

Utjecaj ugradnje silicija na strukturu i svojstva hidroksiapatita

Podvezanec, Daniel

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:149:396533>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Daniel Podvezanec

UTJECAJ UGRADNJE SILICIJA
NA STRUKTURU I SVOJSTVA HIDROKSIAPATITA

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.

Zahvaljujem mom mentoru, prof.dr.sc. Hrvoju Ivankoviću na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade završnog rada.

Velike zahvale na iznimnoj podršci majci Blaženki, ocu Renatu, bratu Antoniu ,djevojci Ivi i cijeloj obitelji.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i pomagali mi tijekom dosadašnjeg studiranja.

Sažetak

Hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), kao jedan od najvažnih minerala iz grupe kalcijevih fosfata, vrlo je sličan mineralnoj komponenti prirodne kosti te se zbog toga intenzivno istražuje kao materijal u liječenju koštanih oštećenja. Posebice se ističe svojstvom bioaktivnosti odnosno, potiče specifični biološki odgovor organizma te se na taj način povezuje s prirodnim koštanim tkivom. Jedan od načina kojim se može utjecati na poboljšanje njegove bioaktivnosti jest ugradnja različitih elemenata u njegovu strukturu. S obzirom da je dokazano da silicij (Si) ima vrlo važnu i značajnu ulogu u koštanom i hrskavičnom tkivu djelujući na fiziološki sustav tijekom stvaranja i rasta skeleta kod složenih organizama, ugradnja Si u strukturu HA svakako pridonosi bržem zacjeljivanju koštanih oštećenja.

Silicij odnosno SiO_4^{4-} tetraedri, svojom veličinom su slični PO_4^{3-} tetraedrima, i mogu ih lako zamijeniti u kristalnoj rešetci HA s posljedičnom kompenzacijom naboja. Istraživanja su pokazala da u usporedbi s HA, SiHA pokazuje finiju mikrostrukturu s manjom veličinom zrna, te veću brzinu otapanja apatitne faze. *In vitro* studije sugeriraju da je poboljšano *in vivo* ponašanje koje pokazuje SiHA s obzirom na čisti HA, povezano sa većom koncentracijom iona kalcija i fosfora uslijed procesa otapanja, ali i sa dinamičkim mikrokolišem u kojem se javljaju proteinske interakcije. *In vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da koštane stanice, osteoblasti i osteoklasti, različito reagiraju na SiHA s obzirom na nesupstituirani HA, i to u vidu poboljšane proliferacije i razvoja u zrele stanice.

Ključne riječi: biokeramika, hidroksiapatit, silicij

Abstract

Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), as one of the most important minerals from the group of calcium phosphates, is very similar to the mineral component of the natural bone and therefore it is intensively investigated as a bone substitute material. Hydroxyapatite is bioactive, able to stimulate specific biological response of the organism and connect with the natural bone tissue. One of the ways to influence, improve its bioactivity is substitution of various elements into its structure. Since the researches have proved that the silicon (Si) has a very important and significant role in bone and cartilage tissue, acting on the physiological system during the formation of the skeletal growth in complex organisms, substitution of Si into the HA structure contributes to the healing process of bone defects.

Silicon or SiO_4^{4-} tetrahedron, has a similar size as PO_4^{3-} tetrahedra, so it can be easily replaced in the crystal lattice of HA followed by chargecompensation. Studies have shown that in comparison with HA, SiHA has a finer microstructure with a smaller grain size and a greater rate of dissolution of apatite phase. *In vitro* studies suggest that improved *in vivo* behavior of SiHA compared to the pure HA, is associated with a higher concentration of calcium and phosphorus ions due to the dissolution process, but also with the dynamic microenvironment in which protein interactions occur. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that bone cells, osteoblasts and osteoclasts, favor the SiHA over pure HA, showing enhanced proliferation and differentiation.

Keywords: bioceramics, hydroxyapatite, silicon

Sadržaj

Sažetak	iii
Abstract	iv
1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Biomaterijali	2
2.2. Biokeramika	4
2.3. Hidroksiapatit	5
3. Silicij	7
3. Metode dobivanja SiHA	8
4. Ugradnja silicija u strukturu HA	9
5. Mikrostruktura i utjecaj sinteriranja na SiHA	13
6. <i>In vitro</i> bioaktivnost	14
7. Utjecaj SiHA na koštane stanice	15
8. Biokompatibilnost SiHA	16
9. Daljnja istraživanja: poboljšanje biološke aktivnosti	16
Zaključak	17
Životopis	20

1.UVOD

S ciljem poboljšanja kvalitete života pacijenata, velika pozornost se posvećuje razvoju novih materijala/implantata koji s odgovarajućim fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima zamjenjuju ili obnavljaju oštećeno tkivo. Kada je riječ o materijalima koji se koriste u liječenju koštanih oštećenja, značajno mjesto zauzimaju kalcijevi fosfati, posebno hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) koji je vrlo sličan mineralnoj komponenti prirodne kosti. Osim toga, hidroksiapatit je bioaktivan, odnosno potiče specifični biološki odgovor organizma na taj način vezujući se sa prirodnim koštanim tkivom. Također, služi kao predložak na koji prijanjaju koštane stanice čijim se umnažanjem i rastom stvara novo tkivo. [1]

Hidroksiapatit ima strukturu koja je vrlo pogodna za supstituciju različitih iona. Poznato je da je hidroksiapatit u prirodnoj kosti zapravo nestehiometrijski, te u svojoj strukturi sadrži različite ione poput CO_3^{2-} , te u manjoj količini ione Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Ni^{2+} , OH^- , F^- , Cl^- , i dr.[2]. Takve supstitucije blago mijenjaju strukturu HA i često imaju važne učinke na njegova svojstva kao što je topljivost, tvrdoća, krhkost i druga svojstva. Stoga, u kontekstu primjene HA kao materijala za liječenje koštanih defekata intenzivno se istražuju mogućnosti ugradnje različitih iona kojima bi se ubrzalo zacjeljivanje kosti i pospješio oporavak kosti. Jedan od istraživanih supstituenata u strukturi HA je silicij u obliku SiO_4^{4-} tetraedra. Biološka uloga silicija poznata je već više od stoljeća, počevši od rada Louisa Pasteura koji je vjerovao da silicij može pomoći liječiti mnoge bolesti. Početkom 1970.-ih počinje se proučavati uloga silicija u kostima i zaključuje se da silicij igra veliku ulogu u procesu kalcifikacije kosti. Silicij je potreban za formiranje kostiju i povezan je i s organskom i s anorganskom fazom kosti. Hidroksiapatit s ugrađenim silicijem se može kemijski vezati na kost preko jake 'bioaktivne veze'. Time je osigurana osteointegracija i funkcionalnost implantata.[3]

Cilj ovog rada je dati kratki osvrt na, u literaturi opisane metode dobivanja hidroksiapatita s ugrađenim silicijem te utjecaj silicija na strukturu i svojstva hidroksiapatita.

