

Priprava visokoporoznoga biorazgradljivoga i biokompatibilnoga materijala na temelju supstituiranoga hidroksiapatita

Bauer, Leonard

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:548897>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Leonard Bauer

**PRIPRAVA VISOKOPOROZNOGA
BIORAZGRADLJIVOGA I BOKOMPATIBILNOGA
MATERIJALA NA TEMELJU SUPSTITUIRANOGA
HIDROKSIAPATITA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Leonard Bauer

**PREPARATION OF HIGHLY POROUS
BIODEGRADABLE AND BIOCOMPATIBLE
MATERIAL BASED ON SUBSTITUTED
HYDROXYAPATITE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Leonard Bauer

**PRIPRAVA VISOKOPOROZNOGA
BIORAZGRADLJIVOGA I BOKOMPATIBILNOGA
MATERIJALA NA TEMELJU SUPSTITUIRANOGA
HIDROKSIAPATITA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Leonard Bauer

**PREPARATION OF HIGHLY POROUS
BIODEGRADABLE AND BIOCOMPATIBLE
MATERIAL BASED ON SUBSTITUTED
HYDROXYAPATITE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Zagreb, 2021.

Bibliografski podaci

UDK: 66:615.461:611.018.4(043.3)
Znanstveno područje: tehničke znanosti
Znanstveno polje: kemijsko inženjerstvo
Znanstvena grana: kemijsko inženjerstvo u razvoju materijala
Institucija: Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Zavod za fizikalnu kemiju
Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković
Broj stranica: 104
Broj slika: 38
Broj tablica: 10
Broj priloga: 0
Broj literaturnih referenci: 220
Datum obrane: 8. travnja 2021.

Sastav povjerenstva za obranu:

prof. dr. sc. Krešimir Košutić,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
doc. dr. sc. Anamarija Rogina,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
prof. dr. sc. Lidija Ćurković,
Fakultet strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i
Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu,
Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na 216. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 28. svibnja 2018., te odobrena na 14. redovitoj sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu u 349. akademskoj godini (2017./2018.), održanoj 28. rujna 2018.

Zahvale

Istraživanja doktorskog rada provedena su u okviru projekta „Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva“ (Projekt HaTEA, IP-2014-09-3752, voditelj projekta: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković) zahvaljujući programu „Projekt razvoja karijere mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (mentor: prof. dr. sc. Marica Ivanković) financiranih od strane Hrvatske zaklade za znanost. Zahvaljujem Hrvatskoj zakladi za znanost na financijskoj potpori koja je omogućila moj ulazak u istraživački svijet.

Većina istraživanja doktorskog rada provedena je na Zavodu za fizikalnu kemiju i Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Zahvaljujem svim zavodskim i ostalim kolegama s kojima sam dijelio mnoge znanstvene i prijateljske trenutke.

Istraživanja bioloških svojstava provedena su u suradnji sa Zavodom za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zahvaljujem dr. sc. Maji Antunović i izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić na vrlo uspješnoj suradnji.

Istraživanja mehaničkih svojstava provedena su u *Centre for Biomaterials and Tissue Engineering, Polytechnic University of Valencia*, Valencija, Španjolska. Zahvaljujem prof. dr. sc. Gloriji Gallego Ferrer na suradnji i ugodnom istraživačkom boravku u Valenciji.

Najveće hvala mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na profesionalnom vođenju, učenju, savjetima i pomoći, srdačnosti i strpljivosti kojima je oblikovala moj put. Također, zahvaljujem voditelju projekta prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću na savjetima i idejama.

Veliko hvala mojoj obitelji na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci kojom me prate tijekom obrazovanja.

Hvala svima koji su živjeli doktorat sa mnom!

Sažetak

Koštana oštećenja koja ne mogu zacijeliti normalnim metabolizmom koštanog tkiva u medicini se uobičajeno tretiraju metalnim implantatima koji okolnom tkivu pružaju mehaničku potporu prilikom regeneracije. Nedostatci uobičajenih implantata su mogućnost imunološke reakcije na strano tkivo i potreba za operativnim procesom uklanjanja inertnog implantata nakon završetka regeneracije koštanog oštećenja. Inženjerstvo koštanog tkiva posvećuje veliku pozornost razvoju koštanih nadomjestaka temeljenih na biomaterijalima koji zbog sličnih svojstava s prirodnim tkivom aktivno sudjeluju u metabolizmu koštanog tkiva. Idealan nosač treba biti biokompatibilan i bioaktivan, što znači da ga tijelo ne prepoznaje kao strani materijal i da stvara fizikalno-kemijske veze koje potiču cijeljenje kosti s čvrstim vezanjem za koštano tkivo. Također, bitno je da se nosač biološkim procesom remodeliranja zdrave kosti razgrađuje na netoksične komponente, dok cijelo vrijeme služi kao mehanička i strukturna potpora oštećenom tkivu. Kalcijevi fosfati (CaP) zbog sličnosti s anorganskom komponentom koštanog tkiva najistraživaniji su biomaterijali za primjenu koštanih nadomjestaka. Biomimetičkim pristupom, korištenjem skeleta vodenih beskralježnjaka kao biogenog izvora, moguće je sintetizirati koštani nadomjestak koji je biokemijski, mineraloški i strukturno vrlo sličan ljudskoj kosti. Uz Ca^{2+} , PO_4^{3-} i OH^- ione, koštani kalcij-fosfatni materijal sadrži brojne ione koji imaju velik utjecaj na svojstva koštanog tkiva. Korištenjem polimernih biorazgradljivih materijala moguće je utjecati na svojstva CaP-a i dobiti kompozitni nosač koji oponaša anorgansko-organski kompozitni materijal prirodnog koštanog tkiva.

U sklopu istraživanja ovog doktorskog rada hidrotermalnom reakcijom pri 200 °C nakon 48 sati sintetizirani su magnezijem i stroncijem supstituirani CaP nosači. Korištenjem kalcij-karbonatne strukture sipine kosti, amonij dihidrogenfosfata ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), stroncij nitrata ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$), magnezij klorid heksahidrata ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) ili magnezij perklorata ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) kao reaktanata dobiveni su dvofazni trodimenzionalni visokoporozni nosači hidroksiapatita (HAp) i vitlokita (WH). Kompozitni nosači pripremljeni su vakuuskom impregnacijom poli(ϵ -kaprolaktona) na površinu CaP matrice.

Utjecaj udjela Mg^{2+} i Sr^{2+} iona na sastav i morfološka svojstva pripremljenih nosača ispitan je rendgenskom difrakcijom praha, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama, termogravimetrijskom analizom i elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM) s energijski razlučujućom rendgenskom analizom. Dodatak Mg^{2+} utječe na formiranje nove kristalne faze, WH. Strukturna utočnjavanja provedena Rietveldovom metodom ukazuju da se Mg^{2+} i Sr^{2+} preferirano ugrađuju u strukturu WH. SEM mikrografi pripremljenih uzoraka pokazuju da je međusobno povezana visokoporozna struktura sipine kosti u potpunosti očuvana nakon hidrotermalne sinteze. Mg^{2+} ioni smanjuju dimenziju površinskih mikrosfera karakterističnih za hidroksiapatit. Rezultati mehaničke analize primjenom tlačnog opterećenja pokazuju da WH ima pozitivan utjecaj na mehanička svojstva CaP nosača. Površinska tanka prevlaka poli(ϵ -kaprolaktona) ravnomjerno prekriva površinu nosača i poboljšava mehanička svojstva kompozitnih nosača za jedan red veličine u odnosu na CaP nosače.

Ispitivanjem stanične vijabilnosti dokazano je da supstituirani CaP nosači nisu citotoksični. Provedene su stanične kulture ljudskim mezenhimskim matičnim stanicama (engl. *human mesenchymal stem cells*, hMSC) *in vitro* na CaP i kompozitnim nosačima u osteogenom mediju u trajanju od 21 dana. Imunohistokemijsko bojenje pokazuje da Mg-CaP nosači s masenim omjerom HAp : WH 90 : 10 i 70 : 30 pokazuju veću ekspresiju kolagena tipa I i osteokalcina nego čisti HAp nosač. Nastanak kalcijevih depozita potvrđen je bojenjem s alizarinskim crvenilom. Pozitivan utjecaj Mg^{2+} iona na diferencijaciju matičnih stanica na poroznom 3D CaP nosaču potvrđen je i kvantifikacijom ekspresije gena svojstvenih za osteogenu aktivnost (alkalne fosfataze, koštanog sijaloproteina i proteina matrice dentina) korištenjem kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. U odnosu na kompozitni nosač supstituiran Mg^{2+} ionima, kompozitni nosač kosupstituiran Mg^{2+} i Sr^{2+} ionima pokazao je veću ekspresiju kolagena tipa I i pozitivan utjecaj stroncija na rani stupanj osteogene diferencijacije matičnih stanica.

Ključne riječi: hidroksiapatit, magnezij, matične stanice, poli(ϵ -kaprolakton), sipina kost, stroncij, supstitucija, visokoporozni nosač, vitlokit

Abstract

Bone defects that cannot heal with normal bone tissue metabolism in medicine are usually treated with metal implants that provide mechanical support to nearby tissue during the regeneration process. Drawbacks of conventional implants are the possibility of an immunologic reaction to foreign tissue and need for a postoperative process where the inert implant is removed after complete bone regeneration. Bone tissue engineering dedicates great attention to the development of bone scaffolds based on biomaterials that actively participate in bone tissue metabolism due to properties similar to natural tissue. The ideal scaffold should be biocompatible and bioactive, which means that the organism does not recognise it as foreign material and it forms physicochemical bonds that promote bone healing with tight attachment to bone tissue. Additionally, it is essential that the scaffold is degradable with biological remodelling process to nontoxic components, while providing mechanical and structural support to damaged tissue the whole time. Calcium phosphates (CaP), due to their similarity to the inorganic component of bone tissues, are the most researched biomaterial for bone substitute applications. With a biomimetic approach, use of aqueous invertebrates' skeletons as a biogenic source, it is possible to synthesise bone substitutes that biochemically, mineralogically and structurally resemble the human bone. Besides Ca^{2+} , PO_4^{3-} and OH^- ions, bone calcium-phosphate materials consist of numerous ions that have a great effect on the bone tissue properties. With biodegradable polymer materials, it is possible to affect the CaP properties and synthesise a composite scaffold that resembles inorganic-organic composite material of natural human tissue.

Within the research of this doctoral thesis, magnesium and strontium substituted CaP scaffolds are synthesised by a hydrothermal reaction at 200 °C after 48 h. Using the calcium-carbonate structure of the cuttlefish bone, ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), strontium nitrate ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$), magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) or magnesium perchlorate ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) as reagents, biphasic three-dimensional highly porous scaffolds based on hydroxyapatite (HAp) and whitlockite (WH) are obtained. Composite scaffolds are prepared by a vacuum impregnation of poly(ϵ -caprolactone) to the surface of the CaP matrix.

The effect of Mg^{2+} and Sr^{2+} ions content on the compositional and morphological properties of scaffolds was studied by means of X-ray powder diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy (SEM) with energy-dispersive X-ray analysis. The addition of Mg^{2+} affects the formation of new crystalline phase, WH. Structural refinements performed by the Rietveld method indicate that Mg^{2+} and Sr^{2+} were preferentially incorporated into the WH phase structure. SEM micrographs of prepared samples showed that the interconnected highly porous structure of the cuttlefish bone was completely maintained after the hydrothermal synthesis. Mg^{2+} ions reduce the dimension of surface microspheres characteristic for hydroxyapatite. Mechanical analysis results of compression tests showed a positive impact of the WH on the mechanical properties of CaP scaffolds. The thin surface layer of poly(ϵ -caprolactone) covers the scaffold surface evenly, enters the structure of spherical clusters and, in comparison to CaP scaffolds, enhances the mechanical properties of composite scaffolds by one order of magnitude.

Cell viability tests proved that substituted CaP scaffolds are not cytotoxic. *In vitro* cell cultures with human mesenchymal stem cells (hMSC) are conducted on CaP and composite scaffolds in osteogenic medium for 21 days. Immunohistochemical staining showed that Mg-CaP scaffolds with the HAp : WH wt. ratio of 90 : 10 and 70 : 30 exhibited higher expression of collagen type I and osteocalcin than the pure HAp scaffold. Calcium deposition was confirmed by Alizarin Red staining. The positive effect of Mg^{2+} ions on the differentiation of stem cells on porous 3D scaffolds was also confirmed by quantification of gene expression inherent to osteogenic activity (alkaline phosphatase, bone sialoprotein and dental matrix protein) with real-time quantitative polymerase chain reaction analysis. In comparison to composite scaffold substituted with Mg^{2+} , composite scaffold cosubstituted with Mg^{2+} and Sr^{2+} showed higher expression of collagen I and the positive effect of strontium on the early stage of stem cells differentiation.

