

Strukturalna karakterizacija stroncijem dopiranih kalcijevih fosfata Rietveldovom metodom utočnjavanja

Gudelj, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:827989>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

DIPLOMSKI RAD

ANA GUDELJ

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

ANA GUDELJ

**STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA STRONCIJEM
DOPIRANIH KALCIJEVIH FOSFATA RIETVELDOVOM
METODOM UTOČNJAVANJA**

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

prof. dr. sc. Marica Ivanković

izv. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

Zagreb, rujan 2020.

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

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću, na stručnom vodstvu i ukazanoj prilici za izradu diplomskog rada.

Veliko hvala asistentici Antoniji Ressler, na vodstvu, ukazanom strpljenju, prenesenom znanju, motivaciji, te neizmjernej pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim prijateljima što su ukrasili studentske dane i stvorili brojne uspomene, te bez kojih bi sve bilo znatno teže.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji na strpljenju, motivaciji, potpori i podršci koja mi je ukazana tijekom studiranja.

SAŽETAK:

Znanstvena istraživanja u sklopu inženjerstva koštanog tkiva usmjerena su ka istraživanju materijala za koštane usadke koji oponašaju prirodno koštano tkivo. Kako bi materijal bio odgovarajući mora zadovoljavati tražena svojstva, od mehaničkih do bioloških, kemijskih i fizikalnih. Kao visokopotencijalni materijal pokazao se hidroksiapatit, koji zadovoljava uvjete poput biokompatibilnosti, bioaktivnosti, osteoinduktivnosti, biorazgradnje i sl., te je strukturno i kemijski sličan biološkom apatitu koji se nalazi u prirodnom koštanom tkivu.

Cilj ovog istraživanja je strukturna karakterizacija sintetiziranog hidroksiapatita iz biogenog izvora supstituiranog stroncijem (0, 1, 5 and 10 mol%), koji ima važnu ulogu u razvoju koštanog tkiva i koristi se za tretiranje bolesti koštanog sustava. Sinteza iz biogenog izvora omogućuje da produkt bude nestehiometrijski hidroksiapatit, koji pokazuje više sličnosti biološkom apatitu. Osim toga, sadrži brojne ione važne za razvoj koštanog tkiva. Dobiveni uzorci prije i nakon toplinske obrade analizirani su rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) i Rietveldovom metodom utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. Pripremljeni kalcijevi fosfati (CaP) sastoje se od hidroksiapatita (HAp), oktakalcijevog fosfata pentahidrata (OCP) i amornog kalcijevog fosfata (ACP), a toplinski obrađeni uzorci od β -trikalcijevog fosfata (β -TCP) i ACP-a. Povećanjem udjela stroncija dolazi do povećanja parametara jedinične ćelije dobivenih CaP zbog supstitucije ionom većeg ionskog radijusa. Stroncij u HAp-u zauzima Ca1 položaj, u OCP-u Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8, dok u β -TCP-u Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4 položaje.

Ključne riječi: biogeni izvor, dopiranje, hidroksiapatit, Rietveldova metoda utočnjavanja, stroncij

SUMMARY:

Structural characterization of strontium substituted calcium phosphates by Rietveld refinement method

The main goal of scientific researches in the field of bone tissue engineering is to synthesize a material that mimics natural bony tissue, in order to use it as a bone implant. The material has to be chemically and structurally similar to bony tissue, and possess required properties, such as biocompatibility, bioactivity, osteoinductivity, biodegradability and mechanical support. Hydroxyapatite (HAp) has shown all of the above mentioned properties and is very similar to biological apatite, that is present in natural bony tissue. Therefore, the aim of this research is a structural characterization of synthesized HAp obtained from biogenic source, along with strontium substitution (0, 1, 5 and 10 mol%), that is crucial for bone growth and is used for treating osteoporosis and similar diseases. Result of using biogenic source is multi-substituted nonstoichiometric HAp, which is more similar to biological apatite than synthetic HAp. Various trace elements present in HAp obtained from biogenic source are crucial for bone growth. Prepared samples were analysed by X-ray diffraction analysis (XRD), in order to determine their phase composition. Obtained results were additionally processed by Rietveld refinement method using software, DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. To determine thermal stability of samples, they were heat-treated at 1200 °C and analysed by X-ray diffraction and using Rietveld refinement method.

Prepared calcium phosphates were composed of hydroxyapatite (HAp), octacalcium phosphate pentahydrate (OCP) and amorphous calcium phosphate (ACP), while heat-treated samples were composed of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and amorphous calcium phosphate (ACP). Along with increase of Sr-substitution level, lattice parameters of obtained CaPs increased, as a result of larger radius of substituted strontium ion. Strontium ion occupies in hydroxyapatite Ca1 site, in OCP sites Ca3, Ca4, Ca7 and Ca8, while in β -TCP it occupies sites Ca1, Ca2, Ca3 and Ca4.

Keywords: biogenic source, hydroxyapatite, Rietveld analysis, substitution, strontium

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO:	3
2.1	Inženjerstvo koštanog tkiva	3
2.2.	Prirodno koštano tkivo	5
2.3.	Biomaterijali.....	7
2.3.1.	Biokeramika	7
2.4.	Hidroksiapatit	9
2.5.	Oktakalcijev fosfat	11
2.6.	Trikalcijev fosfat	12
2.6.1.	α -trikalcijev fosfat	13
2.6.2.	β -trikalcijev fosfat.....	14
2.7.	Stroncijem dopirani kalcijevi fosfati	16
2.7.	Rietveldova metoda utočnjavanja	18
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1.	Materijali i metode	21
3.1.1.	Materijali	21
3.1.2.	Sinteza	21
3.2.	Metode karakterizacije	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1.	Rietveldova metode utočnjavanja pripremljenih kalcijevih fosfata	23
4.1.1.	Kvantitativni fazni sastav	23
4.1.2.	Parametri elementarne ćelije	25
4.1.3.	Faktor zauzetosti	26
4.2.	Rietveldova metoda utočnjavanja toplinski obrađenih kalcijevih fosfata.....	28
4.2.1.	Kvantitativni fazni sastav	28
4.2.2.	Parametri elementarne ćelije	30
4.2.3.	Faktor zauzetosti	30
4.3.	Duljine veza u pripremljenim kalcijevim fosfatima.....	31
5.	ZAKLJUČAK	34
6.	LITERATURA:.....	35

1. UVOD

Bolesti koštanog sustava, primjerice artritis, rahitis i osteoporoza, čine sve veći udio u zdravstvenim poremećajima. Oštećenja i bolesti koštanog sustava znatno smanjuju kvalitetu života pa se stvorila potreba za odgovarajućim usadcima¹. Konvencionalni usadci mogu uzrokovati zdravstvene komplikacije, kao što su imunološke reakcije, infekcije te potrebe za dodatnim kirurškim zahvatom². Upravo iz tih razloga, posljednjih nekoliko desetljeća inženjerstvo tkiva intenzivno se razvija u cilju pronalaska materijala, koji će oponašati prirodno koštano tkivo.

Potrebno je poznavanje kemijskog i faznog sastava, bioloških procesa i mehaničkih svojstava prirodnog koštanog tkiva kako bi se razvili koštani usadci koji su funkcionalno slični prirodnom koštanom tkivu. Koštani usadci građeni su od sintetskog materijala na temelju keramike, metala i/ili polimera koji ugradnjom u organizam mogu djelomično ili potpuno zamijeniti koštano tkivo ili određenu funkciju koštanog tkiva³. Veliku pažnju privlače kompozitni materijali na temelju anorganske faze, biokeramike, koja je mehanički otporna i bioaktivna, te organske faze, polimera koji osigurava razgradnju *in vivo*⁴. Kalcijevi fosfati (CaP) istaknuli su se među biokeramičkim materijalima, a najpoznatiji predstavnik je hidroksiapatit (HAp). Hidroksiapatit je glavni gradivni materijal kostiju i zubi, a čini ~70 wt% sastava koštanog tkiva⁵. Istraživanja pokazuju da HAp poboljšavaju bioaktivnost i biokompatibilnost kompozitnih materijala. Kemijska sličnost sintetskog HAp-a biološkom apatitu jedan je od razloga intenzivnog istraživanja ovog materijala⁴. Koštano tkivo sadrži brojne elemente u tragovima (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) koji pozitivno utječu na obnavljanje koštanog tkiva. Kako bi se postigao odgovarajući sastav koštanog usatka, što sličniji prirodnom koštanom tkivu, sintetski hidroksiapatit je dopiran metalnim ionima⁶. Stroncij (Sr^{2+}) ima važnu ulogu u razvoju kosti i primjenjuje se za tretiranje bolesti koštanog tkiva⁷. Stroncij pokazuje dvojni mehanizam djelovanja koji omogućuje povećanje koštane mase i njene čvrstoće. Potiče nastajanje novog koštanog tkiva povećanjem broja osteoblastnih stanica, koje su zadužene za stvaranje nove kosti, a resorpciju sprječava inhibiranjem aktivnosti osteoklastnih stanica⁸.

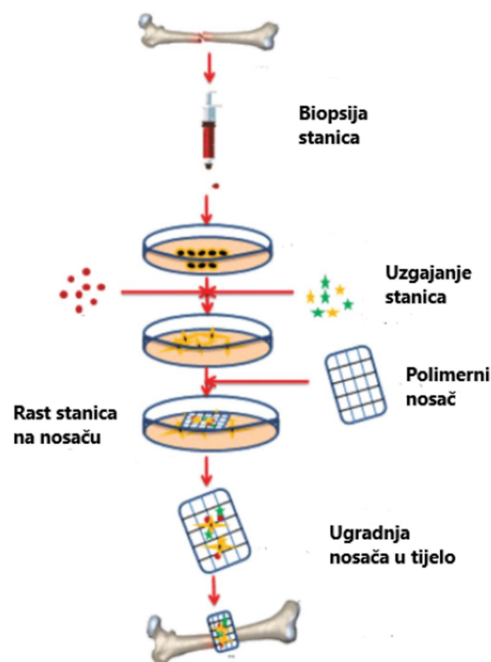
Sinteza hidroksiapatita detaljno je istražena, te postoji više metoda dobivanja kao što su sol-gel metoda, hidrotermalna, metoda precipitacije ili kemijskog taloženja i dr. U posljednje vrijeme istražuje se mogućnost sinteze HAp-a iz biogenih izvora, jer sintetske sirovine ne posjeduju elemente u tragovima, što je slučaj kod sirovina iz biogenog izvora. Kao biogeni izvor koriste se koralji, ljuske jajeta, ljuštore školjki i sipina kost, koji u svom sastavu imaju brojne elemente u tragovima, čime se dodatno približavaju sastavu prirodnog koštanog tkiva⁹. Ovakav pristup ekološki je prihvatljiviji s obzirom na obnavljanje i smanjenje bio-otpada¹⁰.

2. TEORIJSKI DIO:

2.1 Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje koje paralelnom upotrebom inženjerskog znanja i medicine nastoji razviti koštane usadke koji će obnoviti ili poboljšati funkciju koštanog tkiva¹¹. Novija istraživanja u području inženjerstva koštanog tkiva pokazuju da primjenom prirodnih ili sintetskih koštanih usadaka, pri koštanim oštećenjima koja su posljedica prijeloma i/ili bolesti koštanog sustava, može ubrzati njegovo obnavljanje¹². Prema tome, uporaba usadaka za obnovu koštanog tkiva uvelike može olakšati liječenje koštanih oštećenja i tako poboljšati kvalitetu života¹¹.

Priprava usadaka započinje izolacijom stanica biopsijom, koje se uzgajaju *in vitro* na nosaču, koji se zatim ugrađuje u tijelo pacijenta (*in vivo*). Slika 1. prikazuje princip funkcioniranja inženjerstva koštanog tkiva.



Slika 1. Princip funkcioniranja inženjerstva koštanog tkiva¹³.