2. OPĆI DIO

2.1. Biomaterijali

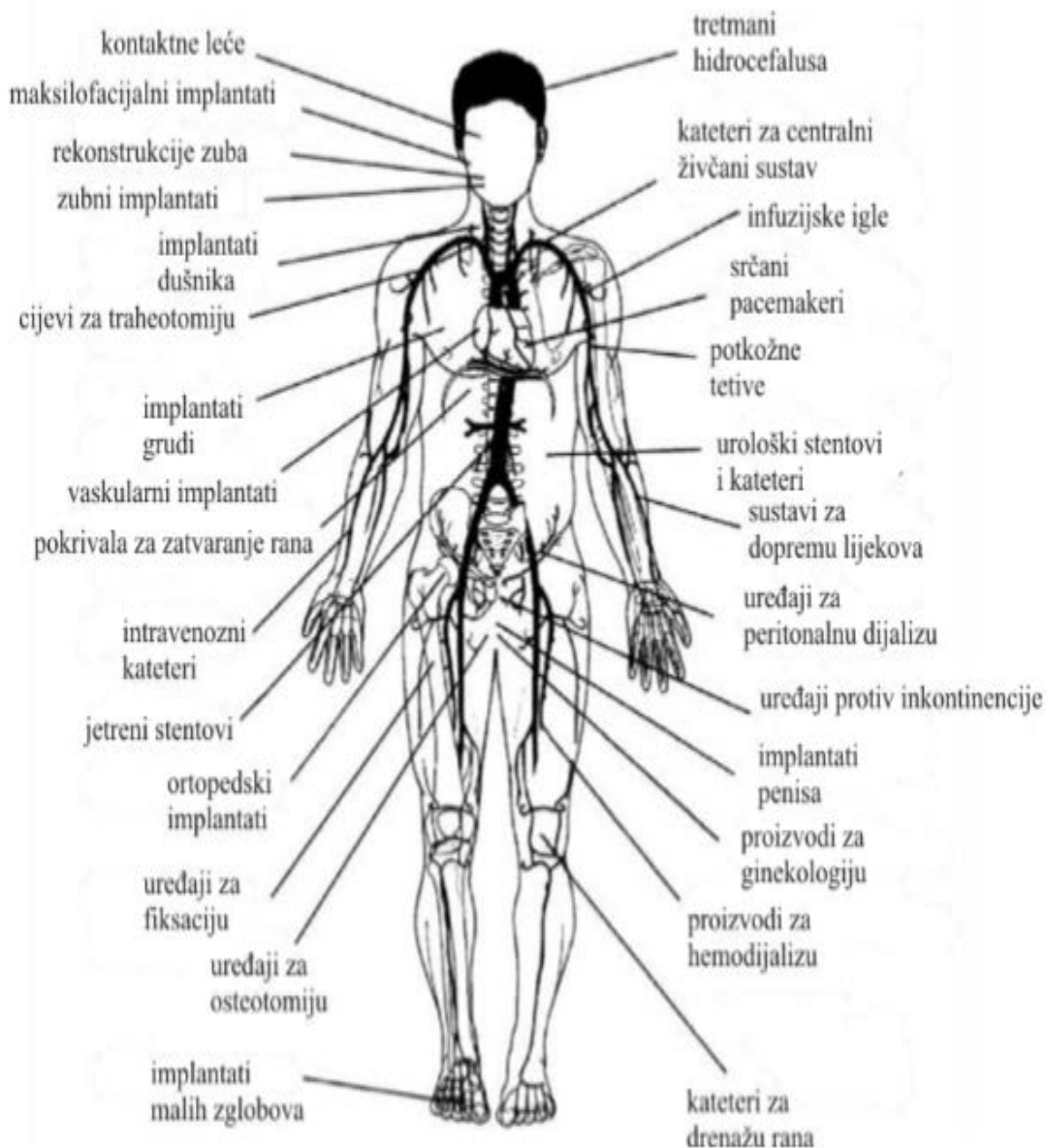
Postoje razne definicije biomaterijala, a donedavno najšire prihvaćena je glasila: biomaterijal je sintetski ili prirodni materijal koji se koristi kao zamjena za dio živog tkiva ili je u produženom kontaktu sa živim tkivom. Prema radu D.F. Williamsa iz 2009. godine, nova definicija glasi: biomaterijal je tvar načinjena tako da se sama ili kao dio kompleksnog sustava, u kontroliranoj interakciji sa organizmom, može koristiti za regulaciju terapijske ili dijagnostičke procedure u medicini ili veterini. [4]

Biomaterijali su u odnosu na većinu tehničkih materijala skupi jer moraju osigurati dugotrajan opstanak u uvjetima koji uključuju korozivne slane otopine pri temperaturi od oko 37°C pod promjenjivim opterećenjem. S obzirom na to da su rijetki materijali u stanju podnijeti takve uvjete, njihovo stvaranje smatra se bitnim napretkom u svijetu znanosti.[4]

Biomaterijale dijelimo na:

- metale
- keramiku
- polimere
- kompozite

Glavna razlika između materijala i biomaterijala je u njihovoj sposobnosti da opstanu u tijelu bez oštećivanja okolnog tkiva i bez da sami budu oštećeni. U tu kategoriju nisu uključeni materijali od kojih se izrađuju proteze, slušni aparati i slične naprave koje su u kontaktu samo sa površinom kože, jer se ona ponaša kao zaštitna barijera između tijela i vanjskog svijeta. Budući da se biomaterijali ugrađuju u živi organizam, moraju biti biokompatibilni, odnosno ne smiju izazivati toksične, alergijske ili kancerogene reakcije.



Slika 1. Prikaz ljudskog tijela te položaja na koje se ugrađuju implantati od biomaterijala koji imaju zadatak nadomještanja ili poboljšanja funkcija oštećenog, uklonjenog tkiva ili organa.[5]

Tijekom 60.-tih i 70.-tih godina prošlog stoljeća otkrivena je prva generacija biomaterijala. Uvjeti koje su ti prvi materijali morali zadovoljavati su biološka inertnost i mehanička svojstva slična svojstvima tkiva koje se zamjenjuje. Osnovna je karakteristika inertnih biomaterijala da oni ne tvore vezu s okolnim tkivom. Najčešći je odgovor tkiva na

implantat od inertnog biomaterijala, stvaranje vlaknaste kapsule oko implantata, što katkada dovodi do njegove potpune izolacije. Zbog toga neki implantati postaju deformirani ili pomaknuti što može uzrokovati oštećenje okolnog tkiva.

Drugoj generaciji biomaterijala osim bioaktivnih, pripadaju i tzv. resorbirajući biomaterijali. To su prvenstveno polimeri građeni od polimljične i poliglikolne kiseline koje se u tijelu hidrolitički potpuno razgrade na CO_2 i H_2O . U tjelesnoj se tekućini takvi materijali kontrolirano otapaju i postepeno zamjenjuju obnovljenim tkivom, čime se izbjegava potreba za naknadnim operativnim zahvatom uklanjanja implantata.

