

# Priprava i karakterizacija silicijem dopiranog visokoporoznog hidroksiapatit-kitozan kompozitnog materijala

---

Posarić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:552232>

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

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



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Posarić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Posarić

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA SILICIJEM DOPIRANOG  
VISOKOPOROZNOG HIDROKSIAPATIT-KITIZAN  
KOMPOZITNOG MATERIJALA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Dajana Milovac

dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2017.

## **Zahvale**

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću na prihvaćenom mentorstvu, odobrenoj temi i stručnom vodstvu.*

*Zahvaljujem se asistentici dr. sc. Dajani Milovac na savjetima i pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela i izrade ovog rada.*

*I na kraju, posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na razumijevanju i poticanju tijekom školovanja i studiranja.*

## Sažetak

Cilj rada bila je priprava visokoporoznog silicijem dopiranog hidroksiapatit-kitozan kompozitnog materijala za potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela prirodnih znanosti i inženjerstva usmjereno razvoju bioloških nadomjestaka za obnovu, održavanje ili unaprjeđenje funkcije oštećenog tkiva. U inženjerstvu koštanog tkiva koriste se biorazgradljivi polimerni materijali i bioaktivna keramika, kao što je hidroksiapatit. Također, silicij ima vrlo važnu ulogu u mineralizaciji i formiranju kosti, stoga se danas koristi u širokom području medicinskih nadomjestaka i koštanih graftova.

Hidrotermalnom pretvorbom aragonita iz sipine kosti, pri 200 °C kroz 72 h, pripremljen je silicijem supstituirani hidroksiapatit (Si-HA) s potpuno očuvanom mikrostrukturom. Nadalje, visokoporozni kompozitni materijal, Si1%-HA/kitozan, dobiven je tehnikom vakuumske impregnacije. Karakterizacija pripremljenih materijala utvrđena je instrumentalnim metodama: infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, (FTIR), kvalitativna mineralna rendgenska difrakcijska analiza (XRD), termogravimetrijska analiza, (TGA) i pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .

FTIR spektri uzorka hidroksiapatita i Si-HA različitog masenog udjela silicija pokazuju smanjenje intenziteta fosfatnih, karbonatnih i hidroksilnih skupina s povećanjem udjela dodanog silicija što može ukazivati na ugradnju  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedara na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  tetraedara. XRD analiza potvrđuje nastanak HA kao jedine prisutne mineralne faze nakon hidrotermalne reakcije. TGA metodom potvrđena je prisutnost kitozana od oko 10 mas.%, a SEM mikrografija analiziranih kompozitnih uzoraka prikazuje lamelarnu strukturu sipine kosti prevučenu tankim filmom kitozana nakon impregnacije 2%-tnom otopinom kitozana.

**Ključne riječi:** inženjerstvo tkiva, hidroksiapatit, kitozan, kompozitni materijal.

# Synthesis and characterization of Si-doped highly porous hydroxyapatite-chitosan composite materials

## Abstract

The aim of this work was preparation of highly porous silicon doped hydroxyapatite-chitosan composite materials with potential application in bone tissue engineering. Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function. Biodegradable polymeric materials and bioactive ceramics, such as hydroxyapatite, are used in bone tissue engineering. Also, silicon plays an important role in bone mineralization and formation and is therefore incorporated into a wide variety of medical implants and bone grafts used today.

Silicon-substituted hydroxyapatite (Si-HA) was prepared successfully by hydrothermal transformation of aragonitic cuttlefish bone at 200 °C during 72 h with a fully preserved original microstructure. Next, a highly porous composite material, Si1%-HA/chitosan, was obtained using the vacuum impregnation technique. Characterization of prepared composite material was carried out by instrumental methods: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), Thermogravimetric analysis (TGA) and Scanning electron microscopy (SEM).

FTIR spectra of HA and Si-HA with different content of silicon, show the decrease in intensity of phosphate, carbonyl and hydroxyl groups with silicon content increased. The decrease in intensity may confirm successful substitution of  $\text{SiO}_4^{4-}$  for  $\text{PO}_4^{3-}$ . XRD analysis confirms occurrence of HA as the only present mineral phase after hydrothermal reaction. TGA analysis showed that the Si1%-HA/CS composite contain 16 wt.% of chitosan. SEM micrographs of the analyzed composite materials show the lamellar structure of cuttlefish bone coated with 2 w/v.% solution of chitosan.

**Keywords:** tissue engineering, hydroxyapatite, chitosan, composite materials.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Inženjerstvo tkiva .....	2
2.2. Inženjerstvo koštanog tkiva .....	3
2.3. Koštana biologija .....	4
2.4. Zahtjevi skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva.....	5
2.5. Biomaterijali u inženjerstvu koštanog tkiva .....	6
2.5.1. Bioaktivna keramika .....	7
2.5.1.1. Hidroksiapatit, HA .....	8
2.5.1.2. Sinteza hidroksiapatita iz sipine kosti .....	11
2.5.1.3. Uloga silicijeva iona, $\text{SiO}_4^{4-}$ .....	11
2.5.1.4. Silicijem supstituirani hidroksiapatit.....	12
2.5.1.5. Metode pripreve Si-HA.....	13
2.5.2. Biorazgradljivi polimeri.....	13
2.5.2.1. Kitozan .....	14
2.6. Hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal .....	16
2.7. Sipina kost .....	18
2.7.1. Mikrostruktura sipine kosti .....	20
2.7.1.1. Lamelarna matrica.....	20
2.7.1.2. Organska komponenta.....	21
2.7.1.3. Leđni oklop .....	21
2.7.2. Arhitektura i funkcija sipine kosti.....	21
2.7.3. Uloga organske komponente.....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. Materijali .....	23
3.2. Sinteza silicijem dopiranog hidroksiapatita.....	23
3.3. Priprava otopine kitozana .....	24
3.4. Visokoporozni hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal .....	25
3.5. Karakterizacija materijala.....	25
3.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, FTIR .....	25
3.5.2. Kvalitativna mineralna rendgenska difrakcijska analiza, XRD .....	26
3.5.3. Termogravimetrijska analiza, TGA .....	26
3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija, SEM.....	26

4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1. FTIR analiza .....	27
4.2. XRD analiza .....	31
4.3. TGA analiza.....	36
4.4. SEM analiza.....	37
5. ZAKLJUČCI .....	41
6. LITERATURA.....	42



## 1. UVOD

U suvremenom svijetu otkazivanje organa i tkiva izazvanih ozljedama, bolestima ili drugim vrstama oštećenja dovodi do strukturalnih oštećenja hrskavice, kostiju i mišića, uzrokujući bol i nesposobnost za rad ljudi na različitim pozicijama širom planete. Danas se teži ovakve probleme riješiti na što bezbolniji, učinkovitiji i dugotrajniji način obzirom da je ljudsko zdravlje glavni preduvjet za kvalitetan život. Napretkom medicine razvijene su razne nove tehnologije i metode kojima je moguće nadomjestiti pojedini dio tijela. Upotreba biomaterijala u medicini omogućila je nove perspektive za liječenje različitih bolesti. Tako da su se istraživanja biomaterijala, s točno određenim svojstvima za specifičnu primjenu, usmjerila prema novoj grani biomedicine, tzv. inženjerstvu tkiva (eng. *Tissue Engineering*)<sup>1</sup>.

Iako su postojeće metode obnavljanja tkiva i zamjene organa uspješne, potreba za inženjerstvom tkiva javlja se ponajprije zbog ograničene mogućnosti dobivanja organa od donora, kao i potencijalne imunološke reakcije. Inženjerstvo tkiva, kao novije područje u biomedicinskom inženjerstvu, nudi golemi potencijal za promjene tradicionalnog pristupa u kliničkom liječenju, odnosno novi terapijski izbor za regeneraciju kosti na prirodan način<sup>1,2</sup>.

Glavni zahtjevi materijala koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva jesu biokompatibilnost, biorazgradljivost, odgovarajuća mehanička svojstva i visokoporoznost. Osnovna je ideja inženjerstva tkiva da se kosti sa zamijećenim nepravilnostima zamijene s materijalima za premošćivanje tzv. skeletima (eng. *Scaffolds*), koji trebaju pružiti primjerenu strukturnu potporu i u kombinaciji s koštanim ili matičnim stanicama i bioaktivnim molekulama poticati i aktivno stimulirati obnovu nove funkcionalne kosti. Najčešći materijal koji se koristi za izradu skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva je biokeramika, odnosno hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) i srodni amorfni i kristalni kalcij fosfati. Uz njih su važni biorazgradljivi prirodni ili sintetski polimeri ponajviše zbog biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i odgovarajućih mehaničkih svojstava. Hidroksiapatit je vrlo prikladan materijal za regeneraciju koštanog tkiva zbog izrazite biokompatibilnosti i bioaktivnosti, tj. sposobnosti da potakne specifični biološki odgovor organizma. Obzirom da hidroksiapatit sadrži ionske supstituente u svojoj rešetki, tokom posljednjih dvaju desetljeća intenzivno je istraživani silicij kao jedan od supstituenta.

Iako kitozan, kao prirodni polimer, i hidroksiapatitna keramika posjeduju izvrsnu bioaktivnost i biorazgradljivost nedostaje im mehaničke čvrstoće. Iz tog razloga potrebna je dodatna faza koja bi poboljšala mehaničku čvrstoću bez narušavanja bioaktivnosti materijala<sup>2,3</sup>.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Inženjerstvo tkiva

U području medicine i implantata znanstvenici sve više teže da se na neki način oponaša priroda te da se to iskoristi u kliničkim tretmanima i terapijama. *Langer* i *Vacanti*<sup>4</sup> su 1993. to novo interdisciplinarno područje, inženjerstvo tkiva, definirali kao područje koje objedinjuje principe inženjerstva i prirodnih znanosti u cilju razvoja i dobivanja bioloških nadomjestaka koji zadržavaju ili poboljšavaju funkciju tkiva ili organa. Cilj inženjerstva tkiva je oponašati funkciju prirodnog tkiva. Postignuća primjene ovog pristupa uključuju umjetnu kožu, zamjenu hrskavica, zacjeljivanje kostiju te krvnih žila, a ciljevi koji se postavljaju za daljnja istraživanja su i razvijanje srčanih zalistaka, tkivno inženjerstvo složenih sustava, kao i dobivanje cijelih organa (jetra, bubrezi)<sup>5</sup>.

Dvije glavne strategije koje se koriste u ovom području su *in vitro* i *in vivo* strategija inženjerstva tkiva. One uključuje signalne molekule, koje bi trebale reproducirati prirodni slijed signala prema spontanom obnavljanju tkiva, stanice u slučaju nemogućnosti samo-regeneracije tkiva, te trodimenzionalne strukture, skelete, koje daju mehaničku potporu u razvoju novih tkiva. Signalne molekule su uglavnom faktori rasta (eng. *Growth factors*), razne vrste proteina koji djeluju na staničnu migraciju, diferencijaciju, širenje i organizaciju u određenom tkivu. U oba slučaja, stanice u ozlijeđenom tkivu trebaju određenu mikro-okolinu za diferencijaciju i umnažanje s krajnjim ciljem obnove ozlijeđenog tkiva.

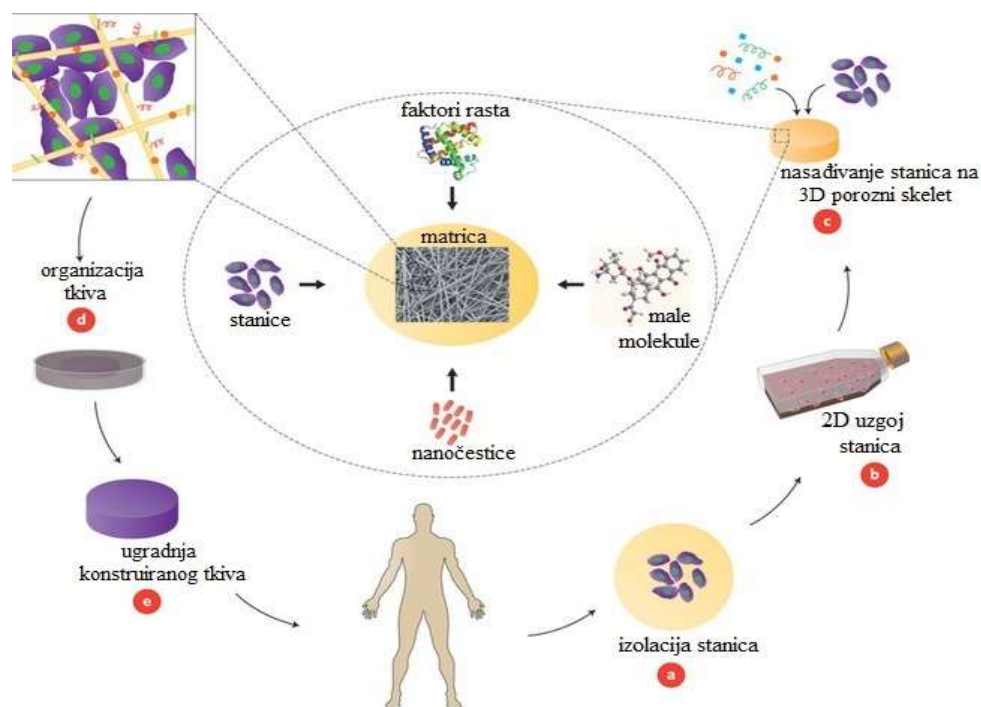
Kod *in vitro* inženjerstva tkiva riječ je o razvoju tkiva sličnih konstrukcija tkivu na kojem rastu nove stanice. Ograničenost ove metode je u teškoj *in vitro* simulaciji svih bioloških zbivanja koja se događaju *in vivo* u tkivu. Usprkos tome, ova se metoda koristi u inženjerstvu kosti, zglobne hrskavice i arterija, dok se samo proizvodnja umjetne kože koristi klinički. Druga primjena *in vitro* inženjerstva tkiva se oslanja na zamjenu funkcija organa korištenjem alo- ili kseno- genskih stanica u kombinaciji s biomaterijalima kako bi zaštitili stanice od imunološke reakcije tijela primaoca dok održavaju svoje biološke funkcije (biološki hibridni umjetni organi).

S druge strane, *in vivo* inženjerstvo tkiva za cilj ima stvoriti biološku okolinu prikladnu za obnavljanje tkiva, pod uvjetom da su biološki elementi uglavnom osigurani od živog tijela. Glavni elementi u tkivu kao što su izvanstanična matrica (eng. *Extracellular matrix*, ECM), stanice i molekularni signali, trebaju poticati popravak i obnavljanje oštećenih dijelova. U tom smjeru krenule su brojne metode temeljene na upotrebi polimernih skeleta koji imitiraju izvanstaničnu matricu i služe kao privremeni predložak za diferencijaciju i širenje novih

stanica. Skeleti ne samo da trebaju osigurati mehaničku potporu stanicama nego i mikroklimu molekularnih signala koji vode stanice prema obnavljanju tkiva<sup>6</sup>.

## 2.2. Inženjerstvo koštanog tkiva

Područje inženjerstva koštanog tkiva zahtjeva zajedničku suradnju znanstvenika, inženjera i kirurga kako bi se postigao krajnji cilj stvaranja koštanih nadomjestaka koji poboljšavaju regeneraciju i popravak kostiju. Glavni elementi u tkivu, na kojima se temelje istraživanja, su izvanstanična matrica, stanice i molekularni signali te oni trebaju poticati popravak i obnavljanje oštećenih dijelova. Kako bi se kosti uspješno obnovile ili popravile vrlo je bitno poznavanje biologije kostiju i njihovog razvoja. Inženjerstvo koštanog tkiva zahtjeva da se novoobnovljena kost u potpunosti integrira sa susjednim tkivom te da obavlja funkcije autohtone kosti<sup>5</sup>.

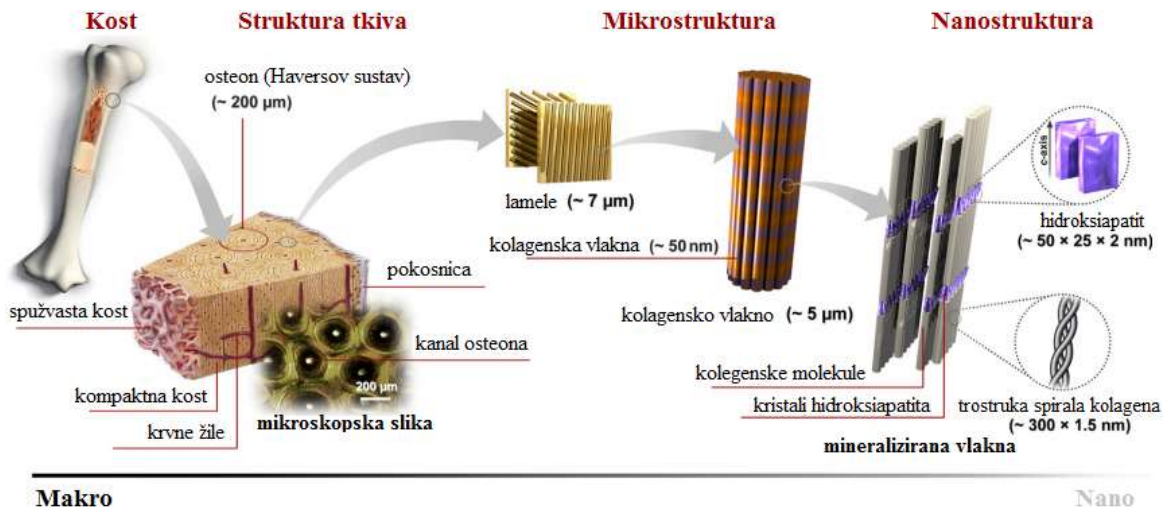


**Slika 1.** Koncept inženjerstva tkiva koji uključuje nasađivanje stanica na porozni skelet<sup>7</sup>.

a) Koštane stanice se izoliraju iz pacijenta te se potom mogu uzgajati *in vitro* (b) na dvodimenzionalnoj površini za učinkovitu ekspanziju. c) Zatim se stanice nasađuju na porozni skelet zajedno s faktorima rasta, malim molekulama i mikro- ili nanočesticama. d) Nadalje se tako konstruirano tkivo uzgaja u bioreaktoru kako bi se osigurali optimalni uvjeti za dobivanje tkiva koje će oponašati prirodno tkivo. e) Nakon toga slijedi ugradnja okosnice u oštećeno tkivo pacijenta<sup>7</sup>.

