim tkivima sisavaca je različit od 1 ppm u serumu, 2-10 ppm u jetri, bubrežima, plućima i mišićima, 100 ppm u kostima i ligamentima pa sve do 200-600 ppm u hrskavičnom i nekim drugim vezivnim tkivima. Istraživanja provedena na različitim vezivnim tkivima utvrdila su visok sadržaj (200-550 ppm) silicija u spojevima koji se nalaze u vanstaničnoj

matrici, ukazujući da je silicij važan biološki agens za umreživanje, koji djeluje na arhitekturu i žilavost vezivnog tkiva.

Istraživanja na mladim miševima i štakorima, ukazala su na važnu ulogu silicija u procesu nastajanja kosti unutar nemineraliziranog područja osteoida (aktivna područja kalcifikacije). U tim područjima nađen je udio silicija do 0.5 mas. %, što upućuje na njegovu važnu ulogu u procesu kalcifikacije kosti.

U sličnim istraživanjima praćena je brzina rasta štakora držanih na dijeti siromašnoj silicijem s rastom štakora hranjenih hranom obogaćenom silicijem. Opažen je 33,8 % brži rast štakora uzgajanih hranom obogaćenom silicijem, dok su kod druge skupine opažene deformacije lubanje i zubne cakline kao i manji sadržaj vode u kostima i manja količina glikozaminoglikana. Na temelju ovih istraživanja utvrđeno je da je silicij, kao član skupine elemenata u tragovima, krucijalan u stvaranju koštanog, hrskavičnog i vezivnog tkiva, a primaran mu je utjecaj vezan na odvijanje metaboličkih procesa važnih u stvaranju organskog matriksa. Pojava koštanih i hrskavičnih malformacija posljedica su manjka silicija u organskom matriksu odnosno u stvaranju kolagena i glikozaminoglikana. Potvrda važnosti silicija u stvaranju vezivnog tkiva vidljiva je u spoznajama da su silicijevi ioni najvažniji ioni u osteogenim stanicama, posebice u stupnju njene metaboličke aktivnosti.

Druga brojna istraživanja pokazuju da silicij također sudjeluje u biokemijskim-enzimskim procesima na razini sub-stanične strukture stvarajući važne veze s drugim elementima. Primjenom cDNA (komplementarna DNA) mikro-fragmentalne analize utvrđeno je da brzo otpuštanje topivih silikatnih, fosfatnih i kalcijevih iona može aktivirati specifične gene koji kontroliraju ciklus osteoblastnih stanica u procesu formiranja i rasta novih kostiju. Dokazano je da vodena otopina silicija, u formi orto-silicijeve kiseline,  $\text{Si(OH)}_4$ , pospješuje množenje osteoblasta dijeljenjem kao i stvaranje kolagena, povećavajući aktivitet osteokalcina i alkaliske fosfataze.

Važan korak u sintezi kolagena tipa I i njegovo izlučivanje u izvanstanični prostor je hidroksilacija ostataka prolina ( $\alpha$ -amino kis.) kolagenskog lanca koja je katalizirana prolihidroksilazom čija aktivnost ovisi o količini prisutnog silicija. Poznato je također da silicij povezuje makromolekule glikozaminoglikana tvoreći mrežu između kolagena i proteoglikana stabilizirajući tako molekule koštanog matriksa i sprečavajući njihovu enzimsku razgradnju.

Silicij ima vrlo važnu i značajnu ulogu u koštanom i hrskavičnom tkivu djelujući na fiziološki sustav tijekom stvaranja i rasta skeleta kod složenih organizama. Također utječe na sintezu hrskavičnog tkiva i integritet vanstaničnog matriksa, kao i na procese biomineralizacije, procese sinteze i proliferacije osteoblasta, direktno utječući na procese remodeliranja, stvaranja osteoklasta i resorpcijskih aktivnosti. [4]

## 7. ZAKLJUČAK

Visoka stabilnost i fleksibilnost strukture hidroksiapatita omogućava širok spektar ionskih zamjena. Razlog istraživanja brojnih ionskih zamjena je pojava biološkog hidroksiapatita kao tvorbenika tvrdog tkiva u organizmu koji ima nestehiometrijski sastav. Biološki hidroksiapatit zapravo je karbonatni hidroksiapatit koji u svojoj strukturi sadrži brojne ione "nečistoće" koji imaju esencijalnu ulogu u biokemiji organizma.