Treća generacija biomaterijala dizajnirana je tako da potiče stanični odgovor na molekulskom nivou, čime se aktiviraju geni koji pomažu obnovu živog tkiva. Zanimljiv primjer treće generacije biomaterijala su polimeri na čijoj su površini ugrađeni proteini, peptidi i druge biomolekule koje oponašaju okolinu izvanstanične matrice i tako potiču višefunkcionalnu staničnu površinu. Ti stanični transplantati obećavaju mnogo u liječenju, naprimjer, neuroloških bolesti.[5]

2.2.Biokeramika

Biokeramički materijali se smatraju biokompatibilnim, tvrdim, sa relativno slabom otpornošću na naprezanje, odličnom tlačnom čvrstoćom i visokom otpornošću na habanje. Ovi materijali (prirodni ili sintetički), korišteni samostalno ili u kombinaciji s polimerima, su najpogodniji od svih biomaterijala koji se koriste u liječenju tkiva.[6] Biokeramika se sastoji od raznih polikristalnih materijala – stakla, staklokeramike te bioaktivnih kompozita sa keramikom kao ojačalom. Svi oni se mogu, po potrebi, proizvoditi u poroznom ili neporoznom stanju (u formi praška, granulata ili prevlake). Nedostaci bioaktivne keramike jesu njena mala gustoća i čvrstoća zbog čega se takva keramika ne može koristiti za implantate izložene velikom opterećenju. Trenutno se od biokeramike većinom proizvode implantati izloženi manjim opterećenjima, kao što su dijelovi srednjeg uha, ispune oštećenih kostiju u oralnoj i ortopedskoj kirurgiji i presvlake dentalnih implantata i metalnih proteza.

Prvotne keramike koje su se koristile u kliničkoj primjeni su aluminijev oksid i cirkonijev oksid, keramike odličnih mehaničkih karakteristika, što je i glavni razlog zbog kojeg su izabrane za implantate. Ti materijali pokazuju izrazito sporu kinetiku razgradnje tako da se mogu smatrati gotovo inertnima dok bioaktivna keramika u kontaktu s fiziološkim

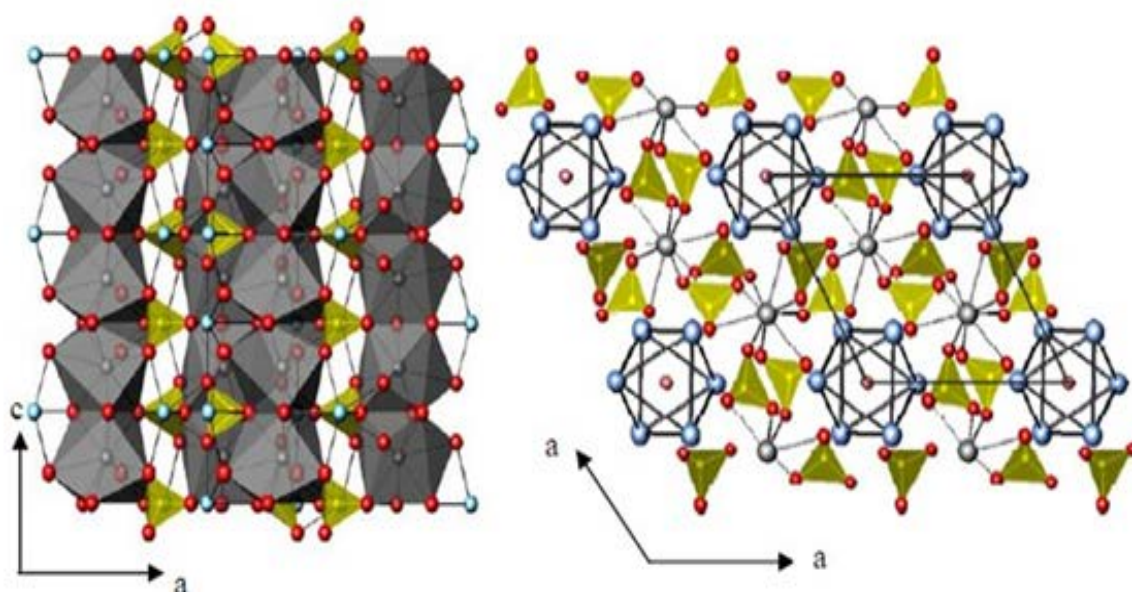
otopinama kemijski reagira stvarajući novo tkivo.

U posljednje vrijeme se ispituje njihova sposobnost otpuštanja lijekova, za što neki tipovi biokeramike imaju velik potencijal. Njihova glavna karakteristika je površinska reaktivnost, koja uzrokuje vezanje s kosti što poboljšava formiranje iste. To se svojstvo koristi za popravak ili rekonstrukciju oštećene ili ostarjele kosti koja nije u stanju samostalno ispunjavati svoju funkciju.[4]

Među biokeramičkim materijalima posebno mjesto pripada kalcijevim fosfosfatima. Najpoznatiji kalcijevi fosfati koji se koriste u biomedicinskim aplikacijama su HA, oktakalcijev fosfat (OCP), amorfn kalcijev fosfat (ACP), i α/β TCP (α/β trikalcijev fosfat). Kalcijevi fosfati koji imaju odnos Ca/P manji od 1 i veći od 2, nisu prihvatljivi za implantaciju u tkiva. [7] Kalcijevi fosfati biološkog podrijetla čine glavnu komponentu svih kalcificiranih tkiva kod sisavaca, te sa ostalim kalcijevim fosfatima prirodnog podrijetla čine većinu sirovine za proizvodnju fosfatnih gnojiva. [8] Kalcijevi fosfati su slabo topljivi u vodi, netopljivi u bazičnim otopinama i lako topljivi u kiselim otopinama. To je bitno svojstvo jer je ljudsko tijelo blago bazičnog pH (oko 7.4). U čistom stanju su svi bijele boje i umjerene tvrdoće (neznatno manje od ljudske kosti), dok su u prirodi uslijed nečistoća gotovo uvijek obojeni.

2.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit, HA, je u količini od ~43 mas. % temeljni mineralni sastojak ljudske kosti. To je kalcijev fosfat čija stehiometrijska formula glasi $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, s molarnim omjerom Ca/P=1,67. Hidroksiapatit je mineral ionskog karaktera, kristalna struktura se može opisati kao kompleksna heksagonska slagalina kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u kristalnoj rešetci. Osnovna apatitna struktura je heksagonska s prostornom grupom $P6_3/m$ i parametrima rešetke $a=9,4 \text{ \AA}$ i $c=6,9 \text{ \AA}$. Čisti HA se nikada ne pojavljuje u prirodi, ali umjetno sintetiziran ima široku primjenu. U posljednje je vrijeme intenzivno istraživao kao materijal pogodan za nadomjestak kosti, jer je dokazano da ubrzava širenje koštanog tkiva oko implantata zato što tvori direktnu vezu sa susjednim tkivom i tako poboljšava mehaničko vezanje implantata.[9]



Slika 2. Kristalna struktura hidroksiapatita. A) Sivom bojom su prikazani koordinacijski poliedri kationa Ca^{2+} koje povezuju žuti PO_4^{3-} tetraedri. B) Plavom bojom prikazani su kationski položaji Ca^{2+} . Crvenom bojom prikazani su atomi kisika, a ružičastom X- anioni[9]