Key words: cuttlefish bone, highly porous scaffold, hydroxyapatite, magnesium, poly(ϵ -caprolactone), stem cells, strontium, substitution, whitlockite

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Cilj rada..... | 2 |
| 2. OPĆI DIO | 4 |
| 2.1. Koštano tkivo..... | 6 |
| 2.2. Bioaktivna keramika | 7 |
| 2.2.1. Primjena bioaktivne keramike..... | 10 |
| 2.3. Hidroksiapatit | 13 |
| 2.3.1. Ionske supstitucije koštanog apatita | 15 |
| 2.3.2. Supstitucija hidroksiapatita metalnim ionima | 16 |
| 2.3.2.1. <i>Magnezij</i> | 16 |
| 2.3.2.2. <i>Stroncij</i> | 18 |
| 2.3.2.3. <i>Kosupstitucija magnezijevim i stroncijevim ionom</i> | 20 |
| 2.4. Postupci pripreme hidroksiapatita | 21 |
| 2.4.1. Biomimetički pristup | 23 |
| 2.4.2. Hidroksiapatit iz sipine kosti..... | 25 |
| 2.5. Kompozitni trodimenzionalni nosači..... | 27 |
| 2.5.1. Polimerni materijali u inženjerstvu koštanog tkiva | 29 |
| 2.5.2. Poli(ϵ -kaprolakton) | 30 |
| 2.6. Ispitivanje bioloških svojstava <i>in vitro</i> | 32 |
| 2.6.1. Ispitivanje stanične vijabilnosti | 32 |
| 2.6.2. Ispitivanje bioaktivnosti..... | 33 |
| 2.6.2.1. <i>Uloga mezenhimskih stanica u osteogenezi</i> | 33 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 35 |
| 3.1. Materijali | 35 |
| 3.2. Priprava kompozitnih nosača | 35 |
| 3.2.1. Sinteza poroznih CaP nosača | 35 |
| 3.2.2. Priprava metalnim ionima supstituiranih CaP nosača | 36 |
| 3.2.3. Priprava kompozitnih nosača vakuumskom impregnacijom | 37 |
| 3.3. Karakterizacija materijala | 37 |
| 3.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza | 37 |
| 3.3.1.1. <i>TOPAS i Rietveldova metoda</i> | 38 |
| 3.3.2. Vibracijska spektroskopija | 39 |
| 3.3.3. Termogravimetrijska analiza..... | 39 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.3.4. | Elektronska pretražna mikroskopija | 39 |
| 3.3.5. | Određivanje mehaničkih svojstava | 40 |
| 3.4. | Određivanje bioloških svojstava staničnim kulturama <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.4.1. | Citotoksičnost | 41 |
| 3.4.2. | Kultura hMSC <i>in vitro</i> u trodimenzionalnim statičnim uvjetima..... | 42 |
| 3.4.2.1. | <i>Izolacija i proliferacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica</i> | 42 |
| 3.4.2.2. | <i>Osteogena diferencijacija hMSC</i> | 43 |
| 3.4.2.3. | <i>Imunohistokemijska detekcija kolagena tipa I i osteokalcina</i> | 43 |
| 3.4.2.4. | <i>Histološka analiza</i> | 44 |
| 3.4.2.5. | <i>Izolacija ukupnog RNA i RT-qPCR analiza</i> | 44 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 45 |
| 4.1. | Magnezijem supstituirani hidroksiapatit | 45 |
| 4.1.1. | Rendgenska difrakcijska analiza | 46 |
| 4.1.1.1. | <i>Kvantitativna analiza i utočnjavanje strukture</i> | 47 |
| 4.1.2. | Vibracijska spektroskopija | 54 |
| 4.1.3. | Termogravimetrijska analiza | 56 |
| 4.1.4. | Analiza mikrostrukture | 57 |
| 4.1.5. | Određivanje bioloških svojstva | 60 |
| 4.1.5.1. | <i>Određivanje citotoksičnosti</i> | 60 |
| 4.1.5.2. | <i>Imunološka ispitivanja diferencijacije ljudskih matičnih stanica</i> | 61 |
| 4.1.5.3. | <i>Kvantitativna evaluacija osteoindukcije</i> | 65 |
| 4.2. | Supstitucija stroncijem i kosupstitucija magnezijem i stroncijem..... | 67 |
| 4.2.1. | Rendgenska difrakcijska analiza | 67 |
| 4.2.1.1. | <i>Kvantitativna analiza i utočnjavanje strukture</i> | 68 |
| 4.2.2. | Vibracijska spektroskopija | 71 |
| 4.2.3. | Termogravimetrijska analiza | 73 |
| 4.2.4. | Analiza mikrostrukture | 74 |
| 4.2.5. | Citotoksičnost | 75 |
| 4.3. | Karakterizacija kompozitnih nosača | 76 |
| 4.4. | Određivanje mehaničkih svojstva | 81 |
| 4.5. | Ispitivanje osteogenih svojstava kompozitnih nosača | 85 |
| 5. | ZAKLJUČAK | 89 |
| 6. | LITERATURA..... | 90 |
| | Životopis | 102 |

1. UVOD

Kalcij-fosfatna (CaP) keramika je zbog svoje sličnosti s prirodnim koštanim tkivom opsežno istraživana i primjenjivan materijal za koštane nadomjestke [1–4]. Iako se metalni implantati tradicionalno koriste za rješavanje unutarnjih prijeloma i pri oporavku koštanih oštećenja koja ne mogu zacijeliti sami od sebe, neki od njihovih glavnih nedostataka jesu nepotpuno zacjeljivanje zbog širenja stresa, inertnosti materijala i mogućnost imunološke reakcije na strano tijelo te potreba za kirurškim uklanjanjem implantata [5]. Korištenjem biokompatibilnih, bioaktivnih i biorazgradljivih koštanih nadomjestaka na temelju kalcij-fosfatnih materijala nadilaze se nedostaci uobičajenih komercijalnih materijala temeljenih na metalnim ili inertnim keramičkim materijalima.

Uz najistraživaniji hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), dvofazne smjese HAp-a i srodnih kalcij-fosfata privukle su značajnu pažnju zbog biokompatibilnosti i mogućnosti modifikacije svojstava materijala. S ciljem boljeg oponašanja prirodnog koštanog tkiva, ionske supstitucije unutar apatitne kristalne rešetke općenito su prihvaćena praksa. Nekoliko preglednih radova objavljeno je na temu ionima supstituiranih kalcij-fosfatnih materijala [6–9].

Mineralni dio kosti sastoji se od prirodnog nestehiometrijskog kalcijem deficitnog karbonatnog hidroksiapatita supstituiranog brojnim ionima koji bitno utječu na funkcionalna svojstva materijala. Mg^{2+} ion je zbog uloge u metabolizmu kosti [10] privukao značajan istraživački interes u području biomaterijala. Nedostatak magnezija može rezultirati smanjenjem koštane mase, smanjenjem rasta kosti i osteoporozom. Stroncij, iako unutar ljudskog tijela jedan od minerala u tragovima, ima značajnu biološku ulogu u održavanju koštane mase i procesu obnove koštanog tkiva [11,12].

Istraživanja ovog doktorskog rada nastavak su rada istraživačke grupe Ivanković i suradnika [13–30] u području pripreme kompozita na temelju kalcij-fosfatnih materijala i biorazgradljivih polimera za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Korištenjem sipine kosti, prirodni je aragonit hidrotermalno transformiran u HAp, očuvana je visokoporozna međupovezana makroporoznost strukture te je potvrđena biokompatibilnost i bioaktivnost pripremljenih nosača.

Sipina kost jeftini je svjetski dostupan prirodni materijal visoke čvrstoće, visoke poroznosti (~ 90 %) i visoke međupovezanosti pora te može poslužiti kao izvor biomimetičke

strukture za pripremu koštanih nadomjestaka. Visoka poroznost i međupovezanost pora neophodni su za nosače u inženjerstvu koštanog tkiva, omogućuju migraciju i jednoliku raspodjelu stanica, vaskularizaciju i adekvatan transport nutrijenata, kisika i metaboličkih produkata. Hidrotermalna sinteza jednostupnjevita je postupak koji se odvija pri relativno blagim reakcijskim uvjetima u usporedbi s konvencionalnim keramičkim procesom u čvrstom stanju. U svrhu poboljšanja mehaničkih svojstava, glavnog nedostatka koštanih nadomjestaka temeljenih na kalcij-fosfatnim materijalima, korišteni su različiti biorazgradljivi polimeri za proizvodnju kompozitnih nosača s poboljšanim mehaničkim i ostalim primjenskim svojstvima.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog doktorskog rada pripremiti je biokompatibilni kompozitni materijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Pozornost je usmjerena na istraživanje utjecaja supstitucije kalcij-fosfatne faze ionima magnezija i stroncija na primjenska svojstva nosača.

Pripremljeni su i karakterizirani kompozitni nosači na temelju ionima supstituiranih kalcijevih fosfata i biorazgradljivoga polimera poli(ϵ -kaprolaktona). Hipoteza istraživanja je da će materijal svojim mineraloškim i elementarnim sastavom, visokoporoznom međupovezanom strukturom i biološkim odazivom određenim na temelju kulture *in vitro* oponašati anorgansku komponentu ljudske kosti. Biorazgradljivi polimerni površinski sloj trebao bi poboljšati mehanička svojstva kalcij-fosfatne keramike temeljene na ionima supstituiranome hidroksiapatitu i podupirati strukturu prilikom razvoja koštanog tkiva.

Kompozitni nosač bi kao trodimenzionalna struktura trebao nadomjestiti oštećeno koštano tkivo koje zbog koštane traume, upale ili pojave tumora ne može zacijeliti. Pripremljeni nadomjestak mora u potpunosti biti biokompatibilan s koštanim tkivom, pružati strukturu za prijanjanje, rast i diferencijaciju matičnih stanica. Materijal bi u potpunosti trebao biti biorazgradljiv i netoksičan, a brzina razgradnje takva da prilikom cijelog procesa remodeliranja i zacjeljivanja koštanog oštećenja nadomjestak pruža zadovoljavajuća mehanička svojstva i strukturni okvir za razvoj novog koštanog tkiva.

Tijek istraživačkog rada može se podijeliti na sljedeće cjeline:

- Sinteza visokoporozne strukture temeljene na hidroksiapatitu supstituiranom metalnim ionima uz korištenje hidrotermalne transformacije sipine kosti
- Sustavno istraživanje utjecaja udjela Mg^{2+} i Sr^{2+} iona na kemijski sastav, kristalografska, mikrostrukturalna i mehanička svojstva kalcijevih fosfata
- Priprava i karakterizacija kompozitnih nosača temeljenih na metalnim ionima supstituiranom hidroksiapatitu i poli(ϵ -kaprolaktonu)
- Ispitivanje toksičnosti i određivanje osteogenog potencijala pripremljenih nosača korištenjem ljudskih mezenhimskih matičnih stanica

2. OPĆI DIO

Sve duži životni vijek ljudi i poboljšanje kvalitete zdravstvenog sustava pred inženjerstvo koštanog tkiva stavljaju zahtjev za razvojem naprednih koštanih biomaterijala. Pojam „biomaterijal“ s vremenom je poprimao i dobivao sve složenije značenje. Krajem 20. stoljeća znanstvenici su se dogovorili da se biomaterijalom definira sintetski ili prirodni materijal koji se koristi za zamjenu dijelova živog sustava ili ima određenu funkciju u direktnom kontaktu s živim tkivom [31]. Od prvotnog pokušaja definiranja, redovito se proširuje i unaprjeđuje definicija. Biomaterijal je supstanca koja može poprimiti oblik, samostalno ili kao dio kompleksnog sustava, koja se u kontroliranoj interakciji direktno koristi u živom organizmu i prisustvuje u terapijskom ili dijagnostičkom postupku u ljudskoj ili veterinarskoj medicini [32].

Kako se prilikom priprema biomaterijala prolazi kroz korake sinteze i obrade materijala te oblikovanja i proizvodnje konačnog produkta, potrebno je razumijevanje sinergijskih interakcija iz područja znanosti o materijalima, biologije, kemije, medicine i tehničkih znanosti. Da bi se potencijalni implantat zadovoljavajuće ponašao u živom organizmu i u što manjoj mjeri smetao u normalnom funkcioniranju tijela važan je interdisciplinarni pristup [33,34]. Primjena *in vivo* temeljni je cilj razvoja biomaterijala, a povezivanje znanja iz područja molekularne biologije, histologije, anatomije i fiziologije sastavni dio istraživanja biomaterijala.

Inženjerstvo tkiva (engl. *tissue engineering*) interdisciplinarno je područje koje primjenjuje znanja iz inženjerskih i biomedicinskih znanosti, upotrebljava stanice, različite materijale i metode, prikladne biokemijske i fizikalno-kemijske faktore za razvoj nadomjestaka s ciljem obnove, održavanja, poboljšanja ili zamjene različitih bioloških tkiva i organa [35]. Cilj inženjerstva koštanog tkiva (engl. *bone tissue engineering*, BTE) kreirati je koštani nadomjestak (engl. *scaffold*) za oporavak kritičnih koštanih defekata koji ne mogu zacijeliti sami od sebe, a posljedica su gubitka kosti uslijed trauma, upala ili pojave tumora.

Metalni implantati tradicionalno se koriste za rješavanje unutarnjih prijeloma. Jedan od glavnih nedostataka nepotpuno je zacjeljivanje zbog njihovog preuzimanja glavine opterećenja (engl. *stress shielding*) te potreba za kirurškim uklanjanjem implantata. Potencijalno rješenje je korištenje biorazgradljivih materijala koji su manje kruti i ne zahtijevaju kirurško uklanjanje. Dodatna prednost je postepeni prijenos opterećenja s implantata na kost kako implantat gubi čvrstoću, dopuštajući postepenu remodelaciju kosti što smanjuje vjerojatnost ponovnog loma.

Da bi se postigao željeni cilj rekonstrukcije koštanog tkiva, nosač mora zadovoljiti specifična svojstva. Mora imati zadovoljavajuću površinsku hrapavost za prihvat i umnažanje stanica. Mehanička čvrstoća neophodna je da nosač izdrži tlačne sile i omogući remodeliranje oštećenog tkiva. Visoka poroznost i odgovarajuća dimenzija pora veoma su bitne za migraciju stanica, vaskularizaciju i difuziju nutrijenata. Stoga, nosači trebaju imati visoko međusobno povezanu poroznu strukturu tvorenu od kombinacija makro- i mikropora, gdje više od ~ 60 % pora mora biti u rasponu od 150 – 400 μm i najmanje 20 % pora manjih od 20 μm [33].