Istraživanja su uglavnom usmjerena u biomedicinsku svrhu gdje se sintetizirani hidroksiapatit pokušava približiti strukturi biološkog uz kontrolirane uvjete sinteze i ciljane supstitucije. Teško je predvidjeti na koje mjesto će pojedini ion doći, međutim prethodno poznavanje karakteristika iona (polarnosti, elektronegativnosti te radijusa) može uvelike pomoći. Kod kationskih izmjena može se očekivati da kationi s ionskim radijusom većim od kalcijevog iona, kao što je slučaj sa stroncijem, preferirat će Ca1 kristalografski položaj, dok kationi manjih radijusa zauzimaju Ca2 položaj kao u slučaju manganovih iona. Elektronegativnost pojedinih iona ima utjecaj na raspodjelu kationa između dva kristalografska položaja. Veća elektronegativnost znači i veći afinitet prema kovalentnim interakcijama kao i povezivanje vodikovim vezama.

Različite ionske izmjene imaju utjecaj na strukturu hidroksiapatita, parametre jedinične ćelije, stupanj kristalnosti, te morfologiju uzorka.



## 8. LITERATURA

1. Ljiljana M. Veselinović, Rendgenska analiza nanostrukturnih prahova kalcijum fosfata dobijenih novim postupcima sinteze, Rudarsko-geološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2010.
2. <http://www.laboratorijskeanalize.com/analize/k/kostani-markeri/>
3. Sakshi Jain, Processing of hydroxyapatite by biomimetic process, Department of ceramic engineering, National institute of technology Rourkela, 2010.
4. Orlić, S., Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike, Zagreb, 2012.
5. Miroslav Požek, Strukturna istraživanja, part I: difrakcijske metode, 2013.
6. <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>
7. <http://electronicstructure.wikidot.com/cation-substitutions-in-hydroxyapatite>
8. T. I. Ivanova, O. V. Frank-Kamenetskaya, A. B. Kol'tsov and V. L. Ugolkov - Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition, Department of Crystallography, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, 2000.
9. Fumiaki Miyaji, Yoshiteru Kono, Yoko Suyama; Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite; Materials Research Bulletin 40; 2004.
10. A.Rajendran, et al., Synthesis, phase stability of hydroxyapatite–silver composite with antimicrobial activity and cytocompatibility, Ceramics International, 2014
11. Adriana Bigi, Elisa Boanini, Chiara Capuccini, Massimo Gazzano; Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, Inorganica Chimica Acta 360, 2007.
12. A.Tampieri, G.Celotti, E.Landi and M.Sandri: Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization, Trans Tech Publications, Switzerland, 2004.
13. Valentina Aina, Gigliola Lusvardi, Basil Annaz, Iain R. Gibson, Flora E. Imrie, Gianluca Malavasi, Ledi Menabue, G.Cerrato, G. Martra; Magnesium and strontium co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties; Springer Science+Business Media New York 2012.
14. Yan Li, Jasmine Widodo, Sierin Lim, Chui Ping Ooi; Synthesis and cytocompatibility of manganese (II) and iron (III) substituted hydroxyapatite nanoparticles, J Mater Sci, 2012.
15. Neuman S. Resende, Marcio Nele, Vera M.M. Salim, Effects of anion substitution on the acid properties of hydroxyapatite, Thermochimica Acta 451, 2006.
16. Qing-Xia ZHU, Ya-Ming LI, and Dan HAN; Co-substitution of carbonate and fluoride in hydroxyapatite: Effect on substitution type and content; Front. Mater. Sci. 2015.