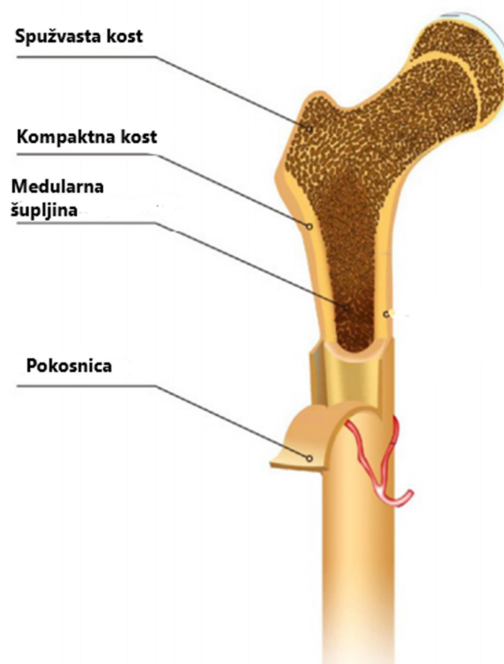
Inženjerstvo koštanog tkiva temelji se na istraživanju i razvoju biomaterijala koji potiču obnovu kosti, odnosno stvaranje novih koštanih stanica (osteogeneza). Biokompatibilnost i poroznost su prvi uvjeti koje biomaterijali moraju zadovoljiti kako bi mogli služiti kao nosači za stanice i rast novog koštanog tkiva. Osim poroznosti i biokompatibilnosti, biomaterijali moraju posjedovati odgovarajuća mehanička svojstva, biti biorazgradivi i ekonomski isplativi¹⁴. Nosač je trodimenzionalna matrica, odnosno mehanička i strukturna potpora koja

omogućuje migraciju, vezanje, proliferaciju i integraciju stanica. Visokoporozni materijali omogućuju protok kisika, hranjivih tvari, faktora rasta i metaboličkog otpada, te vaskularizaciju i integraciju tkiva¹⁵. Kao materijali za izradu okosnica često se koriste biorazgradivi polimeri (prirodnog i sintetskog podrijetla) i bioaktivna keramika. Polisaharidi (škrob, alge, kitozan i hitin, hijaluronska kiselina) i proteini (želatina, kolagen i fibrin) predstavnici su prirodnih polimera, dok su poli(mliječna kiselina), poli(glikolna kiselina), poli(ϵ -kapolakton) najčešće primjenjivani sintetski polimeri. Sve veću pozornost privlače organsko/anorganski kompozitni materijali koji oponašaju prirodno koštano tkivo, a njihova osnovna prednost nad metalnim usadcima je mogućnost razgradnje *in vivo*. Kao anorganska faza u takvim kompozitnim materijalima uglavnom se primjenjuju kalcijevi fosfati (CaP). Među njima se ističe hidroskiapatit (HAp), koji strukturom i svojstvima nalikuje biološkom apatitu¹⁶.

Pripravljene usadke se ugrađuje na oštećeno područje te se vremenom razgrađuje i zamjenjuje novim, tek nastalim, koštanim tkivom. Brzina razgradnje nosača i brzina nastajanja novog koštanog tkiva mora biti jednaka, kako bi se izbjeglo naprezanje ili pucanje tkiva/materijala. Nakon ugradnje, nije potreban kirurški zahvat uklanjanja nosača jer se on resorbira, što je jedna od glavnih prednosti ovakvih usadaka¹⁷.

2.2. Prirodno koštano tkivo

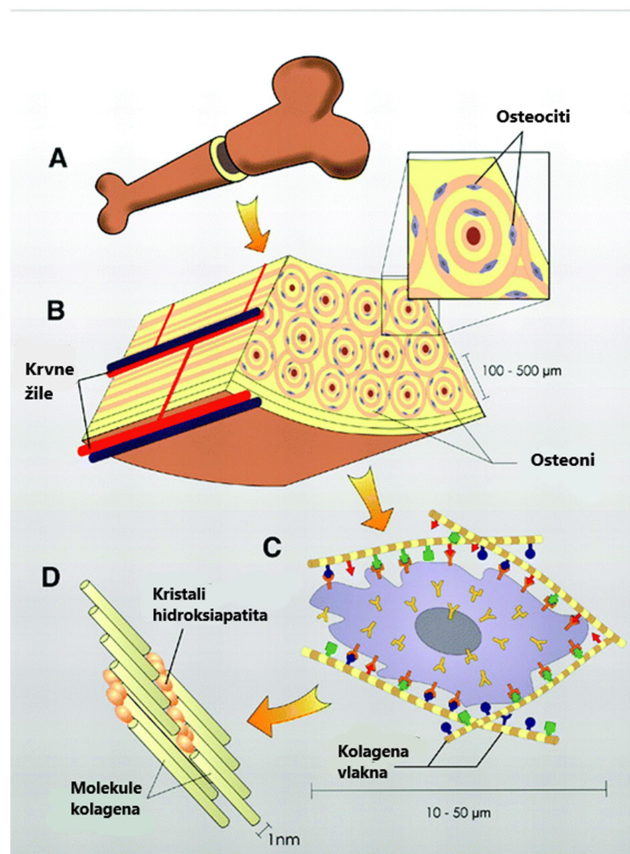
Kostur odraslog čovjeka se sastoji od 200 do 250 kostiju koje imaju važnu ulogu u ljudskoj fiziologiji. Osim što su strukturna potpora tijelu, štite unutarnje organe, osnova su kretanja, skladište minerala, te sadrže hematopoetsko tkivo koje proizvodi krvne stanice. Kost je jedna od najkompleksnijih biomineraliziranih sustava i sastoji se od ~67% anorganske tvari, ~28% organske tvari, dok ostatak čini voda. Većinu anorganske tvari čini hidroksiapatit, dok organsku tvar čini kolagen i nizak udio proteina, polisaharida i lipida¹⁸. Slika 2 prikazuje strukturu duge kosti, gdje vanjski dio kosti čini gust sloj glatke i čvrste koštane tvari, koja se naziva kompaktna kost (engl. *cortical*). Porozan unutrašnji dio koštanog tkiva posjeduje niža mehanička svojstva u odnosu na kompaktni dio kosti te se naziva spužvasta kost (engl. *trabecular*).



Slika 2. Prikaz presjeka strukture duge kosti¹⁸.

Na slici 3 prikazana je struktura kosti od makrometarske (gornji dio slike) do nanometarske razine (donji dio slike). Na mikrometarskoj razini, sredina slike, prikazane su koštane stanice, osteoni i krvne žile. Glavnu ulogu u rastu i razvoju kostiju imaju koštane stanice osteociti, osteoblasti i osteoklasti. Najbrojnija vrsta koštanih stanica su osteociti, koji reguliraju djelovanje osteoblasta i osteoklasta, kako ne bi došlo do narušavanja homeostaze⁴. U

suprotnom, može doći do razvoja bolesti kao što je gubitak koštane mase i osteoporoza¹⁹. Osteoblasti potiču rast novog koštanog tkiva, dok su osteoklasti resorbirajuće koštane stanice koje razgrađuju koštano tkivo kiselim djelovanjem enzima²⁰. Osteoni su cilindrične strukture, promjera od 200-250 μm , koje snažno priljubljene čine čvrstu i gustu kost. Šuplje središnje kanale osteona ispunjavaju krvne žile i živci. Gradivne jedinice osteona su lamele, pločice sastavljene od kolagenskih vlakana, među kojima su smješteni kristali HAp-a⁴. Kristali su nanometarskih dimenzija, prosječne duljine 50 nm, širine 25 nm i debljine 2-5 nm, raspoređeni u organskoj matrici. Ovakva složena građa kosti utječe na fizikalna, kemijska i biološka svojstva²¹.



Slika 3. Morfologija kosti pri raznim uvećanjima²¹.

2.3. Biomaterijali

Biomaterijali potiču staničnu funkciju i usmjeravaju interakcije između stanica unutar nosača. Biomaterijali imaju sposobnost da svojim prisustvom u tijelu ne oštećuju okolno tkivo. Budući da se biomaterijali ugrađuju u živi organizam, moraju biti biokompatibilni te ne smiju izazivati alergijske, toksične ili kancerogene reakcije²².

U inženjerstvu tkiva razlikuju se materijali za tvrdo koštano tkivo, (engl. *hard – tissue replacement*) kao što su ortopedski i dentalni materijali, te materijali za meko koštano tkivo (engl. *soft – tissue replacement*) u koje se ubrajaju materijali za plastičnu kirurgiju i kardiovaskularni usadci²³. Biomaterijali, u usporedbi s većinom tehničkih materijala, više su cijene. Takvi materijali osiguravaju dugotrajnu stabilnost pri fiziološkim uvjetima, odnosno u okruženju korozivne „slane“ otopine i pod promjenjivim opterećenjem. Metali su najčešće korišteni materijali za izradu proteza kuka, dentalnih umetaka te pločica i vijaka za fiksaciju kosti. Nedostatci koji se javljaju pri njihovoj upotrebi su potreba za dodatnom operacijom, refrakture nakon uklanjanja usatka, trošenje, odbacivanje usatka ili loše vezanje te visoka električna i toplinska vodljivost. Druga vrsta biomaterijala su polimeri, a razlikuju se prirodni i sintetski. Osim metala i polimera koriste se biokeramički materijali, samostalno ili u kompozitnim materijalima²³.

2.3.1. Biokeramika

Od 20. stoljeća ubrzano se razvija biokeramika na temelju glinice (Al_2O_3) i cirkonija (Zr_2O_3) i kalcijevog fosfata (CaP), koji danas ima široku uporabu²⁴.

Otpornost na habanje, velika tvrdoća i biokompatibilnost biokeramike veliki je motiv daljnjim istraživanjima. Niska gustoća i čvrstoća te slaba otpornost na naprezanje svojstva su zbog kojih se biokeramički materijali ne koriste za izradu nosača izloženih velikim opterećenjima²⁵. Biokeramika je pronašla primjenu u nekoliko grana medicine, primjerice ortopedskoj i oralnoj kirurgiji. Ovisno o oštećenju, moguća je proizvodnja poroznog i neporoznog (granulati, prašci, prevlake) oblika²⁵.

Nosači su najčešće građeni od polimera i biokeramike s jasnom granicom faza kako bi se dobio kompozit kombiniranih svojstava. Među biokeramikom ističu se CaP, a najvažniji predstavnici su HAP, amorfni kalcijev fosfat (ACP), oktakalcijev fosfat (OCP), i α -trikalcijev fosfat (α -TCP) i β -trikalcijev fosfat (β -TCP). Svi navedeni CaP imaju omjer kalcija i fosfata

veći od 1 i manji od 2 (Tablica 1). Omjer Ca/P izvan tih okvira nije pogodan za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva²⁶.

Tablica 1. Omjer kalcijevih i fosfnih iona u kalcijevim fosfatima²⁷.

IME I KRATICA	KEMIJSKA FORMULA	OMJER Ca/P
Amorfni kalcij fosfat (ACP)	-	1,5
Hidroksiapatit (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Hidroksiapatit s manjim udjelom Ca (CDHAp)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,5-1,67
Dikalcij fosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Oktakalcij fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
α – Trikalcij fosfat (α - TCP)	$\alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
β – Trikalcij fosfat (β - TCP)	$\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5

Topljivost CaP pri određenim pH vrijednostima vrlo je važan parametar koji utječe na ponašanje materijala *in vivo*. HAp i β -TCP se zbog niske topljivosti koriste za proizvodnju usadaka. Poznavanjem topljivosti moguće je prilagoditi brzinu resorpcije biokeramike kako bi ona odgovarala brzini nastanka novog koštanog tkiva, a to se postiže pripremom višefazne CaP biokeramike. Upotreba više faza rezultira boljom resorpcijom nego što bi imale pojedine komponente²⁸. CaP su netopljivi u bazičnim otopinama, slabo topljivi u vodi i dobro topljivi u kiselim otopinama. Kalcij fosfatna biokeramika pogodna je za masovnu proizvodnju, dostupna je i stabilna.

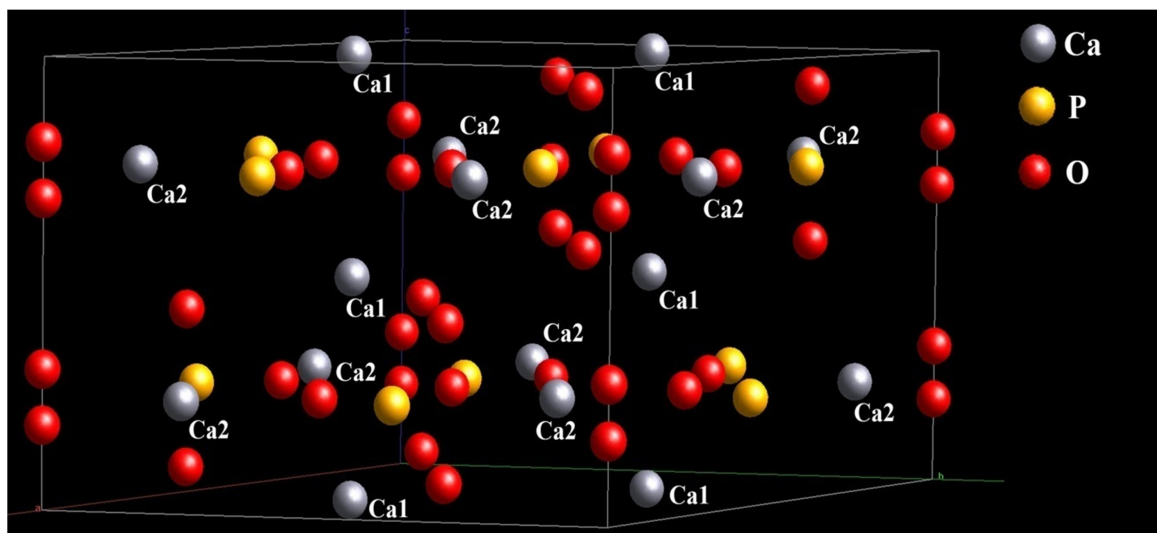
2.4. Hidroksiapatit

Glavni gradivni mineral kostiju i zubi, hidroksiapatit, ima molarni omjer kalcija i fosfora $\text{Ca/P} = 1,67$, a njegova kemijska formula je $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Molarni omjer je izrazito važan, jer u slučaju njegovog odstupanja, pri toplinskoj obradi materijala može doći do pojave drugih CaP i oksida²⁹.