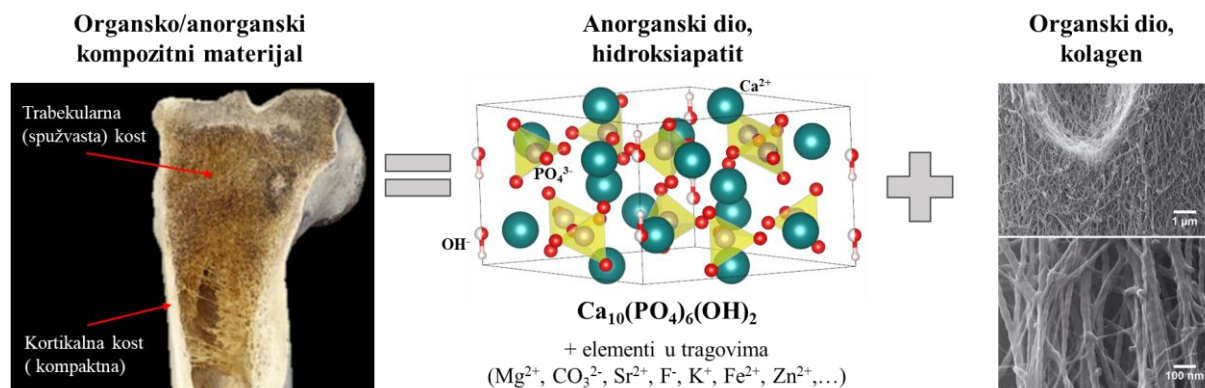
Bioaktivni materijal potaknuti će stvaranje površinskog sloja biološkog apatita što će rezultirati izravnim vezivanjem s prirodnom kosti. Nadalje, nosač treba biti načinjen od materijala s kontroliranom bioresorpcijom i biorazgradljivošću, poput kalcij-fosfata, tako da omogući urastanje novonastalog tkiva u materijal nadomjestka i da nakon procesa zacjeljivanja nova kost u potpunosti zamijeni nosač. Produkti razgradnje nosača ne smiju biti toksični, a sami proces resorpcije mora biti što više u skladu s procesom formiranja kosti (između nekoliko mjeseci i dvije godine ovisno o poziciji i ulozi kosti [36]). Implantat služi kao privremeni nadomjestak i strukturna osnova koja pruža potporu rastu stanica i održavanju metabolizma koštanog tkiva, sve dok novo formirano koštano tkivo u potpunosti ne preuzme prirodno mehaničko opterećenje. Uz sve to, poželjno je da se nosač može lako pripremiti u različitim veličinama i oblicima. U konačnici, tijekom procesa sterilizacije ne smije doći do promjene ili gubitka svojstava nosača. Stoga, svaki nadomjestak mora zadovoljiti mnoga svojstva i funkcije prije, tijekom i nakon ugradnje.

2.1. Koštano tkivo

Jedan od ciljeva inženjerstva koštanog tkiva razviti je materijal što sličniji prirodnoj kosti. Na slici 1 prikazan je presjek kosti. Kost se može podijeliti na dva strukturno i funkcionalno različita tipa [37–39]:

- Kortikalna kompaktna kost – debeli i gusti dio koji služi za održavanje mehaničke funkcije na koju se vežu ligamenti i tetive
- Trabekularna spužvasta kost – visokoporozni metabolički aktivan dio unutar kojeg se nalazi koštana srž.

Kortikalna (kompaktna) kost sastoji se od 69 % minerala, 22 % organske matrice i 9 % vode [40]. Kolagen čini i do 90 % organskog dijela kosti i pruža strukturu unutar koje su smješteni biološki kalcijevi fosfati. Mineralni dio kosti sastoji se od prirodnog nestehiometrijskog hidroksiapatita koji sadrži različite supstituente i kosti daje mehaničku potporu i čvrstoću. Kristali kosti su ekstremno mali, s prosječnom dužinom od 50 nm (u rasponu 20 – 150 nm), prosječno široki 25 nm (raspon 10 – 80 nm) i debljinom od samo 2 – 5 nm [39]. Kao primjetna posljedica, velik dio svakog kristala predstavlja njegova površina zbog čega imaju izvanrednu sposobnost interakcije s okolinom.



Slika 1. Presjek kosti (prirodnog organsko/anorganskog kompozitnog materijala) s označenim područjem trabekularne (spužvaste) i kortikalne (kompaktna) kosti [41]. Koštano tkivo sastoji se od anorganskog dijela, nestehiometrijskog supstituiranog kalcijem deficitnog hidroksiapatita [42,43], i organskog dijela, kojeg većinski čine kolagenska vlakna [44].

Koštano tkivo otvrdnuta je izvanstanična matrica koja pruža potpurnu funkciju organizmu. Osnovna komponenta koštanog tkiva jesu stanice i matrica. Iako koštane stanice čine manji dio volumena kosti, imaju presudnu funkciju u procesu osteogeneze (stvaranja koštanog tkiva). Unutar koštanog tkiva nalaze se četiri tipa stanica [38]:

- Osteogene stanice – nediferencirane matične stanice iz kojih nastaju osteoblasti
- Osteoblasti – mononuklearne stanice koje sintetiziraju koštanu matricu
- Osteociti – zrele koštane stanice koje održavaju strukturu i funkciju kosti
- Osteoklasti – multinuklearne stanice koje razlažu koštanu matricu

Stanična diferencijacija proces je u kojem stanice mijenjaju stanični tip. Osteoblasti i osteociti nisu sposobni za mitozu – nastaju diferencijom iz osteogenih stanica, a razlažu ih osteoklasti, koji nastaju iz monocita i makrofaga (dva tipa bijelih krvnih stanica). Osteoklasti kontinuirano razlažu koštano tkivo, dok osteoblasti kontinuirano tvore novu kost. Ravnoteža aktivnosti osteoblasta i osteoklasta odgovorna je za konstantno preoblikovanje kosti [38,45,46].

2.2. Bioaktivna keramika

Glavni poticaj za istraživanje i korištenje kalcij-fosfata kao materijala za nadomjestak koštanog tkiva jest njihova kemijska sličnost mineralnoj komponenti kosti sisavaca i zubi. Materijali posjeduju svojstva netoksičnosti, biokompatibilnosti – tijelo ih ne prepoznaje kao strani materijal i, najvažnije, pokazuju bioaktivnost te se integriraju u živo koštano tkivo istim procesom prirodnog remodeliranja zdrave kosti. Navedena svojstva dovode do osteointegracije, fizikalno-kemijske veze između implantata i kosti [47]. Poznato je da CaP-i potiču adheziju i proliferaciju osteoblasta [48]. Međutim, uz sve to, glavno ograničenje njihove primjene u medicini jesu slaba mehanička svojstva; CaP biomaterijali vrlo su lomljivi, ne mogu se primijeniti na mjestima s velikim mehaničkim opterećenjima te se primarno koriste kao punila i prevlake [1,47].

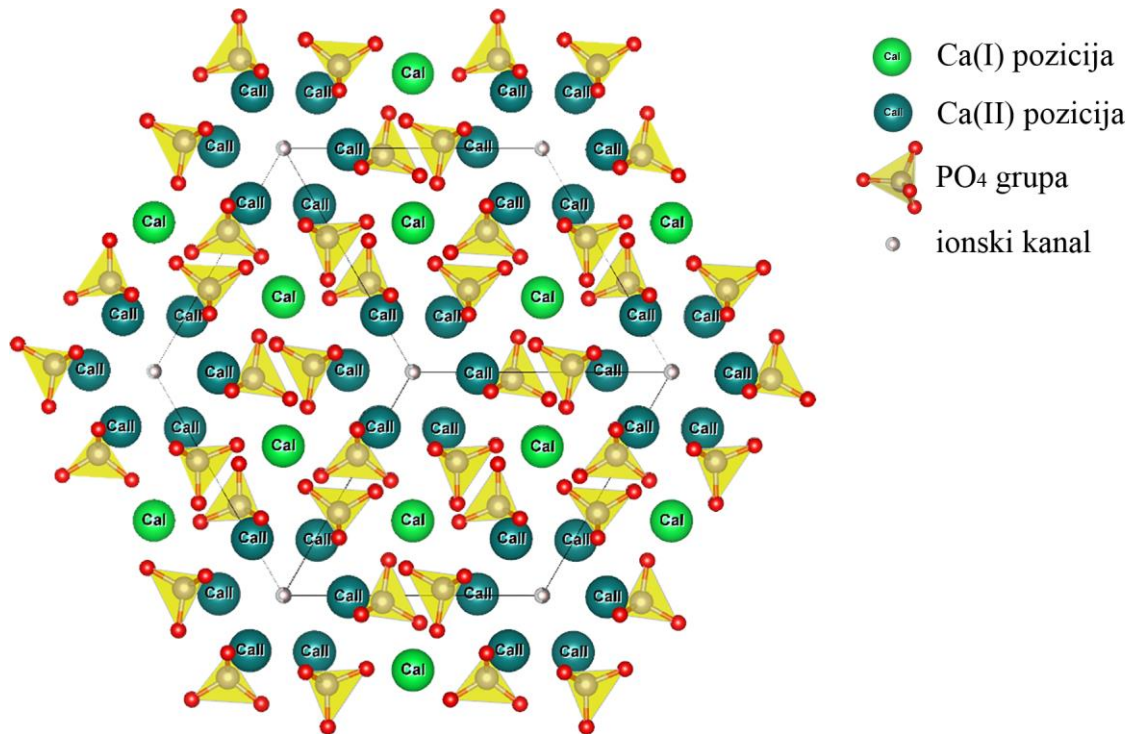
Tablica 1 prikazuje kalcijeve fosfate s pripadajućom kemijskom formulom i strukturnim karakteristikama koji se najčešće spominju u kontekstu inženjerstva koštanog tkiva i području biomaterijala. Među navedenim kalcijevim fosfatima samo su neki prikladni za primjenu u medicini. Oni s Ca/P omjerom manjim od 1 uopće nisu prikladni za implantate zbog svoje velike topljivosti i kiselosti, kao ni tetrakalcij-fosfat zbog svoje bazičnosti. Međutim, prilikom korištenja u medicini ti „neprikladni“ kalcijevi fosfati mogu se uspješno kombinirati s ostalim kalcijevim fosfatima ili drugim materijalima [33].

Tablica 1. Glavni kalcij-fosfatni spojevi s pripadajućim kemijskim formulama i strukturnim karakteristikama [49].

| Naziv i kemijska formula | Kratica i mineraloško ime | Strukturna karakteristika (dimenzije u Å) | Gustoća (g/cm ³) | Ca/P omjer |
|--|---------------------------|--|------------------------------|------------|
| Monokalcij-fosfat monohidrat: Ca(H ₂ PO ₄) ₂ × H ₂ O | MCPM | Trikliniski P $\bar{1}$ $a=5,6261, b=11,889, c=6,4731$ $\alpha=98,633, \beta=118,262, \gamma=83,344$ | 2,23 | 0,5 |
| Monokalcij-fosfat anhidrid: Ca(H ₂ PO ₄) ₂ | MCPA | Trikliniski P $\bar{1}$ $a=7,5577, b=8,2531, c=5,5504$ $\alpha=109,87, \beta=93,68, \gamma=109,15$ | 2,57 | 0,5 |
| Dikalcij-fosfat dihidrat: CaHPO ₄ × 2H ₂ O | DCPD, brušit | Monokliniski Ia $a=5,812, b=15,180, c=6,239$ $\beta=116,25$ | 2,3 | 1 |
| Dikalcij-fosfat anhidrid: CaHPO ₄ | DCPA, monetit | Trikliniski P $\bar{1}$ $a=6,916, b=6,619, c=6,946$ $\alpha=96,18, \beta=103,82, \gamma=88,34$ | 2,93 | 1 |
| Amorfni trikalcij-fosfat: Ca ₃ (PO ₄) ₂ × nH ₂ O | ATCP (ACP) | Ca ₉ (PO ₄) ₆ klasteri, S ₆ simetrija | - | 1,5 |
| Oktakalcij-fosfat: Ca ₈ (PO ₄)(HPO ₄) ₂ | OCP (OCPt) | Trikliniski P $\bar{1}$ $a=19,692, b=9,523, c=6,835$ $\alpha=90,15, \beta=92,54, \gamma=108,65$ | 2,67 | 2,667 |
| β -trikalcij-fosfat: Ca ₃ (PO ₄) ₂ | β -TCP | Trigonalni R3c $a=10,439, b=37,375$ | 3,07 | 1,5 |
| α -trikalcij-fosfat: Ca ₃ (PO ₄) ₂ | α -TCP | Monokliniski P2 ₁ /a $a=12,887, b=27,280, c=15,219$ $\beta=126,20$ | 2,86 | 1,5 |
| Tetrakalcij-fosfat: Ca ₄ (PO ₄) ₂ O | TTCP | Monokliniski P2 ₁ $a=7,023, b=11,986, c=9,473$ $\beta=90,90$ | 3,05 | 2 |
| Hidroksiapatit: Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ | HAp, hidroksiapatit | Heksagonalni P6 ₃ /m $a=9,418, c=6,881$ | 3,16 | 1,667 |

Glavna komponenta kosti jest kalcij-fosfatni mineral koji je po sastavu i strukturi sličan mineralima apatitne grupe, koji se nalaze u Zemljinoj kori [50,51]. Izraz apatit odnosi se na grupu kalcij-fosfatnih minerala koji se mogu opisati kemijskom formulom Ca₅(PO₄)₃(F,OH,Cl) i tema su brojnih interdisciplinarnih istraživanja i primjena, posebice u području mineralogije, geologije, biomineralizacije, medicine i biomaterijala [51]. Svaki mineral ima karakteristična

svojstva koja su posljedica kombinacije kemijskog sastava i strukturnih parametara. Svojstva minerala prirodne kosti, poput gustoće i čvrstoće, posljedica su procesa formiranja čvrstog kristalnog apatita. Da bi se formirao apatit potrebni su svi elementi u određenim količinama, npr. ne samo kalcij, nego i fosfor, kisik i određeni ioni (Cl^- , F^- , OH^- , ...) koji se smještaju u strukturu [50]. Slika 2 prikazuje strukturu apatita s pogledom niz kristalografsku os c .