## 2.3. Koštana biologija

Kostur, koji je potporanj tijelu, kompleksan je niz pojedinačnih kostiju posebne strukture i sastava ovisno o specifičnom obliku i funkciji. Kost je jedinstven materijal zanimljivih fizičkih i mehaničkih svojstava. Posjeduje sposobnost obavljanja širokog spektra funkcija i reagira na razne metaboličke, fizičke i endokrine podražaje. Posjeduje višefunkcionalna svojstva koja uključuju temelj ljudskog kretanja, podršku strukturi, zaštitu organa u tjelesnim šupljinama te održavanje homeostaze ključnih elektrolita (stalnih fizioloških uvjeta) skladištenjem kalcijevih i fosfatnih iona. Može podnijeti težak teret, izdržati velike sile i savijati se bez loma do određene granice. Većina kostiju ima relativno gust vanjski sloj, poznat kao kortikalna ili gusta kost, koji okružuje manje gusti i porozni dio, trabekularnu ili poroznu kost, iznutra ispunjenu želatinoznom tkivom, odnosno koštanom srži. Kost je vezivno tkivo koje se sastoji od specifičnih stanica: osteoblasta koji sudjeluju u stvaranju izvanstanične tvari (proizvodnja kolagenih vlakana s mineraliziranom tvari), osteocita (osteoblasta zarobljenih unutar praznina) i osteoklasta koji su značajni u razgradnji izvanstanične tvari radi oslobodjenja prostora osteoblastima za stvaranje nove koštane tvari<sup>8</sup>.



Slika 2. Hijerarhijska struktura prirodne kosti<sup>9</sup>.

Udio mineralne tvari, većinski karbonatnog hidroksiapatita, varira ovisno o vrsti i starosti koštanog tkiva. Udio biološkog apatita u kortikalnoj kosti je 80-90%, a u trabekularnoj 15-25%. Mikroskopska struktura kosti odgovara ravnomjerno raspoređenim nanometarskim kristalima hidroksiapatita uzduž kolagenskih vlakana koje djeluju kao organska matrica (Slika 2.). Prosječna dužina kristala je 50 nm, širina 25 nm te debljina 2-5 nm<sup>10</sup>.

## 2.4. Zahtjevi skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva

Biološka tkiva sastoje se od stanica, signalizacijskog sustava i izvanstanične matrice. Izvanstanična matrica je trodimenzijski molekularni kompleks sastavljen od kolagena, elastina i laminina<sup>11</sup>. U želji za obnovom tkiva, tj. vraćanjem funkcije, inženjerstvo koštanog tkiva razvija skelete koji stvaraju sintetski mikro-okoliš pružajući trodimenzijsku potporu kako bi se kontroliralo i usmjeravalo stanično ponašanje i promicale stanične interakcije. Odgovarajući trodimenzijski nosač važna je komponenta za inženjerstvo tkiva, kao i niz svojstava koja skelet čine pogodnim za primjenu. Osim što je važan izbor odgovarajućeg materijala, od izuzetne važnosti su i makro- i mikro-svojstva materijala i raznovrsni zahtjevi skeleta. S obzirom na vrlo kompleksan biološki sustav kao što je ljudska kost, skup zahtjeva koje skelet mora zadovoljavati je prilično izazovan. Glavni zahtjevi su: biokompatibilnost, biološka razgradnja, međusobna povezanost pora trodimenzijske strukture, dobra mehanička svojstva, osteoindukcija (interakcije s koštanim stanicama), osteoprovodnost (stvaranje novog koštanog tkiva) i biološka aktivnost, svojstva površine te tehnologija proizvodnje i sterilizacija<sup>12</sup>.

### **A) Biokompatibilnost**

Biokompatibilnost je svojstvo materijala da bude prihvaćen od strane živog organizma u koji se ugrađuje i ispunjava namjenu za koju je predviđen. Površinska kompatibilnost podrazumijeva kemijsku, fizikalnu i biološku podudarnost nadomjestka i tkiva domaćina, dok je za strukturnu kompatibilnost potrebna dobra prilagodba nadomjestka mehaničkom ponašanju tkiva domaćina. Za optimalnu interakciju između biomaterijala i tkiva potrebne su i površinska i strukturna kompatibilnost. Idealno biokompatibilan materijal ne smije imati iritirajuće, toksično, kancerogeno ili alergijsko svojstvo na živi organizam. Biokompatibilnost materijala ovisi o kemijskoj i fizikalnoj prirodi komponenti od kojih se sastoji, o vrsti i o lokalizaciji tkiva na koja će se primijeniti, trajanju izloženosti i površinskim karakteristikama materijala. Najčešće se definira praćenjem svojstava materijala, odnosno određivanjem je li materijal zadovoljio postavljene zahtjeve<sup>13,14</sup>.

### **B) Biorazgradnja**

Biološka razgradnja (biodegradacija) je kemijsko razaranje materijala od strane živih organizama koje vodi promjenama fizičkih svojstava. Ukazuje na potrebu postojanja određenih bioloških procesa koji prouzrokuju takve promjene. U inženjerstvu tkiva teži se povratku ili poboljšanju prvotnih funkcija tkiva pomoću biorazgradljivih skeleta. Nakon usađivanja,

biorazgradljivi materijal bi trebao zadržati svoja mehanička svojstva do vremena kad više nije potreban i zatim bi trebao biti apsorbiran i izlučen iz tijela bez zaostalih tragova. Kemijska hidroliza hidrolitički nestabilnog osnovnog lanca najpoželjniji je način (mehanizam) razgradnje polimera<sup>15,16</sup>.

### ***B) Poroznost trodimenzijskih struktura***

S obzirom na to kako se pojedina tkiva mišićno-koštanog sustava međusobno razlikuju, nemoguće je dizajnirati univerzalni skelet koji bi bio pogodan za sve namjene. Dizajn skeleta ima važan utjecaj u inženjerstvu koštanog tkiva i potrebno ga je prilagoditi biološkim i strukturnim karakteristikama tkiva koje se regenerira. Skelet mora posjedovati visokoporoznu strukturu (poroznost do 90%) s otvorenim međusobno povezanim porama. Poroznost i međupovezanost pora važni su za ravnomjerno raspoređivanje stanica unutar samoga skeleta te kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari, plinova i metaboličkog otpada.

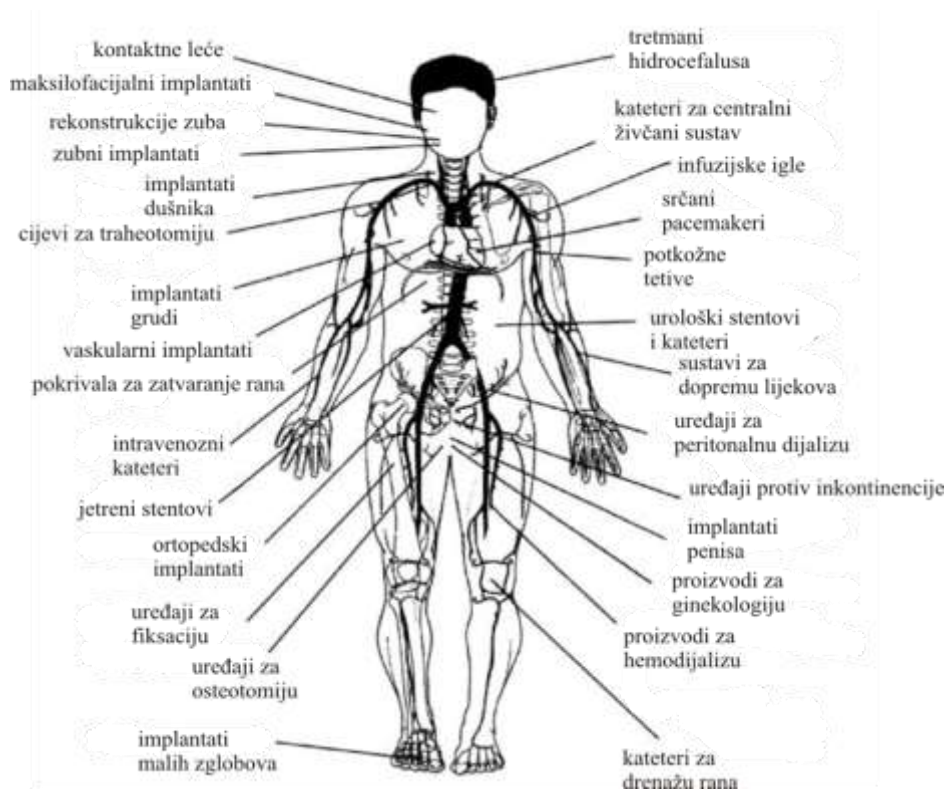
Vrlo važan faktor u dizajniranju skeleta je veličina pora koje moraju biti dovoljno velike da omoguće migraciju stanica unutar strukture, ali i dovoljno male da se uspostavi dovoljno velika specifična površina. Minimalna veličina pora je oko 100  $\mu\text{m}$ , ali se preporučuju pore veće od 300  $\mu\text{m}$ <sup>11</sup>.

## **2.5. Biomaterijali u inženjerstvu koštanog tkiva**

Pri izradi skeleta za inženjerstvo koštanog tkiva izbor biomaterijala je od presudne važnosti. Biomaterijali su sintetski ili prirodni materijali koji omogućuju svoju primjenu u dodiru s biološkim sustavima. Prvenstveno se koriste za medicinske namjene kao zamjena ili nadogradnja strukturnih komponenata ljudskog organizma kako bi se nadomjestila oštećenja do kojih dolazi zbog starenja, bolesti ili nesretnih slučajeva. Ugrađeni u medicinsko pomagalo postaju dio tkiva ili organa. Koriste se i za uzgoj živih stanica, ispitivanje proteina u kliničkim istraživanjima, genskim istraživanjima, izradi opreme za biotehnoške namjene i drugo. Danas gotovo da nema dijela ljudskog tijela koji se ne može uspješno zamijeniti nekim biomaterijalom.

Najvažnija karakteristika im je biokompatibilnost, tj. sposobnost materijala da odgovori na željeni način prilikom primjene. Biomaterijali su materijali ili kombinacije materijala, sintetski ili prirodni, koji se koriste za popravak, zamjenu ili kao model za dio tkiva i organa *in vitro* i *in vivo*. Dijele se u četiri glavne skupine: polimeri, metali, keramika (uključujući staklokeramiku i staklo) i prirodni materijali (podrijetlom iz biljaka i životinja)<sup>13,15</sup>.

Kombinacijom najmanje dvije različite vrste materijala nastaje kompozitni materijal. Veliki izazov pred istraživače postavlja stalna potreba moderne medicine i tehnologije za novim biomaterijalima sa svojstvima za točno određenu upotrebu koja će zadovoljiti vrlo visoke standarde i zahtjeve.



**Slika 3.** Prikaz ljudskog tijela i pozicija na koje se ugrađuju implantati od biomaterijala<sup>14</sup>.

### 2.5.1. Bioaktivna keramika

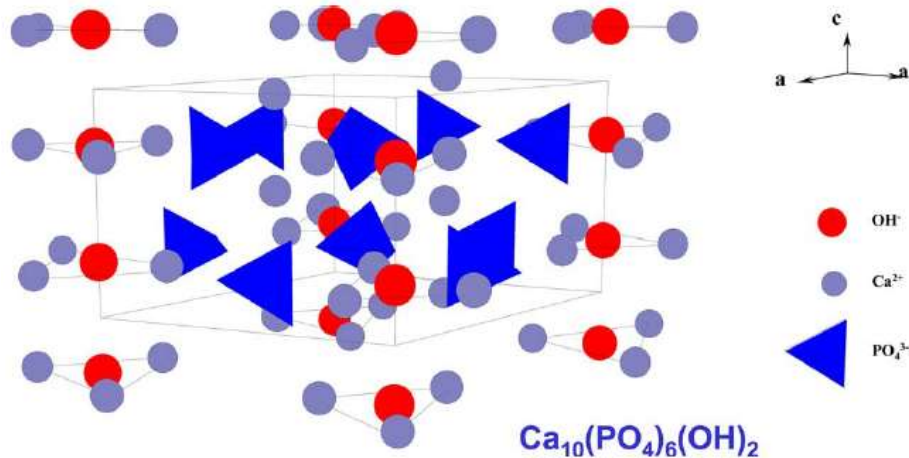
Kalcijev fosfat je materijal zanimljiv za kliničku primjenu, istraživanje i proizvodnju korisnih biomaterijala za proizvodnju nadomjestaka ili fiksatora. Općenito, biomaterijali i djelomično bioaktivna keramika (biokeramika) mogu poslužiti kao zamjenski materijali pojedinih tkiva u ljudskom tijelu<sup>9</sup>.

Keramički materijali koji se koriste u rekonstruktivnoj medicini mogu se klasificirati u dvije velike grupe: bioinertna i bioaktivna keramika. Bioinertna keramika ne izaziva neželjene reakcije, ali ne postiže nikakve interakcije s okolnim tkivom (npr. aluminijev oksid)<sup>9</sup>. Najčešće dolazi do stvaranja vlaknaste kapsule oko implantata, što može dovesti i do njegove potpune izolacije, a u konačnici to može uzrokovati oštećenje okolnog tkiva. Također, tijekom vremena fiziološko okruženje utječe na kemijsku stabilnost i mehaničku čvrstoću ovih materijala<sup>17</sup>.

Nasuprot tome, bioaktivna keramika ima pozitivan utjecaj na okolno tkivo i ima mogućnost vezanja s koštanim tkivom<sup>9</sup>. Bioaktivnost je sposobnost materijala da u kontaktu s tjelesnom tekućinom na svojoj površini potakne specifični biološki odgovor organizma, što rezultira stvaranjem veze s tkivom<sup>17</sup>. Među najvažniju bioaktivnu keramiku ubrajaju se kalcijevi fosfati, određeni kompoziti stakla i staklokeramike.

### 2.5.1.1. Hidroksiapatit, HA

Najčešće korišteni kalcijev fosfat (CaP) u proizvodnji koštanih nadomjestaka je hidroksiapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  i to upravo zbog svoje kemijske i strukturne sličnosti biološkom apatitu u kostima (oko 60 mas.% kosti je izrađeno od hidroksiapatita). U posljednje vrijeme vrlo istraživan kao materijal jer je dokazano da ubrzava širenje koštanog tkiva oko nadomjestaka zato što tvori izravnu vezu sa susjednim tkivom i tako poboljšava mehaničko vezanje nadomjestaka<sup>9</sup>. Sintetička hidroksiapatitna keramika (HA) upotrebljava se kao porozni materijal, prah ili prevlaka na metalnim protezama kako bi se postiglo bioaktivno učvršćivanje<sup>17</sup>.



**Slika 4.** Kristalna struktura karbonatnog hidroksiapatita<sup>9</sup>.

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<sup>14</sup>. Osnovna apatitna struktura je heksagonska s prostornom grupom  $P6_3/m$  i parametrima rešetke  $a=9,4 \text{ \AA}$  i  $c=6,9 \text{ \AA}$ <sup>18</sup>.



Hidroksiapatit, kao biomaterijal, pokazuje jako dobra svojstva kao što su dobra biokompatibilnost i bioaktivnost, dobro vezanje na okolno koštano tkivo *in vivo* te osteoprovodnost. Između velikog broja postojećih vrsta kalcijevih fosfata važno je poznavati približni odnos kalcija i fosfora (Ca/P omjer), kiselosti i topljivosti. Niži Ca/P omjer daje veću kiselost i topljivost smjese. Za  $Ca/P < 1$  i kiselost i topljivost su ekstremno visoke te se oba parametra značajno smanjuju tako da se Ca/P omjer približava 1,67, što je upravo stehiometrijski iznos hidroksiapatita. U Tablici 1. prikazano je nekoliko primjera kalcijevih fosfata poredanih prema njihovim Ca/P omjerima<sup>9</sup>.

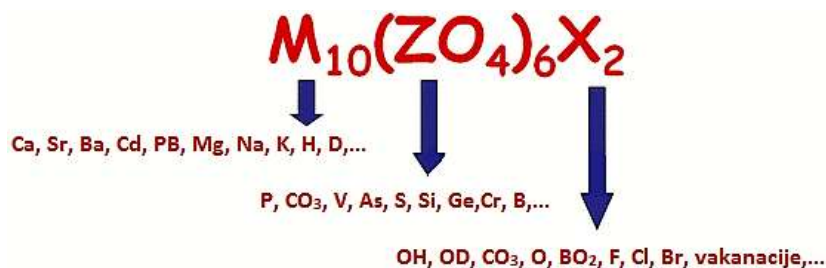
**Tablica 1.** Primjeri kalcijevih fosfata poredanih prema njihovim Ca/P omjerima<sup>9</sup>.

Ca/P omjer	Naziv	Formula	Kratica
0,5	Monokalcijev fosfat monohidrat	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	MCPM
0,5	Monokalcijev fosfat	$Ca(H_2PO_4)_2$	MCPA
1,0	Dikalcijev fosfat dihidrat	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	DCPD
1,0	Dikalcijev fosfat	$CaHPO_4$	DCPA
1,33	Oktakalcijev fosfat	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	OCP
1,5	$\alpha$ -trikalcijev fosfat	$Ca_3(PO_4)_2$	$\alpha$ -TCP
1,5	$\beta$ -trikalcijev fosfat	$Ca_3(PO_4)_2$	$\beta$ -TCP
1,67	Hidroksiapatit	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	HA

Parametri kristalne rešetke nekih od navedenih fosfata vrlo su slični, što dovodi do preklapanja difrakcijskih maksimuma te otežava interpretaciju rezultata dobivenih rendgenskom difrakcijom. Uvjeti sinteze veoma utječu na veličinu kristala, morfologiju i strukturu konačnog kalcijeva fosfata, tako da je precizna karakterizacija elektronskom difrakcijom i visokorezolucijskim elektronskim transmisijskim mikroskopom (HRTEM) veoma važna u istraživanju dvofaznih CaP smjesa.