Prednost upotrebe hidroksiapatita kao biokeramike ili biomaterijala u usporedbi s ostalim biokeramikama, kao što je npr. „Bioglass”, jest njegova kemijska sličnost sa anorganskom komponentom ljudske kosti i zuba. Koristi se za zubne implantate, premaze na protezama, kromatografiju nukleinskih kiselina i proteina, za kontrolu otpuštanja lijekova itd. Najbitnije svojstvo mu je da podržava obnavljanje kosti na mjestu gdje je proteza ili nadopuna ugrađena. U strukturu HA 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.[10] Na kationska mjesta u apatitnoj strukturi mogu se ugraditi jednovalentni kationi kao Na^+ i K^+ ili dvovalentni kationi kao Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ili trovalentni kationi kao La^{3+} . Kationska mjesta mogu ostati i prazna i to maksimalno dvije vakancije od mogućih deset u stehiometrijskom apatitu. Ovako prilagodljiva apatitna struktura omogućava sinteze materijala različitih fizikalnih i kemijskih svojstava kakva imaju koštana i hrskavična tkiva ili zubna caklina i dentin. No ova struktura ima za posljedicu i laku ugradnju nepoželjnih toksičnih iona o čemu naročito treba voditi brigu prilikom sinteze čistog HA.[11]

$M_{10}(ZO_4)_6X_2$	
M	Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K, H,...
Z	P, CO ₃ , V, As, S, Si, Ge, Cr, B,...
X	OH, OD, CO ₃ , O, BO ₂ , F, Cl, Br...

Tablica 1. Formula apatitnog minerala i moguće zamjene u njegovim trima podrešetkama.

HA 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, CO₃²⁻. Iz tog je razloga prikladnije da se biološki apatiti nazivaju karbonatnim apatitima (CHA), a ne hidroksiapatitom, HA. Kod bioloških apatita CO₃²⁻ grupe su ugrađene na mjesto PO₄³⁻ grupa, a uz to su zbog očuvanja jednakosti naboja Ca²⁺ ioni zamijenjeni Na⁺ ionima.[12]

Biološki apatiti privlače još veću pozornost od kada je dokazano da određene zamjene na Ca²⁺, PO₄³⁻ i OH⁻ mjestima u HA strukturi, te prisutnost nekih drugih elemenata, igraju važnu ulogu u ukupnoj fiziološkoj funkciji i procesu zacjeljivanja kostiju (osteointegracija).[13]

3. Silicij

Među mnogobrojnim prisutnim elementima u mineralnoj komponenti kosti silicij ima presudnu ulogu za normalan rast i razvoj hrskavičnog i koštanog tkiva.[14] Sadržaj silicija u različitim tkivima sisavaca je različit od 1 ppm u serumu, 2-10 ppm u jetri, bubrezima, 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. [15] Silicij ima vrlo važnu i značajnu ulogu u koštanom i hrskavičnom tkivu djelujući na fiziološki sustav tijekom stvaranja i rasta skeleta kod složenih organizama. Silicij također utječe na sintezu hrskavičnog tkiva i integritet vanstaničnog

matriksa, kao i na procese biomineralizacije, procese sinteze i proliferacije koštanih stanica, direktno utječući na procese remodeliranja, stvaranja osteoklasta i resorpcijskih aktivnosti.[11]

3. Metode dobivanja SiHA

Među najzastupljenijim metodama pripreve SiHA su taloženja, hidrotetalna metoda i sol-gel metoda. Tako je Ruys sa suradnicima pripremio SiHAp sol-gel metodom koristeći kalcijev nitrat, diamonijev hidrogen fosfat i amonijev hidroksid kao polazne komponente za dobivanje HA, dok je silicij dodan u obliku tetraetilortosilikata (TEOS). Materijal je sinteriran na 1100°C tijekom 1h. Rendgenska difrakcija analiza (XRD) pokazala je da prisustvo $\text{Ca}_5[(\text{SiO}_4)(\text{PO}_4)](\text{PO}_4)$ faze, a promjene u parametrima kristalne rešetke HA ukazale su na ugradnju silicija u strukturu HA. [16]

Gibson i suradnici su pripremili SiHA metodom taloženja reakcijom kalcijeva hidroksida i fosforne kiseline, održavajući pH otopine na 10.5 pomoću amonijeva hidroksida. Silicij je dodan u obliku silicijeva acetata u količini od 0.4 mas.%, uz stehiometrijski omjer $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si}) = 1.67$. Materijal je zatim žaren na 1200°C tijekom 2h. Rezultati XRD analize su pokazali smanjenje parametra a , a povećanje parametra c . Pretpostavlja se da je silicijev ion zamijenio mjesto fosforne skupine, pritom stvarajući OH^- vakancije da bi se zadovoljila neutralnost.[17]

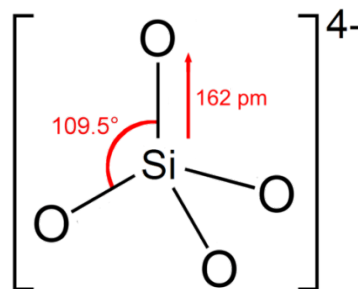
Marques i suradnici su pripravili SiHA istom metodom taloženja, slično kao i Gibson, s dodatkom 0.2 mas.% Si, te dobio povećanje parametra a što je suprotno rezultatima Gibsona, dok je parametar c ostao nepromijenjen.[18]

Tang i suradnici su pripremili SiHA hidrotermalnom metodom koristeći kalcijev nitrat, amonijev fosfat i tetraetilortosilikat (TEOS), pri $\text{pH} > 10$ s omjerom $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})=1.67$, dok je udio Si iznosio 0.8, 1.5 i 4.0 mas.%. Hidrotermalna reakcija se odvijala pri 200°C tijekom 8h. Uzorci su zatim žareni na 800 i 1000°C. Rezultati su pokazali, slično kao i u prethodnim istraživanjima, smanjenje parametra a i povećanje parametra c . FTIR analizom je utvrđeno smanjenje intenziteta vrpce OH skupine s povećanjem koncentracije silicija. Također, pojavile su se i karakteristične vibracije za SiO_4^{4-} grupu, te kod uzoraka od 1.5 i 4.0 mas.% Si i Si-O veza, za koju autori pretpostavljaju da je nastala uslijed polimerizacije SiO_4^{4-} grupa. [19] Prema istraživanju Orlića, SiHA se također može dobiti ugradnjom silicija u HA dobiven

hidrotermalno iz sipine kosti, odnosno kalcijeva karbonata, u reakciji s amonijevim dihidrogen fosfatom pri temperaturi do 200°C. Za reakciju ugradnje silicija u strukturu HA korišten je TEOS. Rezultati prikupljeni XRD i FTIR metodama jasno upućuju na moguću ugradnju silicija u strukturu HA, ali ne nude jednoznačne dokaze. Jednoznačna potvrda ugradnje silicija u strukturu HA dobivena je metodom nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja (²⁹Si NMR). [11]

4. Ugradnja silicija u strukturu HA

Prema Gibsonu, najjednostavniji model ugradnje SiO₄⁴⁻ iona u strukturu HA je supstitucija s PO₄³⁻ funkcionalnim grupama.[20] Silicij odnosno SiO₄⁴⁻ tetraedri, svojom veličinom, su slični PO₄³⁻ tetraedrima, i mogu ih lako zamijeniti u kristalnoj rešeci HA s posljedičnom kompenzacijom naboja. Duljina P-O veze u tetraedrijskoj koordinaciji (0,157 nm) je usporediva s duljinom veze Si-O (0,166 nm) u istoj koordinaciji.[21] Postoji nekoliko mehanizama po kojima može doći do kompenzacije naboja. Naboj se može kompenzirati stvaranjem anionskih vakancija ili suviškom kalcija u strukturi [131-135].