Moguća su dva slučaja:

1. molarni omjer Ca/P manji je od 1,67; dolazi do nastajanja α - ili β -TCP.
2. molarni omjer Ca/P veći je od 1,67; dolazi do nastajanja kalcijevog oksida (CaO) i hidroksiapatitne faze²⁹.

HAp je ionskog karaktera, a njegova kristalna rešetka heksagonske je simetrije. Parametri elementarne ćelije iznose $a = b = 9,41369 \text{ \AA}$ i $c = 6,90197 \text{ \AA}$. Atomi kalcija i kisika zauzimaju različite položaje. Četiri od deset kalcijevih atoma zauzimaju položaj Ca1, dok preostalih šest zauzima položaj Ca2. Po jedan kisikov atom nalazi se na pozicijama O1 i O2, a dva kisikova atoma nalaze se na poziciji O3 u prostornoj grupi $P6_3/m^{30}$. Slika 4 prikazuje kristalnu rešetku HAp-a s označenim pozicijama kalcijeva atoma.



Slika 4. Struktura kristalne rešetke HAp-a dobivena računalmim programom DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Dopiranje biološki važnim elementima pridonosi biološkim svojstvima hidroksiapatita, utječe na parametre elementarne ćelije te na fizikalna svojstva poput topljivosti i stabilnosti. Zamjene iona mogu biti kationske i anionske prirode, a dopiranje je moguće na mjestima kalcijeva iona, fosfatnog iona i hidroksidnog iona. Na pozicije kalcijevih iona najčešća je supstitucija kationa natrija, magnezija, kalija, cinka, stroncija, mangana i dr. Na položajima PO_4^{3-} i OH^- najčešća je supstitucija karbonatnim (CO_3^{2-}) ionima, koja može biti:

1. A-tip; pri kojem dolazi do supstitucije OH^- s CO_3^{2-}
2. B-tip; pri kojem dolazi do supstitucije PO_4^{3-} s CO_3^{2-}

B-tip supstitucije povoljniji je kako bi se što bolje imitirala CO_3^{2-} supstitucija u prirodnom koštanom tkivu. Dopiranjem kristalna rešetka zadržava heksagonsku strukturu i ostaje u prostornoj grupi $P6_3/m$ ³¹.

Hidroksiapatit se primjenjuje u inženjerstvu koštanog tkiva te kao porozna keramika u kolonskoj kromatografiji za odjeljivanje nepolarnih molekula, kao senzor za plinove i katalizator³². Većina sintetskih HAp-a ima kemijsku formulu ranije navedenu s određenim rasporedom atoma, dok hidroksiapatit sintetiziran iz biogenih izvora (koralji, ljuštore školjaka, ljuske jajeta, sipina kost) uključuje i druge ione kao što je CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} i Cl^- . Zbog prisustva dopiranih iona, HAp iz biogenog izvora, sadrži manjak kalcijevih iona, odnosno dobiva se hidroksiapatit s manjkom kalcijevih iona (CDHA, engl. *Calcium deficient hydroxyapatite*), karakterističan za prirodno koštano tkivo. Njegova kemijska formula može se prikazati kao $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, ($0 < x < 1$), a točna formula nije poznata³³. Kemijski sastav CDHA više nalikuje biološkom apatitu nego stehiometrijski HAp. Osim toga, CDHA omogućuje bržu resorpciju živih stanica i bržu regeneraciju koštanog tkiva.

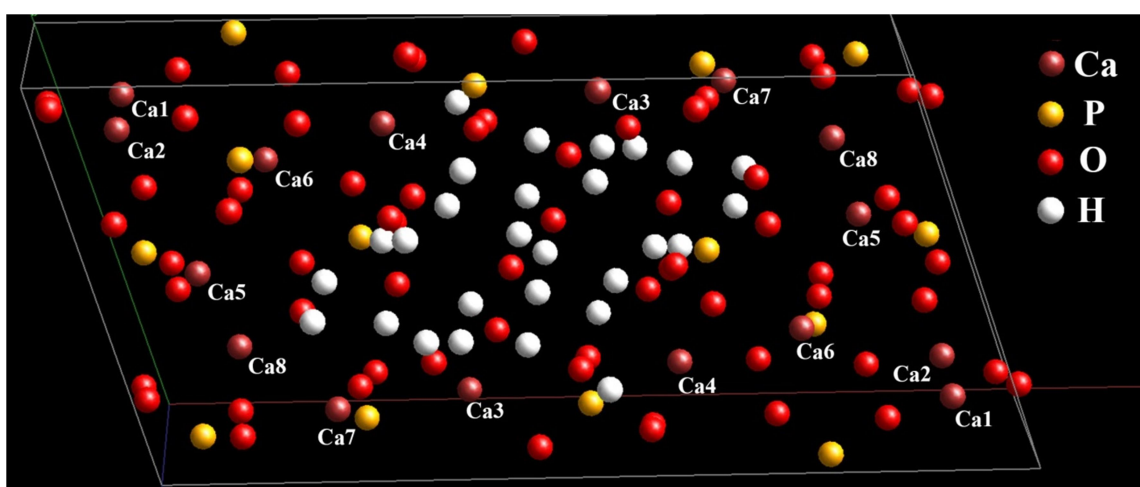
Ioni koji se nalaze u biogenom HAp-u pridonose boljim svojstvima i sličnijem sastavu prirodnom tkivu³⁴. Kao biogeni izvor koriste se ljuštore školjki, kosti životinja, koralji i ljuske jajeta. Kristalizacija CDHA uključuje nastajanje metastabilnih intermedijara koji prelaze u termodinamički stabilniji oblik, hidroksiapatit. Intermedijarni produkti su ACP i OCP, $(\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ ³⁵.

Danas je poznat cijeli niz postupaka dobivanja hidroksiapatita, a mogu se podijeliti na suhe i mokre postupke pripreve (hidroliza, precipitacija, hidrotermalna metoda i dr.), te priprava tankih filmova na odgovarajućim supstratima (premazivanjem).

Suhe metode se mogu izvesti na dva načina: reakcijom u čvrstom stanju (engl. *solid-state synthesis*) i mehano-kemijskim reakcijama. Nedostaci ovih metoda su veliki kristali i niska čistoća, a prednost je visoka kristalnost HAp-a. Mokre metode koriste različite vodene otopine iona fosfata i kalcija, a kristali HAp-a najčešće se dobivaju kemijskim taloženjem. Mokrim kemijskim metodama može se precizno kontrolirati morfologija i veličina čestica. Metode premazivanja najviše su u uporabi kod izrade usadaka u dentalnoj medicini i ortopediji. Koriste se razne metode kao što je elektroforezna depozicija, uranjanje, plazma raspršivanje, termalno raspršivanje i dr.³¹

2.5. Oktakalcijev fosfat

Kristalna rešetka OCP-a je triklinska (prostorna skupina P1), a transformacijom u HAp dolazi do rotacije fosfatnih skupina i gubitka vode. Elementarnu ćeliju OCP-a gradi osam kalcijevih iona i dvije fosfatne skupine. Stehiometrijski omjer Ca/P iznosi 1,33, dok maseni postotak kalcija iznosi 32,63%, fosfora 18,91%, kisika 47,22% i vodika 1,23%. Rezultati istraživanja kristala OCP-a upućuju na nestehiometrijski sastav kemijske formule $\text{Ca}_{16}\text{H}_{4+x}(\text{PO}_4)_{12}(\text{OH})_x(10-x)(\text{H}_2\text{O})^{36}$. OCP ima strukturu vrlo sličnu hidroksiapatitu, gdje šest kalcijevih iona (Ca1, Ca2, Ca5, Ca6, Ca7 i Ca8) i dvije fosfatne skupine (PO_4^{3-}) zauzimaju gotovo jednake položaje kao i u HAp-u. Druga dva kalcijeva iona (Ca3 i Ca4) te jedna hidrogenfosfatna skupina (HPO_4^{2-}) nalaze se u hidratiziranom sloju, koji se nalazi između dva apatitna sloja³⁶. Slika 5 Prikazuje strukturnu rešetku OCP-a s označenim pozicijama Ca iona.



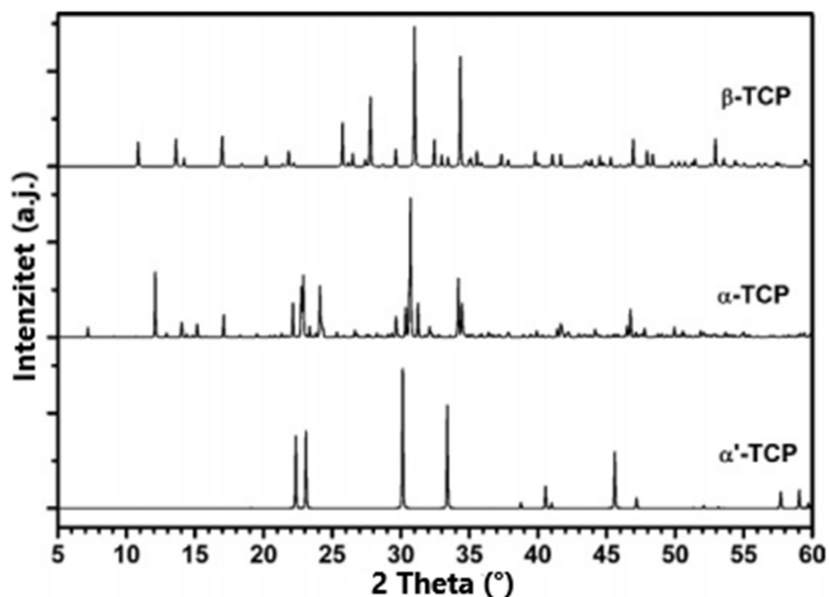
Slika 5.Struktura kristalne rešetke oktakalcijeva fosfata s označenim položajima kalcijeva atoma, dobivena pomoću računalnog softvera DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Parametri jedinične ćelije OCP-a su: $a = 19,692 \text{ \AA}$, $b = 9,523 \text{ \AA}$, $c = 6,835 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,15^\circ$, $\beta = 92,54^\circ$, $\gamma = 108,65^\circ$. Često se javlja kao prijelazni spoj pri kemijskom taloženju hidroksiapatita, te je poznavanje transformacije OCP-a u HAp važno za razumijevanje mineralizacije u prirodnom koštanom tkivu. OCP je poželjna faza u materijalima za regeneraciju koštanog tkiva, jer transformacija OCP-a u HAp potiče diferencijaciju stanica i proliferaciju osteoblastnih stanica *in vivo* i *in vitro*³⁷.

2.6. Trikalcijev fosfat

Trikalcijev fosfat (TCP), kemijske formule $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$, često se koristi kao materijal za izradu usadaka ili kao dio kompozitnog materijala za regeneraciju koštanog tkiva. Biokompatibilan je, ima povoljna osteoinduktivna i resorpcijska svojstva. Kristalizira u trigonskom sustavu, a jedinična ćelija je heksagonske simetrije s molarnim omjerom $\text{Ca/P} = 1,5$. Postoje tri polimorfne faze TCP-a: niskotemperaturni β -TCP i visokotemperaturni oblici, α' -TCP i α -TCP. α' -TCP privlači malo pozornosti jer je stabilan na temperaturama višim od 1430°C , a hlađenjem preko temperature prijelaza transformira se u α -TCP³⁸. Suprotno tome, β -TCP je stabilan je pri sobnoj temperaturi, dok pri temperaturama većim od 1125°C prelazi u α -TCP. Visokotemperaturni oblici topljiviji su nego li β -TCP³⁵. α - i β -TCP trenutno imaju nekoliko kliničkih primjena kao što su stomatologija, maksilofacijalna kirurgija i ortopedija. β -TCP je sastavni dio jedno- i dvofaznih biokeramičkih materijala i kompozita, dok je α -TCP glavni sastojak hidrauličkih koštanih cemenata. Usprkos jednakom kemijskom sastavu, α - i β -TCP se značajno razlikuju po svojoj strukturi, gustoći i topljivosti, pa za posljedicu imaju različita biološka svojstva i različitu kliničku primjenu³⁹.

Rengenskom difrakcijskom analizom (XRD) moguće je identificirati polimorfe TCP-a. Na slici 6 prikazan je difraktogram polimorfni modifikacija TCP-a gdje je vidljivo kako sva tri polimorfa imaju karakteristične odzive, te je potvrđeno kako je rendgenskom difrakcijskom analizom moguća njihova identifikacija³⁹.