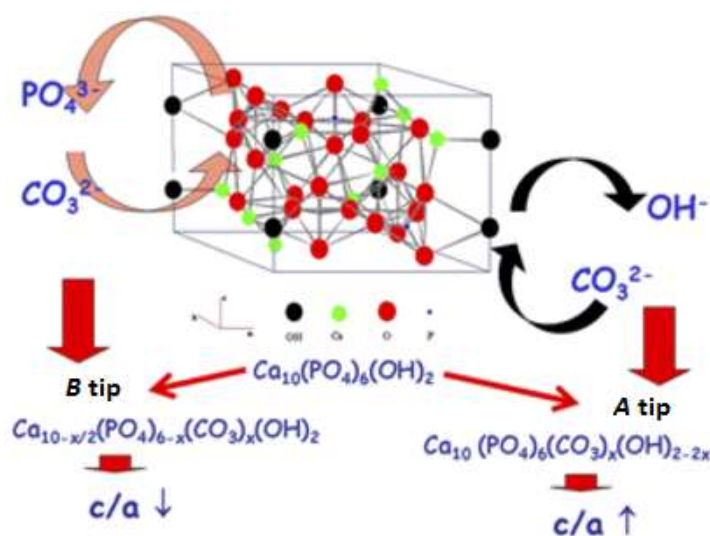
Tijekom prošlog desetljeća istraživane su razne metode pripreme HA nanočestica s preciznom kontrolom njihove mikrostrukture. Te metode uključuju razne tipove već poznatih metoda kemijske sinteze. Izbor načina pripreme praška dobro definirane strukture i posebne primjene može biti težak.

HA je nestehiometrijski mineral, sa sposobnošću da prihvati kompozicijske varijacije u njegovim trima podreškama (Slika 5.). Niti jedan biološki HA ne pokazuje stehiometrijski Ca/P udio, ali se takvi sastavi povezuju s povećanjem kristalnosti<sup>9</sup>.



**Slika 5.** Formula apatitnog minerala i moguće zamjene u njegovim trima podreškama<sup>18</sup>.

Hidroksiapatit ima sposobnost ionske supstitucije, tj. moguće su supstitucije s različitim anionskim i kationskim vrstama (Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, F<sup>-</sup>). Dakle, u strukturu HA mogu se ugraditi različiti ioni, a te se supstitucije mogu odvijati na mjestima kalcijevih iona, fosfatnih ili hidroksilnih skupina. Osim glavnih iona Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i OH<sup>-</sup>, sastav bioloških apatita uvijek uključuje i CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (~ 4,5%), kao i niz drugih iona poput Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i F<sup>-</sup>. Posljedice ovih supstitucija su promjene u svojstvima, parametru kristalne rešetke, morfologiji, topljivosti, ali bez značajne promjene u simetriji. Među najvažnijim supstitucijama je supstitucija s karbonatnim ionima. Moguća su dva tipa supstituiranja s CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ionima: a) tip A pri kojem dolazi do supstitucije OH<sup>-</sup> iona i b) tip B pri kojem se supstituiraju PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ioni (Slika 6.)<sup>9,18</sup>.

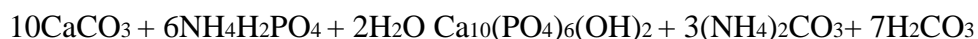


**Slika 6.** Kristalna struktura i moguće ionske zamjene u karbonatnim apatitima<sup>18</sup>.

Mala veličina kristala apatita je vrlo važan čimbenik kada se govori o topljivosti bioloških apatita u usporedbi s mineralnim apatitima. Male dimenzije i niska kristaličnost su dvije izrazite značajke bioloških apatita koje u kombinaciji s nestehiometrijskim sastavom, unutrašnjom kristalnom neuređenošću i prisutnošću karbonatnih iona u rešetci objašnjavaju njegove posebne karakteristike<sup>18</sup>.

### 2.5.1.2. Sinteza hidroksiapatita iz sipine kosti

HA se jednostavnim načinom može pripremiti uporabom bioloških struktura i materijala koji imaju visokoporoznu strukturu, poput koralja, morskih školjkaša, životinjskih skeleta i sličnog. Prema tome sipina kost pokazala se kao prikladna sirovina za niz primjena. *Poompradub*<sup>19</sup> i suradnici ispitivali su potencijalnu primjenu sipine kosti kao punila za prirodnu gumu te je utvrđeno kako sipina kost pruža slična mehanička svojstva kao i komercijalna punila. *Yildirim*<sup>19</sup> i suradnici nadalje su istraživali kompatibilnost sirove sipine kosti s ljudskim koštanim tkivom i utvrdili kako je mineralni sastav sipine kosti kompatibilan s ljudskim koštanim tkivom. Daljnja istraživanja upotrebe sipine kosti u inženjerstvu koštanog tkiva uključivala su hidrotermalnu transformaciju aragonita u hidroksiapatit. *Rocha*<sup>19</sup> i suradnici prvi su zapravo koristili hidrotermalnu transformaciju za pripremu poroznog hidroksiapatita uz zadržavanje originalne strukture sipine kosti. To istraživanje pokazalo je da je nakon 24 h, pri 200 °C, aragonit u potpunosti moguće prevesti u AB-tip karbonatnog HA, a da se pritom potpuno očuva originalna mikrostrukura i arhitektura sipine kosti<sup>20</sup>. Reakcija hidrotermalne sinteze dana je jednadžbom:



### 2.5.1.3. Uloga silicijeva iona, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>

Među mnogobrojnim prisutnim elementima u mineralnoj komponenti kosti silicij ima presudnu ulogu za normalan rast i razvoj hrskavičnog i koštanog tkiva. Istraživanja provedena na različitim vezivnim tkivima utvrdila su visok sadržaj (200-550 ppm) silicija u spojevima koji se nalaze u izvanstaničnoj matrici, ukazujući da je silicij važan biološki agens za umreživanje, koji djeluje na arhitekturu i žilavost vezivnog tkiva<sup>19</sup>.

Na temelju istraživanja *Schwartz*a i *Milnea*<sup>21</sup> (pratili su brzinu rasta štakora držanih na dijete siromašnoj silicijem s rastom štakora hranjenih hranom obogaćenom silicijem) utvrđeno

je da je silicij, kao član skupine elemenata u tragovima, ključan u stvaranju koštanog, hrskavičnog i vezivnog tkiva.

Silicij ima vrlo važnu i značajnu ulogu u koštanom i hrskavičnom tkivu djelujući na fiziološki sustav tijekom stvaranja i rasta skeleta.

#### 2.5.1.4. Silicijem supstituirani hidroksiapatit

Mineralna komponenta kosti ima sličnu kristalografsku strukturu kao hidroksiapatit, ali za razliku od HA, često pokazuje nedostatak kalcija, fosfatnih i hidroksilnih skupina, unutarnji nered u kristalu, te sadrži razne kationske i anionske supstituente. Potencijalni supstituenti u tragovima jesu natrij (do 0,8 mas.%) i magnezij (do 0,5 mas.%), dok se u još manjim količinama pojavljuju kalij, stroncij, cink, fluor, klor i silicij. Svi ovi faktori sudjeluju u stvaranju apatita koji je dovoljno netopljiv da bi bio stabilan, a dovoljno reaktivan kako bi se submikroskopski kristaliti konstantno otapali i ponovno stvarali *in vivo*, omogućavajući tako stalan izvor metabolički važnih anorganskih nutrijenata, kao što je silicij<sup>22</sup>. Više od jednog stoljeća silicij se smatra materijalom vrlo važne biološke uloge, još od *Louisa Pasteura*<sup>23</sup> koji je vjerovao kako silicij može pomoći u liječenju mnogih bolesti.

Jedan od načina poboljšanja bioaktivnosti hidroksiapatita je dobivanje supstituiranog apatita koji nalikuje kemijskom sastavu i strukturi mineralne faze u kostima. Obzirom na važan utjecaj silicija na bioaktivnost bioaktivnih stakla i staklokeramike, ugrađivanje silicija u apatitnu strukturu je dobar način poticanja bioaktivnosti HA. Istraživanja *Carlislea*<sup>24</sup> ukazala su na veliku biološku ulogu silicija u procesu formiranja i kalcifikacije kosti. Ugradnja silicija tijekom sinteze HA, osigurava implantatu da se kemijski poveže s kosti jakom bioaktivnom vezom, čime su osigurana dobra svojstva i biointegritet implantata.

*In vitro* istraživanja (*Gibson*, 1999.) pokazala su da supstitucija fosfatnih iona sa silicijevim u hidroksiapatitu povećava aktivnost osteoblastnih stanica u usporedbi s čistim hidroksiapatitom. Nadalje, *in vivo* istraživanja (*Patel*, 2002.) pokazala su da je srastanje koštanog tkiva, na površini keramičkog materijala, znatno brže na površini silicijem supstituiranog HA nego na implantatu od čistog HA<sup>23</sup>. Posljedica supstitucije je promjena svojstava, promjena parametara rešetke, kristalografske morfologije, topljivosti, kristaličnosti i toplinske stabilnosti HA.

Najjednostavniji model ugradnje  $\text{SiO}_4^{4-}$  iona u strukturu HA, s obzirom na atomski radijus, je supstitucija s  $\text{PO}_4^{3-}$  funkcionalnim grupama.  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedri, svojom veličinom,

slični su  $\text{PO}_4^{3-}$  tetraedrima i mogu ih lako zamijeniti u kristalnoj rešetci HA s posljedicom kompenzacije naboja. Duljina P-O veze u tetraedarskoj koordinaciji (0,157 nm) je usporediva s duljinom Si-O veze (0,166 nm) u istoj koordinaciji. Postoji nekoliko mehanizama po kojima može doći do kompenzacije naboja, a koji mehanizam će prevladati ovisi o termodinamičkim uvjetima za vrijeme sinteze materijala. Ugradnjom silicija u hidroksiapatit dobivaju se materijali izvrsne biološke aktivnosti: silicij modificira svojstva materijala izravnim utjecajem na fiziološke procese u koštanom tkivu. Također, utvrđeno je kako ugradnja silicija u strukturu HA povećava njegovu topljivost te bolja topljivost Si-HA ubrzava srastanje kosti s biokeramikom<sup>21, 25</sup>.

### **2.5.1.5. Metode priprave Si-HA**

Za dobivanje silicijem supstituiranog hidroksiapatita koristi se nekoliko metoda:

1. Sol-gel postupak: nije prihvatljiv, jer ovi materijali osim hidroksiapatitne faze sadrže i kristalične faze ovisne o stupnju supstitucije silicija
2. Reakcija u čvrstom stanju: zahtjeva ugradnju sekundarnih atoma ili iona, kao što su lantan ili sulfat
3. Metoda taloženja: zahtjeva sinteriranje na visokoj temperaturi koje obično vodi k nastajanju većih kristala
4. Hidrotermalna metoda: obično daje materijale visokog stupnja kristalnosti, s Ca/P omjerom vrlo bliskim stehiometrijskom omjeru<sup>24</sup>.

### **2.5.2. Biorazgradljivi polimeri**

Obzirom da je krajem 20. stoljeća zagađenje okoliša uzrokovano upotrebom sintetskih polimera postalo izrazito veliko, sve više napora i zanimanja se ulagalo u istraživanje biorazgradljivih polimera. Biorazgradljivi polimeri uspješno se koriste za različite primjene u regenerativnoj medicini, ortopediji, inženjerstvu tkiva, poljoprivredi, pakiranju proizvoda itd.<sup>26</sup>.

Biorazgradljivi polimeri mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: 1) prirodni, uključujući polisaharide (škrob, alginat, hitin, kitozan, derivati hijaluronske kiseline) i proteine (soja, kolagen, fibrin gelovi, svila); 2) sintetski polimeri (poli-mliječna kiselina, poliglikolna kiselina, polihidroksibutirat). Ovi polimeri posjeduju dobru biokompatibilnost i imaju prednost korištenja u medicini zbog toga što ih ljudski organizam metabolički razgrađuje te nije potrebno raditi dodatne kirurške zahvate vađenja materijala. Osnovni kriteriji prema kojemu se polimeri

odabiru za primjenu kao razgradljivi biopolimeri jesu: odgovarajuća mehanička svojstva i brzina razgradnje za namijenjenu primjenu, produkti razgradnje ne smiju biti toksični, biokompatibilnost, prihvatljiv rok trajanja/stabilnost, mogućnost jednostavne obrade i prihvatljiv trošak<sup>27</sup>.

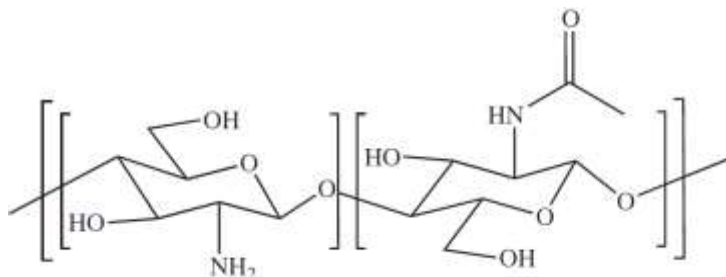
Činjenica da su biorazgradljivi i da im se mehanička svojstva mogu poboljšati, polimere čini vrlo pogodnim materijalima za obnovu kosti. Mehanička svojstva tih polimera mogu se poboljšati modifikacijom strukture polimera ili dodavanjem punila ili ojačavala<sup>28</sup>.

U proizvodnji skeleta za inženjerstvo tkiva koriste se različiti biomaterijali poput kolagena, proteoglikana kao i kitozan. Za razliku od sintetskih polimera, prirodni polimeri su biološki aktivni i obično promiču izvrsnu adheziju i rast stanica. Međutim, priprema skeleta homogene i reproducibilne strukture upotrebom biomaterijala i dalje predstavlja veliki izazov za znanstvenike<sup>28</sup>.

### 2.5.2.1. Kitozan

#### *Struktura i svojstva kitozana*

Kitozan je jedinstven polimer, koji osim biokompatibilnosti i biorazgradljivosti posjeduje izvanredna svojstva. Kitozan je linearan, kristalasti polisaharid složen od N-acetil-D-glukozaminskih (acetilirana jedinica) i D-glukozaminskih (deacetilirana jedinica) strukturnih jedinica (Slika 7.). Kao takav, kitozan nije rasprostranjen u prirodi, međutim može se dobiti djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina. Stupanj deacetilacije (eng. *Deacetylation Degree*, DD) kitozana koji prikazuje podatak o broju amino skupina duž lanca, izračunava se kao omjer D-glukozamina i sume D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Deacetilirani hitin može se nazvati kitozonom kada sadržava barem 60% D-glukozamina, što odgovara stupnju deacetilacije od 60%. Deacetilacija hitina se provodi hidrolizom u jakim lužnatim uvjetima ili enzimskom hidrolizom<sup>29</sup>.



Slika 7. Kemijska struktura kitozana<sup>29</sup>.

Poslije celuloze, hitin je drugi najzastupljeniji prirodni polimer, a najčešće se nalazi u beskralježnjacima (rakovi, školjke, kukci), te u gljivama, zelenim algama i kvascima. Na industrijskoj razini dva glavna izvora kitozana su školjke i gljivične mlice. Međutim, životinjski izvori pokazuju nedostatke zbog svojih sezonskih varijacija, ograničenih izvora i promjenjivosti u sadržaju proizvoda što može dovesti do nedosljednih fizikalno-kemijskih značajki.

Tijekom proizvodnje teško je predvidjeti karakteristike kitozana. Stoga se sadašnji pristup temelji na analizi svojstava i sastava dobivenog proizvoda, a ne na ciljanju unaprijed određenih karakteristika kontroliranjem procesa proizvodnje. Karakterizacija kitozana je važna, ali nije lako izvediva. Obzirom da je prirodno temeljen spoj, kitozan može biti kontaminiran organskim i anorganskim nečistoćama i imati široku polidisperznost, zbog čega proizvođači posvećuju više pozornosti viskoznosti nego molekulskoj masi. Kitozan je slabo topljiv, osim u kiselom mediju, što otežava provedbu analize.

Kitozan se od hitina razlikuje po prisutnosti amino skupina koje daju jedinstvena svojstva. Amino skupine D-glukozamina omogućavaju topljivost u kiselim medijima, te mu prema tome topljivost ovisi o pH otopine, odnosno nađeno je da se otapa u otopinama kojima je  $\text{pH} < 6$ . Kitozan sa svojom protoniranom amino skupinom postaje polikation koji može naknadno stvarati ionske komplekse s raznim prirodnim ili sintetskim anionskim vrstama. Kitozan je specifičan po tome što je jedini u prirodi pronađen polisaharid s pozitivnim nabojem. Pokazao se kao odličan kandidat u širokom spektru primjena zajedno sa svojim jedinstvenim biološkim svojstvima uključujući biokompatibilnost, biorazgradljivost s bezopasnim nusproduktima, netoksičnost, fiziološku inertnost, izvanredan afinitet za proteine, antibakterijski utjecaj, itd.<sup>29</sup>.

### ***Kitozan kao biomaterijal***

Za objašnjenje biorazgradljivosti kitozana važno je znati da kitozan nije samo polimer s amino skupinama, nego je i polisaharid koji prema tome sadrži lomljive glikozidne veze. Kitozan se *in vivo* razgrađuje pomoću nekoliko proteina, ali uglavnom lizozimom. Do sada je nađeno osam kitinaza u ljudskom tijelu, ali samo su tri enzimski aktivni prema kitozanu. Razgradnjom kitozana dobivaju se netoksični oligosaharidi različitih veličina. Ti oligosaharidi se mogu razgraditi u organizmu ili se mogu dalje izlučiti iz tijela. Kitozan je kristalasti polimer te je polimerni stupanj kristalizacije izravno povezan s kinetikom biorazgradnje. Stoga smanjenjem stupnja deacetilizacije smanjuje se i njegova kristalnost što rezultira povećanjem

brzine biorazgradnje. Pretpostavlja se da kraći lanci kitozana brže podliježu razgradnji u oligosaharide od kitozana veće molekulske mase<sup>29</sup>.