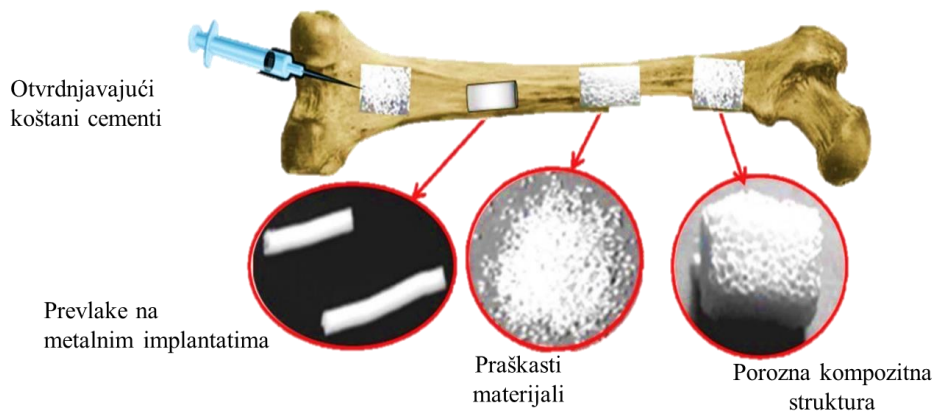


Slika 2. Pogled na strukturu apatita [42] niz kristalografsku c -os pokazuje smještaj tetraedarske PO_4 grupe, kalcijevih iona i „ionskog kanala“. Paralelogram označava granicu kristalografske jedinične ćelije. Svaka kristalografska pozicija (uključujući i ionski kanal) ima određenu veličinu te se stoga ne može bilo koji atom ili ionska grupa smjestiti na svaku poziciju. Vizualizacija strukture dobivena korištenjem programa Vesta [43]. Veličine iona nisu prikazane u realnom odnosu.

Apatiti su znatno fleksibilniji od ostalih minerala, što znači da su vrlo podložni kemijskim supstitucijama. Supstitucija uzrokuje male promjene u strukturi minerala i ima ključan utjecaj na svojstva minerala, poput topljivosti, čvrstoće i toplinske stabilnosti. Pojedine ionske supstitucije u kristalnoj strukturi koštanog apatita mijenjaju svojstva minerala i uvelike utječu na veličinu kristalita i topljivost. Štoviše, ljudsko tijelo modificira topljivost apatita (koštanog apatita, cakline, dentina) putem ionskih supstitucija, na što se može gledati kao ugradnju određenih „nečistoća“ s ciljem postizanja željenih karakteristika. Kristalografski gledano, anorganska komponenta kosti i cakline okarakterizirana je kao mineral hidroksiapatit, koji sadrži hidroksidni ion (OH^-) i ima vrlo specifičnu strukturu i sastav [51].

2.2.1. Primjena bioaktivne keramike

Bioaktivna keramika temeljena na kalcijevim fosfatima značajno se razvila u zadnjim desetljećima; njena primjena se progresivno raširila i postala je najčešće ugrađivani bioaktivni materijal. Jedno od najznačajnijih svojstava CaP materijala njihova je osteokonduktivnost, svojstvo za poticanje cijeljenja kosti i čvrsto vezanje za koštano tkivo. U inženjerstvu koštanog tkiva CaP materijali koriste se za zamjenu oštećenog koštanog tkiva u obliku poroznih keramika, premaza na metalnim protezama i dentalnim implantatima, kompozitnih materijala s organskim makromolekulama te kao injekcijski kalcij-fosfatni cementi u stomatologiji i ortopedskim operacijama (slika 3). Zadnjih godina velika pozornost istraživača usmjerena je i na mnoge druge primjene takvih materijala – za nosače lijekova, cjevčica za rekonstrukciju živaca i adsorpciju supstrata u pojedinim načinima ciljanog liječenja raka [49].



Slika 3. Različiti primjeri biomedicinske primjene kalcij-fosfatne biokeramike [52].

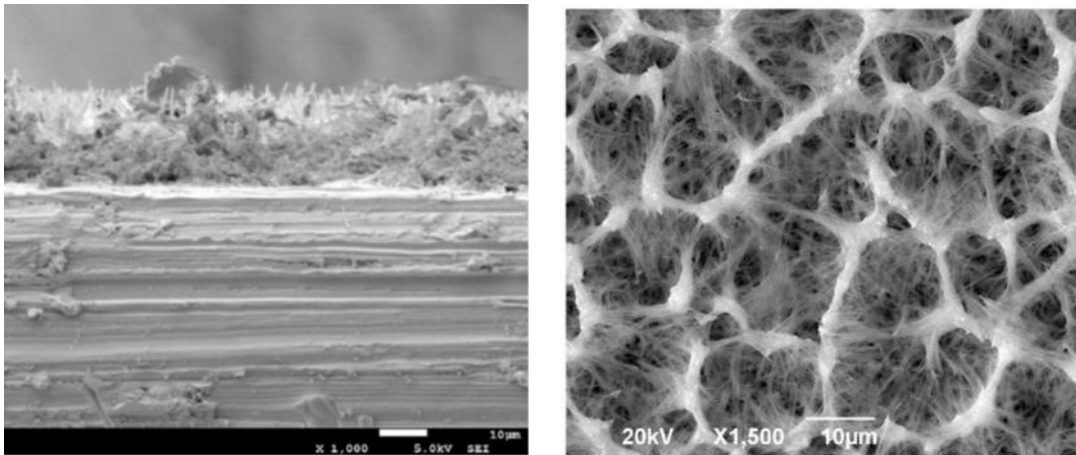
Samootvrdnjavajući koštani cementi

U potrebi za biokeramikom koja zahtijeva minimalno invazivnu operaciju razvijene su samootvrdnjavajuće tvorevine koje se sastoje od kalcijevog fosfata te se primjenjuju injektiranjem i/ili kao koštani nadomjesci koji mogu mijenjati oblik. Općenito se mogu podijeliti na dvije grupe. Prvu grupu čine dva različita kalcijeva fosfata (jedan bazičan, drugi kiseo) gdje se reakcija pokreće namakanjem. Drugu grupu čine oni koji se sastoje od jednog kalcij-fosfatnog spoja, poput amorfnog kalcijevog fosfata s omjerom Ca/P 1,5-1,667 ili od α -trikalcijevog fosfata koji u kontaktu s vodom i tkivom tvore hidroksiapatit. Unatoč velikom broju početnih sastava, sve vrste samootvrdnjavajućih cemenata u konačnici tvore samo dva spoja – kalcijem deficitni hidroksiapatit ili dikalcij-fosfat dihidrat (brušit) [53].

Premazi, filmovi, slojevi

Godinama je klinička primjena kalcij-fosfatne biokeramike većinski bila ograničena na mjesta s malim mehaničkim opterećenjem upravo zbog njihovog najvećeg nedostatka, slabih mehaničkih svojstava, dok se metalni implantati tradicionalno koriste za rješavanje unutarnjih prijeloma. Kako metali ne podliježu kemijsko-biološkom vezanju s kosti, tj. ne tvore mehanički stabilnu vezu između implantata i koštanog tkiva, biokompatibilnost metalnih implantata moguće je poboljšati stavljanjem biokeramičke mikrometarske porozne prevlake na površinu metalnih implantata [54]. Glavni faktori koji utječu na svojstva takvih implantata jesu debljina površinskog premaza (utječe na adheziju sloja i njegovu fiksaciju – optimum između 50 – 100 μm), kristalnost (utječe na topljivost i biološko ponašanje), fazna i kemijska čistoća te poroznost. Premazi kalcij-fosfata smanjuju otpuštanje potencijalno opasnih kemijskih spojeva metalnog implantata i štite njegovu površinu od imunološkog napada [55].

Porozna površina poboljšava razvoj i urastanje kosti u implantata. Klinički rezultati pokazuju da takvi implantati daju znatno veći životni vijek implantata u odnosu na one koji na površini nemaju kalcijeve fosfate, osobito kod mlađih pacijenata [54,56,57]. Iako se biokompatibilnost metalnih implantata uvelike poboljšava stavljanjem mikrometarske porozne prevlake hidroksiapatita na površinu (slika 4), takvi se materijali i dalje ne mogu biološki resorbirati.

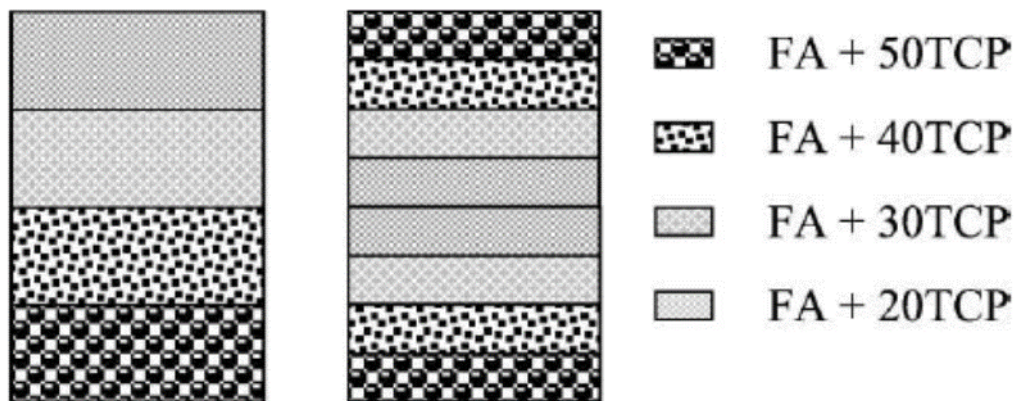


Slika 4. SEM mikrografi kalcij-silikatno/cinkom supstituiranog hidroksiapatitnog kompozita korištenog kao prevlake na titanijevom implantatu [54].

Funkcionalno strukturirana biokeramika

Funkcionalno strukturiranom biokeramikom (engl. *functionally graded bioceramics*) nazivaju se materijali koji imaju različit sastav ili različitu strukturu na površini u odnosu na unutrašnjost materijala. Ideja iza takvih materijala je postizanje odličnih mehaničkih svojstava i biokompatibilnosti. Naime, površinska svojstva utječu na biokompatibilnost cijelog nadomjestka, dok najčvršći materijal gotovo u potpunosti određuje mehanička svojstva cijelog nadomjestka. U određenoj mjeri, prethodno spomenuti premazi, filmovi i slojevi mogu se smatrati funkcionalno strukturiranim biokeramikama. No u smislu ove podjele [33], takvim funkcionalnim materijalima smatraju se materijali koji su u potpunosti načinjeni samo od kalcijevog fosfata. Npr. nosač koji se sastoji od gusto sinterirane hidroksiapatitne unutrašnjosti koji prema površini sadrži sve više α -TCP [58].

Na slici 5 prikazan je shematski prikaz strukture iz istraživanja Wong i sur. [59] gdje je dobiven funkcionalno strukturirani biomaterijal β -TCP-a i fluorapatita (FA) koji je pripremljen na 100 MPa i sinteriran pri 1300 °C i 2 h.

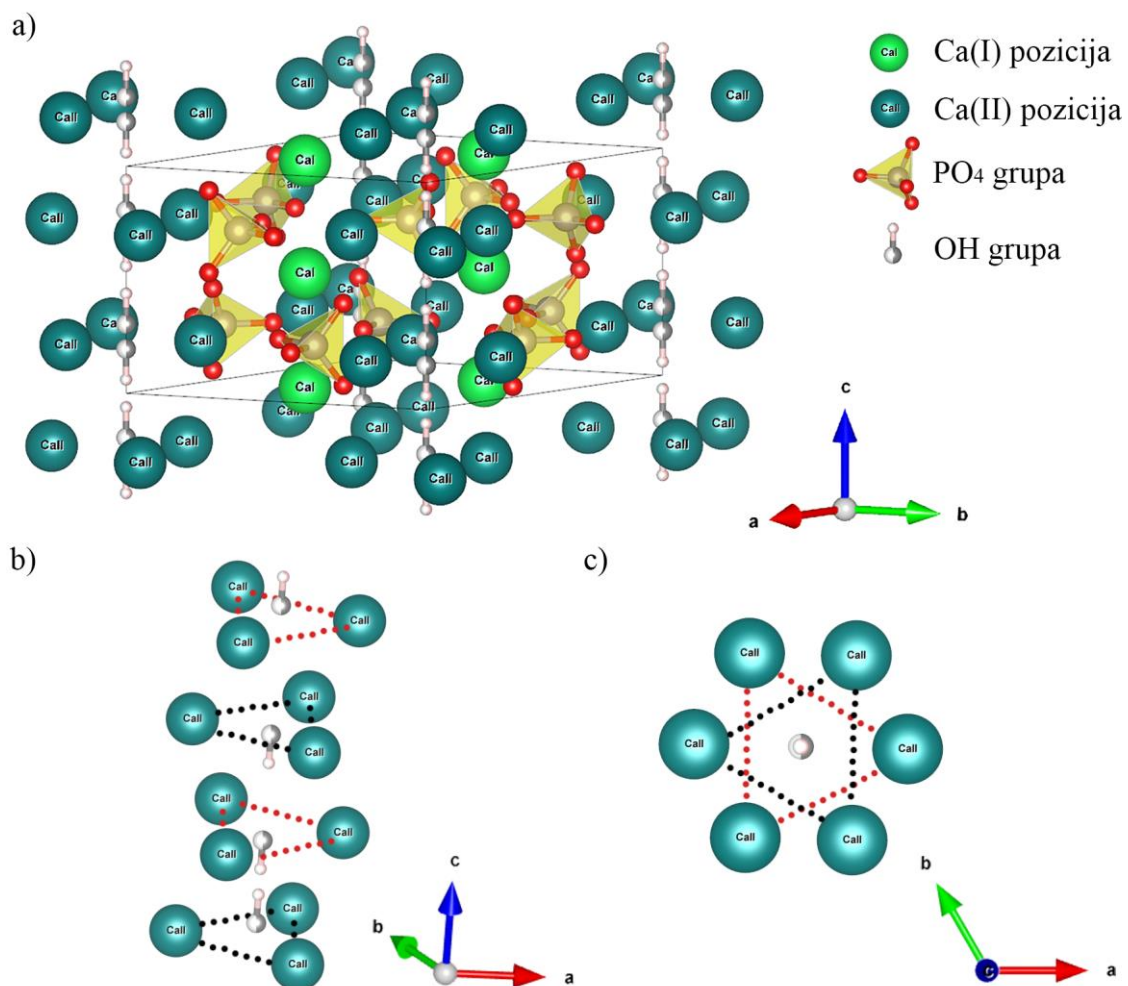


Slika 5. Shematski prikaz fluorapatit/ β -TCP slojevitog biokompozita s nesimetričnim funkcionalno strukturiranim (lijevo) i simetrično strukturiranim materijalom (desno) [59].