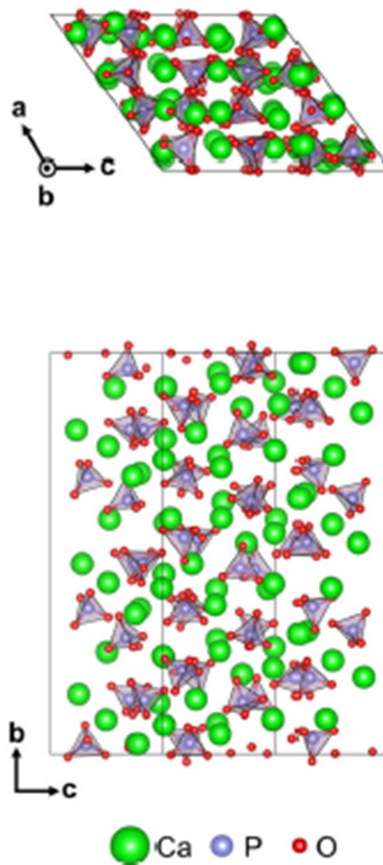


Slika 6. Difraktogram polimorfa β -TCP-a, α -TCP-a i α' -TCP-a³⁹

Osim rendgenskom difrakcijskom analizom, za karakterizaciju polimorfa TCP-a često se upotrebljava infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR, engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR, engl. *Nuclear magnetic resonance*).

2.6.1. α -trikalcijev fosfat

α -TCP je netoksičan, osteoinduktivan i bioaktivan materijal. Razlika α -TCP-a od ostalih CaP, je veći stupanj resorpcije. Osim za implantate, može se koristiti kao biorazgradivi nosač za kontrolirano otpuštanje lijekova, makromolekula ili stanica. α -TCP spada u prostornu grupu $P2_1/a$ s parametrima elementarne ćelije $a = 12,89 \text{ \AA}$, $b = 27,28 \text{ \AA}$ i $c = 15,22 \text{ \AA}$. Na slici 7 prikazana je kristalna struktura α -TCP-a.

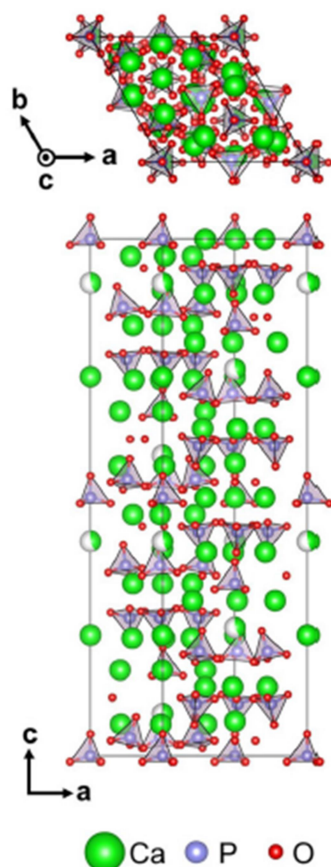


Slika 7. Kristalna rešetka α -TCP-a⁴⁰.

Kristalna struktura α -TCP-a manje je gustoće od β -TCP-a, a veće od α' -TCP-a. Teorijska gustoća α -, α' - i β -TCP-a iznosi: 2,866, 2,702 i 3,066 (g/cm^3). Razlike u gustoći podudaraju se s termodinamičkim svojstvima polimorfa, te njihovoj temperaturnoj stabilnosti, pa je tako β -TCP, najveće gustoće, stabilan pri sobnoj temperaturi, dok je α -TCP stabilan tek iznad 1125 °C³⁹.

2.6.2. β -trikalcijev fosfat

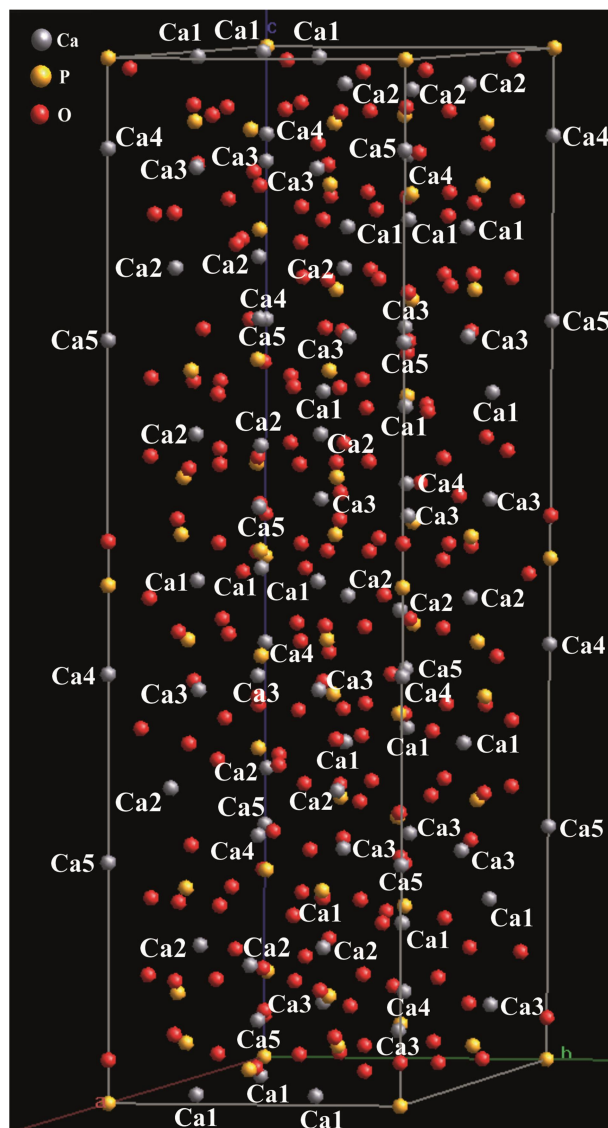
β -TCP kristalizira u trigonskom kristalnom sustavu, prostorne grupe $R3/c$, a parametri elementarne ćelije su $a = b = 10,44 \text{ \AA}$ i $c = 37,40 \text{ \AA}$, a toplinski je stabilan do 1125 °C. Slika 8 Prikaz je kristalne strukture β -TCP-a.



Slika 8. Kristalna struktura β -TCP⁴⁰.

Često se koristi za izradu kompozitnih materijala u svrhu obnove tkiva. Prema Weinandu i suradnicima oštećeno tkivo obnavlja se unutar nekoliko tjedana jer se β -TCP izravno veže za koštano tkivo⁴⁸. β -TCP je pogodan za supstituciju brojnim ionima kao što su: Mg^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , Ga^{3+} , Mn^{2+} , čime se mijenjaju fizikalna i biološka svojstva. β -TCP se dobiva toplinskom obradom apatitnog trikalcijeva fosfata ili amornog trikalcijeva fosfata koji se mogu pripremiti u vodenoj otopini neutralizacijom ili hidrolizom, u alkoholnom mediju dvostrukom dekompozicijom i sol gel postupkom⁴⁹.

Slika 9 prikaz je kristalne rešetke β -TCP-a dobivena pomoću računalnog programa DIFFRA.SUITE TOPAS V.5.0. Prikazan je raspored atoma kalcija, kisika i fosfora u kristalnoj rešetki β -TCP-a. Kalcijevi atomi zauzimaju pet različitih pozicija u rešetki.



Slika 9. Struktura kristalne rešetke β -TCP-a dobivena računalnim programom DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

2.7. Stroncijem dopirani kalcijevi fosfati

Stroncij je kemijski element prisutan u ljudskom tijelu, odnosno mineralnoj fazi kostiju. Do četiri puta veće koncentracije stroncija prisutne su u novonastaloj nego u starijoj kompaktnoj kosti. U posljednje vrijeme stroncij se sve više istražuje zbog brojnih povoljnih svojstava kao što je povećanje koštane mase i njene čvrstoće. Stroncij potiče nastanak novog koštanog tkiva te inhibira resorpciju kostiju. Nastajanje novog koštanog tkiva potiče povećanjem broja osteoblastnih stanica, koje imaju zadaću stvaranja nove kosti, dok resorpciju sprječava inhibiranjem aktivnosti osteoklasnih stanica⁴¹. Osim toga, stroncij djeluje na usklađenost rada

signala osteoblasta i osteoklasta, te potiče proliferaciju i sprječavaju apoptozu koštanih stanica⁴². Stroncij se, u obliku stroncijeva ranelata, koristi kao komercijalni lijek za sprječavanje osteoporoze⁴³.

Kalcijev (Ca^{2+} , $r = 194 \text{ pm}$) i stroncijev ion (Sr^{2+} , $r = 219 \text{ pm}$) sličnog su atomskog radijusa. Usprkos maloj razlici, supstitucijom Ca^{2+} sa Sr^{2+} ionom u kristalnoj rešetci može doći do promjena parametara elementarne ćelije, veličine kristala te topljivosti⁴⁴. U kristalnoj rešetci HAp-a, kalcij zauzima dva položaja, Ca1 i Ca2⁴⁵. Prema literaturi Sr^{2+} se preferira supstituirati na položaj Ca1⁴⁶. Razlog tomu je niža energija supstitucije na položaju Ca1 u usporedbi s položajem Ca2. U strukturi OCP-a, Ca^{2+} ioni zauzimaju osam pozicija, kao što je prikazano na slici 5. Prema istraživanjima Katsuyuki i suradnika dopirani Sr^{2+} ion zauzima položaje Ca3, Ca4, Ca8, zbog nižih energija supstitucije. Također, energije supstitucija ovih pozicija općenito su manje nego za hidroksiapatit, što znači da se u OCP može dopirati veći udio stroncija nego li u HAp⁵⁰.

Sr^{2+} ioni, u strukturi β -TCP-a, zauzimaju položaje Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4 zbog najpovoljnije energije i duljine veze. Veza na poziciji Ca5–O kraća je u odnosu na ostale, a s obzirom na to da je Sr^{2+} ion nešto veći od Ca^{2+} iona, na tom supstitucija nije povoljna⁴⁰.

2.7. Rietveldova metoda utočnjavanja

Rietveldova metoda utočnjavanja je tehnika koja, temeljem modela koji uključuje parametre kristalne strukture, podešava cijelu eksperimentalnu difrakcijsku sliku uzorka s izračunatim profilom. Model koji uključuje parametre kristalne strukture kao što su točna pripadajuća prostorna simetrijska grupa, što točnije dimenzije elementarne ćelije i približni početni položaji atoma u rešetci potrebno je unijeti prije samog provođenja Rietveldove metode. Ova metoda upotrebom cijele difrakcijske slike smanjuje sistematske efekte preferirane orijentacije i ugašenosti, eliminiranje problema preklapanja maksimuma što omogućava promatranje složenijih difrakcijskih slika i onih koje sadrže šire maksimume. Osim toga, ovom metodom utočnjavaju se kristalne strukture i parametri profila maksimuma za pojedine faze u smjesi te je bolje definiran intenzitet maksimuma zbog utočnjavanja pozadine preko cijele difrakcijske slike. Neki od nedostataka ove metode su: složena upotreba metode, potreba strukturnih modela za svaku pojedinu fazu u uzorku te nemogućnost utočnjavanja simetrije iz difraktograma⁵¹.

Rietveldova metoda se zasniva na utočnjavanju kristalne strukture varijacijom strukturnih parametara te parametara koji imaju direktan efekt na difrakcijsku sliku, a sve u cilju postizanja najboljeg slaganja između eksperimentalne i računске difrakcijske slike. Difrakcijske slike istraživanih uzoraka, snimljene standardnim rendgenskim difraktometrom, mogu se koristiti kao ulazni podaci u obradi. Ulazni podaci su digitalizirani i utočnjavaju se metodom najmanjih kvadrata u svrhu minimiziranja razlika između eksperimentalne i izračunate difrakcijske slike i to prema izrazu (1)⁵¹

$$D = \sum_i \omega_i |y_i(o) - y_i(c)|^2 \quad (1)$$

gdje je: $\omega_i = \frac{1}{y_i}$ - pridružena matematička težina,

$y_i(o)$ i $y_i(c)$ - opaženi i izračunati intenzitet u i -tom koraku na difrakcijskoj slici

Difrakcijski intenzitet $y_i(c)$ u i -tom koraku, dobiven je zbrajanjem doprinosa pozadine i svih K difrakcijskih maksimuma koji daju mjerljiv intenzitet, prema izrazu (2):

$$y_i(c) = y_{ib}(c) + S \sum_K p_K L_K |F_K|^2 G(\Delta\theta_{iK}) P_K \quad (2)$$

pri čemu je:

$y_{ib}(c)$ - intenzitet pozadinskog zračenja, odnosno šum

S - množitelj normiranja

p_K - faktor višekratnosti za mrežne ravnine (hkl),

L_K - Lorentzov i polarizacijski faktor,

F_K - strukturni faktor,

P_K - funkcija usmjerene orijentacije,

θ_{iK} - Braggov kut,

$G(\Delta\theta_{iK})$ - funkcija profila κ -tog difrakcijskog maksimuma

Strukturni faktor, F_K , fizički je vrlo značajan budući da sadrži informacije o faktoru zauzeća atomskih mjesta, izotropnom temperaturnom faktoru i relativnim koordinatama atoma u jediničnoj ćeliji⁵².