Međutim, kompatibilnost kitozana u fiziološkoj sredini ovisi i o metodi pripreme (zaostali proteini mogu izazvati alergijske reakcije) i o stupnju deacetiliranja, tj. biokompatibilnost se povećava sa stupnjem deacetiliranja. Povećanjem broja pozitivnih naboja povećava se interakcija između stanica i kitozana, što dovodi do veće biokompatibilnosti.

### ***Porozni skeleti kitozana za inženjerstvo tkiva***

Tijekom pripreme trodimenzionalnih skeleta posebnu poroznost treba obratiti na biokompatibilnost, mehanička svojstva, morfologiju i poroznost skeleta. Samim time kitozan se pokazao izvrsnim biomaterijalom za pripremu poroznih skeleta, koji mogu poslužiti kao zamjena za oštećena ili nedostajuća tkiva ili organe, te dopustiti adheziju i širenje stanica. Istraživanjem kitozana razvijene su razne metode za fino oblikovanje kitozanskih hidrogelova i pjena (spužva) kao primjerene trodimenzionalne skelete u inženjerstvu tkiva<sup>29</sup>.

## **2.6. Hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal**

Obzirom da je raznim istraživanjima utvrđeno kako hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal, HA/CS, posjeduje izvrsna svojstva kao što su biokompatibilnost, biofunktionalnost te antialergijska svojstva, takav materijal pokazao se znatno isplativim kao i idealnim materijalom u inženjerstvu tkiva za liječenje mišićno-koštanih nedostataka<sup>30</sup>.

U inženjerstvu tkiva je razvijeno nekoliko metoda pripreme visokoporoznih skeleta, među kojima se izdvajaju toplinski potaknuto razdvajanje faza (eng. *thermally induced phase separation*), ispiranje čestica porogena (eng. *solvent casting/particulate leaching*), liofilizacija (eng. *freeze-drying*) i elektropredenje (eng. *electrospinning*)<sup>30</sup>.

### ***Toplinski potaknuto razdvajanje faza***

Ova metoda razdvajanja faza razvijena je s ciljem proizvodnje poroznih skeleta međusobno povezanih pora. Temelji se na promjeni toplinske energije koja potiče razdvajanje homogene polimerne otopine na višefazni sustav. Kada dođe do razdvajanja faza, homogena otopina se razdvaja na fazu bogatu polimerom i fazu bogatu otapalom. Veličina i oblik pora mogu se kontrolirati podešavanjem termodinamičkih i kinetičkih parametara (priroda otapala, koncentracija polimera, temperatura razdvajanja faza, brzina hlađenja). Također, metoda



omogućava kontroliranje veličine pora mijenjanjem uvjeta pripreve te je omogućen širok raspon oblikovanja skeleta različitih oblika i veličina<sup>31</sup>.

Upotrebom ove metode Sun<sup>32</sup> i suradnici su uspješno pripravili HA/CS kompozitni skelet. Zaključili su da se prilagođavanjem procesnih parametara i svojstva sustava može dobiti porozni materijal. Kod skeleta je uočena visoka poroznost i međusobna povezanost poroznog prostora, s veličinom pora od 20 do 350  $\mu\text{m}$ . Dodavanjem HA nanočestica kitozanu poboljšana su mehanička svojstva kompozitnog materijala u odnosu na čisti CS.

### ***Ispiranje čestica porogena***

Ova metoda jedna je od najčešćih metoda pripreve poroznih skeleta. Proces započinje tako da se polimer prvo otapa u hlapljivom otapalu, te se u njemu dispergiraju čestice porogena, koje se nakon sušenja u kalupu ispiru otapalom. Nakon isparavanja otapala, materijal se vadi iz kalupa i potom uranja u odgovarajuće otapalo kako bi se isprao (izlučio) porogen i dobili porozni skeleti vanjskog oblika određenog kalupom<sup>31</sup>.

Kashiwazaki<sup>33</sup> i suradnici dobili su HA/CS materijal koji posjeduje poroznost 60,6% i 87,1% i međusobno povezane pore veličine od 100 do 200  $\mu\text{m}$ . Takav kompozit pokazuje mehaničku fleksibilnost i mogućnost oblikovanja u bilo koji željeni oblik.

Ovakav proces je vrlo jednostavan i prilagodljiv te omogućuje nezavisnu kontrolu morfologije i oblika. Međutim, kao nedostatak treba naglasiti mogućnost zaostalog porogena te visoke procesne temperature koje sprječavaju mogućnost pripojenja bioaktivnih molekula<sup>31</sup>.

### ***Liofilizacija***

Upotrebom liofilizacije (sušenje zamrzavanjem) mogu se pripraviti visokoporozni skeleti (> 90 %) s kontrolom veličine pora. Glavna prednost metode je što ne zahtjeva visoke temperature ili zasebno ispiranje, međutim, kao nedostatak se navodi što je veličina pora ograničena i vrijeme obrade je duže<sup>34,35</sup>.

Proces liofilizacije podrazumijeva uklanjanje vode iz zamrznutog proizvoda sublimacijom. Sublimacija se odvija kada smrznuta tekućina izravno prelazi u plinovito stanje. Kao rezultat, dobije se suhi polimerni skelet s međusobno povezanom poroznom mikrostrukturom. Iako je ovo najskuplji oblik sušenja zbog duljine trajanja procesa, niske temperature kondenzatora i upotrebe vakuuma, dobije se najbolja kvaliteta suhog proizvoda.

Ovom su metodom proizvedeni različiti polimerni i kompozitni skeleti, uključujući i HA/CS skelet, te je i dalje jedna od najčešće korištenih metoda za pripremu visokoporoznih skeleta za inženjerstvo tkiva<sup>34</sup>.

### ***Elektropredenje***

Proces elektropredenja zbog svoje široke primjene postalo je predmetom mnogih istraživanja budući da omogućava proizvodnju materijala ciljanih fizikalno-kemijskih svojstava, ovisno o namjeni. Jednostavan je i uspješan ovo postupak predenja za proizvodnju visokoporozne i međusobno povezane nanovlaknaste strukture koja oponaša svojstva izvanstanične matrice, a dobivaju se iz polimerne otopine (ili taljevine) pod utjecajem električne sile. Nanovlaknasti skeleti mogu pružiti stanicama okolišne i fizičke značajke te promicati rast i dobru funkciju stanica<sup>31,36</sup>.

Zhang<sup>31</sup> i suradnici uspješno su pripravili HA/CS kompozitna nanovlakna kombinacijom procesa *in situ* sutaloženja i elektropredenja. No, kao manu ovog procesa važno je istaknuti što se njime ne može proizvesti trodimenzionalni strukturirani materijal.

### **2.7. Sipina kost**

Sipe (eng. *cuttlefish*) su morski beskralježnjaci koje imaju unutrašnju strukturu poznatu kao sipina kost (*Sepia Officinalis L.*) ili sipovina. Takva unutrašnja struktura je porozna i sastavljena je od kalcij karbonata, što sipama osigurava mogućnost plutanja<sup>37</sup>.

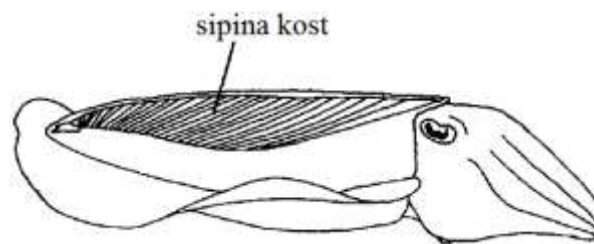


**Slika 8.** Prikaz sipe u prirodnom okruženju<sup>37</sup>.

Sipina kost sastoji se od skeletne strukture i krutog plutajućeg spremnika koji omogućava sipi da bude gušća ili rjeđa od morske vode. S obzirom da životinje gušće od morske vode mogu konstantnu dubinu održavati samo uz utrošak značajne količine energije,

promjenjiva uloga plutajućeg spremnika omogućava sipi značajnu prednost, a to je da sipa može održavati stalnu poziciju u vodi s vrlo malim utroškom energije i uz malo truda.

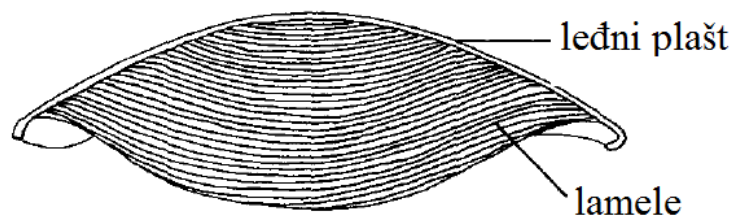
Sipina kost (koja zauzima oko 9% volumena sipe) ima poroznu strukturu, podijeljena je lamelama te u sebi sadržava i tekućinu i plin. Sipa mijenja gustoću kosti s promjenom količine tekuće faze unutar porozne strukture kosti. Vrlo je zanimljivo to što plin (uglavnom dušik) ima tlak od oko 0,8 bar, te se ekstrakcijom tekućine iz komore povećava plutajuća sposobnost sipe koja time postaje 'aktivna pumpa'. Pri dubini od 70 m razlika tlaka između unutrašnje i vanjske kosti iznosi oko 7 bara<sup>38</sup>.



**Slika 9.** Shematski prikaz položaja sipine kosti<sup>38</sup>.

Dakle, sipina kost strukturno mora biti prilagođena u pogledu krutosti koja je potrebna za skeletnu strukturu, dok s druge strane, kost mora biti i čvrsta, ali lagana kao spremnik koji je sposoban izdržati znatan vanjski pritisak.

Sipina kost sastoji se od dva dijela: gustog vanjskog zida ili leđnog oklopa i unutarnje lamelarne matrice (lamelle su međusobno odijeljene s brojnim stupićima)<sup>38</sup>.

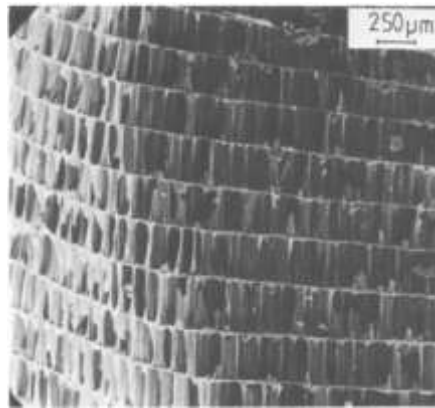


**Slika 10.** Poprečni presjek sipine kosti<sup>38</sup>.

## 2.7.1. Mikrostruktura sipine kosti

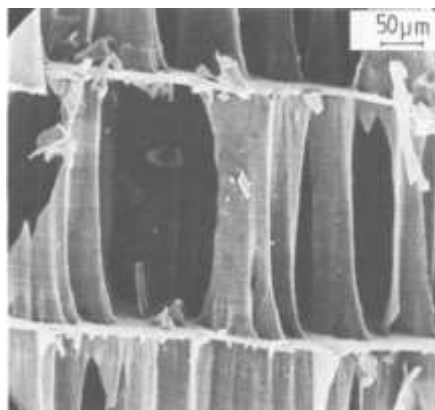
### 2.7.1.1. Lamelarna matrica

Paralelni slojevi ili lamele, izgrađeni od kalcij karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), oblikuju komore (odjeljke) koje su međusobno izolirane, ali se unutar svake pojedine komore plin ili tekućina mogu slobodno kretati. Razmak između lamela je različit u određenim dijelovima sipine kosti i uglavnom iznosi između 200 i 600  $\mu\text{m}$ <sup>38</sup>.



**Slika 11.** SEM mikrograf lamelarne matrice<sup>38</sup>.

„Strop“ svake komore je poduprt brojnim potpornjima sigmoidalnog poprečnog presjeka (Slika 12.). XRD analiza potvrdila je da je sipina kost izgrađena od aragonitne modifikacije kalcij karbonata, a ta se kristalna forma može stabilizirati prisutnošću stroncija (kako je navedeno u radu znanstvenika *Hewitta*). Gustoća suhe unutarnje lamelarne matrice iznosi  $190 \pm 20 \text{ kg m}^{-3}$ , što s obzirom da gustoća aragonita iznosi oko  $2940 \text{ kg m}^{-3}$ , predstavlja poroznost (zanemarujući organsku komponentu) od 93%<sup>38</sup>.



**Slika 12.** SEM mikrograf stupića koji podupiru lamele<sup>38</sup>.

### 2.7.1.2. Organska komponenta

Skeleti svih mekušaca izgrađeni su od kalcij karbonata i organske komponente koja najvjerojatnije sudjeluje u procesu nastajanja ljuštore. Lamelarna matrica sipine kosti sadrži između 3 i 4,5% ukupne težine organskog materijala. U unutarnjoj matrici sipine kosti svaka lamela i potporni stupić su prevučeni membranama od organskog materijala u obliku tankog filma. Organska komponenta leđnog oklopa sipine kosti i unutarnje strukture jest kompleks protein-hitin, s time da je u leđnom oklopu ima u deseterostruko većem udjelu nego u lamelarnoj matrici.

Priroda organske komponente u oklopima mekušaca privukla je velik interes biokemičara. Hitin je jedna od najšire rasprostranjenih organskih molekula u koštanim i epidermalnim strukturama prisutnima u ljušturama mekušaca. To je izotaktni poli-N-acetil-D-glukozamin povezan s  $\beta$ -(1,4)-glikozidnim vezama. Međutim, hitin samostalno nije prisutan u takvim koštanim i epidermalnim strukturama, već se nalazi u kompleksima hitin-protein, na primjer u glikoproteinima ili mukoproteinima. Prema tome, hitin rijetko predstavlja više od 50% ukupne količine organske tvari u hitinskim strukturama. Hitin izlučen iz leđnog oklopa i lamelarne matrice sipine kosti identificira se kristalografski kao  $\beta$ -tip. Hitin je kovalentno vezan sa proteinom. Osim stabilnog glikoproteina, većina hitinskih struktura također sadrži slobodni protein koji se može lako ekstrahirati vodom<sup>38</sup>.

### 2.7.1.3. Ledni oklop

Leđni oklop je gust, čvrst pokrov koji prekriva lamelarnu matricu i izolira odvojene komore. Oklop se sastoji je od tri sloja: tvrde vanjske kalcificirane zone debljine oko 1 mm, prozirne srednje zone debljine oko 0,3 mm koja se sastoji od čvrstih, vlaknastih slojeva stvrdnutog hitina, te tanke unutrašnje kalcificirane zone. Ova slojevita struktura je neporozna i čini 30-40% težine organskog materijala, što je vjerojatno uzrok čvrstoće leđnog materijala<sup>38</sup>.

### 2.7.2. Arhitektura i funkcija sipine kosti

Zapravo su za inženjerstvo materijala i znanost zanimljiva dva aspekta: prvo, koliko dobro su se makroskopska i mikroskopska struktura sipine kosti prilagodile zadaćama koje taj organ zahtjeva, te drugo, kojim je mehanizmom nastala tako izuzetna i složena struktura. Unutarnji tlak plina mora se održavati ispod 1 bar te oklop sipe mora izdržati visok vanjski

hidrostatski tlak pod kojim se sipa nalazi i iz tog razloga sipina kost mora imati sposobnost kombiniranja visoke tlačne čvrstoće i male težine. Izolirane komore imaju dvojaku funkciju. Prvo, služe kao individualni odjeljci u kojima se mogu regulirati relativne količine plina i tekućine kontrolirajući time plutanje sipe. S druge strane, komore pružaju strukturnu stabilnost, u kombinaciji s visokom poroznošću (93%) i niskom specifičnom težinom, koja može izdržati vanjski tlak veći i od 10 bar. *Denton*<sup>38</sup> i suradnici objavili su da sipina kost može biti izložena tlaku od 24 bar prije nego što dođe do urušavanja strukture, što odgovara dubini od 230 m. Unutarnja struktura sastoji se od paralelnih stupića koji međusobno odjeljuju lamele. Poprečni presjek potpornih stupova u lamelarnoj matrici u obliku slova S doprinosi tlačnoj čvrstoći iz razloga što oblik minimizira svaku tendenciju za izvijanjem stupova. Leđni oklop pruža čvrst i jak pokrov za lamelarnu matricu. *Currey*<sup>38</sup> je u svome radu zabilježeno je da je čvrstoća kosti optimalna kad je sadržaj organske komponente u oklopu oko 34%. Stoga proizlazi kako leđni oklop ima važnu mehaničku ulogu.

### **2.7.3. Uloga organske komponente**

Sposobnost organske komponente leđnog oklopa da se podvrgne plastičnoj deformaciji i time poveća čvrstoću kompozitne strukture je samo jedna od uloga koju ima organska komponenta u sipinoj kosti. Općenito, uloga organskih polimera u biološkim materijalima je kontrola rasta i očuvanja granica i oblika strukture<sup>38</sup>.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za sintezu silicijem dopiranog visokoporoznog hidroksiapatit-kitozan kompozitnog materijala u eksperimentu su korišteni sljedeći materijali i kemikalije:

- Sipina kost (*Sepia officinalis L.*), iz Jadranskog mora
- Natrijev hipoklorit, NaClO, 13%, Gram-mol d.o.o.
- Amonij dihidrogenfosfat,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $c = 0,6 \text{ mol dm}^{-3}$
- Etanol,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Gram-mol d.o.o.
- Tetraetoksisilan (TEOS),  $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ , 98%
- Kitozan,  $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_n$ ,  $\bar{M} = 100 - 300 \text{ kg mol}^{-1}$ , ACROS Organic
- Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 99,8%, Sigma-Aldrich
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika

#### 3.2. Sinteza silicijem dopiranog hidroksiapatita

Sipina kost (*Sepia officinalis L.*), iz Jadranskog mora koristila se kao polazni materijal za hidrotermalnu sintezu hidroksiapatita. Kost je mehanički očišćena tako što se ostrugao kruti vanjski plašt kosti, te se zatim porozni dio rezao cirkularnom pilom na manje komadiće debljine 5-6 mm. Izrezani komadići tretirani su otopinom natrijeva hipoklorita (NaClO, 13%, Gram-mol d.o.o.), na sobnoj temperaturi, približno 48 h kako bi se uklonila organska komponenta kosti. Nakon uklanjanja organske komponente, sipina kost je ispirana destiliranom vodom i sušena pri 105 °C.