Kao što je već spomenuto, glavni nedostaci poroznih nosača temeljenih na kalcijevim fosfatima jesu njihova slaba mehanička svojstva koja onemogućavaju primjenu na mjestima s velikim mehaničkim opterećenjem. Stoga se kalcijevi fosfati u kombinaciji s biorazgradljivim polimernim materijalima mogu koristiti kao punila ili se pokušavaju razviti visoko porozni kompozitni materijali, što otvara vrlo aktualnu i složenu tematiku ovog istraživačkog područja.

2.3. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit je apatitni mineral koji pobuđuje velik interes i kojem se pridaje pozornost u biologiji i znanosti o materijalima. Čisti stehiometrijski hidroksiapatit ima kemijsku formulu $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, odnosno $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kako bi se naznačilo da kristalnu ćeliju čine dvije jedinične formule. HAp kristalizira u heksagonalnoj kristalnoj rešetci s parametrima kristalne rešetke $a = b = 9,43 \text{ \AA}$ i $c = 6,88 \text{ \AA}$ [60]. Prostorna grupa HAp-a je $P6_3/m$ (176) čiji elementi simetrije su rotacijska os šestog reda paralelna s c -osi i $\frac{1}{2}$ translacija niz c -os (vijčana heksagira 6_3) te zrcalna ravnina okomita na rotacijsku i c -kristalografsku os (slika 6).



Slika 6. Vizualizacija strukture Holly Springs hidroksiapatita [42] dobivena korištenjem programa Vesta [43]. a) trodimenzionalni prikaz heksagonalne kristalne rešetke hidroksiapatita, $P6_3/m$ (176). Paralelogram označava granicu jedinične ćelije koja se sastoji od šest PO_4 tetraedara, četiri Ca(I) atoma i šest Ca(II) atoma te dvije OH grupe. b) smještaj Ca(II) atoma oko ionskog kanala. c) pogled na raspored Ca(II) atoma niz kristalografsku os c . Veličine iona nisu prikazane u realnom odnosu.

Kristalografska struktura hidroksiapatita pojednostavljeno se može objasniti postojanjem četiriju različitih kristalografskih pozicija u jediničnoj ćeliji apatita [50,60,61]:

- Tetraedalne pozicije za 6 P^{5+} iona, svaka u koordinaciji s četiri kisika
- Ca(I) pozicija za četiri Ca^{2+} iona
- Ca(II) pozicija za ostalih šest Ca^{2+} iona (poredanih tako da tvore ionski kanal duž kristalografske c -osi)
- ionskog kanala, koji je obično zauzet s dva monovalentna iona (OH^- , F^- i/ili Cl^-).

Od monovalentnih iona F^- se najlakše smješta u ionski kanal jer je njegov ionski radijus dovoljno malen da dopušta najsimetričniji smještaj u ionskom kanalu te je stoga fluorapatit apatit s najvećom kristalografskom simetrijom. Ova činjenica ukazuje da je fluorapatit slabije topljiv od HAp-a i ostalih apatita koji nemaju ione fluora u svojoj strukturi. Zubna caklina u svojoj strukturi ima veći udio fluora u usporedbi s koštanim apatitom – upravo je zbog fluora otpornija na niže pH vrijednosti do kojih dolazi u ustima tijekom konzumacije hrane.

Općenita kemijska formula apatita može se prikazati s $A_{10}(BO_4)_6(C)_2$, gdje mogu biti $A = K^+, Na^+, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Sr^{2+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, \dots$; $B = As^{5+}, P^{5+}, Si^{4+}, V^{5+}, Cr^{5+}, Cr^{6+}, Mn^{5+}, S^{6+}, \dots$; $C = F^-, Cl^-, OH^-, Br^-, O_2^-, O_3^-, O_2^{2-}, O^{2-}, I^-, NCO^-, NO_2^-, \dots$ [39,62]. Supstituenti utječu na parametre kristalne rešetke i svojstva što čini bitnu razliku između sintetskog i prirodnih hidroksiapatita. Broj mogućih ionskih supstitucija u biološkom apatitu manji je nego u geološkom zbog ograničene dostupnosti iona u tijelu.

Zbog kristalne strukture apatita postoje strukturalna ograničenja koliko određenog iona može biti ugrađeno. Što HAp postaje kristalichniji, to su sve teže unutarnje promjene i rast. Važno je naglasiti da je kost vrlo važan sustav za detoksikaciju od teških metala s obzirom na njihovu laku ugradnju u apatit. Teški metali u obliku netopljivih fosfata mogu biti zadržani u tvrdim tkivima bez znatnih promjena u njihovim strukturalnim svojstvima. Mogućnost izmjene iona u ovim strukturama omogućuje znanstvenicima iz područja materijala dizajniranje i karakterizaciju novih i boljih kalcij-fosfatnih materijala za specifične primjene.

Mehanička svojstva HAp-a slična su onima anorganske komponente kosti. Modul elastičnosti hidroksiapatita iznosi 40 – 100 GPa, zubne cakline 74 GPa, dentina (komponente zuba) 21 GPa i kosti 12 – 18 GPa. Gusto nakupljene umjetne tvorevine HAp-a imaju tlačnu čvrstoću reda veličine 100 MPa, dok ljudska kost ima 300 MPa [39]. Vrijednosti su dakako znatno manje, čak i više od jednog reda veličine, kad se govori o vrlo poroznim umjetnim tvorevinama.

2.3.1. Ionske supstitucije koštanog apatita

Poznato je da brzina regeneracije kosti ovisi o nekoliko faktora kao što su poroznost, sastav, topljivost i prisutnost određenih elemenata koji se otpuštaju tijekom resorpcije keramičke komponente, čime olakšavaju regeneraciju kosti koju obavljaju stanice osteoblasta. Uz ione Ca^{2+} , PO_4^{3-} i OH^- , biološki apatiti uvijek sadrže CO_3^{2-} te je potvrđeno postojanje iona u tragovima – F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , citrata i karbonata [39,63,64]. Mineralni sastav varira s godinama i uvijek je prisutan manjak kalcija, s karbonatnim i fosfatnim ionima u kristalnoj rešetci. Formula $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_x(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0,3}$ predstavlja prosječni sastav kosti, kod kojeg se vrijednost y smanjuje, a x povećava sa starenjem, dok vrijednost $x+y$ ostaje konstantna i iznosi 1,7 [39].

Magnezij je jedan od glavnih supstituenata u biološkim apatitima (caklina 0,44 mas. %, dentin 1,23 mas. %, kost 0,72 mas. %) [63]. Do 60 % magnezija u ljudskom tijelu nalazi se u kostima, neophodan je za sprečavanje osteoporoze i oštećenja koštanog tkiva, stimulira razvoj i rast kosti te utječe na izlučivanje vitamina D. Nedostatak u tijelu nadoknađuje se iz koštanih zaliha. Utvrđeno je da je u kalcificiranim tkivima količina magnezija u apatitnoj fazi veća u prvoj fazi stvaranja kosti (~ 5 %) te da opada s napretkom procesa kalcifikacije i sa starošću osobe. Prisustvo magnezija ubrzava kinetiku nukleacije HAp-a, istovremeno usporavajući njegov rast. Povećana koncentracija magnezija u hrskavičnom tkivu i dječjim kostima potvrđuje njegov važan utjecaj na kvalitativne promjene u koštanoj matrici i njenu otpornost na lom. Mlađe kosti i one u razvoju sadrže veće količine silicija, stroncija i cinka koji stimuliraju osteoblaste, a time posljedično nastanak kosti. Uz osiguravanje pravilne mineralizacije kosti, silicij je bitan za održavanje visoke koštane gustoće, stroncij za tretiranje osteoporoze, a cink za funkcioniranje enzima te je potvrđena veza između čvrstoće kosti i njegova udjela [65–67].

Prisutnost karbonatnog iona znatno utječe na omjer Ca/P u biološkim apatitima. Što je viši udio karbonata u strukturi apatita to je veća njegova metabolička aktivnost. Veća topljivost karbonatnog apatita u odnosu na nekarbonatni objašnjava se činjenicom da je Ca- CO_3^{2-} veza slabija nego Ca- PO_4^{3-} veza te je stoga karbonatni apatit podložniji otapanju u kiselim otopinama [50,68]. Tako npr. zubna caklina, koja se smatra inertnim tkivom, sadrži vrlo nizak udio karbonatnog iona u svojoj strukturi kako bi bila otpornija na niži pH, za razliku od kostiju i dentina, koji su vrlo aktivno tkivo. Karbonatni ioni su ili adsorbirani na površini ili su ugrađeni u HAp strukturu. Karbonat se u HAp može supstituirati na mjesto OH^- (A-tip) ili na

poziciju PO_4^{3-} (B-tip). B-tip dominira u ljudskim kostima s udjelom od 2 do 8 mas. % [68], ovisno o starosti osobe, dok se udio A/B-tipa kreće od 0,7 – 0,9 mas. % i nalazi ga se više u starijim nego u mlađim tkivima [69]. B tip supstitucija za posljedicu ima smanjenje a -kristalne osi, stupnja kristalnosti i toplinske stabilnosti, dok utječe na povećanje c -osi, naprezanja unutar kristala i topljivosti [65]. Tijekom testiranja *in vivo* opaženo je smanjenje kristalčnosti i povećanje topljivosti kod B-tipa HAp-a [64]. B-tip karbonatnog HAp-a za razliku od A-tipa pokazuje veći afinitet prema osteoblastnim stanicama budući da ne mijenja polarnost površine HAp-a. Ovo se odražava u većoj staničnoj adheziji i pojačanom stvaranju kolagena [70].

Uz održavanje sveukupne bilance naboja, varijacija sastava hidroksiapatita nije ograničena ako se supstituirana struktura može smjestiti unutar kristalne rešetke. Nedostatak negativnog naboja uzrokovan supstitucijom PO_4^{3-} za CO_3^{2-} ili HPO_4^{2-} grupom nadomješta se gubitkom pozitivnog naboja Ca^{2+} iz strukture. Koštani biološki apatiti uvijek imaju manjak kalcija te se zbog toga tradicionalno nazivaju kalcijem deficitni apatiti – Ca/P omjer je uvijek niži od 1,667, koji odgovara stehiometrijskom apatitu [39,50].

2.3.2. Supstitucija hidroksiapatita metalnim ionima

Iz pogleda znanosti o materijalima, s obzirom na ionsku supstituciju prirodne kosti, neophodna je strukturna karakterizacija ionski supstituiranog HAp-a. U sklopu rada unutar istraživačke grupe Ivanković i sur. [16,24–26,29] sustavno se istražuje utjecaj vrste i količine elemenata u tragovima (npr. Mg, Sr, Zn, Cu, Si) na kemijski sastav, morfologiju, poroznost, kristalografska i mehanička svojstva 3D-nosača. Očekuje se da će detaljno istraženi postupak sinteze dati visokoporozni kompozitni nosač od supstituiranoga hidroksiapatita i biorazgradljivoga polimera sa svojstvima vrlo bliskim onima prirodnog koštanog tkiva.

2.3.2.1. Magnezij

Jednostruka supstitucija omogućuje praćenje utjecaja pojedinog iona na sintezu i strukturnu karakterizaciju. Ugradnja magnezija u sintetički HAp ograničena je ako drugi ioni poput karbonata ili fluora nisu simultano ugrađeni [64,71]. Povećanje koncentracije magnezija smanjuje kristalnost, povećava ugradnju HPO_4^{2-} i povećava područje topljivosti [64].

Za ugradnju Mg^{2+} unutar kristalne rešetke HAp-a, većinom se koristi metoda mokre precipitacije [72–77]. U nekim istraživanjima koristi se mehanokemijska hidrotermalna sinteza [78] i sol-gel metoda [79]. Supstitucija magnezija umjesto kalcija u hidroksiapatitnu strukturu odvija se unutar ograničenog područja (do 10 mas. %), gdje je većina smještena na površinu ili prisutna kao zasebna faza [80,81]. Postoje različiti rezultati o Ca poziciji na koju se Mg^{2+} ion može ugraditi. Istraživanje Laurencin i sur. [82], obavljeno na ~ 10 mol. % Mg-supstituiranom HAp-u pomoću nuklearne magnetske rezonancije ^{43}Ca i Ca K-edge rendgenske absorpcijske spektroskopije, direktno ukazuje da je preferirana pozicija ugradnje Mg na Ca(II) poziciju.

Ugradnja veće količine magnezija smanjuje stabilnost HAp-a i pospješuje nastanak faza bogatijih magnezijem – vitlokita ($Ca_{18}Mg_2(HPO_4)_2(PO_4)_{12}$), magnezijevog β -trikalcijska fosfata ($Ca_{3-x}Mg_x(PO_4)_2$) i magnezijeva oksida [39,50,62,65,71]. Ispitivanjem *in vitro* Serre i sur. [83] pokazali su da je prevelik udio magnezija toksičan za koštane stanice i sprječava njihov nastanak. Navedeno ukazuje da rezultate, s obzirom na pojavu novih kristalnih faza i smanjenja stupnja kristalčnosti, treba uzeti s velikim oprezom, tj. voditi računa o svojstvima ovisno o ciljanom području primjene.

Mg^{2+} ioni igraju veliku ulogu u formiranju vitlokita [84,85]. Sve do nedavno, vitlokit (engl. *whitlockite*, WH, $Ca_9Mg(HPO_4)(PO_4)_6$), iako drugi najzastupljeniji mineral u ljudskoj kosti [86,87] nije značajno istraživao u kontekstu inženjerstva koštanog tkiva.