Kako bi slaganje između eksperimentalne i izračunate difrakcijske slike bili dobri potrebno je imati valjane ulazne podatke. Faktor slaganja (R-faktor) brojčano opisuje kvalitetu utočnjavanja. Najčešće se koristi težinski faktor (R_{wp}), koji se izračunava prema izrazu (3):

$$R_{wp} = 100 \times \sqrt{\left[\frac{\sum_i w_i (y_{oi} - y_{ci})^2}{\sum_i w_i y_{oi}^2} \right]} \quad (3)$$

Krajnja vrijednost R_{wp} faktora trebala bi biti što sličnija vrijednosti očekivanog faktora, R_{exp} , koji se računa prema izrazu (4):

$$R_{exp} = 100 \times \sqrt{\left[\frac{N - P + C}{\sum_i w_i y_{oi}^2} \right]} \quad (4)$$

Pri čemu je:

w_i – težinska funkcija,

$N - P + C$ – broj stupnjeva slobode,

N – broj izmijenjenih intenziteta,

P – broj parametara koji se utočnjavaju,

C – broj ograničenja koja se koriste u metodi najmanjih kvadrata

Rezultati su prihvatljivi kada je $R_{wp} \leq 10\%$. Utočnjavanje se ponavlja sve dok faktor R_{wp} ima jednaku vrijednost tijekom tri uzastopna ciklusa utočnjavanja^{52,53}.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Materijali

Za pripremu kalcijevih fosfata korišteni su:

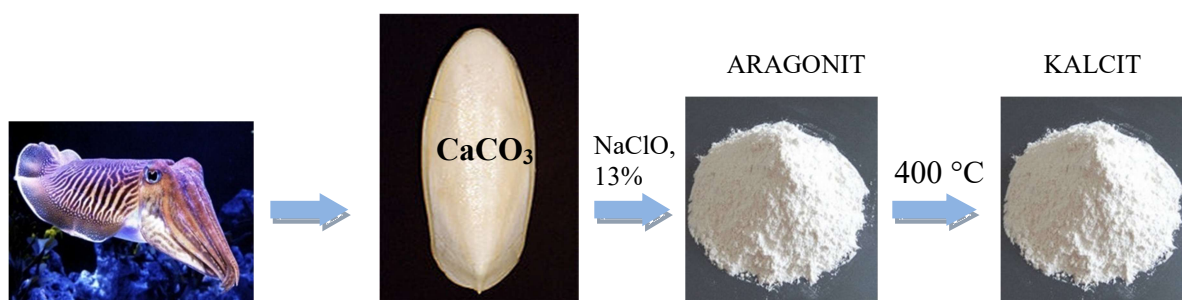
- urea fosfat, UPH, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4$, (Sigma-Aldrich)
- stroncijev nitrat, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, (AcrosOrganics)
- biogeni prekursor kalcijeva iona

Standard korišten za rendgensku difrakcijsku analizu :

- silicij, Si, (NIST)

3.1.2. Sinteza

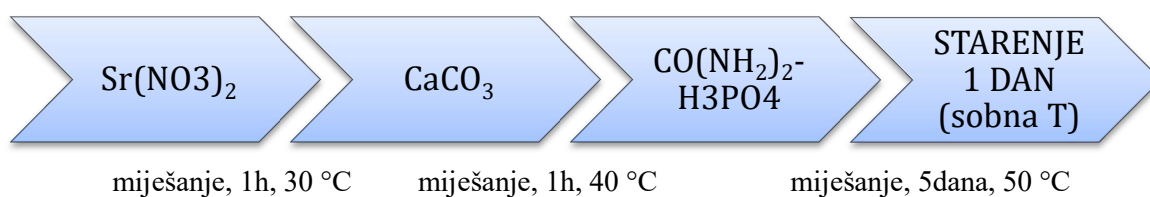
Sipina kost korištena je kao biogeni izvor Ca^{2+} iona. Nakon uklanjanja plašta, kost se reže na komadiće veličine 1 cm^3 i uranja u 13 % otopinu natrijeva hipoklorita, (NaClO), u svrhu uklanjanja organskih komponenti unutar 24 sata. Zatim se kosti ispiru kipućom demineraliziranom vodom i suše pri $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon sušenja, kosti su toplinski obrađene 2 sata pri $400 \text{ }^\circ\text{C}$ i brzinom zagrijavanja $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Na slici 10 shematski je prikazan postupak dobivanja kalcita iz sipine kosti.



Slika 10. Shematski prikaz pripreme kalcita iz sipine kosti.

Odgovarajuća količina stroncijeva nitrata, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, kalcijeva karbonata, CaCO_3 i uree fosfata, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4$, dodana je u demineraliziranu vodu kako bi omjer $(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{P}$

iznosio 1,67. Reakcija se provodila pet dana pri temperaturi od 50 °C, uz dan starenja pri sobnoj temperaturi. Proces je shematski prikazan proces na slici 11. Pripremljeni CaP dopirani su s 0, 1, 5 i 10 mol% Sr²⁺ iona. Pripremljeni uzorci CaP, CaP-1Sr, CaP-5Sr, CaP-10Sr filtrirani su i sušeni na sobnoj temperaturi 24 sata. Dio pripremljenih uzoraka toplinski su obrađeni pri 1200°C, te su označeni CaP-Sr0-1200, CaP-Sr1-1200, CaP-Sr5-1200 i CaP-Sr10-1200.



Slika11. Shematski prikaz sinteze kalcijeva fosfata supstituiranog stroncijem.

3.2. Metode karakterizacije

Rendgenskom difrakcijskom analizom, pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000 s $\text{CuK}\alpha$ (1,5406 Å) zračenjem pri 40 kV i 30mA određen je mineralni sastav sintetiziranih i žarenih prašaka. Mjerno područje kuteva, za pripremljene uzorke, bilo je 3° – 60°, a za žarene 20° – 70°, dok je brzina snimanja od 0,2°/10s. Kako bi bilo moguće odrediti udio amorfne faze u uzorcima, dodan je standard silicija (5,0 wt%). Identifikacija kristalnih faza provedena je uz pomoć ICDD baze podataka (engl. *The International Centre for Diffraction Data*).

Rietveldova metoda utočnjavanja provedena je pomoću računalnog programa DIFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. Određeni su parametri elementarnih ćelija, duljine veza i faktori zauzetosti za pripremljene uzorke prije i nakon toplinske obrade. Korišten strukturni model za HAp preuzet je iz istraživanja Veselinović i suradnici⁵³, OCP iz istraživanja Espanol i sur.⁵⁴, β -TCP iz istraživanja Hoshikawa i sur.⁵⁵, i stroncijev karbonat (SrCO_3) iz istraživanja Strommea i sur.⁵⁶. Kako bi bilo moguće precizno određivanje zauzetosti položaja Ca atoma u strukturama HAp-a, OCP-a i β -TCP-a položaj P, O i H držane su konstantnim.

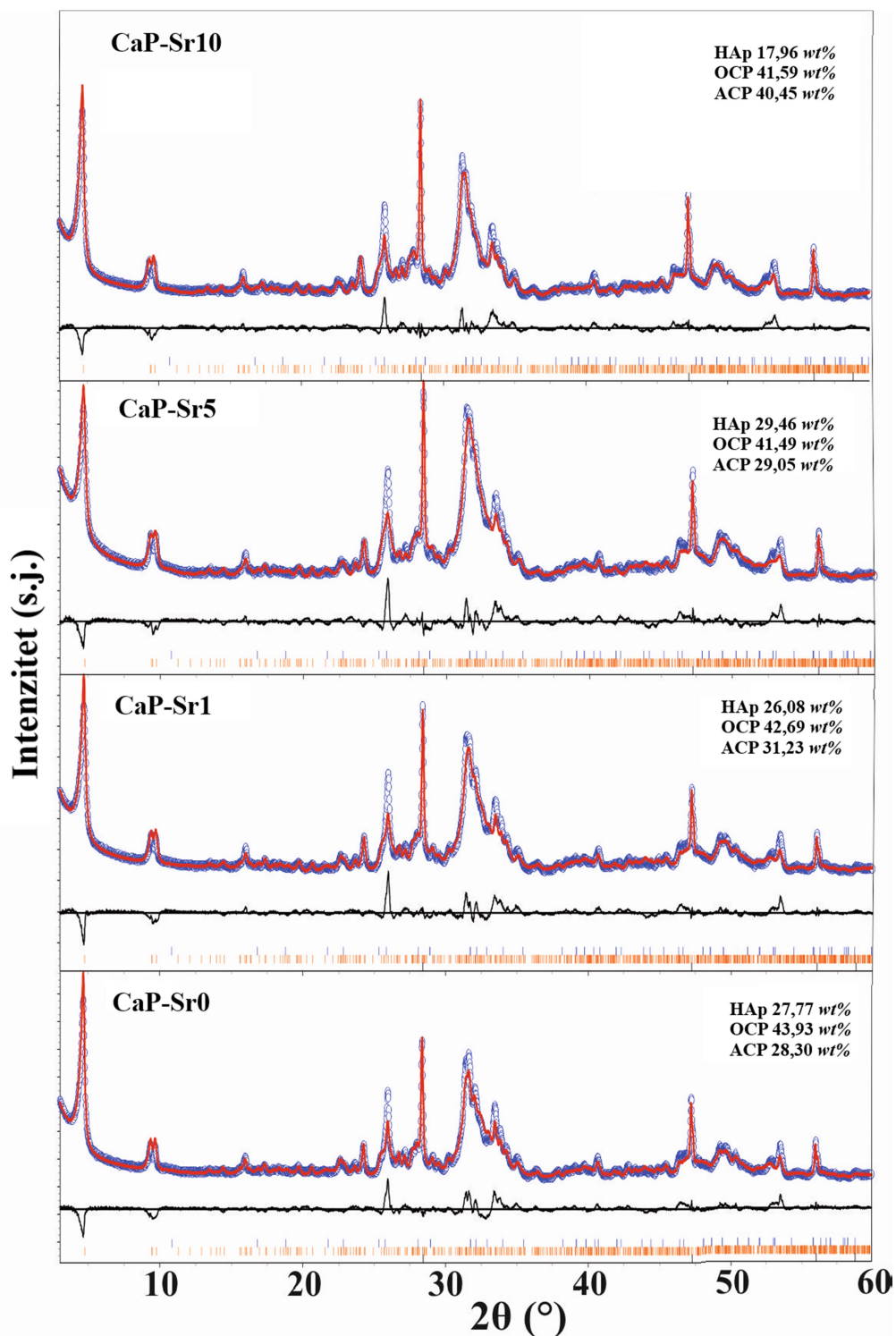
Težinski faktor, R_{wp} , numerički opisuje razinu utočnjavanja. Krajnja vrijednost R_{wp} trebala bi biti manja ili jednaka 10% i što sličnija eksperimentalna vrijednost R- faktora.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rietveldova metode utočnjavanja pripremljenih kalcijevih fosfata

4.1.1. Kvantitativni fazni sastav

Slika 12 prikazuje difraktograme dobivene Rietveldovom metodom utočnjavanja pripremljenih uzoraka CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10. Difraktogrami prikazuju karakteristične pikove HAp-a (ICDD 09-0432) i OCP-a (ICDD 26-1056), te pikove karakteristične za korišteni standard, silicij (ICDD 27-1402). Širina karakterističnih pikova OCP i HAp faze ukazuje na nisku kristalnost. Udio ACP faze, približno je jednak u uzorcima CaP-Sr0 (28,30 wt%), CaP-Sr1 (31,23 wt%) i CaP-Sr5 (29,05 wt%), dok kod uzorka CaP-Sr10 dolazi do njenog porasta (40,45 wt%). Promjene u sastavu kod sustava CaP-Sr10 mogu upućivati na ograničenost supstitucije Sr^{2+} ionom pri višim koncentracijama. Udio OCP-a u svim uzorcima iznosi ~ 42 wt%. Novija istraživanja pokazuju kako je OCP, uz ACP prekursor nastajanja prirodne mineralne faze te se ACP smatra poželjnom fazom u sintetskim materijalima za regeneraciju koštanog tkiva⁵⁷. Agregacija $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_3^{4-}$ kompleksa početni je korak, a odvija se u fazi prije nukleacije. Potom dolazi do otpuštanja H^+ ili vezanja Ca^{2+} iona te dolazi do nukleacije i taloženja sferičnih čestica ACP-a koje se sastoje od $\text{Ca}_2(\text{HPO}_4)_3^{2-}$ kompleksa. Sferične čestice ACP-a počinju formirati vrpce OCP-a s manjkom kalcija. Nastale vrpce se transformiraju u pločice OCP-a, koje prelaze u hidroksiapatit s manjkom kalcija. Udio ACP-a u prirodnom mineralnom tkivu iznosi 1–30 wt% , te ima povoljno djelovanje na brzinu obnavljanja koštanog tkiva^{57,58}.