Slika 3. Silicijev ion

Izvor: <http://www.wikiwand.com/en/Silicate>

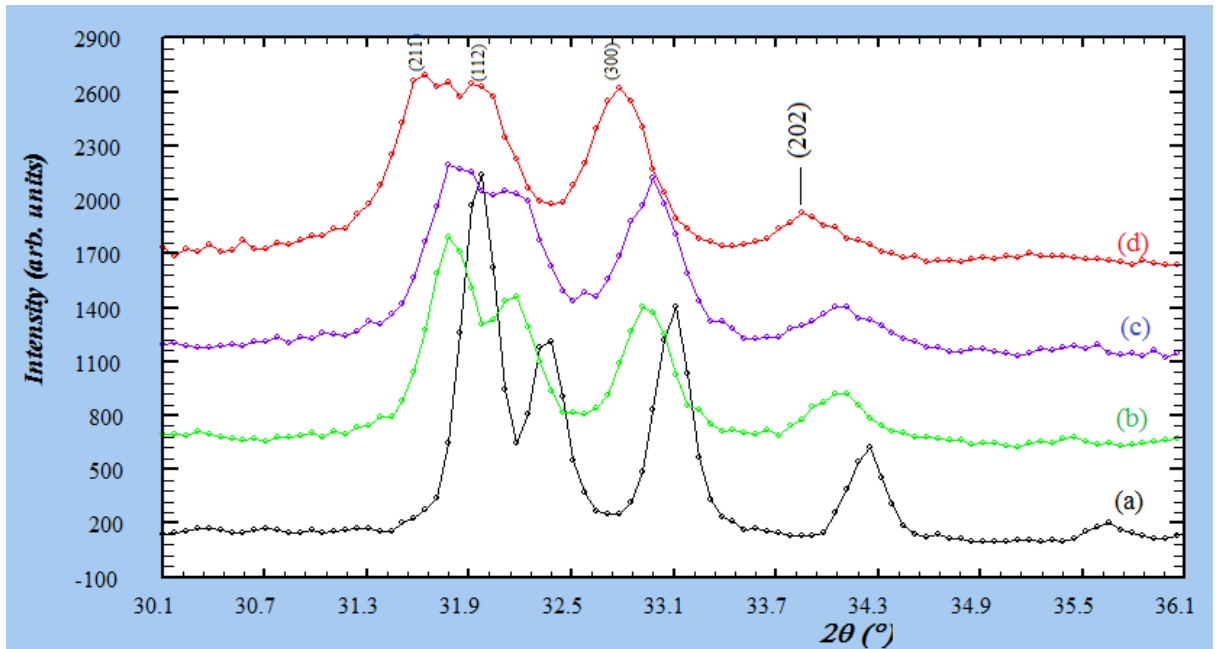
Prema autorima mehanizam kompenzacije negativnog naboja zbog ugradnje SiO₄⁴⁻ tetraedarana mjesta PO₄³⁻ odvija se stvaranjem vakancija na mjestima OH- skupina u rešetci HA, prema izrazu:



$$(x = 0 - 2)$$

[22] Količina silicija koja se može ugraditi je ograničena. Literaturne vrijednosti su u rasponu od 0.1 do 5% Si. Male količine od 0.5-1% su dovoljne za postizanje važnih biomimetičkih poboljšanja.

Prema istraživanjima Yacoubia i suradnika, [23] parametri i volumen elementarne ćelije SiHA su veći nego kod čistog HA. Povećanje parametara elementarne ćelije rezultat je blagog pomaka SiHA difrakcijski pikova prema nižim vrijednostima Braggovog kuta u usporedbi sa čistim HA.



Slika 4. Pomak difrakcijskih maksimuma uzoraka s ugrađenim silicijem: (a) čisti HA, (b) Si1.4HA, (c) Si1.6HA and (d) Si1.8HA.

Pomak difrakcijskih pikova je veći što je veći udio dodanog silicija. Povećanje parametra se može objasniti većom duljinom veze Si-O (1.62Å) u odnosu na duljinu veze P-O (1.51Å). Stoga, pretpostavlja se da supstitucija PO_4^{3-} tetraedara sa SiO_4^{4-} tetraedrima doprinosi porastu parametara elementarne ćelije SiHA. Kako raste udio ugrađenog silicija tako rastu i parametri ćelije a i c . Također, povećanju mogu doprinosti i veći radijus Si^{4+} iona (0.042 nm) u odnosu na P^{5+} (0.035 nm).

Veličina kristalita, određena Scherrerovom jednažbom, pokazuje da se povećanjem udjela silicija sa 3.9 na 5.1 mas.%, veličina kristalita smanjuje sa 40 nm na 25 nm uzduž a osi, te sa 31 nm na 25 nm uzduž c osi. Čisti HA ima veličinu kristalita od 41 nm uzduž a , i 42 nm uzduž c osi. To ukazuje na utjecaj supstituiranog silicija na veličinu kristalita.

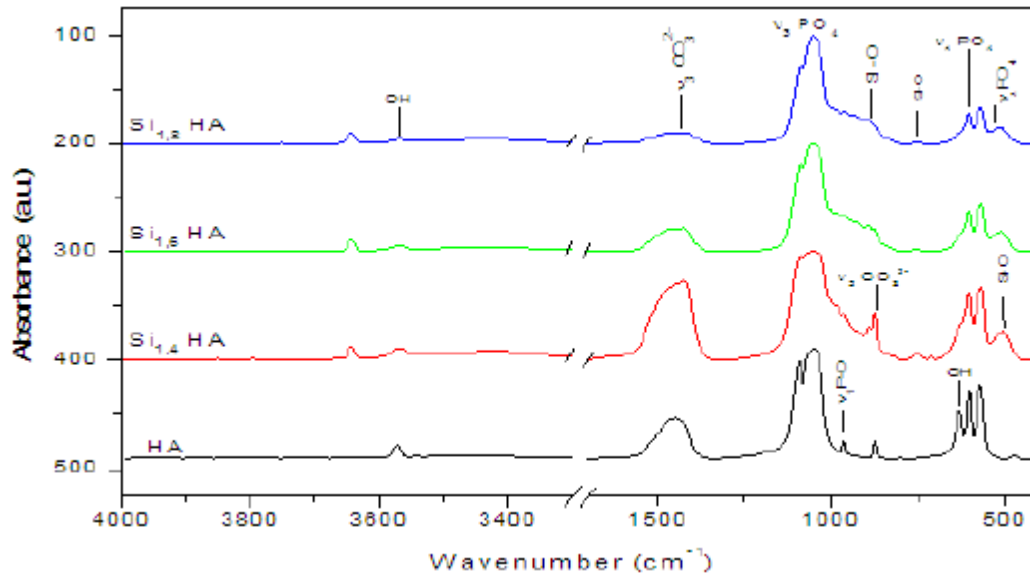
Tablica 2. Veličina parametara i volumen ćelije uzoraka čistog HA i HA s ugrađenim Si.