Kristalna struktura WH-a analogna je onoj β -TCP [88] i izraz vitlokit se vrlo često koristi za označavanje β -TCP. Zbog sličnosti kristalne rešetke i strukture trikalcijska fosfata i vitlokita, unatoč tome što je razlika razjašnjena [89], ta dva pojma se često poistovjećuju i naizmjenice koriste kao sinonimi ili se neispravno identificiraju. Unatoč mogućnosti zamjene, pažnju treba usmjeriti na pravilnu upotrebu imenovanja ova dva minerala. $(Ca_{3-x}Mg_x)(PO_4)_2$ [88] i vitlokit [89,90] imaju sličan difraktogram temeljen na romboedarskoj kristalnoj strukturi, omjeri između aniona i kationa isti su. Međutim, vitlokit je moguće razlikovati po postojanju HPO_4^{2-} grupe unutar strukture i gubitku mase prilikom termičkog raspada iz HPO_4^{2-} u $P_2O_7^{4-}$, te potom u PO_4^{3-} [91]. Izraz vitlokit trebao bi se koristiti za prirodni mineral i sintetski gdje su Mg^{2+} i HPO_4^{2-} ioni prisutni unutar strukture. Potrebno je napomenuti da i nestehiometrijski biološki hidroksiapatit sadrži HPO_4^{2-} grupu te je u slučaju postojanja sustava nestehiometrijskog HAp-a i vitlokita identifikacija otežana. Vitlokit u svoju strukturu može primiti različite količine magnezija. Kako je Mg^{2+} ion manji od Ca^{2+} , tada je i kristalna

rešetka koja sadrži više magnezija manja, što sukladno s Braggovim zakonom znači da će doći do pomaka pikova XRD difraktograma prema višim difrakcijskim kutovima [91].

Jang i suradnici [84,85] pokazali su da čiste WH nanočestice mogu biti formirane u Mg^{2+} ionima bogatim i kiselim otopinama. U odnosu na HAp, WH pokazuje veću mehaničku tlačnu čvrstoću i bolja osteogena svojstva u ispitivanjima *in vitro* i *in vivo* [90,91]. Vitlokit je u fiziološkim uvjetima topljiviji od HAp-a i može kontinuirano otpuštati Mg^{2+} ione koji poboljšavaju rast i osteogenu diferencijaciju matičnih stanica [84,91,92]. Dodatno, negativno nabijena površina WH omogućava pozitivno nabijenim osteogenim proteinima poput koštanih morfogenih proteina (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP) da se adsorbiraju na površinu elektrostatskim interakcijama [91].

Niz dvofaznih smjesa Mg-HAp i vitlokita pripremljeni su kontinuiranom hidrotermalnom sintezom (engl. *continuous hydrothermal flow synthesis*) [93]. Dvofazni HAp/WH materijali nedavno su pripremljeni iz prirodnih izvora [94]. Pretpostavlja se da dvofazna kalcij-fosfatna smjesa HAp-a i WH-a može oponašati prirodnu kost bolje nego pojedine faze zasebno. Pokazano je da osteogena aktivnost raste kad su WH i HAp prisutni u omjeru otprilike 1 : 3, što je slično omjeru u prirodnoj ljudskoj kosti [95].

2.3.2.2. Stroncij

Ugradnja iona poput stroncija u strukturu HAp rešetke važna je zbog biološke uloge iona [11,12]. Stroncij pripada elementima u tragovima u ljudskom tijelu, pri čemu je u većoj koncentraciji prisutan u metabolički aktivnijim kostima [96]. Usporava resorpcijsku aktivnost i diferencijaciju osteoklasta čime se smanjuje brzina razgradnje kosti. Istovremeno utječe na povećanu diferencijaciju osteoblasta i stimulira formiranje kosti. Stroncijev ranelat koristi se za smanjenje učestalosti lomova kod pacijenata s osteoporozom [97,98]. Dugoročne kliničke studije potvrđuju pozitivan utjecaj stroncijeva ranelata što povećava interes za ugradnjom stroncija u kalcijeve fosfate [99].

Sr^{2+} ion, ionskog radijusa 0,120 nm, u strukturi hidroksiapatita može supstituirati Ca^{2+} , ionskog radijusa 0,099 nm, cijelim rasponom supstitucije do stroncijevog apatita uz gotovo linearno povećanje parametara i volumene jedinične ćelije te povećanja gustoće [100,101]. Rezultati strukturnog utočnjavanja pokazuju da se Sr^{2+} ugrađuje i na Ca(I) i Ca(II)

kristalografsku poziciju unutar apatita. Unatoč distribuciji stroncija na obje kristalografske pozicije, primijećeno je da se pri manjim udjelima preferirano ugrađuje na Ca(I) poziciju, a pri udjelima većim od 10 % Sr^{2+} iona preferirano na Ca(II) poziciju [100–104]. Raspodjela stroncijevih iona unutar kristalne strukture vođena je interakcijama metalnih iona i kisika na dvije različite pozicije. Na četiri Ca(I) pozicije metalni ioni su striktno poravnati u stupac paralelan s *c*-osi i svaki je okružen s 9 atoma kisika. Šest Ca(II) pozicija raspoređeno je tako da metalni ioni tvore jednakostranične trokute centrirane oko apatitnog kanala, gdje je svaki okružen sa sedam atoma kisika. Ca(I) pozicija dozvoljava smještaj kationa većeg radijusa zbog dužeg prosječnog razmaka Ca(I)-O veze. Pri vrlo malim udjelima stroncij je prisutan samo na ograničenom broju jediničnih ćelija. Međutim, povećanjem broja prisutnih Sr^{2+} iona odbijanje iona na Ca(I) poziciji uzrokovalo bi značajno povećanje *c* kristalografske osi, što se izbjegava ugrađivanjem na Ca(II) pozicije koje lakše smjeste veći broj iona stroncija.

Detaljna strukturna i morfološka analiza provedena na Sr-HAp uzorcima precipitiranih iz vodenih otopina s različitim koncentracijama stroncija pokazuje da pri supstitucijama kalcija stroncijem manjim od 50 % dolazi do smanjenja veličine i oblika kristalita [100]. Destabilizacija kristalne strukture većim Sr^{2+} ionom i smanjenje stupnja kristalnosti utječe na povećanje topljivosti [105], koja se dodatno povećava u prisutnosti kosupstitucije CO_3^{2-} ionom [106].

Testiranja *in vitro* Sr-HAp-a korištenjem fibroblastnih stanica indiciraju da ovisno o udjelu stroncij ima različit utjecaj na ponašanje stanica. Koncentracija stroncija s udjelom u rasponu 3 – 7 % značajno stimulira aktivnost osteoblasta i diferencijaciju, što je potvrđeno povećanom aktivnosti alkalne fosfataze i proizvodnjom kolagena tipa I i osteokalcina. Štoviše, čak 1 % supstitucija stroncijem pokazala se dovoljnom za utjecaj na proliferaciju osteoklasta [107,108].

Hidroksiapatit koji sadrži stroncij u ispitivanjima *in vivo*, kao površinska prevlaka na titanijevom nosaču [12] i prilikom primjene kao koštanog cementa [109], pokazuje povećanu bioaktivnost, potiče nastanak koštane mase i jaču osteointegraciju u odnosu na materijale od nesupstituiranog hidroksiapatita. Ispitivanjima *in vivo* pokazano je da pri velikim dozama stroncij rezultira nepravilnom mineralizacijom kosti i smanjuje apsorpciju kalcija. Većina stroncija se smješta na površini kristala i nakon prestanka tretiranja visokim dozama dolazi do naglog smanjenja koncentracije stroncija u kostima [96]. U prisutnosti velike koncentracije, stroncij se u organizmu ograničeno ugrađuje u strukturu apatita – manje od 10 % atoma kalcija unutar kristalne rešetke supstituira se stroncijem [110].

2.3.2.3. Kosupstitucija magnezijevim i stroncijevim ionom

Mali je broj studija koje razmatraju istovremenu ugradnju više različitih iona u strukturu hidroksiapatita. Kosupstitucija dva različita iona, uz balansiranje razlikama ionskog radijusa i/ili valencije, olakšava ugradnju iona. Stroncij, ion većeg radijusa od kalcija, potpomaže supstituciju iona magnezija, manjeg ionskog radijusa od kalcija, koji zbog unutarnjih naprezanja kristalne rešetke sam ograničeno ulazi u strukturu hidroksiapatita [111–113].

Aina i sur. [111] pokazali su precipitacijom u vodenom mediju da se kosupstitucijom Mg^{2+} i Sr^{2+} iona u hidroksiapatit može utjecati na stupanj kristalnosti uzorka i udio β -TCP-a. Magneziju se pripisuje smanjenje kristalnosti pripremljenih uzoraka i povećanje udjela β -TCP-a. Prisutnost stroncija očituje se u povećanju parametara jediničnih ćelija hidroksiapatita i β -TCP-a u odnosu na nesupstituirane kristalografske faze. Pri istom udjelu magnezija, povećanjem udjela stroncija primijećeno je smanjenje udjela β -TCP-a.

Kako brojni istraživački radovi potvrđuju pozitivan utjecaj magnezija i stroncija na osteogenu aktivnost stanica *in vitro* i *in vivo*, pretpostavlja se da bi magnezij i stroncij zajedničkim djelovanjem trebali sinergijski djelovati na poboljšanje osteogenih svojstava kosupstituiranih materijala.

Geng i sur. [114] hidrotermalnom sintezom pripravili su praškaste uzorke hidroksiapatita kosupstituirane magnezijem i stroncijem uz značajno smanjenje stupnja kristalnosti i povećanje topljivosti HAp-a, što je povoljno za primjenu kao biomaterijala. Testiranjem *in vitro* pokazalo se da materijali kosupstituirani magnezijem i stroncijem ovisno o koncentraciji iona mogu imati i pozitivan i negativan utjecaj na prianjanje, proliferaciju i diferencijaciju stanica [114]. Navedeno ukazuje da bi se optimiranjem kosupstitucije moglo utjecati na supstituciju Mg^{2+} u HAp fazu, nastanak druge kristalografske faze i povećanje bioaktivnosti sintetiziranih nosača.

2.4. Postupci priprave hidroksiapatita

Postupci priprave apatita mogu se svrstati u sljedeće tri grupe:

- postupci priprave iz čvrstih prekursora, tj. suhe sinteze
- postupci priprave u otopini, najčešće metoda precipitacije, potom hidrotermalne metode te metode hidrolize i kondenzacije
- postupci kondenzacije reaktanata u plinovitoj fazi, koji služe za pripravu tankih apatitnih filmova na odgovarajućim nosačima

Precipitacijska metoda najviše se primjenjuje zbog mogućnosti priprave velikih količina HAp-a i vrlo dobre reproducibilnosti. Metoda uključuje simultano miješanje vodenih otopina fosfatnih i kalcijevih spojeva ili dodavanje vodene otopine fosfata kap po kap u vodenu otopinu kalcijeve soli. Kao izvor kalcijevih iona u sustavu koriste se vodene otopine nitratnih, hidroksidnih, kloridnih ili acetatnih prekursora kalcija. Najčešće korišteni prekursori fosfatnih iona su vodene otopine amonij dihidrogen fosfata ili fosforne kiseline.

Precipitacija HAp-a provodi se vrlo čistim kemikalijama uz kontroliranu brzinu dodavanja reaktanata u temperaturnom području između 25 i 90 °C pri $\text{pH} > 9$, koji se najčešće održava dodatkom razrijeđene otopine NH_4OH . Bitan korak u sintezi je „starenje“ otopine koje se provodi nekoliko sati uz stalno miješanje da se omogući postepena ugradnja kalcija u apatitnu strukturu i postizanje stehiometrijskog omjera Ca/P od 1,667. Tijekom procesa starenja morfologija precipitata mijenja se od početne, koju čine izolirani, krhki i izduženi kristalići nestehiometrijskog HAp-a, do konačnog stehiometrijskog HAp-a sačinjenog od „blokova sraslaca“. Nakon starenja talog se pere nekoliko puta destiliranom vodom da se uklone nečistoće koje se vrlo rado vežu na apatitnu strukturu. Talog se zatim suši, prosijava i po potrebi kalcinira. Morfologija i veličina kristalita sintetiziranog HAp-a značajno ovisi o uvjetima sinteze. Sinteze provedene pri višim temperaturama dat će HAp većeg stupnja kristaličnosti od sinteza provedenih na sobnoj temperaturi [115].

Heterogena reakcija između kalcita, CaCO_3 , i vodene otopine fosfata jedna je od metoda za sintezu HAp-biomaterijala [116]. Kompleksna heterogena reakcija kontrolirana je mehanizmima otapanja i reprecipitacije i teško ju je kontrolirati. Za dobivanje reproducibilnih rezultata ovom metodom važno je kontrolirati i ne mijenjati karakteristike ishodnog kalcita (veličinu čestica, specifičnu površinu, poroznost). Unatoč složenosti, prednost pripreme ovakvog HAp-a je što su reaktanti jeftini i lako dostupni, a mogući nusprodukti nisu štetni te ih nije potrebno uklanjati.

Premda se znatno rjeđe koristi, HAp se može pripremiti i visokotemperaturnim faznim reakcijama čvrsto-čvrsto. Ove reakcije ne koriste otapalo i mogu se koristiti za sintezu HAp-a u obliku gotovih keramičkih tijela (reakcijsko sinteriranje). Svojstva konačnog produkta bitno se ne mijenjaju s procesnim parametrima, stoga ne zahtijevaju preciznu kontrolu, što ovu metodu čini prikladnim za proizvodnju većih količina produkata. Visokotemperaturne sinteze često rezultiraju nehomogenim i grubo zrnatim apatitima što može utjecati na kasniju primjenu i preradu [33]. HAp se može sintetizirati i hidrolizom iz drugih kalcij-fosfatnih spojeva [117] i sol-gel postupkom [118].

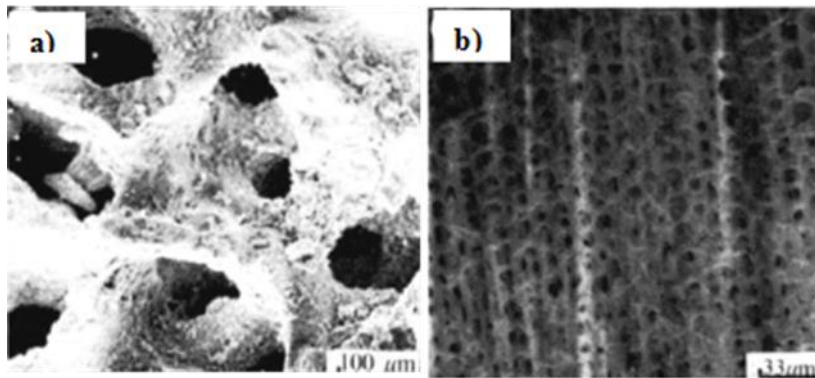
Hidrotermalna sinteza (slika 7) je, nakon precipitacije, druga najkorištenija metoda za pripremu HAp-a. Hidrotermalna sinteza postupak je u vodenom mediju pri povišenim temperaturama ($T > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i tlakovima ($p > 100\text{ kPa}$) odvijaju jednofazne ili višefazne reakcije s ciljem dobivanja kristaličnog HAp-a direktno iz otopine. Sinteze HAp-a uglavnom su vođene pri autogenim tlakovima (tlaku zasićene pare iznad otopine pri određenoj temperaturi). Hidrotermalnom sintezom se može pripremiti dobro kristaliziran i vrlo homogen karbonatni HAp [119]. Najviše se koristi za prevođenje kalcij-karbonatnih prirodnih bioloških struktura u HAp jer omogućuje očuvanje originalne trodimenzionalne arhitekture.