Slika 12. Difraktogrami pripremljenih uzoraka CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10.

Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ($R_{wp} < 10\%$, $R_{exp} < 3\%$). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma

HAp-a, OCP-a i standarda (Si) dani su na dnu difraktograma.

4.1.2. Parametri elementarne ćelije

Rietveldovom metodom utočnjavanja određeni su parametri elementarne ćelije HAp-a i OCP-a u ovisnosti o udjelu dopiranog stroncija (Tablica 2). Povećanjem udjela stroncija u HAp-u, dolazi do povećanja parametara a i b , dok se parametar c ne mijenja značajno. Povećanje parametara elementarne ćelije rezultira povećanjem volumena jedinične ćelije s početnog $529,6925 \text{ \AA}^3$ (CaP-Sr0), do konačnog volumena od $538,2464 \text{ \AA}^3$ (CaP-Sr10). U kristalnoj rešetki OCP-a do povećanja dolazi kod svih parametara elementarne ćelije. Povećanje parametara elementarne ćelije rezultiralo je povećanjem volumena, pa je tako početni volumen jedinične ćelije $1220,9606 \text{ \AA}^3$, dok konačni volumen iznosi $1233,5943 \text{ \AA}^3$. Ca^{2+} ion manjeg je atomskog radijusa od Sr^{2+} iona. Supstitucijom većeg iona u elementarnu rešetku dolazi do povećanja parametara elementarne ćelije.

Tablica 2. Parametri elementarnih ćelija pripremljenih uzoraka CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10.

HAp				
	V (\AA^3)	a (\AA)	b (\AA)	c (\AA)
CaP-Sr0	529.6925	9.41369	9.41369	6.90197
CaP-Sr1	530.1351	9.43005	9.43005	6.88380
CaP-Sr5	534.4684	9.46036	9.46036	6.89567
CaP-Sr10	538.2464	9.49446	9.49446	6.89461
OCP				
	V (\AA^3)	a (\AA)	b (\AA)	c (\AA)
CaP-Sr0	1220.9606	19.69511	9.53534	6.85167
CaP-Sr1	1223.4897	19.70591	9.54063	6.85980
CaP-Sr5	1229.1811	19.72191	9.55317	6.87736
CaP-Sr10	1233.5943	19.73528	9.57108	6.88204

4.1.3. Faktor zauzetosti

Tablice 3. i 4. prikazuju atomske koordinate i faktore zauzetosti (FZ) položaja Ca atoma u HAp-u i OCP-u. U strukturi HAp-a postoje dvije pozicije Ca^{2+} iona na koje se Sr^{2+} ion može supstituirati. Rezultati pokazuju da se Sr^{2+} ion supstituirao na položaj Ca1, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima Matsunage i suradnika⁵⁹. Međutim, okupacije Ca pozicija ne rastu linearno, u skladu s rastom parametara elementarne ćelije uzrokovanim rastućom Sr-supstitucijom. Rezultati ukazuju na mogućnost drugih mehanizama supstitucije uz ionsku supstituciju, što rezultira povećanjem parametara ćelije. Navedeni dodatni mehanizam može biti smještanje Sr^{2+} iona u šupljine unutar strukture kristalne rešetke što dovodi do rasta parametara ćelije.

Sr^{2+} ioni smještaju se u strukturi OCP-a na pozicije Ca3, Ca4, Ca7 i Ca8, a njihova okupacije raste porastom udjela Sr-supstitucije. Međutim, zauzetost položaja Ca opada i u HAp-u i OCP-u u uzorku CaP-Sr10. Pretpostavlja se da se pri višim udjelima Sr-supstitucije (*mol %*) veći dio Sr^{2+} iona smješta u šupljine kristalne strukture i adsorbira na površini kristala.

Tablica 3. Prikaz atomskih koordinata i faktora zauzetosti položaja Ca atoma u hidroksiapatitu.

	CaX	x	y	z	FZ		CaX	x	y	z	FZ
HAp-Sr0	Ca1	0.27022	0.65302	-0.00878	0.14	HAp-Sr1	Ca1	0.30412	0.67276	-0.00462	0.07
	Sr1	0.27022	0.65302	-0.00878	0.19		Sr1	0.30412	0.67276	-0.00462	0.26
	Ca2	0.25851	0.98137	0.21431	1		Ca2	0.24041	0.98051	0.22389	1
	Sr2	0.25851	0.98137	0.21431	0		Sr2	0.24041	0.98051	0.22389	0
HAp-Sr5	Ca1	0.31452	0.68135	-0.00200	0.06	HAp-Sr10	Ca1	0.29688	0.69580	0.00565	0.21
	Sr1	0.31452	0.68135	-0.00200	0.27		Sr1	0.29688	0.69580	0.00565	0.12
	Ca2	0.23551	0.98399	0.22813	1		Ca2	0.22021	0.99088	0.22289	1
	Sr2	0.23551	0.98399	0.22813	0		Sr2	0.22021	0.99088	0.22289	0

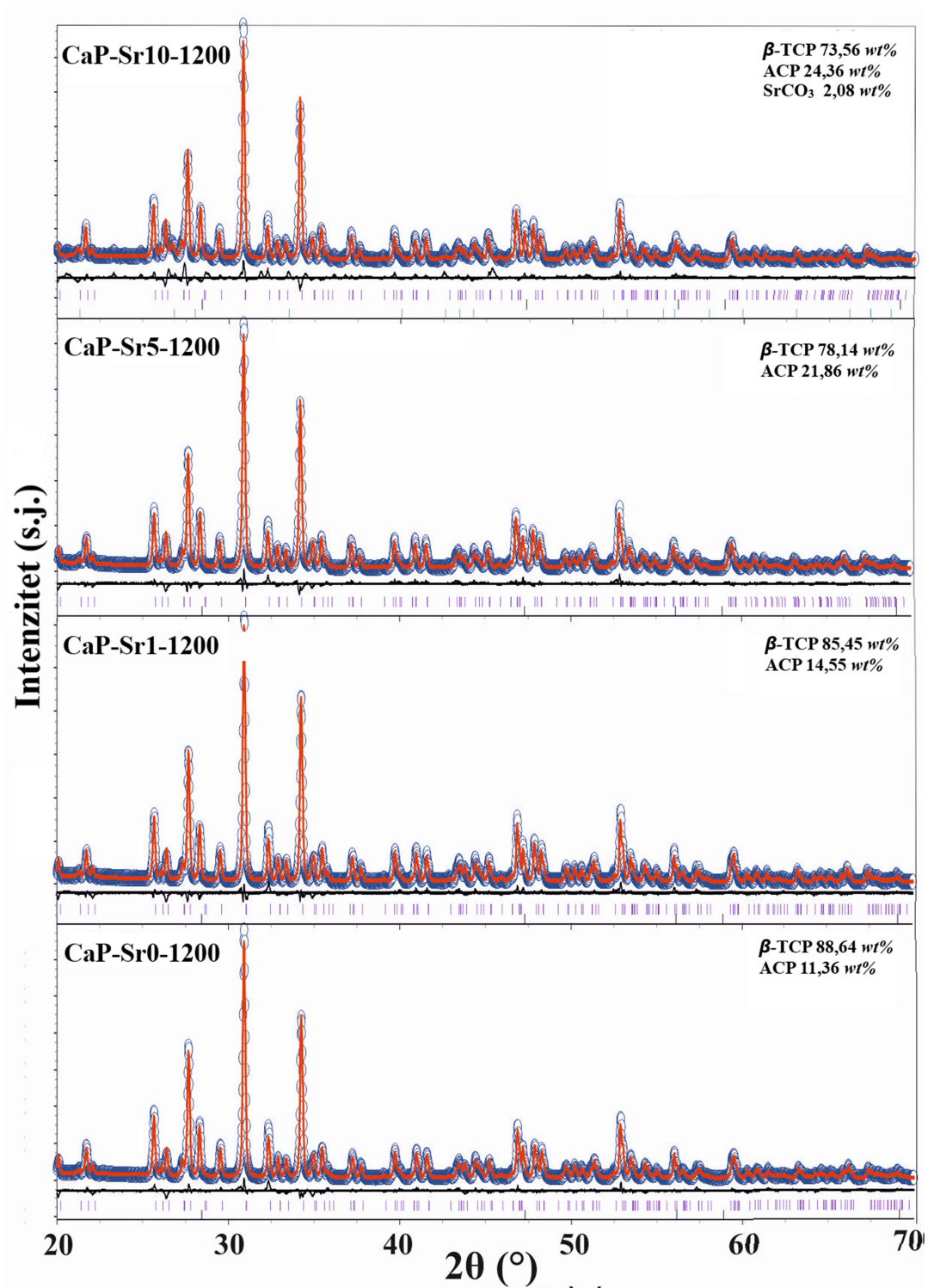
Tablica 4. Prikaz atomskih koordinata i faktora zauzetosti položaja Ca atoma oktakalcijevom fosfatu pentahidratu.

	CaX	x	y	z	FZ		CaX	x	y	z	FZ
OCp-Sr0	Ca1	0.06537	0.79051	-0.01299	1	OCp-Sr1	Ca1	0.06341	0.79240	-0.01205	1
	Sr1	0.06537	0.79051	-0.01299	0		Sr1	0.06341	0.79240	-0.01205	0
	Ca2	0.06714	0.81004	0.47973	1		Ca2	0.06875	0.81378	0.48146	1
	Sr2	0.06714	0.81004	0.47973	0		Sr2	0.06875	0.81378	0.48146	0
	Ca3	0.36826	0.04247	0.04492	0.85		Ca3	0.36465	0.04238	0.03848	0.81
	Sr3	0.36826	0.04247	0.04492	0.15		Sr3	0.36465	0.04238	0.03848	0.19
	Ca4	0.37370	0.81929	0.54711	0.69		Ca4	0.37328	0.81494	0.53915	0.63
	Sr4	0.37370	0.81929	0.54711	0.31		Sr4	0.37328	0.81494	0.53915	0.37
	Ca5	0.10338	0.44330	0.75791	1		Ca5	0.10169	0.45045	0.76146	1
	Sr5	0.10338	0.44330	0.75791	0		Sr5	0.10169	0.45045	0.76146	0
	Ca6	0.21079	0.66885	0.27423	0.92		Ca6	0.20839	0.67115	0.28100	1
	Sr6	0.21079	0.66885	0.27423	0.08		Sr6	0.20839	0.67115	0.28100	0
	Ca7	0.22637	0.13399	0.75292	0.73		Ca7	0.22485	0.13502	0.74278	0.73
	Sr7	0.22637	0.13399	0.75292	0.27		Sr7	0.22485	0.13502	0.74278	0.27
	Ca8	0.11922	0.21326	0.26413	1		Ca8	0.12105	0.22403	0.26245	1
	Sr8	0.11922	0.21326	0.26413	0		Sr8	0.12105	0.22403	0.26245	0
OCp-Sr5	Ca1	0.05781	0.79600	-0.00962	1	OCp-Sr10	Ca1	0.05937	0.79143	-0.00074	1
	Sr1	0.05781	0.79600	-0.00962	0		Sr1	0.05937	0.79143	-0.00074	0
	Ca2	0.07162	0.81184	0.46680	1		Ca2	0.06863	0.80869	0.47583	1
	Sr2	0.07162	0.81184	0.46680	0		Sr2	0.06863	0.80869	0.47583	0
	Ca3	0.36142	0.05130	0.02467	0.71		Ca3	0.36255	0.03939	0.03690	0.88
	Sr3	0.36142	0.05130	0.02467	0.29		Sr3	0.36255	0.03939	0.03690	0.12
	Ca4	0.37556	0.81483	0.5097	0.35		Ca4	0.37355	0.81803	0.52538	0.48
	Sr4	0.37556	0.81483	0.5097	0.65		Sr4	0.37355	0.81803	0.52538	0.52
	Ca5	0.09912	0.45821	0.74035	1		Ca5	0.10505	0.43697	0.75489	1
	Sr5	0.09912	0.45821	0.74035	0		Sr5	0.10505	0.43697	0.75489	0
	Ca6	0.20688	0.69639	0.28326	1		Ca6	0.20804	0.67872	0.28073	1
	Sr6	0.20688	0.69639	0.28326	0		Sr6	0.20804	0.67872	0.28073	0
	Ca7	0.22405	0.14572	0.73439	0.75		Ca7	0.22652	0.15012	0.74298	0.74
	Sr7	0.22405	0.14572	0.73439	0.25		Sr7	0.22652	0.15012	0.74298	0.26
	Ca8	0.12732	0.22695	0.26031	0.84		Ca8	0.11852	0.21128	0.26005	0.86
	Sr8	0.12732	0.22695	0.26031	0.16		Sr8	0.11852	0.21128	0.26005	0.14

4.2. Rietveldova metoda utočnjavanja toplinski obrađenih kalcijevih fosfata

4.2.1. Kvantitativni fazni sastav

Analiza toplinske stabilnosti pripremljenih uzoraka provedena je pri 1200 °C. Na slici 13 prikazan je difraktogram toplinski obrađenih uzoraka CaP-Sr0-1200, CaP-Sr1-1200, CaP-Sr5-1200 i CaP-Sr10-1200. Difraktogrami svih uzoraka prikazuju pikove karakteristične za β -TCP, (ICDD 09-0169). Karakteristični pikovi za stroncijeve spojeve ne pojavljuju se na difraktogramima CaP-Sr1-1200 i CaP-Sr5-1200 što potvrđuje ugradnju stroncija u kristalne rešetke HAp-a i OCP-a prije toplinske obrade. Difraktogram uzorka dopiran CaP-Sr10-1200 pokazuje karakterističan pik za SrCO₃ (ICDD 05-0418), što ukazuje da se dodana količina stroncija ne može u potpunosti supstituirati u strukturu CaP uzorka, prije toplinske obrade. Pretpostavlja se da dolazi do djelomične adsorpcije na površini prije toplinske obrade uzorka te kao rezultat toga do nastajanja SrCO₃ nakon toplinske obrade. Dodatno, uz adsorpciju na površini moguće je da dolazi do smještanja određenom udjela stroncija u ACP fazu uzorka CaP-Sr10.