Uzorci sipine kosti stavljeni su u teflonsku posudicu u koju je dodana stehiometrijska količina (Ca/P=1,67) amonijeva dihidrogenfosfata ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 99%) i tetraetoksisilan, kao reagens za ugrađivanje silicija. Teflonska posudica sa reagensima umetnuta je u čeličnu tlačnu posudu i stavljena u hidrotermalni reaktor pri temperaturi od 200 °C tijekom 72 h. Samogenerirani tlak je iznosio 18-20 bar. Po završetku hidrotermalne sinteze uzorci su izvađeni, isprani destiliranom vodom i sušeni kroz 24 h pri 105 °C.



**Slika 13.** Prikaz komadića sipine kosti.

### 3.3. Priprava otopine kitozana

Pripremljena je 0,1 M octena kiselina volumena 250 mL. U 50 mL te otopine dodano je 1 g kitozana. Tako je pripravljena 2%-tna otopina kitozana koja je miješana na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 45 °C do postizanja potpune topljivosti kitozana. Zatim je mjereno pH otopine koji je podešen s 4,5 na približno 5,9 dokapavanjem 12 M otopine NaOH.



**Slika 14.** Prikaz miješanja 2%-tne otopine kitozana na magnetskoj miješalici.



### 3.4. Visokoporozni hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal

Uzorci silicijem dopiranog hidroksiapatita (1 mas.% Si) postavljeni su u uređaj za impregnaciju (Citovac Struers) i nakon postignutog vakuuma u čašu s uzorcima usisana je 2%-tna otopina kitozana. Uzorci su zatim izvađeni iz otopine i sušeni pri 50 °C . Nakon 30 minuta sušenja uzorci su ponovno impregnirani s otopinom kitozana te sušeni 24 h pri 50 °C. Osušeni uzorci tretirani su 1 M otopinom NaOH kako bi se uklonile acetilne skupine, ispirani su destiliranom vodom i ostavljeni da se suše na zraku. Na taj način dobiveni su uzorci silicijem dopiranog hidroksiapatita s dva sloja 2%-tne otopine kitozana.



Slika 15. Prikaz kompozita Si1%-HA/CS.

### 3.5. Karakterizacija materijala

#### 3.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, FTIR

FTIR je metoda infracrvene (IR) spektrometrije u kojoj infracrveno zračenje odgovara energiji vibracije molekule. FTIR spektroskopija se najviše upotrebljava u kvalitativnoj analizi koja se osniva na određivanju funkcionalnih skupina na temelju izrađenih tablica ili spektara.

FTIR analiza provedena je na Bruker VERTEX 70 instrumentu s ATR nastavkom uz sljedeće uvjete snimanja: raspon mjernog područja 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , rezolucija od 4  $\text{cm}^{-1}$ , temperatura snimanja od 20 °C.

### **3.5.2. Kvalitativna mineralna rendgenska difrakcijska analiza, XRD**

Rendgenska difrakcijska analiza primjenjuje se za analizu kristaličnih uzoraka. Ovom metodom moguće je identificirati analizirani kristalični materijal, doznati njegovu strukturu, uočiti postojanje defekata u građi i sl..

Upotrebom XRD metode analizirao se pripremljeni kompozitni materijal Si1%-HA/CS koristeći Shimadzu XRD-6000 rendgenski difraktometar s  $\text{CuK}\alpha$  zračenjem pri 40 kV i 30 mA, uz uvjete snimanja: raspon difrakcijskih kutova  $5^\circ < 2\theta < 70^\circ$  i brzina snimanja od  $0,02^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ .

### **3.5.3. Termogravimetrijska analiza, TGA**

Termogravimetrija je tehnika kojom se mjeri količina i brzina promjene mase uzorka kao funkcija temperature i/ili vremena u kontroliranoj atmosferi. TGA analizom prati se mehanizam razgradnje materijala, termičke stabilnosti materijala, određivanje udjela pojedinih komponenata u višekomponentnim sustavima te kinetike reakcija.

Termogravimetrijska analiza provodila se na instrumentu tvrtke Netzsch STA 409 u konstantnoj struji sintetičkog zraka od  $30 \text{ mL min}^{-1}$  i brzinom grijanja od  $10 \text{ K min}^{-1}$ .

### **3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija, SEM**

Pretražna elektronska mikroskopija tehnika je koja omogućava analizu površine te značajno veća povećanja u odnosu na optičku mikroskopiju. Uzorci koji se analiziraju SEM tehnikom moraju biti vodljivi radi analize sekundarnih elektrona s površine, a oni koji nisu vodljivi trebaju se prethodno prekriti tankim slojem zlata ili drugog metala raspršivanjem i vakuum uparavanjem.

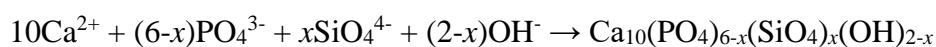
Mikrostruktura uzoraka poroznih materijala, HA i kompozitnog materijala (Si1%-HA/CS), istraživana je pretražnom elektronskom mikroskopijom na uređaju SEM-TESCAN VEGA TS5136LS. Obzirom da su ispitivani uzorci nevodljivi, prethodno su neparivani vodljivim slojem zlata (120 sec) kako bi se dobila bolja kvaliteta mikrosnimaka.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

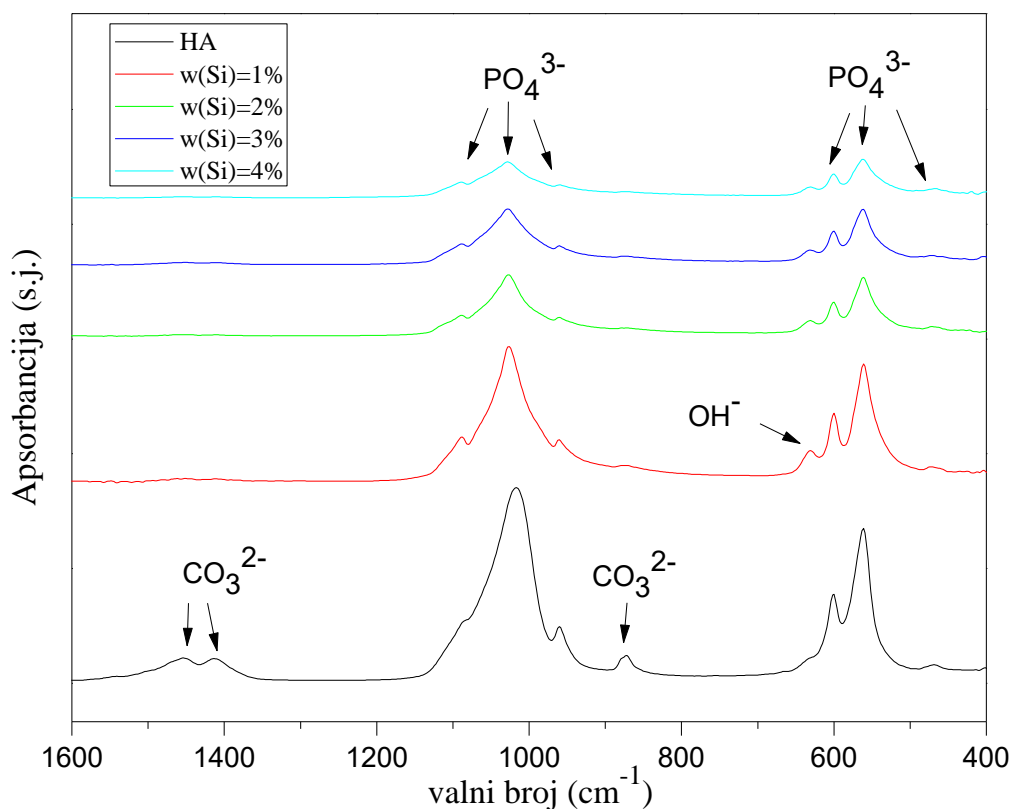
### 4.1. FTIR analiza

FTIR spektroskopija korištena je kako bi se istražio učinak supstitucije silicija na različite funkcionalne skupine, kao što su hidroksilne i fosfatne skupine u hidroksiapatitnoj strukturi, te utvrdilo eventualno pojavljivanje novih funkcionalnih skupina koje mogu dati više saznanja o ugradnji silicija u strukturu HA.

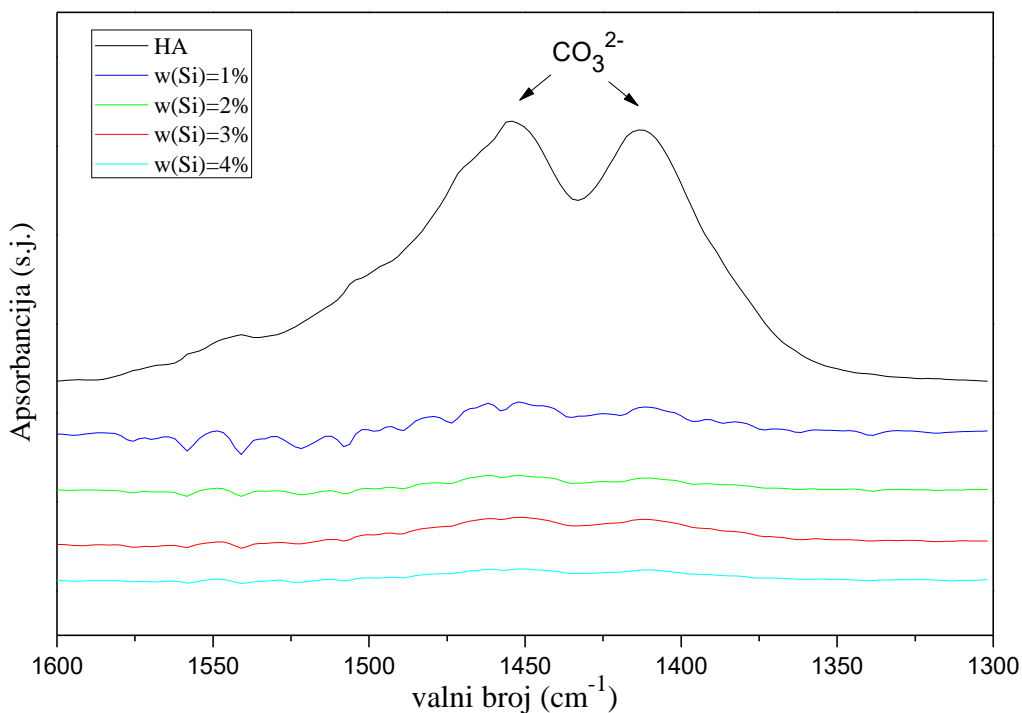
Ugrađivanje silicija provedeno je pod pretpostavkom da  $\text{SiO}_4^{4-}$  skupine zamjenjuju  $\text{PO}_4^{3-}$  skupine, što je opisano Gibsonovim mehanizmom sljedećom jednačbom:



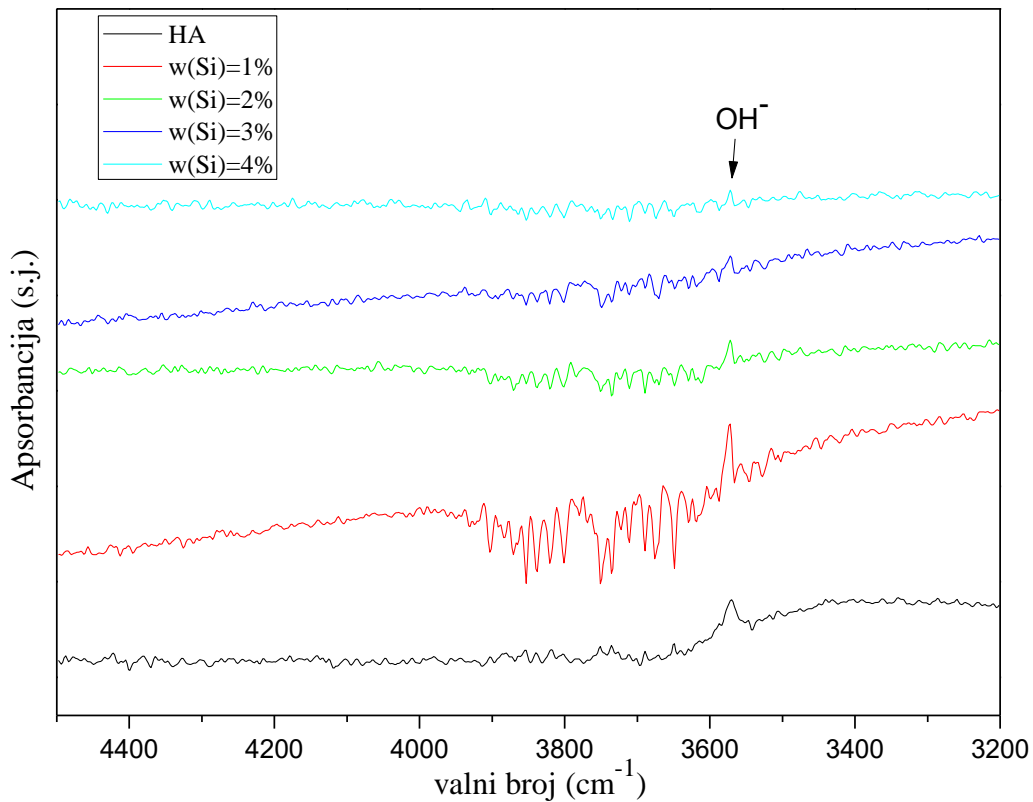
Kako bi se kompenzirao višak negativnog naboja nastalog ugradnjom  $\text{SiO}_4^{4-}$  skupina i održala neutralnost, dio  $\text{OH}^-$  grupa odlazi iz strukture  $\text{HA}^{24}$ .



**Slika 16.** FTIR spektri uzorka hidroksiapatita i Si-HA različitog masenog udjela silicija u području valnih brojeva 1600-400 cm<sup>-1</sup>.

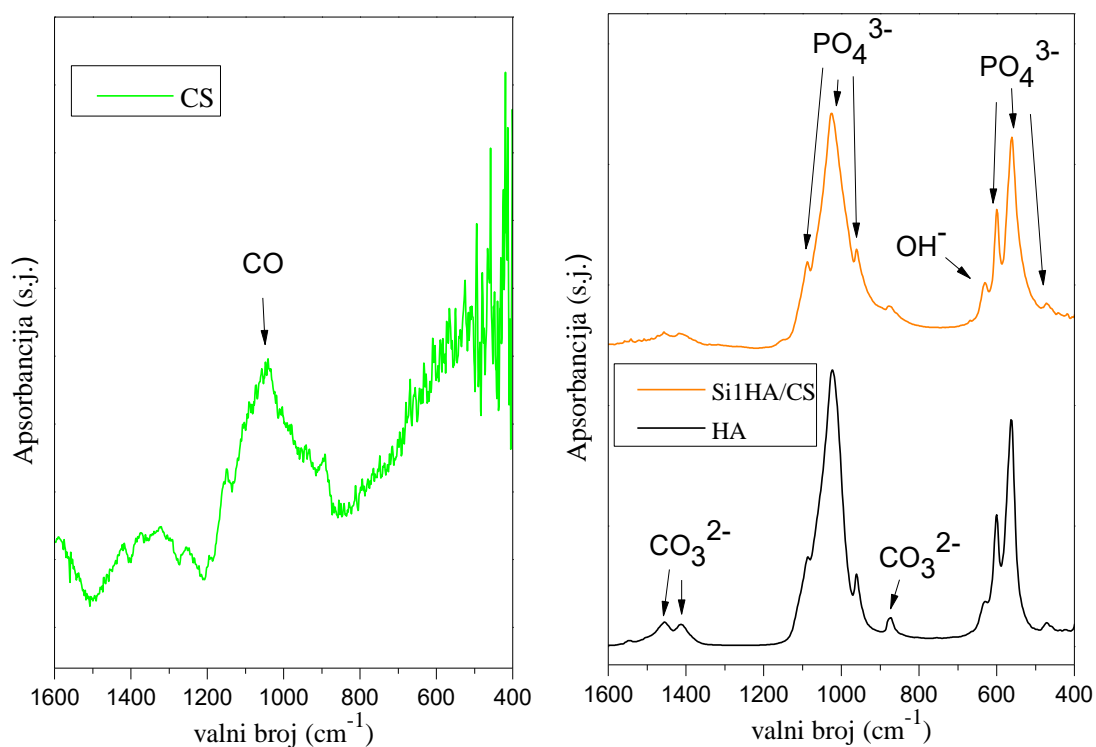


**Slika 17.** FTIR spektri uzorka hidroksiapatita i Si-HA različitog masenog udjela silicija u području valnih brojeva 1600-1300  $\text{cm}^{-1}$ .

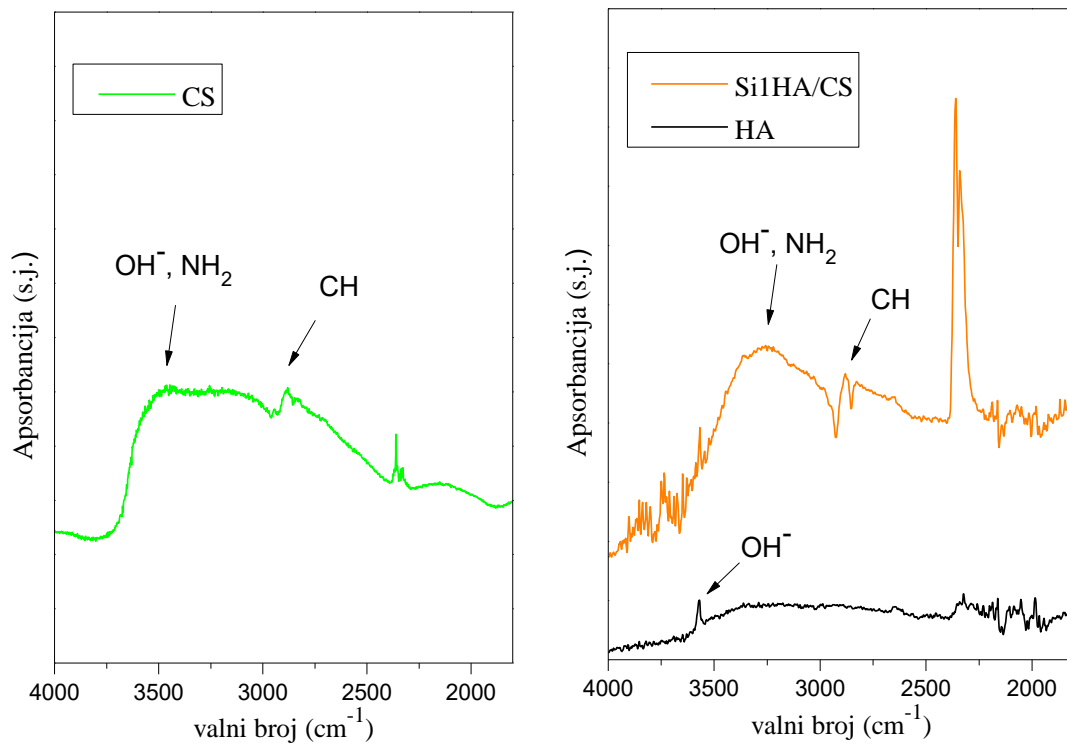


**Slika 18.** FTIR spektri uzorka hidroksiapatita i Si-HA različitog masenog udjela silicija u području valnih brojeva 4500-3200  $\text{cm}^{-1}$ .