Sample	a(Å)	c(Å)	V(Å ³)
HA	9.4142	6.8802	528
Sil.4HA	9.4224	6.9070	531
Sil.6HA	9.4352	6.9078	532
Sil.8HA	9.4388	6.9132	533

Tablica 3. Veličina kristalita uzoraka čistog HAA i HA s ugrađenim Si.

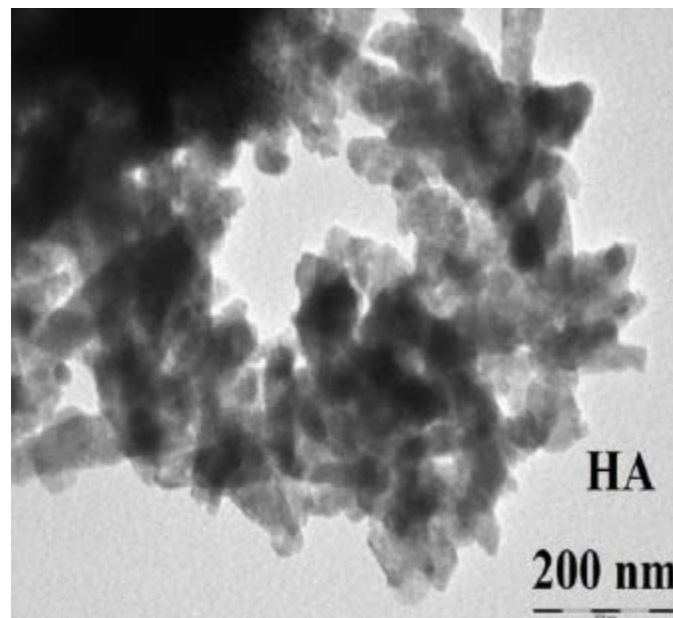
Sample	Crystallite size along a-axis(Å)	Crystallite size along c-axis(Å)	Degree of crystallinity(%)
HA	41	42	82
Sil.4HA	40	31	66
Sil.6HA	40	29	61
Sil.8HA	32	25	57

Analizirajući rezultate dobivene FTIR metodom, nađeno je da se najveći utjecaj supstitucije silicija primjećuje u istežanju i savijanju OH⁻ vrpce pri 3572 i 631 cm⁻¹. Intenziteti tih vrpce opadaju s porastom silicija, te nestaju pri 1.8 mas.% silicija, što se tumači kompenzacijom naboja pri čemu hidroksiapatitna jedinična ćelija gubi jednu OH⁻ skupinu uslijed supstitucije PO₄³⁻ sa SiO₄⁴⁻ tetraedrom. Dodatne tri vrpce se javljaju pri 490, 756 and 890 cm⁻¹, koje izostaju kod čistog HA, a pripisuju se prisutnosti SiO₄⁴⁻ skupine u HA. Također, kako raste udio silicija tako se smanjuje intenzitet CO₃²⁻ vrpce.

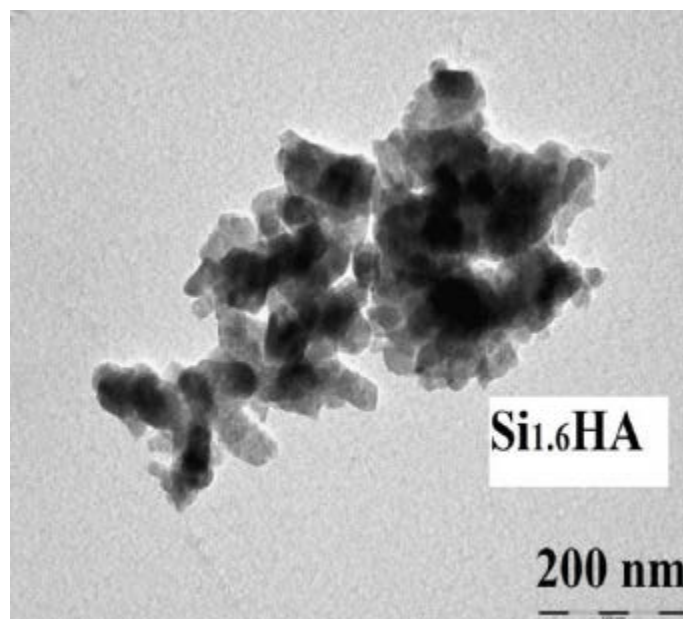


Slika 5. FTIR spektar HA i SiHA.

TEM mikrografi HA i SiHA prašaka sinteriranih na 900°C pokazuju kako silicij ima negativan utjecaj na veličinu kristalita, tj. veličina se smanjuje s povećanjem silicija. Sa slike 6 je vidljivo da su kristaliti HA sferoidalnog oblika, za razliku od kristalita SiHA koji su izduženiji, što sugerira da je u prisutnosti silicija preferiran rast kristala u smjeru *c* osi.



Slika 6. TEM mikrograf HA sinteriranog na 900°C.



Slika 7. TEM mikrograf SiHA sinteriranog na 900°C.

5. Mikrostruktura i utjecaj sinteriranja na SiHA

Termalna stabilnost SiHA ovisi o nekoliko faktora, kao što je sastav (omjer Ca/(P+Si) i Ca/P, sadržaj Si) i uvjeti sinteze. Na temelju ovih parametara moguće je dobiti monofazni HA ili dvofazni kalcijev fosfat koji sadrži HA i TCP s mogućim amorfnim primjesama. Monofazni HA se obično dobiva kada je molarni omjer Ca/P= 1.67-1.75 i koncentracijom Si do 8 mas.%. Ispitivana je termalna stabilnost SiHA dobivenog iz kalcijeva nitrata pri različitim koncentracijama Si (0.8, 1.4, 1.5, i 4.0 mas.%). Pri niskim udjelima Si (<2 mas.%), termalna stabilnost SiHA i čistog HA je bila usporediva, gdje su se oba materijala raspadala pri 1000°C, pri čemu se iznad ove temperature formirala α -TCP metastabilna faza. Također, nađeno je da se SiHA s udjelom Si od 4 mas.% raspada pri nižim temperaturama. Neka istraživanja su pokazala da ugradnja Si u HA strukturu ima jak utjecaj na svojstva materijala prilikom sinteriranja. Tako je nađeno da je za SiHA potrebna veća temperatura sinteriranja da bi se dobila ista gustoća uspoređujući sa čistim HA. Naime, pri temperaturi od 1050°C gustoća SiHA sa 1.6 mas.% Si je bila tek 62 % teorijske vrijednosti, dok je za čisti iznosila 93%. Nakon sinteriranja pri 1200°C, gustoće su bile usporedive, a pri 1300°C nije postojala nikakva razlika. Također, SiHA je pokazao veće skupljanje (19.8-21.1%) u odnosu na HA (18%). Što se tiče utjecaja Si na veličinu zrna HA, nađeno je da SiHA ima finiju mikrostrukturu, s obzirom da Si usporava rast zrna. Prisustvo Si povećava čvrstoću materijala, što se pripisuje upravo smanjenju veličine zrna. [24]