Slika 13. Difraktogrami toplinskiobrađenih uzoraka CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10 pri 1200 °C. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ($R_{wp} < 10\%$, $R_{exp} < 3\%$). ICDD podaci položaja položaja difrakcijskih maksimuma β -TCP, SrCO₃ i standarda (Si) dani su na dnu slike.

4.2.2. Parametri elementarne ćelije

Parametri elementarne ćelije dobiveni pomoću Rietveldove metode utočnjavanja β -TCP-a prikazani su u tablici 5. Vidljivo je kako je duljina bridova a i b jednaka, te kako je povećanjem udjela stroncija došlo do produljenja bridova a i b a time i do povećanja volumena ćelije i to od početnog $3519,1591 \text{ \AA}^3$ (CaP-Sr0-1200) do $3550,9417 \text{ \AA}^3$ (CaP-Sr10-1200). Kako je Sr^{2+} ion većeg radijusa od Ca^{2+} , njegovom supstitucijom dolazi do povećanja parametra elementarne ćelije.

Tablica 5. Parametri elementarnih ćelija β -TCP-a dobivenog toplinskom obradom uzoraka CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10.

	β -TCP			
	V (\AA^3)	a (\AA)	b (\AA)	c (\AA)
CaP-Sr0-1200	3519.1591	10.42847	10.42847	37.36519
CaP-Sr1-1200	3522.9652	10.43379	10.43379	37.63744
CaP-Sr5-1200	3538.7134	10.45219	10.45219	37.40247
CaP-Sr10-1200	3550.9417	10.46383	10.46383	37.44826

4.2.3. Faktor zauzetosti

U tablici 6. Prikazane su atomske koordinate položaja Ca atoma i pripadajući faktori zauzetosti u toplinski obrađenim uzorcima CaP-Sr0, CaP-Sr1, CaP-Sr5 i CaP-Sr10. U strukturi β -TCP-a, Sr^{2+} ion zauzima položaje Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4 što se slaže s teorijskim rezultatima koje su dobili Matsunaga i suradnici⁴⁰. Na položaju Ca5 ne dolazi do supstitucije, zbog manjeg koordinacijskog broja i duljine veza. Supstitucijske energije neprikladne su na položaju Ca5 u strukturi β -TCP za supstituciju Sr zbog većeg ionskog radijusa i prostorno manjeg položaja Ca5, u odnosu na ostale Ca položaje u strukturi β -TCP-a.

Tablica 3. Prikaz atomskih koordinata i faktora zauzetosti položaja Ca atoma u β -TCP-u.

	CaX	x	y	z	FZ		CaX	x	y	z	FZ
β -TCP-Sr0	Ca1	0.72113	0.85732	0.16738	0.88	β -TCP-Sr1	Ca1	0.71864	0.85274	0.16747	0.85
	Sr1	0.72113	0.85732	0.16738	0.12		Sr1	0.71864	0.85274	0.16747	0.15
	Ca2	0.61669	0.82281	-0.03229	0.95		Ca2	0.61576	0.82157	-0.0326	0.95
	Sr2	0.61669	0.82281	-0.03229	0.05		Sr2	0.61576	0.82157	-0.0326	0.05
	Ca3	0.72832	0.85115	0.06198	0.91		Ca3	0.72669	0.84998	0.06153	0.90
	Sr3	0.72832	0.85115	0.06198	0.09		Sr3	0.72669	0.84998	0.06153	0.10
	Ca4	0.06570	0.05430	-0.08747	0.15		Ca4	-0.05092	-0.05916	-0.08545	0.00
	Sr4	0.06570	0.05430	-0.08747	0.28		Sr4	-0.05092	-0.05916	-0.08545	0.43
	Ca5	0.00000	0.00000	0.73360	1		Ca5	0.00000	0.00000	0.73360	1.00
	Sr5	0.00000	0.00000	0.73360	0		Sr5	0.00000	0.00000	0.73360	0.00
β -TCP-Sr5	Ca1	0.72044	0.85485	0.16615	0.89	β -TCP-Sr10	Ca1	0.72571	0.85373	0.16583	0.86
	Sr1	0.72044	0.85485	0.16615	0.11		Sr1	0.72571	0.85373	0.16583	0.14
	Ca2	0.61603	0.82392	-0.03323	0.92		Ca2	0.61631	0.82088	-0.03219	0.90
	Sr2	0.61603	0.82392	-0.03323	0.08		Sr2	0.61631	0.82088	-0.03219	0.10
	Ca3	0.72765	0.85092	0.06121	0.86		Ca3	0.72144	0.84984	0.06164	0.83
	Sr3	0.72765	0.85092	0.06121	0.14		Sr3	0.72144	0.84984	0.06164	0.17
	Ca4	-0.00427	-0.00562	-0.08340	0.00		Ca4	0.02122	-0.00437	-0.08513	0.12
	Sr4	-0.00427	-0.00562	-0.08340	0.43		Sr4	0.02122	-0.00437	-0.08513	0.31
	Ca5	0.00000	0.00000	-0.08340	1.00		Ca5	0.00000	0.00000	0.73360	1
Sr5	0.00000	0.00000	-0.08340	0.00	Sr5	0.00000	0.00000	0.73360	0		

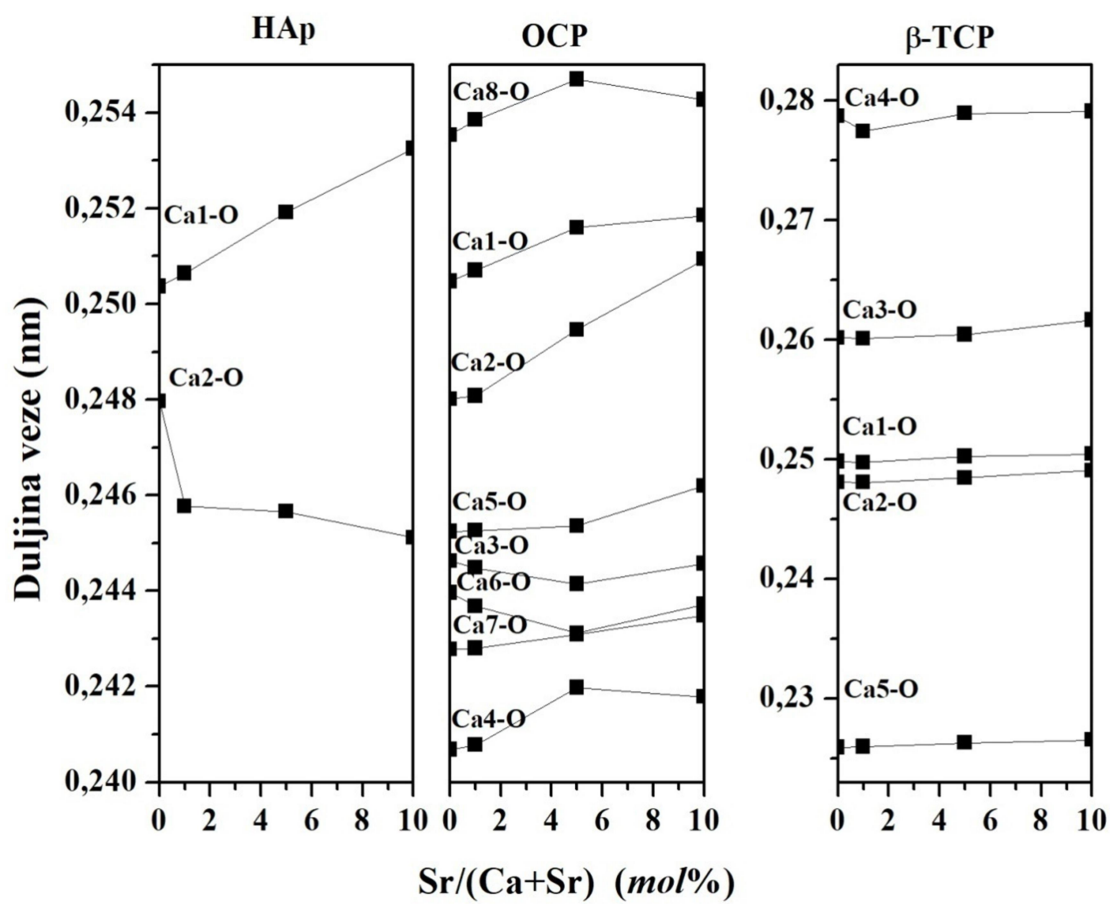
4.3. Duljine veza u pripremljenim kalcijevim fosfatima

Hidroksiapatit posjeduje dva položaja na koje se može smjestiti kalcijev atom. Prema teoretskim istraživanjima Matsunage i Murate, do supstitucije stroncijem dolazi na poziciji Ca1, zbog niže energije supstitucije u odnosu na poziciju Ca2, što je također potvrđeno ovim radom⁵⁹. Položaj Ca1 prostorno je veći, što odgovara Sr-supstituciji. Veza Ca1–O (0,246 nm) dulja je u odnosu na duljinu Ca2–O veze (0,241 nm), što znači da je energija supstitucije položaja Ca1 niža. Međutim, zauzetost Ca1 položaja ne povećava se linearno, kao što je slučaj s parametrima elementarne ćelije. Naime, stroncij se pri višim udjelima može smjestiti i na prazna područja u ćeliji te samim time dolazi do povećanja volumena. Budući da su

pripremljeni uzorci dobiveni iz biogenog izvora (sipina kost), oni mogu posjedovati i neke druge elemente, zbog čega se elementarna ćelija razlikuje od one sintetskog hidroksiapatita. Na slici 14 prikazana je prosječna duljina veza kalcijeva atoma i najbližeg susjednog atoma kisika u HAp-u, OCP-u i β -TCP-u, u ovisnosti o molarnom udjelu Sr-supstitucije (*mol%*). Vidljivo je kako se duljina veza Ca1–O u strukturi HAp-a povećava s molarnim udjelom Sr²⁺ iona, dok duljina veza Ca2–O opada povećanjem molarnog udjela, što upućuje na supstituciju Sr²⁺ iona na položaju Ca1.

Stroncij u kristalnoj rešetci OCP-a preferira supstituciju na položaje Ca3, Ca4 i Ca7 i Ca8. Niža energija supstitucije na pozicijama Ca3 i Ca4 uzrokovana je hidratiziranim slojem u kojem se one nalaze, te ih Sr²⁺ preferira unatoč tome što su one prostorno manje. Zbog veće duljine veza Ca–O pozicije Ca7 i Ca8 povoljne su za supstituciju. S obzirom na više Ca položaja u elementarnoj ćeliji OCP-a, moguće je ugraditi više iona u strukturu, u odnosu na HAp. Duljina veza Ca5–O i Ca6–O iznosi 0,240 nm, dok je ostatak veza u razmjeru od 0,244-0,249 nm. Na slici 14 vidljivo je kako duljina veza Ca1–O, Ca2–O, Ca4–O, Ca5–O, Ca7–O, i Ca8–O raste s povećanjem molarnog udjela stroncija. Neočekivani rast Ca1–O, Ca2–O, Ca5–O i pad duljine veza Ca3–O upućuje na mogućnost ugradnje stroncija na položajima koje prema prijašnjim istraživanjima i literaturi, ne preferira, ili je došlo do ugradnje u šupljine unutar rešetke. S obzirom na sintezu OCP-a iz biogenog izvora očekivana su odstupanja od rezultata i ponašanja sintetskog OCP-a^{59,60}.