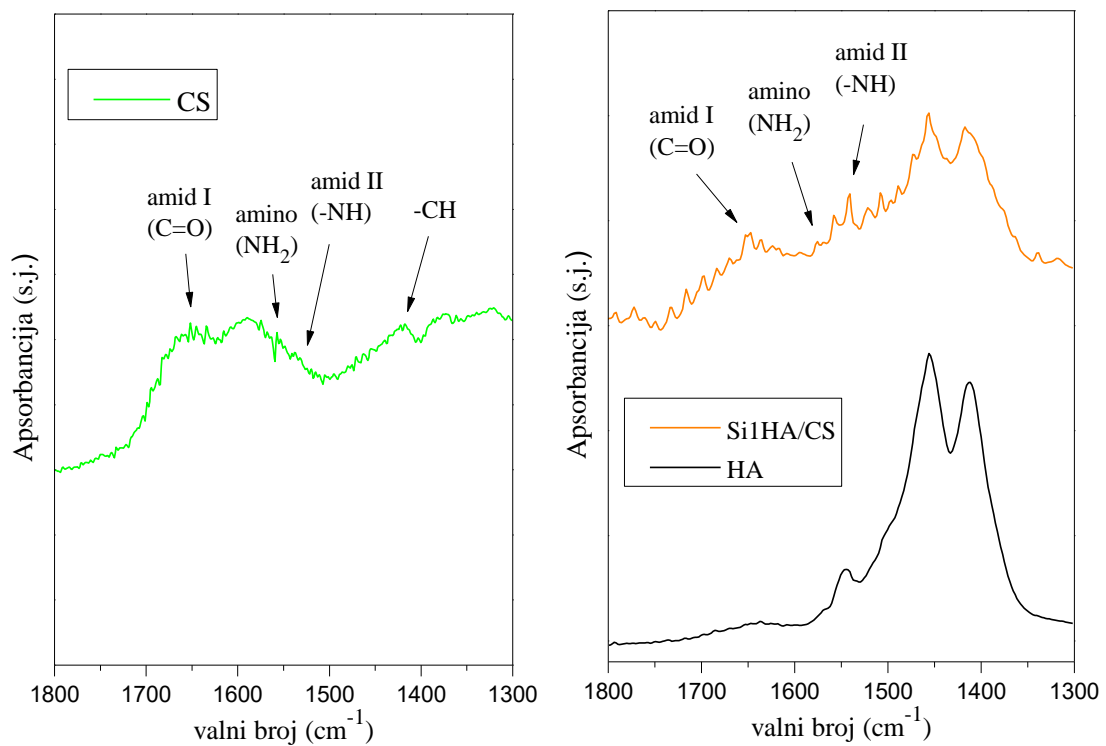
Na grafičkom prikazu FTIR spektra Si-HA vidljive su karakteristične vrpce  $\text{PO}_4^{3-}$  tetraedara pri 470, 561, 599, 960, 1026 i  $1087\text{ cm}^{-1}$  (Slika 16.). HA u svoju strukturu može primiti supstituente kao što je  $\text{CO}_3^{2-}$  skupina, pa tako postoje dva tipa karbonatnih supstitucija: supstitucija  $\text{CO}_3^{2-}$  skupina na mjesto  $\text{OH}^-$  skupina (tip A) i supstitucija  $\text{CO}_3^{2-}$  skupina na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina (tip B). Iz spektra je vidljivo da u hidroksiapatitu koji je sintetiziran hidrotermalnom konverzijom iz aragonitne sipine kosti postoji B tip supstitucije karbonatnih iona čije se vrpce javljaju pri  $1411$  i  $1452\text{ cm}^{-1}$ , te pri  $871\text{ cm}^{-1}$ . Za razliku od čistog HA, FTIR spektri uzoraka HA supstituiranog silicijem pokazuju značajno smanjenje intenziteta karbonatnih vrpce, što prema nekim istraživanjem može upućivati na kompeticijsku ugradnju  $\text{SiO}_4^{4-}$  iona na mjesto fosfatnih skupina (Slika 17.)<sup>39</sup>. Iz FTIR spektra Si-HA uzoraka uočava se i smanjenje intenziteta vrpce fosfatnih skupina kako se povećava udio silicija. Također, intenzitet vrpce pri  $630\text{ cm}^{-1}$  i  $3571\text{ cm}^{-1}$  koje se pripisuju vibracijama  $\text{OH}^-$  skupina slabi s povećanjem udjela silicija (Slika 18.). Prema Gibsonovom mehanizmu, supstitucija  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedra na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  tetraedra dovodi do smanjenja intenziteta vrpce  $\text{OH}^-$  skupine koje su potrebne za kompenzaciju nastalog viška negativnog naboja. Nadalje, detaljna analiza spektra pokazuje izostanak vrpce pri  $800\text{ cm}^{-1}$  koje se pripisuju silikatnim grupama odnosno Si-O-Si vezama u amorfnoj  $\text{SiO}_2$  fazi, što znači da nije došlo do polimerizacije silikatnih tetraedara na površini materijala<sup>40</sup>.



**Slika 19.** FTIR spektri kitozana, uzorka hidroksiapatita i kompozitnog materijala Si1%-HA/CS u području valnih brojeva  $1600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 20.** FTIR spektri kitozana, uzorka hidroksiapatita i kompozitnog materijala Si1%-HA/CS u području valnih brojeva 4000-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

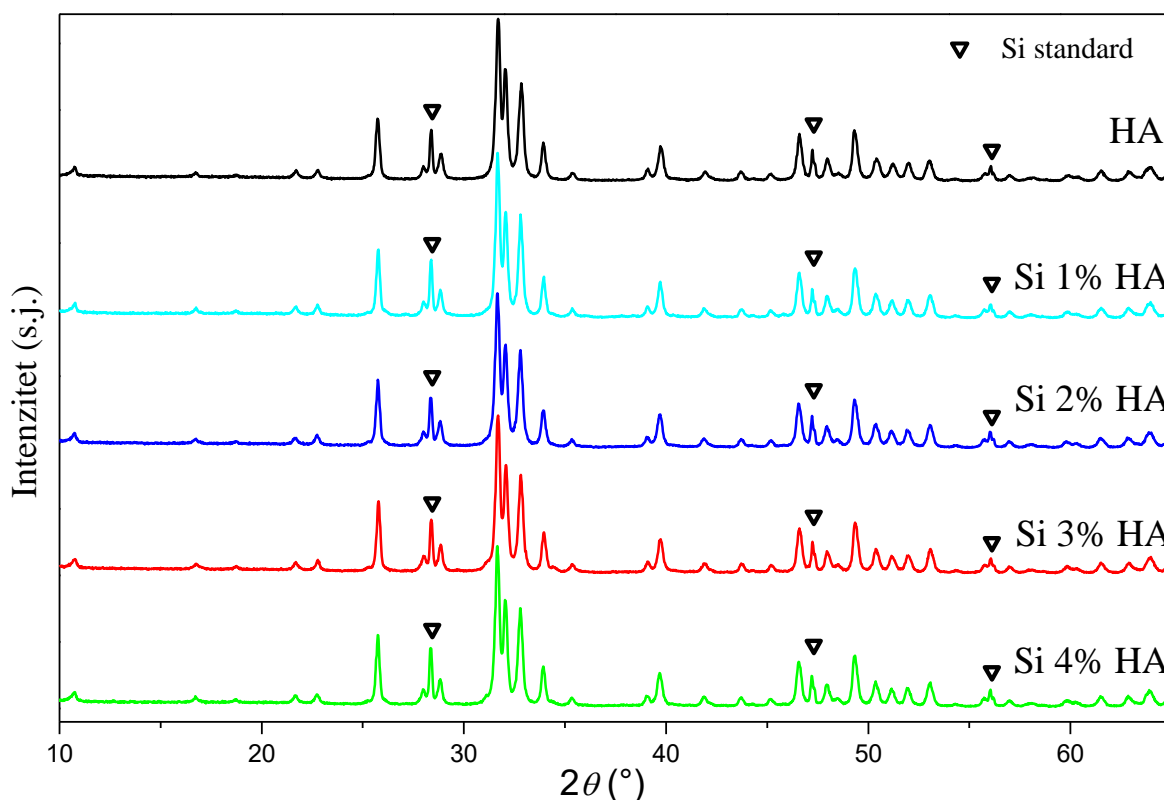


**Slika 21.** FTIR spektri kitozana, uzorka hidroksiapatita i kompozitnog materijala Si1%-HA/CS u području valnih brojeva 1800-1300  $\text{cm}^{-1}$ .

Osim karakterističnih vrpca koje pripadaju hidroksiapatitu, kompozitni materijal Si1%-HA/CS pokazuje široku vrpcu u području valnih brojeva  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$  što odgovara preklapanju vrpca  $-\text{NH}_2$  i  $-\text{OH}$  skupina te međumolekulskim vezama polisaharida. Pri  $2881\text{ cm}^{-1}$  vidljiva je vrpca koja odgovara CH skupini (Slika 20). Vrpce vidljive pri  $1652$ ,  $1575$  i  $1542\text{ cm}^{-1}$ , pripisuju se redom amid I ( $\text{C}=\text{O}$  veza amida), amino ( $-\text{NH}_2$ ) i amid II ( $-\text{NH}$  veza amida) skupinama kitozana (Slika 21.).

## 4.2. XRD analiza

Na slici 22. prikazani su difraktogrami sintetiziranog HA i Si-HA uzoraka. Svaki uzorak sadrži 5 mas.% Si koji je korišten kao standard (JCPDS 27-1402).



**Slika 22.** XRD difraktogrami čistog HA i pripremljenih uzoraka Si-HA različitih masenih udjela silicija prije žarenja.

Dobiveni rezultati pokazuju da je hidrotermalnom konverzijom sipine kosti dobiven HA (JCPDS 09-0432), te da u uzorku HA i Si-HA uzorcima nema prisutne druge faze osim HA. Iz snimljenih difraktograma vidljivo je da supstitucija silicijem ne utječe na difrakcijske

maksimume hidroksiapatita, što je u skladu s dobivenim rezultatima ranijih istraživanja Si-HA sustava<sup>41,42,43</sup>.

Također, nije uočeno niti širenje maksimuma na difraktogramima, što bi upućivalo na smanjenje kristaličnosti i veličine kristalita ugradnjom silicija kao što je nađeno u literaturi<sup>24,43,44,45</sup>.

U Tablici 2. prikazane su vrijednosti veličina kristalita izračunate Scherrerovom metodom iz kojih se može zaključiti da nema značajne promjene veličine kristalita i volumena ćelije HA supstituiranog silicijem u odnosu na HA.

**Tablica 2.** Parametri i volumen ćelije, veličina kristalita i udio pojedinih faza HA i Si-HA izračunati na temelju snimljenih difraktograma.

		HASi	Si1HASi	Si2HASi	Si3HASi	Si4HASi
Hidroksiapatit Parametri rešetke ( $P6_3/m$ )	$a$ (Å):	9,4293	9,4423	9,4433	9,4424	9,4423
	$c$ (Å):	6,9025	6,9017	6,9006	6,9005	6,9012
Volumen ćelije (Å <sup>3</sup> ):		531,494	532,895	532,918	532,815	532,857
Veličina kristalita (nm):		56	63,1	55,2	58,5	59,9

Udio faza (%)

Hidroksiapatit	95,02	94,65	94,71	94,69	94,3
Silicij	4,98	5,35	5,29	5,31	5,7

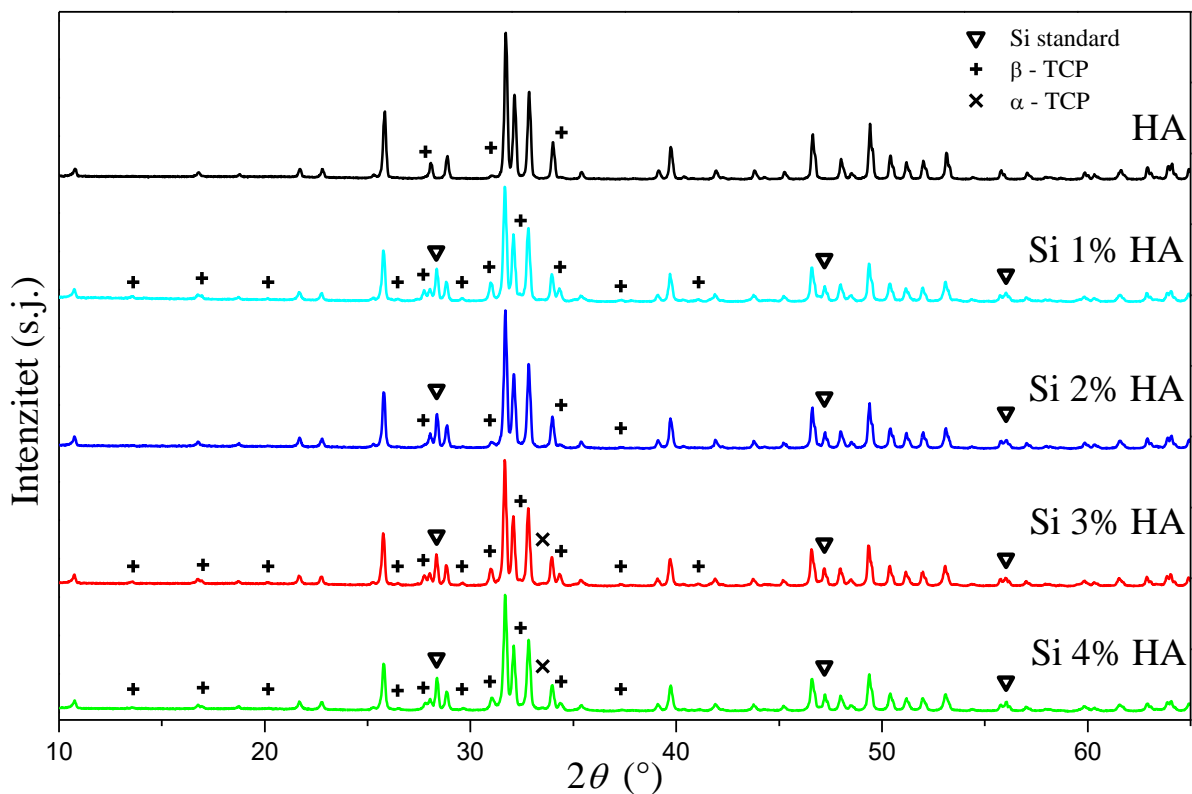
Rietveldovom metodom izračunato je da parametar ćelije  $a$  pokazuje porast u odnosu na vrijednosti čistog HA, dok je razlika vrijednosti između pojedinih Si-HA neznatna. Parametar  $c$  hidroksiapatitne ćelije Si-HA uzoraka gotovo je ostao nepromijenjen u odnosu na vrijednosti čistog HA.

Pretpostavka je da će supstitucijom  $PO_4^{3-}$  skupina sa  $SiO_4^{4-}$  skupinama doći do povećanja parametara rešetke Si-HA uzoraka zato što je ionski radijus  $Si^{4+}$  (0,042 nm) veći od radijusa  $P^{5+}$  (0,035 nm). Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja Si-HA sustava pokazuju da parametri ćelije  $a$  i  $c$  ne slijede teorijske pretpostavke. Tako su npr. *Ruys*<sup>46</sup> i suradnici našli da se parametri  $a$  i  $c$  mijenjaju ugradnjom silicija u HA i to blagim povećanjem u odnosu na HA. *Gibson*<sup>41</sup>, *Kim*<sup>47</sup> i suradnici su našli da se parametar rešetke  $a$  smanjuje, dok se parametar  $c$  povećava. *Marques*<sup>48</sup>, *Leventouri*<sup>49</sup> i suradnici su našli da parametar  $a$  raste s povećanjem udjela silicija, dok parametar  $c$  ostaje nepromijenjen. *Arcos*<sup>50</sup> i suradnici su našli da se parametri  $a$  i  $c$  blago smanjuju u odnosu na vrijednosti čistog HA.