Slika 7. Zatvoreni hidrottermalni reaktor (lijevo) stavlja se u peć na određenu temperaturu i željeno trajanje reakcije. Unutar teflonske posude (desno) reakcija se odvija pri samogeneriranom tlaku koji odgovara tlaku zasićenih para iznad reakcijske otopine.

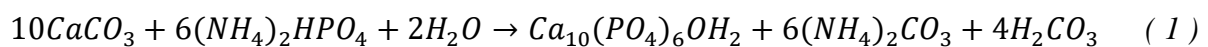
2.4.1. Biomimetički pristup

Početkom 70-ih godina Roy i suradnici [120] biomimetičkim pristupom sintetizirali su visokoporozni mikrostrukturirani nosač s ciljem primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Korištenjem poroznog skeleta vodenih beskrležnjaka hidrotermalnom sintezom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature iz kalcij-karbonatne strukture sintetizirali su hidroksiapatit (slika 8). Na taj način dobili su nosač koji je biokemijski, mineraloški i strukturom sličan ljudskoj kosti, jer, uz odgovarajuću poroznost i međupovezanost pora, početni biogeni aragonitni materijal sadrži i određeni udio metalnih iona u tragovima koji se tijekom sinteze ugrađuju u strukturu i tako daju hidroksiapatit sastava sličnog prirodnoj ljudskoj kosti.

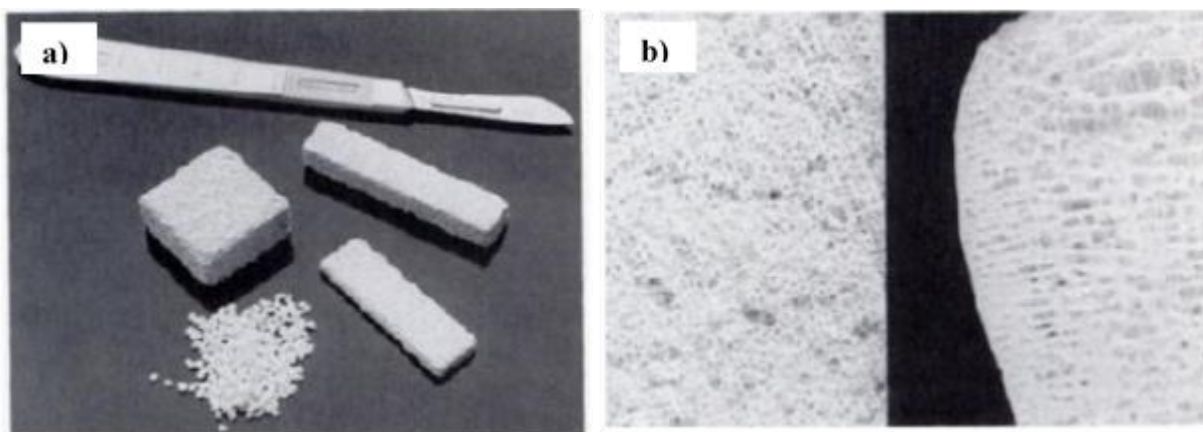


Slika 8. a) i b) SEM mikrografi hidroksiapatitne strukture [120] dobivene hidrotermalnom sintezom iz *Porties* koralja.

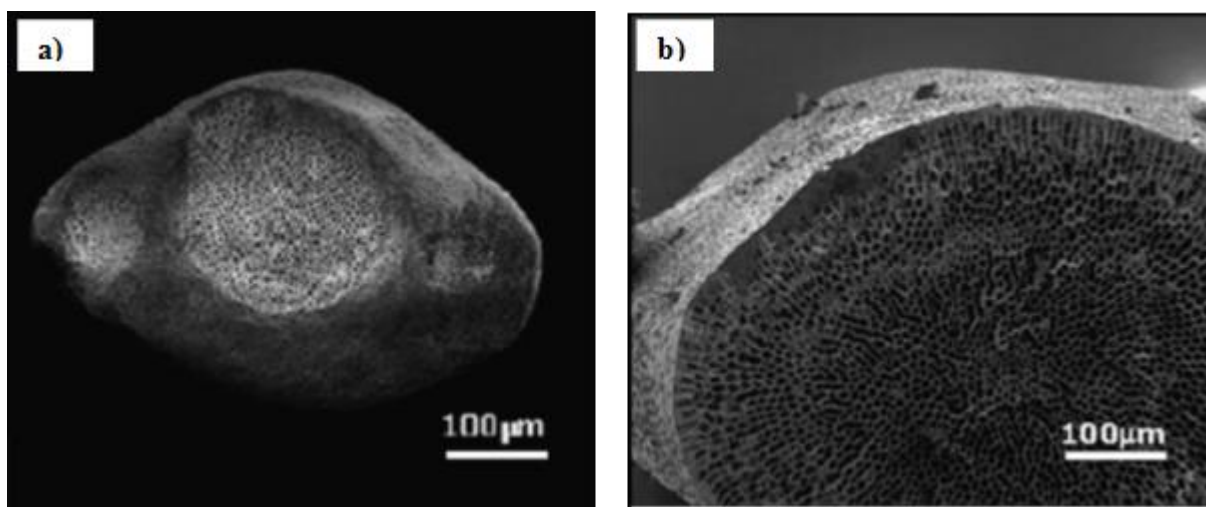
Pretpostavljena kemijska reakcija pretvorbe aragonita u hidroksiapatit pri odgovarajućim reakcijskim uvjetima prikazana je jednadžbom 1.



Sartoris i sur. [121] proveli su kliničko istraživanje na 20 ljudskih pacijenata s nosačem temeljenim na *Porites* koralju (slika 9) još 1986. godine. Od tada biomimetički princip primjenjuju brojni znanstvenici i koriste porozne skelete vodenih beskrležnjaka poput koralja, algi [122] (slika 10), školjkaša [123] i sipine kosti [124]. U konačnici se nakon sinteze dobije nosač s poroznošću, strukturom i materijalom sličnima ljudskoj kosti. Uz skelete vodenih beskrležnjaka za ovakav tip sinteza ponekad se koriste i goveđe kosti [125], a za prirodni izvor kalcija mogu se koristiti i ljuske jajeta različitih životinja [126,127].



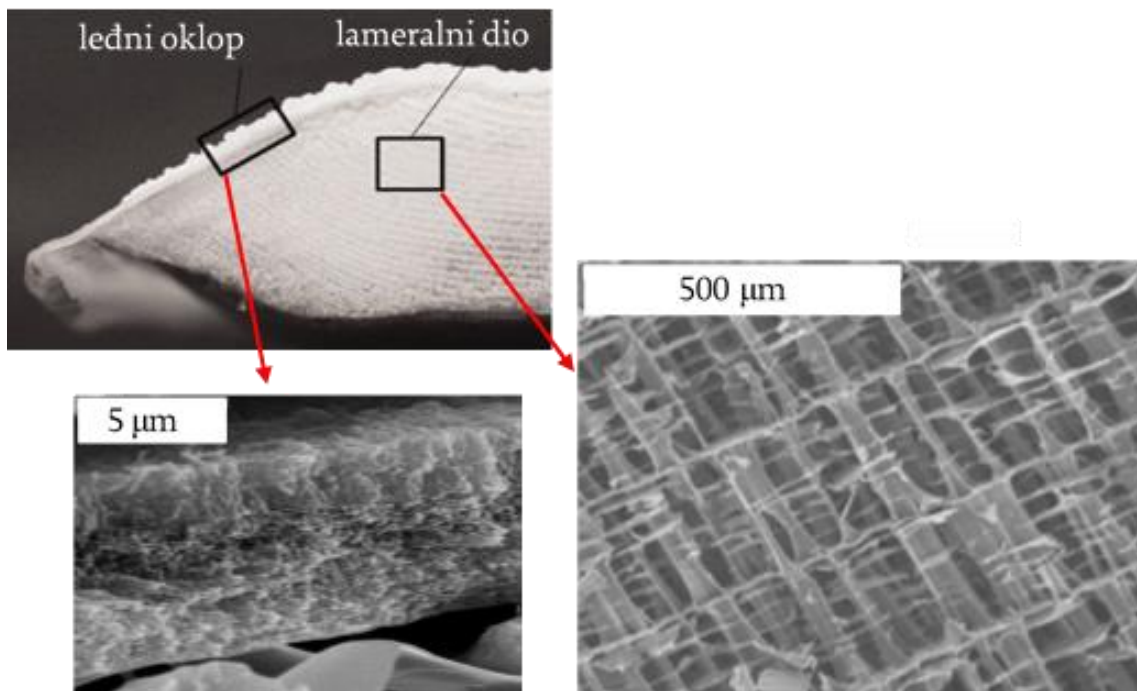
Slika 9. a) Hidroksiapatitni implantat sintetiziran iz *Porites* koralja (veličine $12 \times 25 \times 25$ mm, $8 \times 10 \times 50$ mm, $4 \times 12 \times 40$ mm) i hidroksiapatitnih granula sintetiziranih iz *Goniopora* koralja (promjera $1000 - 2000 \mu\text{m}$). b) Struktura hidroksiapatitnog implantata sintetiziranog iz *Porites* koralja (lijevo) usporediva je sa strukturom trabekularne ljudske kosti (desno). Sintetizirani hidroksiapatitni nosač sastoji se od pora promjera $230 \mu\text{m}$ i paralelnih međusobno povezanih kanala promjera $190 \mu\text{m}$ te ima poroznost od 66 % [121].



Slika 10. SEM mikrografi hidroksiapatitnih nosača sintetiziranih iz alge *Corallina Officinalis*. Walsh i sur. [122] sintetizirali su hidroksiapatitne nosače veličine $1,0 - 1,4$ mm uz očuvanje početne strukture crvene alge s veličinom pora $7 - 13 \mu\text{m}$, duljinom pora od $40 \mu\text{m}$ i debljinom stijenki pora od $1,8 \mu\text{m}$.

2.4.2. Hidroksiapatit iz sipine kosti

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, za sintezu hidroksiapatita biomimetičkim pristupom kao početni materijal moguće je koristiti i sipinu kost [13,14,124,128]. Sipina kost je sa svojim svojstvom krutosti prilagođena za potrebe skeletne strukture. Čvrst je i lagan spremnik koji može izdržati znatan vanjski pritisak. Sipina kost sastoji se od dva dijela, gustog vanjskog leđnog oklopa te unutarnje lamelarne matrice (slika 11). Lamelle su međusobno odijeljene brojnim potpornim stupićima. Paralelni slojevi (lamelle) izgrađeni od kalcij-karbonata tvore odjeljke koji su međusobno zatvoreni, ali se unutar svakog od njih plin ili tekućina mogu slobodno kretati. Razmak između lamela različit je u određenim dijelovima sipine kosti i uglavnom iznosi između 200 i 600 μm . Stropovi svakog odjeljka su podržani brojnim potpornjima sigmoidalnog poprečnog presjeka. XRD analizom potvrđeno je da je sipina kost građena od aragonita, modifikacije kalcij-karbonata stabilizirane metalnim ionima u tragovima koji se nalaze u biogenom morskom okruženju. Gustoća suhe unutarnje lamelarne matrice iznosi oko 0,19 g cm^{-3} , što s obzirom na gustoću aragonita od oko 2,94 g cm^{-3} , predstavlja poroznost od 93 % [13].



Slika 11. Prikaz sipine kosti sa SEM mikrografima koji pokazuju morfologiju leđnog oklopa i lamelarne matrice koja se koristi kao početni materijal za sintezu hidroksiapatitnih nosača [14].

Skeleti svih mekušaca sagrađeni su od kalcijevog karbonata i organske komponente koja sudjeluje u procesu nastajanja ljuštore. U lamelarnoj matrici organska tvar predstavlja 3 – 4,5 % težine. U unutarnjoj matrici sipine kosti svaka lamela i potporni stup prevučeni su membranama od organskog materijala u obliku tankog filma. Organska komponenta unutarnje strukture i leđnog oklopa sipine kosti jest hitin – kompleksni polisaharid koji čini vanjski oklop mnogih člankonožaca. U leđnom oklopu hitina ima deseterostruko više nego unutar lamelarne matrice. Za potrebe sinteze hidroksiapatitnog nosača koristi se samo aragonitna struktura pa je na početku potrebno ukloniti organsku komponentu – mehanički se odstrani kalcitni oklop s velikim udjelom hitina, a ostatak organske komponenta unutar lamelarne matrice uklanja se namakanjem u vodenoj otopini natrijeva hipoklorita.

Kada je cilj simulirati strukturu ljudsku kost, tj. sintetizirati HAp mikrostrukture slične ljudskom koštanom tkivu koristi se hidrotermalna sinteza – metoda omogućuje sintezu materijala kemijski sličnog kosti, s dobrom kristaličnošću, fiziološkom stabilnošću i održava morfološke karakteristike početnog kalcij-karbonatnog prirodnog materijala.

Aragonitna lamelarna porozna struktura sipine kosti pogoduje difuziji reaktanata i brzom transformaciji aragonita u HAp pri hidrotermalnim uvjetima povišene temperature i tlaka [14,124]. Ivanković i sur. [14] ispitali su utjecaj temperature (140 – 220 °C) i trajanja reakcije (20 minuta do 48 h) na sintezu hidroksiapatita iz sipine kosti i potvrdili da se aragonit u potpunosti može transformirati u hidroksiapatit uz očuvanje originalne strukture sipine kosti. Detaljna karakterizacija materijala potvrdila je uspješnu sintezu nestehiometrijskog B-tip karbonatnog HPO_4^{2-} supstituiranog hidroksiapatita [14]. Upravo takav hidroksiapatit glavna je komponenta prirodne ljudske kosti te ima bolja biološka svojstva nego sintetski stehiometrijski HAp [39].