U kristalnoj rešetci β -TCP-a, atom Ca zauzima pet položaja. Prema Matsunagi i suradnicima pozicija Ca4 najpogodnija je za supstituciju većim ionima. Najdulja veza je Ca4–O te iznosi od 0,304 do 0,323 nm, zbog čega je pogodnija za supstituciju sa Sr²⁺ ionom. Osim toga, supstitucija je moguća i na pozicijama Ca1, Ca2, i Ca3. Najkraća veza je Ca5–O koja iznosi od 0,224 do 0,229 nm te nije pogodna za supstituciju većim ionima. Na slici 15 vidljivo je kako duljina svih veza u β -TCP-u raste povećanjem supstitucije stroncijem, osim veze Ca5–O koja ostaje gotovo nepromijenjena. Budući da ta veza nije pogodna za supstituciju većim ionima, očekivano je da se njena duljina neće promijeniti. Najveća promjena u duljini veze nastaje kod Ca4–O veze, što ukazuje na supstituciju najvećeg udjela Sr²⁺ na toj poziciji kako je očekivano prema literaturi⁴⁰.



Slika 14. Prosječna duljina veze (nm) između položaja kalcija i najbližeg susjednog atoma kisika u HAp-u, OCP-u i β -TCP-u u ovisnosti o molarnom udjelu supstitucije stroncijem (mol%).

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je pokazalo kako trofazni sustav hidroksiapatita, oktakalcijeva fosfata i amorfnog kalcijevog fosfata može biti sintetiziran iz biogenog izvora (sipine kosti) metodom precipitacije pri blagim uvjetima u vodenom mediju.

- Uzorci su uspješno dopirani s 1, 5 i 10 % mol stroncijevih iona.
- Pomoću Rietveldove metode utočnjavanja određeni su parametri elementarnih ćelija, koji ukazuju na uspješno dopiranje pripremljenih CaP stroncijem.
- Stroncij je moguće supstituirati u HAp, OCP i β -TCP na položaje kalcijeva atoma s nižom energijom supstitucije.

Pripremljen trofazni sustav dopiran stroncijevim ionima dobiven iz biogenog izvora sličnog je kemijskog i faznog sastava kao mineralna faza prirodnog koštanog tkiva. Kao takva ima potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, a u daljnjim istraživanjima moguće je ispitati biološku aktivnost.

6. LITERATURA:

1. Macan, J., Profesionalne bolesti mišićno-koštanog sustava, *Sigurnost* **49** (2007) 359–397.
2. Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala, *Kemija u Industriji* **54** (2005) 131–134.
3. 3.Zavaglia, C. A. C., Prado da Silva, M. H., Reference Module in Materials Science and Materials Engineering: Feature Article: Biomaterials, (2016).
4. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures, *Acta Biomaterialia* **9** (2013) 7591–7621.
5. Lafon, J. P., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition, *Journal of the European Ceramic Society* **28** (2008) 139–147.
6. Bianco, A., Cacciotti, I., Lombardi, M., Montanaro, L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability, *Materials Research Bulletin* **44** (2009) 345–354.
7. Birgani, Z. T., Malhotra, A., van Blitterswijk, C. A., Habibovic, P., Human mesenchymal stromal cells response to biomimetic octacalcium phosphate containing strontium, *Journal of Biomedical Materials Research A* **104** (2016) 1946–1960.
8. Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., Marie, P. J., The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell, *Bone* **18** (1996) 517–523.
9. Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A. León, B., Biological hydroxyapatite obtained from fish bones, *Materials Science and Engineering C* **32** (2012) 478–486.
10. Suresh Kumar, G., Girija, E.K., Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications, *Ceramics International* **39** (2013) 8293–8299.
11. Bose, S., Sarkar, N., Natural Medicinal Compounds in Bone Tissue Engineering, *Trends in Biotechnology* **38** (2019) 404–417.
12. Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., Mequanint, K., Rizkalla, A. S., Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* **3** (2012) 432–463.

13. https://www.researchgate.net/figure/Steps-involved-in-bone-tissue-engineering-Mesenchymal-cells-are-isolated-from-the-donor_fig4_317101532 (pristup internetu: 10.07.2020.)
14. Hasnain, M. S., Ahmad, S. A., Chaudhary, N., Hoda, M. N., Nayak, A. K. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering u: Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics, Woodhead Publishing (2019) 1–37.
15. Place, E. S., Evans, N. D., Stevens, M. M., Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nature Materials* **8** (2009) 457–470.
16. Bohner, M., Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements, *Injury* **31** (2000) 37–47.
17. Tverdokhlebov, S. I., Bolbasov, E. N., Shesterikov, E. V., Scaffold Materials Based on Fluorocarbon Composites Modified with RF Magnetron Sputtering, Osteogenesis, Yunfeng Lin, IntechOpen, London (2012) 84–115.
18. Qiu, Z.-Y., Cui, Y., & Wang, X.-M. Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes, Woodhead Publishing (2019), 1–37.
19. Dallas, S. L., Prideaux, M., Bonewald, L. F., The osteocyte: An endocrine cell...and more, *Endocrine Reviews* **34** (2013) 658–690.
20. Zhou, H., Lee, J., Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* **7** (2011) 2769–2781.
21. Yulin, L., Changsheng, L., Nanomaterial-based bone regeneration, *Nanoscale* **15** (2017) 4862–4874.
22. Bombaldi de Souza, R. F., Bombaldi de Souza, F. C., Rodrigues, C., Drouin, B., Popat, K. C., Montovani, D., Moraes, A. M., Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues, *Materials Science and Engineering C* **94** (2019) 364–375.
23. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J., Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor, Elsevier Inc, 2004.
24. Vallet-Regi, M., Gonzalez-Calbet, J.M., Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissue, *Progress in Solid State Chemistry* **32** (2004) 1–31.
25. Zhou, Y., Wu, C., & Chang, J. Bioceramics to regulate stem cells and their microenvironment for tissue regeneration, *Materials Today* **24** (2018) 41–56.

26. Naga, S. M., El-Maghraby, H. F., Sayed, M., Saad, E. A., Highly porous scaffolds made of nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshells, *Journal of Ceramic Science and Technology* **6** (2015) 237–243.
27. Dorozhkin, S. V., Calcium orthophosphates: applications in nature, biology, and medicine, Jenny Stanford Publishing (2012).
28. Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials* **25** (2004) 987–994.
29. Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S., Huang, J., Bioceramics: Past, present and for the future, *Journal of the European Ceramic Society* **28** (2008) 1319–1327.
30. LeGeros, R.Z., LeGeros, J. P., Dense Hydroxyapatite, u: Hench, L. L., Wilson, J., An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapur (1993) 139–180.
31. Khalid, H., & Chaudhry, A. A. Basics of hydroxyapatite—structure, synthesis, properties, and clinical applications. Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites, Woodhead Publishing (2020) 85–115.
32. Murugan, R., Ramakrishna, S., Production Of Ultra-Fine Bioresorbable Carbonated Hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia* **2** (2006) 201–206.
33. Cardoso, G.B.C., Tondon, A., Maia, L.R.B., Cunha, M.R., Zavaglia, C.A.C., Kaunas, R.R., In vivo approach of calcium deficient hydroxyapatite filler as bone induction factor, *Materials Science and Engineering C* **99** (2019) 999–1006.
34. P.W. Brown, Constantz, B., Hydroxyapatite and Related Materials, CRC Press, Boca Raton (1994) 368–384.
35. Elliot, J. C., Studies in Inorganic Chemistry: Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, (1994).
36. Suzuki, O., Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystalchemistry, *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 3379–3387.
37. Brown, W. E., Smith, J. P., Lehr, J. R., Frazier, A. W., Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite, *Nature* **196** (1962) 1050–1055.
38. Buerger, M.J. Crystallographic aspects of phase transformations. In: Smoluchowski R, Meyer J.E., Weyl WA, editors. Phase transformations in solids. New York: John Wiley (1951) 183–211.
39. Carrodegua, R. G., De Aza, S., α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomaterialia* **7** (2011) 3536–3546.

40. Matsunaga, K., Kubota, T., Toyoura, K., Nakamura, A., First-principles calculations of divalent substitution of Ca^{2+} in tricalcium phosphates, *Acta Biomaterialia* **23** (2015) 329–337.
41. Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., Marie, P. J., The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell, *Bone* **18** (1996) 517–523.
42. Xue, W., Moore, J. L., Hosick, H. L., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Lu, W. W., Cheung, K. M., Luk, K. D., Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79** (2006) 804–814.
43. Ammann, P., Strontium ranelate: A novel mode of action leading to renewed bone quality, *Osteoporosis International* **16** (2005) 11–15.
44. Christoffersen, J., Christoffersen, M.R., Kolthoff, N., Bärenholdt, O., Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection, *Bone* **20** (1997) 47–54.
45. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M., Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta* **360** (2007) 1009–1016.
46. Kikuchi M, Yamazaki A, Otsuka R, Akao M, Aoki H., Crystal structure of Sr-substituted hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, *Journal of Solid State Chemistry* **113** (1994) 373–378.
47. Matsunaga, K., First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate, *The journal of chemical physics* **128** (2008) 245101.
48. Weinand, C., Pomerantseva, I., Neville, C. M., Gupta, R., Hydrogel- β -TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone, *Bone* **38** (2006) 555–563.
49. Sanosh K. P., Chu, M. C., Balakrishnan, A., Kim, T. N., Cho, S., Sol-gel synthesis of pure nanosized β -tricalcium phosphate crystalline powders, *Current Applied Physics* **10** (2010) 68–71.
50. Matsunaga, K., Murata, H., Strontium Substitution in Bioactive Calcium Phosphates: A First-Principles Study, *The Journal of Physical Chemistry B* **113** (2009) 3584–3589.
51. Hill, R. J., Howard, C. J., Quantitative Phase Analysis from Neutron Powder Diffraction Data Using the Rietveld Method, *Journal of Applied Crystallography* **20** (1987) 467–474.
52. Young, R. A., The Rietveld Method, IUCr Monographs on Crystallography 5, Oxford University Press (1996) 1-36.

53. Veselinović, L., Karanović, Lj., Stojanović, Z., S., Bračko, I., Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing. *J. Appl. Crystallogr.* **43** (2010) 320-327.
54. Espanol, M., Portillo, J., Manero, J. M., Ginebra, M. P., Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of α -tricalcium phosphate by transmission electron microscopy, *CrystEngComm* **12** (2010) 3318–3326.
55. Yashima, M., Sakai, A., Takashi, K., Hoshikawa, A., Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate by neutron powder diffraction, *Journal of Solid State Chemistry* **175** (2013) 272–277.
56. Strømme, K. O., On the crystal structures of the high-temperature forms of strontium and barium carbonate and structurally related compounds, *Acta Chemica Scandinavica* **29a** (1975) 105–110.
57. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., Bohner, M., Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?, *Materials Today* **19** (2016) 69–87.
58. Dorozhkin, S. V., Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates, *Acta Biomaterialia* **8** (2012) 963–977.
59. Matsunga, K., Murata, H., Strontium Substitution in Bioactive Calcium Phosphates: A First-Principles Study, *The Journal of Physical Chemistry B* **113** (2009) 3584–3589.
60. Terra, J., Dourado, E. R., Eon, J. G., Ellis, D. E., Gonzalez, G., Malta Rossi, A., The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study, *Physical Chemistry Chemical Physics* **11** (2008) 568–577.

ŽIVOTOPIS

Ana Gudelj [REDACTED] je završila Osnovnu školu Jure Kaštelana. Nakon završene osnovne škole upisala je VII. Gimnaziju u Zagrebu i maturirala 2015. godine, te potom upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala. 2018. godine upisuje diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala, također na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2019. godine sudjeluje s usmenim izlaganjem na projektnoj HaTEA radionici (engl. *Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering Applications*) s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata dobivenih iz biogenih izvora“. Na Prvom studentskom kongresu o inženjerstvu materijala (e-SKIM) osvaja prvo mjesto za usmeno izlaganje s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata“, te drugo mjesto za postersko izlaganje. 2019. godine osvaja rektorovu nagradu za rad s temom „Sinteza metalnim ionima supstituirane kalcij fosfatne biokeramike u polimernoj matrici kitozana za biomedicinsku primjenu“. 2020. godine jedna je od autora članka „From bio-waste to bone substitute: synthesis of biomimetic hydroxyapatite and its use in chitosan-based composite scaffold preparation“ koji izlazi u časopisu *Chemical Biocemical Engineering Quarterly*.