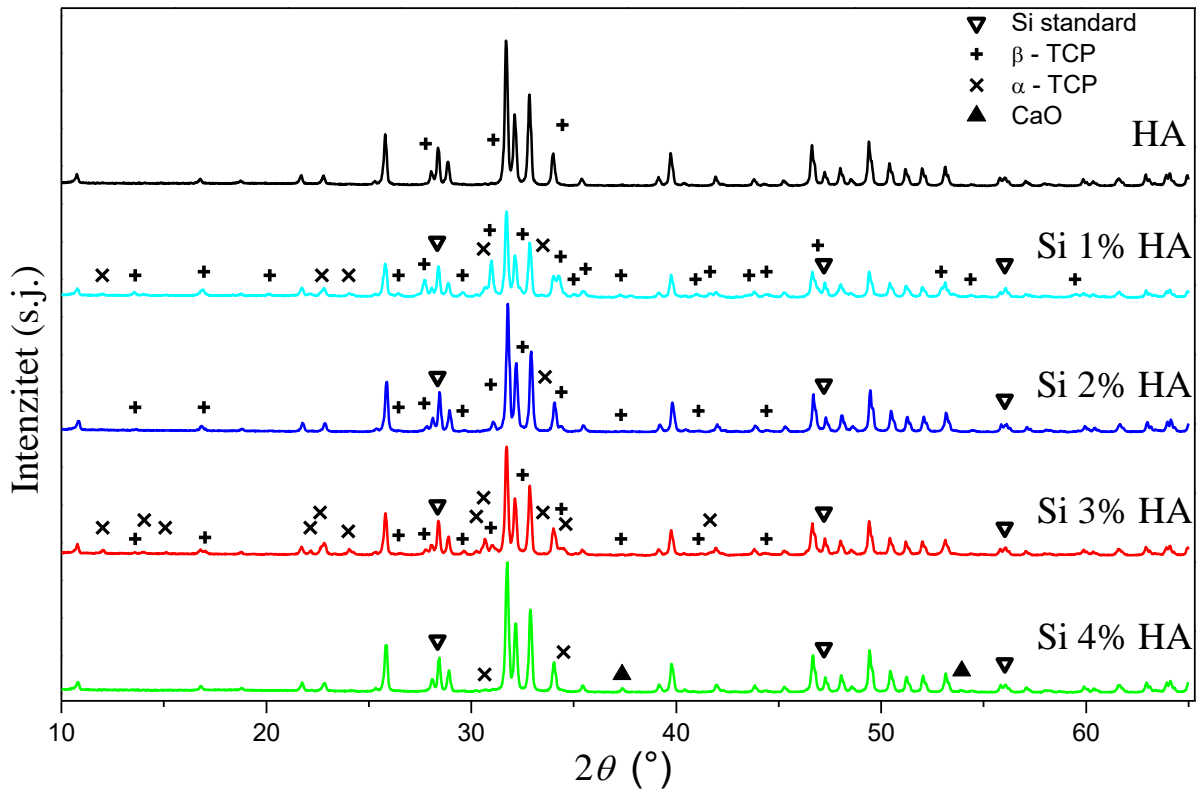


Zou<sup>51</sup> i suradnici su istražili utjecaj silicija na parametre ćelije HA pri različitim temperaturama. Parametar  $a$  je porastao pri temperaturi od 800 °C, dok je pri 1200 °C opadao, a parametar  $c$  je pokazao linearan rast s povećanjem udjela silicija pri obje temperature sinteriranja. Razlozi zbog kojih parametri ćelije HA nakon ugradnje silicija pokazuju vrlo različite trendove u odnosu na teorijske pretpostavke nisu razjašnjeni.

Difraktogrami uzoraka koji su termički obrađeni pri temperaturama 1000 i 1200 °C prikazani su na slikama 23. i 24. Vidljivo je da ne dolazi do širenja difrakcijskih maksimuma uzoraka Si-HA niti do njihova pomaka, iako se može uočiti blago smanjenje intenziteta difrakcijskih maksimuma s porastom udjela silicija.



**Slika 23.** XRD difraktogrami čistog HA i uzoraka Si-HA različitih masenih udjela silicija nakon žarenja pri 1000 °C.



**Slika 24.** XRD difraktogrami čistog HA i uzoraka Si-HA različitih masenih udjela silicija nakon žarenja pri 1200 °C.

**Tablica 3.** Parametri i volumen ćelije, veličina kristalita i udio pojedinih faza HA i Si-HA izračunati na temelju snimljenih difraktograma uzoraka žarenih pri 1000 °C.

		HA 1000+Si	Si1HA 1000+Si	Si2HA 1000+Si	Si3HA 1000+Si	Si4HA 1000+Si
Hidroksiapatit Parametri rešetke ( $P6_3/m$ )	$a$ (Å):	9,4303599	9,429994	9,4281583	9,4290279	9,4300521
	$c$ (Å):	6,8859184	6,8871782	6,888314	6,8896635	6,8898415
Volumen ćelije (Å <sup>3</sup> ):		530,333	530,389	530,27	530,472	530,601
Veličina kristalita (nm):		166,1	143,3	155,6	166,5	119,5

Udio faza (%)

Hidroksiapatit	92,72	79,8	89,42	80,94	81,77
Silicij	4,94	5,49	5,37	5,14	5,49
$\alpha$ -TCP				1,09	2,29
$\beta$ -TCP	2,34	14,71	5,22	12,82	10,44

**Tablica 4.** Parametri i volumen ćelije, veličina kristalita i udio pojedinih faza HA i Si-HA izračunati na temelju snimljenih difraktograma uzoraka žarenih pri 1200 °C.

		HA 1200+Si	Si1HA 1200+Si	Si2HA 1200+Si	Si3HA 1200+Si	Si4HA 1200+Si
Hidroksiapatit Parametri rešetke ( $P6_3/m$ )	$a$ (Å):	9,4280982	9,4278857	9,4268631	9,4285351	9,4285642
	$c$ (Å):	6,8862246	6,8868515	6,8888806	6,8884568	6,8891131
Volumen ćelije (Å <sup>3</sup> ):		530,103	530,127	530,168	530,324	530,377
Veličina kristalita (nm):		163,3	154,4	159,7	159,4	155,6

Udio faza (%)

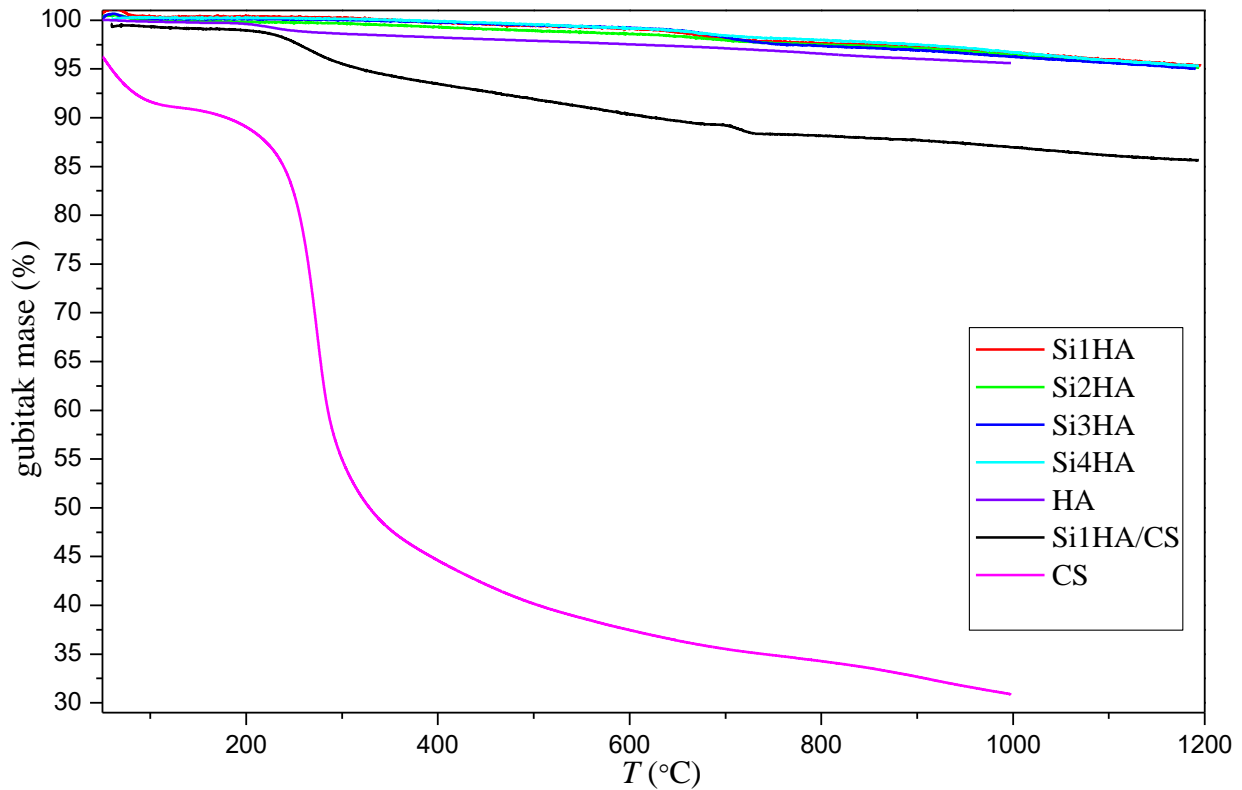
Hidroksiapatit	90,15	59,88	85,41	72,59	90,22
Silicij	5,45	5,71	5,65	5,66	5,42
$\alpha$ -TCP		8,54	1,56	13,62	3,64
$\beta$ -TCP	4,4	25,87	7,38	8,13	
Lime - CaO					0,68

Fazna analiza difraktograma sinteriranih uzoraka pokazala je da se pri temperaturi od 1000 °C u čistom HA stvara nova faza uslijed raspada HA, faza  $\beta$ -TCP. Povećanjem udjela dodanog silicija, povećava se i udio te faze, a u uzorcima s 3 i 4 mas.% Si, javlja se i faza  $\alpha$ -TCP. Sinteriranje uzoraka pri temperaturi od 1200 °C dovodi do stvaranja  $\beta$ -TCP faze u svim uzorcima osim u uzorku s 4 mas.% Si, dok je  $\alpha$ -TCP prisutna u svim uzorcima kojima je ugrađivan silicij. Osim toga, u uzorku s 4 mas.% Si, javlja se i vrlo mala količina CaO.

Parametri ćelije uzoraka koji su termički obrađeni pokazuju drugačiji trend u odnosu na termički neobrađene uzorke. Naime, parametar  $a$  poprima blago niže vrijednosti (izuzev uzoraka s 3 i 4 mas.% Si), dok parametar  $c$  ima konstantan blagi porast vrijednosti u odnosu na HA. Rezultati dobiveni analizom termički obrađenih uzoraka govore u prilog tome da je možda došlo do ugradnje silicija uzevši u obzir da dolazi do promjene vrijednosti parametara ćelije te stvaranja termički manje stabilne strukture HA, odnosno ubrzavanja njegovog raspada prema  $\alpha$ -TCP i  $\beta$ -TCP fazama uslijed ugrađenog  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedra.

### 4.3. TGA analiza

Termogravimetrijskom analizom istražena je termička stabilnost sintetiziranih materijala te određen udio kitozana impregniranog u Si1%-HA uzorak.

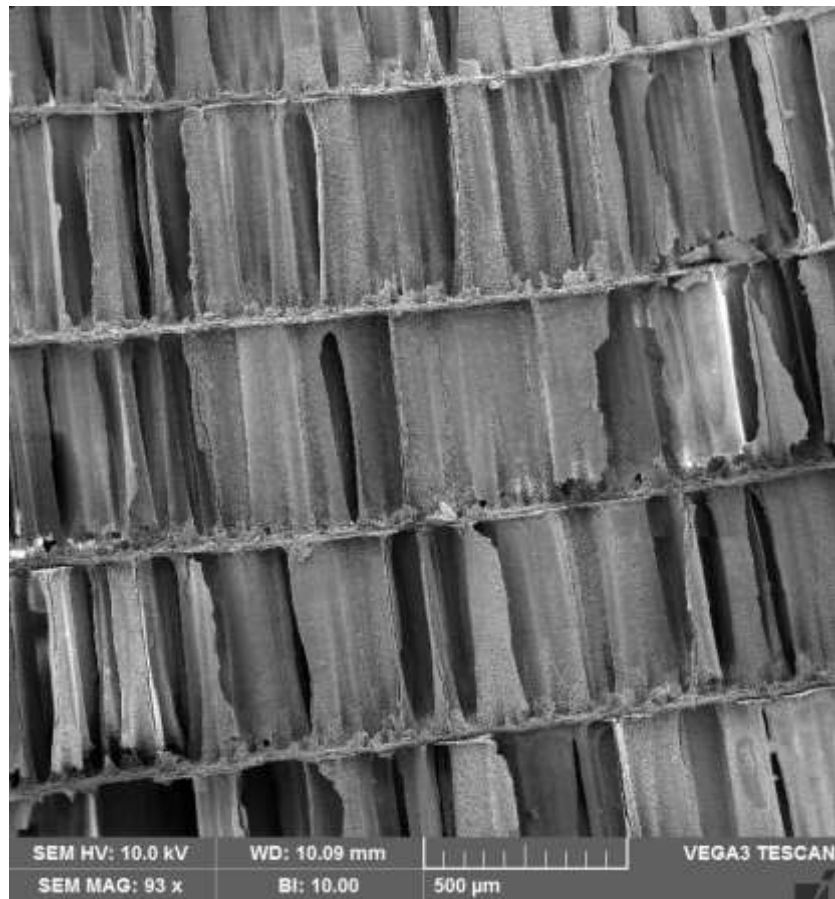


**Slika 25.** TGA krivulje uzoraka Si-HA različitih masenih udjela silicija te kompozitnog materijala Si1%-HA/CS.

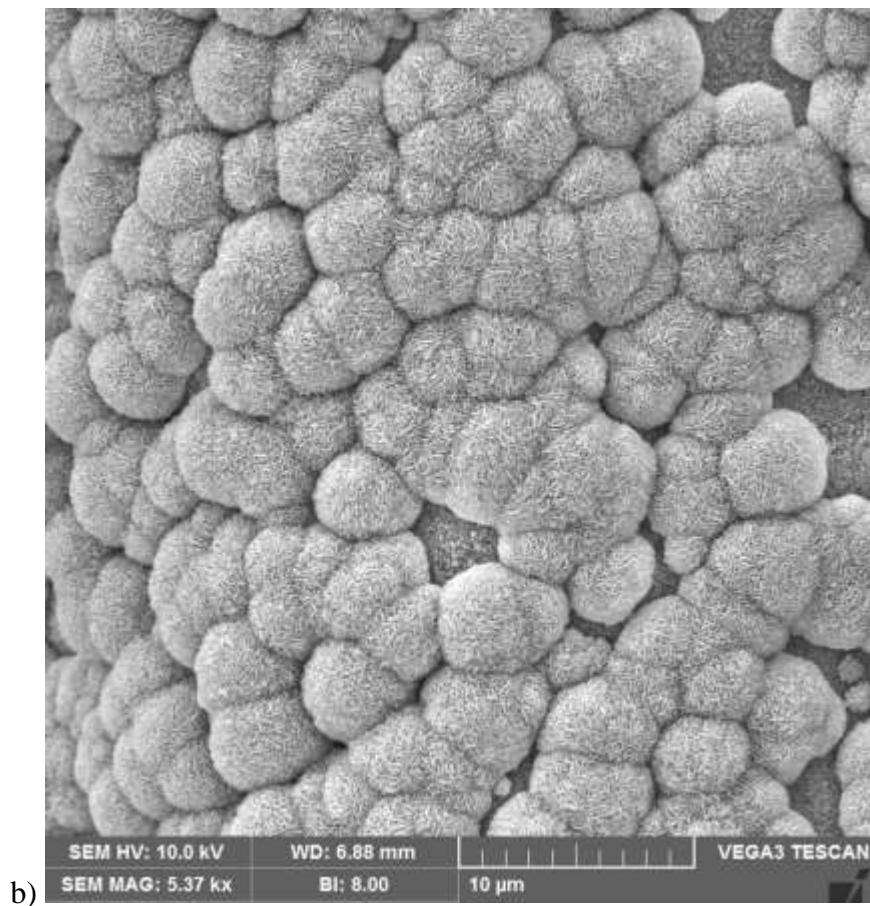
Termogravimetrijska krivulja HA ukazuje na njegovu termalnu stabilnost. Gubitak mase čistog hidroksiapatita od 4,0% se može objasniti gubitkom fizikalno adsorbirane vode, kao i gubitkom CO<sub>2</sub> procesom dekarbonizacije koji nastupa u temperaturnom intervalu od 600 °C do 1000 °C. TGA krivulje uzoraka Si-HA pokazuju trend raspada materijala vrlo sličan raspadu čistog HA. Ukupni gubitak mase pojedinih uzoraka s udjelima silicija od 1 do 4 mas.% Si kreće se između 4,7 i 5,0%. Kompozitni uzorak Si1%-HA/CS pokazuje ukupni gubitak mase od ukupno 14,4 mas.%, što znači da u uzorku ima oko 10% polimerne faze.

#### 4.4. SEM analiza

Mikrostruktura pripremljenih materijala istražena je SEM analizom. Sve mikrografske snimke prikazuju unutarnju površinu materijala.