6. *In vitro* bioaktivnost

In vitro istraživanja bioaktivnosti u SBF (simuliranoj tjelesnoj tekućini) pokazala su da ugradnja Si unutar HA potiče brže i povećano stvaranje apatitnog sloja nego što je to slučaj kod HA. Međutim, kojim mehanizmom Si podupire *in vitro* kao i *in vivo* bioaktivnost, zasad nije potpuno razjašnjeno. Prema nekima, povećanoj bioaktivnosti u odnosu na HA pridonosi povećani broj strukturnih defekata nađenih u SiHA. Supstitucija PO_4^{3-} sa SiO_4^{4-} grupama uzrokuje nastajanje defekata u strukturi, a mehanizmi kompenzacije naboja stvaraju elektronegativniju površinu, što također povećava topljivost. Povećana koncentracija iona kalcija, fosfora i silicija na površini hidroksiapatitne keramike uzrokuje brže taloženje biološkog apatita i srastanje kosti na površinu implantata. Ako bioaktivnost slijedi predloženi mehanizam otapanja i ponovnog taloženja, znači da bolja topljivost Si-HA ubrzava srastanje kosti s ovom biokeramikom. Time je objašnjeno kako silicij povećava bioaktivnost hidroksiapatita te se naglašava mogućnost primjene Si-HA za biomedicinske aplikacije. Da bi se opisao proces otapanje/taloženja koji se odvija na površini materijala, u jednom od brojnih istraživanja, praćena je promjena kemijskog sastava SBF otopine, pri 37°C u prisutnosti SiHA sa različitim udjelima Si (od 0.5 do 2.0 mas.%). Većina silicijevih iona je bila otpuštena iz materijala već nakon prvog dana inkubacije (od 300 do 400 μm), te je uslijedio blagi rast do 25. tog dana (od 400 do 800 μm) u skladu sa koncentracijom Si u početnom materijalu.[24]

Dakako, *in vitro* bioaktivnost može predvidjeti ponašanje materijala u *in vivo* uvjetima, no, također se treba uzeti u obzir i sposobnost materijala da na svojoj površini adsorbira proteine i druge makromolekule, čime se utječe na procese na površini materijala i u njegovoj blizini. Tako su neki istraživači ispitali prirodu interakcije proteina plazme sa SiHA i HA te našli da SiHA ima veću interakciju s proteinom nego čisti HA. Osim toga, rađena su istraživanja i sa drugim medijima (McCoy medij) te različitim molekulama kao što su fibronektin i vitronektin, i sva su potvrdila favoriziranu adheziju na površini SiHA u odnosu na HA. To dovodi do zaključka da, kada su proteini u doticaju sa materijalom, visoka interakcija/adsorpcija na površini SiHA u odnosu na HA, može ograničavati nukleaciju apatita. Ova tvrdnja se pokazala točnom i istraživanjima *in vivo*, gdje su nađena dva različita biološka procesa na mjestu implantacije SiHA, jednog koji se odvijao u dubljim dijelovima implantata, a drugi na površini. Unutar implantata su nađeni znakovi otapanja i prisutni veliki igličasti apatitni kristalići, dok su na površini nađeni pločasti kristalići bez znakova otapanja. Predloženo je da je ovo ponašanje materijala uzrokovano prisutnošću bioloških molekula,

koje ograničavaju procese otapanja i taloženja. Osim količine proteina, također je važna i vrsta proteina i uvjeti u kojima se provodi nasađivanje stanica (statički ili dinamički).[24]

7. Utjecaj SiHA na koštane stanice

Izuzetno je važno istražiti sposobnost materijala da potakne ili podržava razvoj koštanih stanica (osteoblasta) i da može biti resorbiran od strane koštanih stanica (osteoklasta). Ispitivanja su rađena na SiHA (0.8 i 1.5 mas.%) paralelno sa čistim HA. Nakon stimulirane mineralizacije sa glicerofosfatom, 7. dan je pokazao povećanu aktivnost alkalne fosfataze (enzimski biljeg izgradnje kosti) na 1.5 mas.% SiHA, i veći sadržaj proteina na kraju eksperimenta na 0.8 mas.% SiHA u odnosu na ostala dva materijala. Postoje studije u kojima je nabolja adhezija stanica postignuta na 0.8 mas.% Si, u usporedbi sa HA i 1.5 i 2.0 mas.% Si. U jednoj studiji stanice su nasađene na HA i 1.4 mas.% SiHA, te su oba materijala pokazala da podupiru adheziju stanica u jednakoj mjeri, no ipak u korist SiHA nakon 5 dana. Nadalje, oba materijala su podržala razvoj zrelih stanica koje su pod skenirajućim elektronskim mikroskopom izgledale nešto zaobljenije i manje spljoštene na SiHA nego na HA.[24]

Druga brojna istraživanja pokazuju da silicij također sudjeluje u biokemijskim i 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, $\text{Si}(\text{OH})_4$, pospješuje množenje osteoblasta dijeljenjem kao i stvaranje kolagena, povećavajući aktivitet osteokalcina i alkalijske fosfataze. Poznato je također da silicij povezuje makromolekule glikozaminoglikana tvoreći mrežu između kolagena i proteoglikana stabilizirajući tako molekule koštanog matriksa i sprečavajući njihovu enzimsku razgradnju.

Na temelju svih ovih radova jasno je da silicij ima vrlo važnu i značajnu ulogu u koštanom i hrskavičnom tkivu djelujući na fiziološki sustav tijekom stvaranja i rasta skeleta kod složenih organizama. Silicij također utječe na sintezu hrskavičnog tkiva i integritet vanstaničnog matriksa, kao i na procese biomineralizacije, procese sinteze i razvoja koštanih

stanica, direktno utječući na procese remodeliranja, stvaranja zrelih koštanih stanica i resorpcijskih aktivnosti.[24]