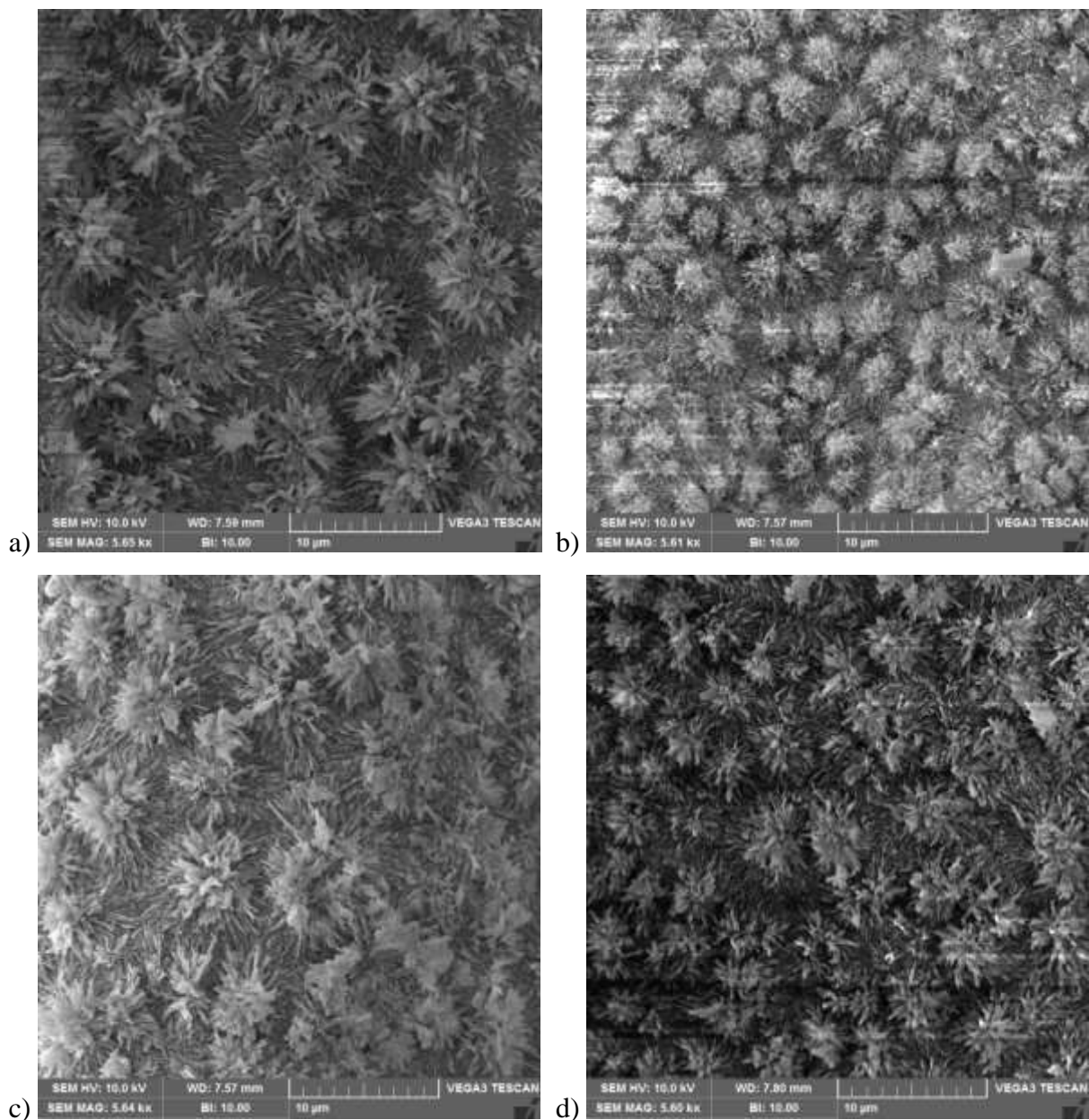


a)



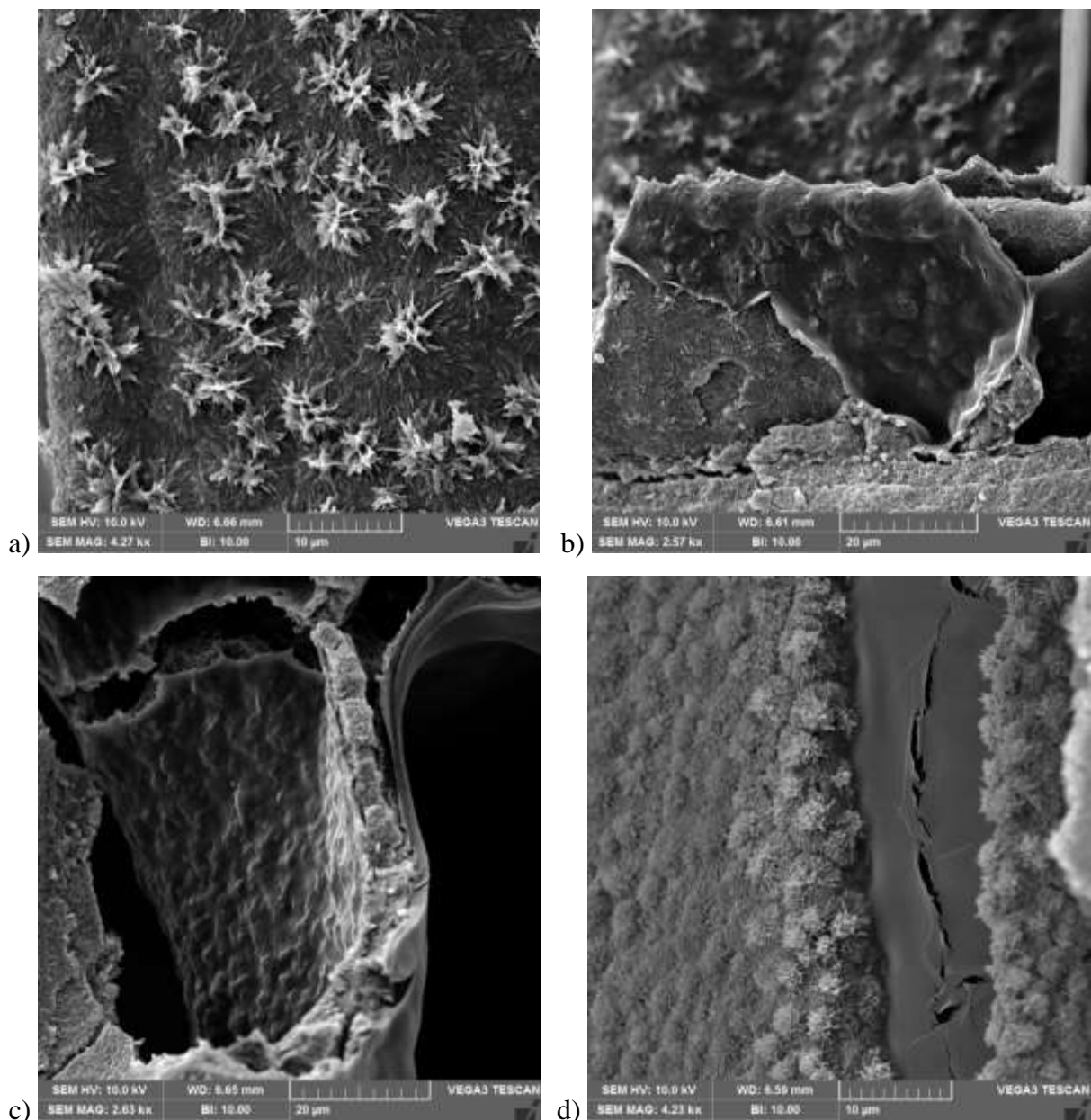
**Slika 26.** SEM mikrograf a) HA i b) sferičnih čestica HA.

SEM mikrograf hidroksiapatita pokazuje da je originalna arhitektura sipine kosti u potpunosti očuvana i nakon hidrotermalne reakcije. Jasno je vidljiva nenarušena lamelarna struktura (Slika 26.a)). Na mikrosnimci kod većeg povećanja (Slika 26.b)) uočava se ujednačena mikrostruktura sačinjena od sferičnih formi, nalik maslačku, koje ravnomjerno prekrivaju površinu lamela i stupova. Ovakve sferične nakupine kristalića HA povećaju specifičnu površinu materijala.



**Slika 27.** SEM mikrografi uzoraka Si-HA različitog masenog udjela silicija,  
a) 1 mas.%, b) 2 mas.%, c) 3 mas.%, d) 4 mas.%.

Na slici 27. (a-d) prikazani su mikrografi silicijem dopiranog hidroksiapatita različitog masenog udjela silicija. Iz mikrografa je vidljivo da već pri 1 mas.% Si dolazi do promjene u izgledu čestica hidroksiapatita koje gube svoju kompaktnost i sferičan oblik u usporedbi s čistim HA. S povećanjem udjela silicija koji je dodan u hidrotetalnu sintezu, osnovni oblik promijenjenih čestica ostaje isti, iako su nešto sitnije u uzorcima s 2 i 4 mas.% Si.



**Slika 28.** SEM mikrografi kompozita Si1%-HA/CS pri različitim uvećanjima (a-d).

Na slici 28. (a-d) prikazani su mikrografi kompozitnog materijala Si1%-HA impregniranog kitozonom pri različitim uvećanjima iz kojih se može vidjeti kako sloj kitozana prekriva čestice HA. Na pojedinim mjestima u materijalu može se naći vrlo tanak sloj kitozana smještenog između stupova lamela, odnosno kao pregrada u porama materijala. SEM analiza pokazuje da je otopina kitozana bila adekvatne viskoznosti da uđe u pore materijala. Iako, analiza uzorka SEM metodom pokazuje da unutar materijala postoje dijelovi površine koji nisu prekriveni slojem kitozana, ili je taj sloj toliko tanak da propada između kristalića HA, što ga čini manje ili nimalo vidljivim. Zaključno, dvostruka impregnacija 2% otopine kitozana ne daje sasvim homogeno prekrivanje površine slojem kitozana unutar uzoraka.



## 5. ZAKLJUČCI

- Provedena je *in situ* ugradnja  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedra u strukturu hidroksiapatita hidrotermalnom konverzijom aragonita iz sipine kosti, pri čemu je kao izvor silikatnih iona korišten TEOS.
- Tehnikom vakuumske impregnacije pripremljen je visokoporozni kompozitni materijal silicijem supstituiranog hidroksiapatita i kitozana, Si-HA/CS.
- FTIR spektri uzorka hidroksiapatita i Si-HA različitog masenog udjela silicija pokazuju smanjenje intenziteta fosfatnih, karbonatnih i hidroksilnih skupina s povećanjem udjela dodanog silicija što može ukazivati na ugradnju  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedara na mjesto  $\text{PO}_4^{3-}$  tetraedara.
- XRD analiza potvrđuje nastanak HA kao jedine prisutne mineralne faze nakon hidrotermalne reakcije. Iako supstitucija silicijem ne utječe na položaj i oblik difrakcijskih maksimuma, promjene vrijednosti parametara ćelije *a* i *c* izračunatih Rietveldovom metodom, upućuju na moguću ugradnju silikatnih iona u strukturu HA.
- Rezultati dobiveni analizom termički obrađenih uzoraka pokazuju da su nastali Si-HA termički manje stabilne strukture HA, koja se raspada prema  $\alpha$ -TCP i  $\beta$ -TCP fazama uslijed ugrađenog  $\text{SiO}_4^{4-}$  tetraedra.
- TGA metodom potvrđena je prisutnost kitozana od oko 10 mas.%.
- SEM analiza uzoraka prikazuje očuvanu lamelarnu strukturu sipine kosti prevučenu tankim filmom kitozana nakon impregnacije.
- Iz SEM mikrografa je vidljivo da dodani silicij dovodi do promjene u izgledu čestica hidroksiapatita koje gube svoju kompaktnost i sferičan oblik u usporedbi s čistim HA.

Iz provedene karakterizacije sintetiziranog kompozitnog materijala kitozana i silicijem supstituiranog hidroksiapatita može se zaključiti da postoji mogućnost da je silikatni tetraedar zamijenio mjesta s fosfatnim tetraedrom u strukturi HA. Jednoznačna potvrda ugradnje silicija u strukturu HA može se dobiti metodom nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja ( $^{29}\text{SiNMR}$ ).

## 6. LITERATURA

1. P. C. Salgado, P. C. Sathler i suradnici, *Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts*, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2 (2011) 318-328.
2. F. Yang, W. L. Neeley i suradnici, *Tissue Engineering: The Therapeutic Strategy of the Twenty-First Century*, u: Cato T. Laurencin, Lakshmi S. Nair, *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*, 1 (2008) 3-32.
3. L. Pighinelli, M. Kucharska, *Chitosan–hydroxyapatite composites*, Carbohydrate Polymers, 93 (1) (2013) 256-262.
4. R. Langer, J. P. Vacanti, *Tissue Engineering*, Science, 260 (1993) 920-926.
5. V. Gaurina Srček, *Tkivno inženjerstvo*, predavanje PBF (2015)
6. Q. Chen, S. Lianga, G. A. Thouasb, *Elastomeric biomaterials for tissue engineering*, Progress in Polymer Science, 38 (2013) 584-671.
7. T. Dvir, B.P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues*, Nature Nanotechnology, 6 (1) (2011) 13-22.
8. A. R. Amini, C. T. Laurencin, S. P. Nukavarapu, *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*, Critical Reviews Biomedical Engineering, 40 (5) (2012) 363-408.
9. M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*, Acta Biomaterialia, 9 (2013) 7591-7621.
10. M. Vallet-Regí, J. M. Gonzalez-Calbet, *Calcium phosphates as substitution of bone tissue*, Progress in Solid State Chemistry, 32 (1) (2004) 1-31.
11. A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*, Macromolecular Bioscience, 4 (2004) 743-765.
12. K. Appasani, R. K. Appasani, *Stem Cells and Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering*, Humana Press, USA (2011)
13. Grupa autora, *Biomaterijali*, Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd (2010)
14. S. Orlić, *Biomaterijali*, predavanje FKIT (2015)
15. E. Vidović, *Biomaterijali*, predavanje FKIT (2015)
16. E. Vidović, *(Bio)degradacija biomaterijala*, predavanje FKIT (2015)
17. A. Moguš-Milanković, *Izazovi i poticaji*, Kemija u industriji, 54 (3) (2005) 131-134.

18. M. Vallet-Regí, D. Arcos Navarrete, *Biological Apatites in Bone and Teeth*, u *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*, Nanoscience and Nanotechnology, 1 (2015) 1-29.
19. J. Cadman, S. W. Zhou, Y. H. Chen, Q. Li, *Cuttlebone: Characterisation, Application and Development of Biomimetic Materials*, Journal of Bionic Engineering, 9 (2012) 367-376.
20. H. Ivanković, G. G. Ferrer, E. Tkalčec, S. Orlić, M. Ivanković, *Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20 (5) (2009) 1039-1046.
21. A. M. Pietak, J. W. Reid, M. J. Stott, M. Sayer, *Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics*, Biomaterials, 28 (2007) 4023-4032.
22. K. A. Hing, P. A. Revell, N. Smith, T. Buckland, *Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds*, Biomaterials, 27 (29) (2006) 5014-5026.
23. A. E. Porter, *Nanoscale characterization of the interface between bone and hydroxyapatite implants and the effect of silicon on bone apposition*, Micron, 37 (8) (2006) 681-688.
24. T. X. Lian, X. X. Feng, L. R. Fang, *Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method*, Materials Letters, 59 (2005) 3841-3846.
25. C. M. Botelho, *Silicon-Substituted Hydroxyapatite for Biomedical Applications*, doktorska disertacija, Tehnički fakultet Sveučilišta u Portu (2005)
26. R. Chandra, R. Rustgi, *Biodegradable Polymers*, Progress in Polymer Science, 23 (7) (1998) 1273-1335.
27. S. Doppalapudi, A. Jain, W. Khan, A. J. Domb, *Biodegradable polymers-an overview*, Polymers for Advanced Technologies, 25 (5) (2014) 427-435.
28. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, Materials Today, 14 (3) (2011) 88-95.
29. F. Croisier, C. Jerome, *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*, European Polymer Journal, 49 (4) (2013) 780-792.
30. L. Pighinelli, M. Kucharska, *Chitosan-hydroxyapatite composites*, Carbohydrate Polymers, 93 (1) (2013) 256- 262
31. Tao Jiang, Meng Deng, Wafa I. Abdel- Fattah, Cato T. Laurencin, *Chitosan-Based Biopharmaceutical Scaffolds in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, u: B. Sarmiento, José das Neves, *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, 21, John Wiley & Sons (2012) 393-427.

32. Tao Sun, Tareef Hayat Khan, N. Sultana, *Fabrication and In Vitro Evaluation of Nanosized Hydroxyapatite/Chitosan-Based Tissue Engineering Scaffolds*, *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014) 1-8.
33. H. Kashiwazaki i suradnici, *Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: Their mechanical and biological properties*, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19 (2-3) (2009) 133-140.
34. N. Sultana, M. Wang, *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds Using the Emulsion Freezing/Freeze-drying Technique and Characteristics of the Scaffolds*, u M. Ramalingam i suradnici, *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*, 4, ScienceDirect (2012) 63-90.
35. B. Subia, J. Kundu, S. C. Kundu, *Biomaterial Scaffold fabrication techniques for Potential Tissue Engineering applications*, u D. Eberli, *Tissue Engineering*, Intech, 7 (2010) 141-152.
36. M. Kurečić, *Electrospinning Nanofibre Production Method*, *Tekstilec*, 56 (2012) 4-12.
37. <http://www.mesa.edu.au/atoz/cuttlefish.asp> (dostupno: 07. lipnja 2017.)
38. J. D. Birchall, N. L. Thomas, *On the architecture and function of cuttlefish bone*, *Journal of Materials Science*, 18 (7) (1983) 2081-2086.
39. L. T. Bang, B. D. Long, R. Othman, *Carbonate Hydroxyapatite and Silicon-Substituted Carbonate Hydroxyapatite: Synthesis, Mechanical Properties, and Solubility Evaluations*, *The Scientific World Journal*, 3 (2014)
40. A. Fidalgo, L. M. Ilharco, *The defect structure of sol–gel-derived silica/polytetrahydrofuran hybrid films by FTIR*, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 283 (2001) 144-154.
41. I. R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, *Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 44 (1999) 422-428.
42. A. E. Porter, S.M. Best, W. Bonfield, *Ultrastructural comparison of hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite for biomedical applications*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68 (1) (2004) 133-141.
43. A. El Yacoubi, A. Massit, M. Fathi, B. Chafik El Idrissi, K. Yamni, *Characterization of silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a wet precipitation method*, *Journal of Applied Chemistry*, 7 (11) (2014) 24-29.
44. E. S. Thian, J. Huang, M. E. Vickers, S. M. Best, Z. H. Barber, W. Bonfield, *Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications*, *Journal of Materials science*, 41 (3) (2006) 709-717.
45. K. P. Sanosh, M. C. Chu, A. Balakrishnan, T. N. Kim, S. J. Cho, *Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol gel technique*, *Bulletin of Material Science*, 32 (5) (2009) 465-470.

46. A. J. Ruys, *Silicon-doped hydroxyapatite*, Journal of the Australian Ceramic Society, 29 (1993) 71-80.
47. S. R. Kim, D. H. Riu, Y. J. Lee, Y. H. Kim, *Synthesis and characterization of silicon substituted hydroxyapatite*, Key Engineering Materials, 218-220 (2002) 85-88.
48. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhaes, R. N Correia, M. Vallet-Regí, *Synthesis and characterization of silicon substituted hydroxyapatite*, Key Engineering Materials, 192–195 (2001) 247-250.
49. Th. Leventouri, C. E. Bunaciu, V. Perdikatsis. *Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite*, Biomaterials, 24 (2003) 4205-4211.
50. D. Arcos, J. R. Carvajal, M. Vallet-Regí, *The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure*, A neutron diffraction study. Solid State Sciences, 6 (2004) 987-994.
51. S. Zou, J. Huang, S. Best, W. Bonfield, *Rietveld studies on silicon substituted hydroxyapatite*, Key Engineering Materials, 309-311 (2006) 113-116.