8. Biokompatibilnost SiHA

Nakon što su prvotni *in vitro* testovi pokazali da SiHA potiče staničnu aktivnost i bioaktivnost, istraživači su započeli sa *in vivo* studijama. Tako je nađeno da je urastanje kosti i prekrivenost novom kosti na implantatu SiHA (0.8 mas.%) znatno veća nego u slučaju HA nakon što su materijali bili ugrađeni u zečeve 23 dana. TEM mikrografi implantata ugrađenih u ovce tijekom 6 i 12 tjedana pokazali su korelaciju između koncentracije Si (max 1.5 mas.%) i brzine otapanja biokeramike, gdje se otapanje prvo odvijalo na granicama zrna koji su u velikom broju prisutni u SiHA materijalu. Postoje studije u kojima su već u ranoj fazi nasadivanja pronađena kolagenska vlakna na granici površini SiHA i kosti, za razliku od čistog HA gdje su izostala. Uz kolagenska vlakna nađeni su i pločasti kristali apatitne faze, veće urastanje kosti i veća površina prekrivena novom kosti. Nadalje, rađena su istraživanja i sa poroznim materijalima koji se smatraju pogodnijima za regeneraciju kosti nego kompaktni materijali. Takav jedan porozni SiHA ugrađen u zečeve tijekom 6 tjedana je pokazao značajnu integraciju kosti u odnosu na kompaktni implantat. Sva ova istraživanja dokazuju bolja svojstva SiHA u *in vivo* uvjetima od samog HA.[24]

9. Daljnja istraživanja: poboljšanje biološke aktivnosti

Razvijanjem novih pristupa i strategija nastoje se poboljšati biološkasvojstva SiHA. Tako se naprimjer, radi se na uporabi SiHA premaza kao dostavljača lijekova, odnosno antibiotika i drugih, kako bi se utjecalo na aktivnost implantata. Na taj način bi bilo moguće smanjiti, izbjeći ili spriječiti poslijeoperacijsku infekciju implantata te istovremeno utjecati na regeneraciju koštanog tkiva. Osim antibiotika, neka istraživanja navode da bi modifikacija površine SiHA silanima mogla također doprinijeti procesu liječenja, jer bi se preko modificirane površine mogli unijeti i faktori rasta. Osim silana, predložena je i modifikacija površine reakcijom između OH skupine HA i COOH skupine iz biotina, što bi povećalo adsorpciju proteina i lijekova koji sudjeluju u procesu bržeg zarastanja kosti. Kako bi se poboljšala biološka svojstva HA i što bolje imitirao sasta prirodne kosti, rađena su istraživanja koja predlažu novu strategiju prema kojoj bi se u HA osim silicija mogli ugraditi i drugi ioni,

primjerice karbonati, magnezij i itrij. Ugrađivanje više od dvije vrste iona je područje koje do sada nije detaljno istraživano, što znači da bi nova istraživanja mogla krenuti u tom smjeru.

Zaključak

Supstitucija Si u HA strukturu svakako daje nova fizikalno-kemijska i biološka svojstva biokeramike. U usporedbi s HA, SiHA pokazuje finiju mikrostrukturu s manjom veličinom zrna, te veću brzinu otapanja apatitne faze. *In vitro* studije sugeriraju da je poboljšano *in vivo* ponašanje koje pokazuje SiHA s obzirom na čisti HA, povezano sa većom koncentracijom iona kalcija i fosfora uslijed procesa otapanja, ali i sa dinamičkim mikrokolišem u kojem se javljaju proteinske interakcije. *In vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da koštane stanice, osteoblasti i osteoklasti, različito reagiraju na SiHA s obzirom na nesupstituirani HA, i to u vidu poboljšane proliferacije i razvoja u zrele stanice. Na temelju kompleksne slike u kojoj su prisutne mnoge varijable, potrebna su sustavna istraživanja kako bi se jasno shvatio utjecaj silicijeve supstitucije u strukturu HA.

Literatura

- [1] L.L. Hench J. Am. Ceram. Soc., 74 (1991), p. 1487
- [2] Brigitte WopenkaT, Jill D. Pasteris Materials Science and Engineering C 25 (2005) 131 – 143
- [3] Klaudia Paljar,UGRADNJA SILICIJA U POROZNU HIDROKSIAPATITNU BIOKERAMIKU,diplomski rad,2009
- [4] Dorozhkin, S.V.: Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. Journal of Functional Biomaterials, 1(1) (2010) 22-107.
- [5] Izazovi i poticaji, Kem. Ind. 54 (3) 131–134 (2005).
- [6] Jokanović V. NANOMEDICINA najveći izazov 21. veka. Data Status, Beograd, 2012
- [7] Chen F, Zhu Y, Wu J, Huang P, Cui D. Nanostructured Calcium Phosphates:Preparation and Their Application in Biomedicine. Nano Biomed.Eng. 2012;4(1):41-9).
- [8] Dorozhkin, S.: Calcium Orthophosphate: Applications in Nature, Biology and Medicine.Pan Stanford Publishing, Boca Raton (2012).
- [9] Naga, S.M., El-Maghraby, H.F., Sayed, M. and Saad, E.A.: Highly Porous Scaffolds Made of Nanosized Hydroxyapatite Powder Synthesized from Eggshells. Journal of Ceramic Science and Technology, 6(3) (2015) 237-244.
- [10] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, Dense hydroxyapatite, in: L. L. Hench and J. Wilson (eds.), Introduction to bioceramics, World Scientific, Singapore, 1993, p. 139-180 .
- [11] Sebastijan Orlić, Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike, Disertacija, 2012.
- [12] S. Jackson, A.G. Cartwright, D. Lewis: Calcif. Tissue Res. 25 (1978) 217-222
- [13] G. Goller et al., Key Eng. Mater. 284-286 (2005) 325
- [14] A.M. Pietak, J.W. Reid, M.J. Stott, M. Sayer: Biomaterials 28 (2007) 4023-4032
- [15] K. Schwarz: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (1973) 1608-1612
- [16] A. J. Ruys. Silicon-doped hydroxyapatite. Journal of the Australian Ceramic Society,29:71{80, 1993.

- [17] I. R. Gibson, S. M. Best, and W. Bonfield. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44:422-428, 1999.
- [18] A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhaes, R. N. Correia, and M. Vallet-Regí. Synthesis and characterization of silicon substituted hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*, 192-195:247-250, 2001.
- [19] X. L. Tang, X. F. Xiao, and R. F. Liu. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method. *Materials Letters*, 59:3841-3846, 2005.
- [20] Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1999;44:422-8
- [21] R.D. Shannon, C.T. Prewitt: *Acta Cryst B*25 (1969) 925-946
- [22] Kentaro Nakata; Takashi Kubo, Chiya Numako, Takamasa Onoki and Atsushi Nakahira, *Materials Transactions*, Vol. 0, No. 5 (2009) pp. 1046 to 1049
- [23] A. El Yacoubi, A. Massit, M. Fathi, B. Chafik, E. Idrissi, K. Yamni, e-ISSN: 2278-5736. Volume 7, Issue 11 Ver. II. (Nov. 2014), PP 24-29
- [24] Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Michael Mucalo, GOOGLE BOOK

Životopis:

Rođen sam 29. 03. 1991. godine u Čakovcu. Završio sam Drugu osnovnu školu u Čakovcu te potom nastavio školovanje u općoj gimnaziji Josipa Slavenskog u Čakovcu. Srednju školu završio sam 2009. godine. Iste godine upisao sam sveučilišni preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Završni rad izradio sam na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale pod vodstvom dr.sc. Hrvoja Ivankovića.