2.5. Kompozitni trodimenzionalni nosači

Kemijska sličnost s kosti i odlična biokompatibilnost razlozi su što su materijali za nadomjestak kosti u potpunosti napravljeni ili presvučeni kalcijevim fosfatima. Nažalost mehanička svojstva nosača temeljenih na kalcij-fosfatnoj biokeramici su loša, implantati su prekrhki i ne mogu se lako oblikovati u željeni oblik i dimenziju [55,129]. Stoga je trenutna primjena kalcij-fosfatnih materijala u operativnim zahvatima većinski ograničena na primjenu u situacijama koje ne traže veliku nosivost (engl. *non-weight-bearing applications*).

Za poboljšanje mehaničkih svojstava poroznih nosača predlaže se korištenje polimernih površinskih premaza [130–132]. Takvi polimerni premazi trebali bi mehanički ojačati i očvrstnuti strukturu i spriječiti odvajanje fragmenata nastalih u slučaju loma ili oštećenja. Osim što nosač daje mehaničku potporu stanicama, on treba služiti i kao osnova za urastanje tkiva [133,134]. Postupak stavljanja polimernog filma na porozni nosač mora omogućiti zadržavanje postojeće strukture uz homogenu raspodjelu polimera preko cijele površine. U suprotnom, polimer će djelomično ili u potpunosti zatvoriti pore. Visoka poroznost keramičkih nosača i međusobna povezanost pora pruža podlogu za prijanjanje stanica, formiranje koštane matrice i funkcioniranje metabolizma koštanog tkiva. U slučaju keramičkih nosača uvijek postoji kompromis između dovoljne mehaničke čvrstoće, poroznosti i bioaktivnosti.

Uobičajeno se proces prevlačenja površine obavlja uranjanjem uzoraka u otopinu polimera ili taljevinu polimera, nakon čega slijedi sušenje. Struktura i mehanička svojstva polimerom presvučenih keramičkih nosača pod utjecajem su različitih postupaka poput uklanjanja viška polimera, zagrijavanja i vakuumiranja, te ovise o koncentraciji polimera u otopini i broja ponavljanja procesa. Povezanost spomenutih faktora ukazuje da je analiza takvih materijala složena, a optimiranje svih faktora dugotrajno [135].

Najprimjenjivnije metode jesu one gdje se kalcij-fosfatni prah koristi u pripravi nosača. Kim i sur. [136] i Zhao i sur. [137] dobili su porozne nosače impregniranjem poliuretanske pjene otopinom koja sadrži prah HAp-a. Dobivena struktura zagrijana je na 600 °C za izgaranje poliuretanske pjene i sinterirana na 1200 – 1300 °C. Tako dobivena porozna struktura HAp-a obložena je poli(ϵ -kaprolaktonom) (PCL-om) i navodi se da su dobiveni nosači visokoporozni (87 %) s kontroliranom veličinom pora (150 – 200 μm) [136]. Tlačna čvrstoća takvih kompozitnih nosača kreće se između 0,24 i 0,45 MPa, a modul elastičnosti između 1 i 1,43 MPa. Rezultati Zhao i sur. [137] indiciraju da se povećanjem koncentracije otopine PCL-a

(5, 10 i 20 % mas./vol.) tlačna čvrstoća povećava s 0,09 MPa na 0,51 MPa, dok se poroznost smanjuje s 90 na 75 % za HAp/PCL kompozitne nosače.

Polimerni premazi preko porozne biokeramičke strukture rezultiraju blagim povećanjem mehaničke čvrstoće i elastičnog ponašanja presvučenog nosača [138–141]. Više istraživanja pokazalo je da se poroznost visokoporoznih nosača neznatno smanjuje povećanjem koncentracije polimera [142–144]. SEM mikrografi pokazuju da se poroznost smanjuje zbog popunjavanja i eventualnog zatvaranja porozne strukture. Za poboljšanje tlačne čvrstoće hidroksiapatitnih nosača dobivenih iz sipine kosti, nosači su jednostavno presvučeni višestrukim uranjanjem nosača u poli(ϵ -kaprolaktonu) nekoliko različitih koncentracija i naknadnim sušenjem. Rezultati pokazuju da se tlačna čvrstoća povećala prevlačenjem s 5 i 10 % PCL-a, dok se poroznost hidroksiapatitnog nosača s 91,3 % smanjuje povećanjem udjela polimera – na 89,6, 88,6 i 76,8 % redom uz korištenje 1, 5 i 10 % otopine PCL-a [142]. Duktilni (žilavi) polimeri kao PCL penetriraju u međusobno povezanu poroznu strukturu, popunjavaju mikropukotine keramičkog nosača te tako poboljšavaju čvrstoću i elastičnost. Dok polimerna prevlaka može ukloniti nedostatke površine keramičkog nosača, ona može služiti i kao difuzijska barijera između keramičkog supstrata i okoliša te tako ograničiti oslobađanje bioaktivnih iona u mikro-okruženje [145].

U radovima istraživačke grupe Ivankovića i suradnika [17,18,23] pripremljen je PCL-om obložen visokoporozan HAp nosač dobiven iz sipine kosti vrlo jednostavnom i jeftinom metodom vakuumske impregnacije. Milovac i sur. [17] testirali su kompozitne nosače u Hankovoj uravnoteženoj solnoj otopini da bi ispitali mogućnost precipitacije biološki aktivnog kalcij-fosfatnog sloja na površini. Fizikalno-kemijska karakterizacija pokazala je da je prevlaka PCL-a vrlo efektivna u poboljšanju mehaničkih svojstava visokoporoznog hidroksiapatitnog nosača dobivenog transformacijom sipine kosti. Zadržana je međupovezanost pora koja je nužna za migraciju stanica, adekvatnu difuziju nutrijenata i metaboličkog otpada te tvorbu novog tkiva. Postignuto je dobro pokrivanje HAp čestica i ulaženje polimera u strukturu. PCL prevlaka dobivena vakuumskom impregnacijom, korištenjem otopine PCL-a u kloroformu, pokazala se vrlo efektivnom u poboljšanju mehaničkih svojstava HAp nosača. Tanki biorazgradljivi polimerni film rezultirao je poboljšanjem Youngovog modula elastičnosti za otprilike jedan red veličine u odnosu na čisti hidroksiapatitni nosač. Dobiveni su Youngovi moduli elastičnosti HAp/PCL nosača od $15,5 \pm 1,2$ MPa uz korištenje 20 % mas./vol. otopine PCL-a [17] i $7,3 \pm 0,7$ MPa uz 10 % mas./vol. [23]. Za čisti hidroksiapatitni nosač vrijednosti se kreću oko $0,7 \pm 0,3$ MPa [17]. Cilj ovakvih visokoporoznih nosača oponašanje je strukture

trabekularne (spužvaste) kosti s primjenom samo na mjestima s malim mehaničkim opterećenjem. Gledajući biološko ponašanje, istraživani materijali pokazali su dobru depoziciju kalcijevog fosfata na površini što ukazuje na dobru bioaktivnost. Nosači nisu citotoksični i promoviraju prianjanje stanica i proliferaciju.

2.5.1. Polimerni materijali u inženjerstvu koštanog tkiva

Polimeri koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva mogu biti prirodni ili sintetski, biorazgradljivi ili nerazgradljivi [146].

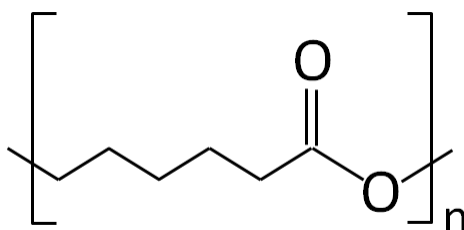
Prirodni polimeri su biokompatibilni i bioaktivni te mogu pozitivno utjecati na adheziju i proliferaciju stanica. Zbog ograničenosti procesa obrade, rizika od sadržavanja nečistoća i moguće razlike između procesnih šarži, teže zadovoljavaju sve zahtjeve za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Najčešće primjenjivani prirodni polimeri mogu se podijeliti na bioaktivne polimere (svila, kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, keratin, aktin i miosin), polisaharide (celuloza, amiloza, dekstran, hitin, glikozaminoglikani) ili polinukleotide (DNA, RNA) [146].

Sintetski polimeri popularni su materijali za izradu nosača u području medicine jer imaju jasno definiranu kemiju i sastav, lako se obrađuju i omogućavaju dobivanje svojstva za specifična područja primjene. Ostale prednosti uključuju novčanu isplativost, mogućnost proizvodnje u velikim količinama, uniformnost i dug uporabni vijek. Fizikalno-kemijska i mehanička svojstva poput vlačne čvrstoće, elastičnog modula i brzine razgradnje usporediva su vrijednostima za kosti. Međutim, sintetski polimeri nisu bioaktivni i mogu izazvati upalne reakcije unutar organizma domaćina. Polimeri poput poli(mliječne) kiseline (engl. *poly lactic acid*, PLA), poli(glikolne) kiseline (engl. *polyglycolic acid*, PGA), poli(L-laktida) (engl. *poly-L-lactide*, PLLA), poli(ϵ -kapolaktona) (engl. *poly ϵ -caprolactone*, PCL), poli(laktično-glikolne) kiseline (engl. *poly lactic-glycolic acid*, PLGA), kopolimeri i poli(hidroksi-alkanoati) (engl. *poly hydroxy-alkanoates*, PHA) klasificiraju se kao sintetski polimeri [147,148].

2.5.2. Poli(ϵ -kaprolakton)

Unutar grupe sintetskih materijala, poli(ϵ -kaprolakton) se zbog svojih svojstava pokazao kao vrlo dobar materijal za primjenu u biomedicini. PCL, uz PGA i PLA, spada u biorazgradljive poliestere. Alifatski je kristalasti polimer s temperaturom taljenja između 59 – 64 °C (iznad tjelesne temperature) te staklištem od -60 °C. Kristalasti PCL pri fiziološkoj temperaturi nalazi se u plastičnom stanju što rezultira visokom žilavosti i odličnim mehaničkim svojstvima. PCL poliester je lako dostupan, relativno jeftin, a kemijska i biološka svojstva mogu se modificirati. Topljiv u kloroformu, diklormetanu, octenoj kiselini, tetrahidrofuranu i toluenu pri sobnoj temperaturi. Slabo je topljiv u acetonu, 2-butanonu, etilacetatu i netopljiv je u etanolu, petroleju i dietileteru [149].

Fizikalno-kemijska svojstva, biorazgradljivost i mehanička svojstva čine ga pogodnim biomaterijalom jer ne podliježe značajnom gubitku svojstava u kratkom vremenu. PCL nije toksičan i kompatibilan je s tkivom, stoga se često koristi u razgradljivim strukturama, kao nosač u regenerativnoj terapiji i otpuštanju medicinski aktivnih tvari. Dugi period razgradnje čini ga popularnim za zamjenu tvrdih tkiva, koja zahtijevaju veliku nosivost, i mekih tkiva, gdje se korištenjem polimera manjih molekulskih masa smanjuje vrijeme razgradnje [146,150,151].



Slika 12. Molekularna struktura PCL-a.

Molekularna struktura PCL-a prikazana je na slici 12. PCL je hidrofobne prirode i nema funkcionalne grupe koje bi omogućile vezivanje stanica. Za poboljšanje interakcije PCL-a s tkivom potrebna je modifikacija površine kojom se poboljšava hidrofilnost i kompatibilnost sa stanicama [152]. Najprimjenjivnije tehnike poboljšanja su taloženje u plazmi (engl. *plasma deposition*) [153], miješanje sa škrobom (engl. *starch-blending*) [154] ili kombinacija s drugim bioaktivnim komponentama [155–162].

Zbog prisutnosti pet hidrofobnih –CH₂ skupina u ponavljajućoj jedinici, PCL se, s razdobljem razgradnje od 2 – 4 godine, razgrađuje najsporije unutar grupe poliestera. Brzina

razgradnje struktura načinjenih od poliesterskih nanovlakana slijedi niz $PGA > PLGA > PLLA > PCL$ [163]. PCL se može razgraditi u prisustvu mikroorganizama [164,165], enzimima [166] ili hidrolitičkom razgradnjom esterske grupe u alifatske estere pri fiziološkim uvjetima [166–168]. Razgradnjom pri tjelesnoj temperaturi ne tvori kiselo okruženje [169–171].

Povećanje poroznosti i dodatak bioaktivne komponente poput kalcijevog fosfata može nadići nedostatke sintetskog polimera. Brži stupanj degradacije PCL-a najčešće se dobiva kombinacijom s kalcijevim fosfatima. Mnoge istraživačke grupe pokazale su da se modificiranjem polimernog nosača korištenjem keramičkih mikročestica može utjecati na nedostatke čistog PCL-a [156–159].

Díaz i sur. [156] sintetizirali su visokoporozni PCL nosač kojem je u suspenziju prije postupka liofilizacije dodano 0, 10, 30 i 50 % hidroksiapatitnih čestica i dokazali da dodatak hidroksiapatitnih čestica ubrzava razgradnju polikaprolaktona. Ispitivanje od 16 tjedana pri 37 °C u simuliranom biološkom fosfatnom puferu pokazuje kontinuiranu i ubranu degradaciju mehaničkih svojstava i smanjenje molekulske mase PCL-a uzoraka koji sadrže hidroksiapatit u odnosu na uzorak bez hidroksiapatita. Uzorci s više hidroksiapatita pokazali su veću degradaciju u usporedbi s onim s manje. PCL je u nosaču bez dodatka hidroksiapatita zadržao svoja mehanička svojstva unutar ispitivanog perioda degradacije. Kod nosača kojima je dodan hidroksiapatit primijećeno je značajno smanjenje molekulske mase PCL-a, od 39 % za uzorak s 10 % HAp-a do 49 % za uzorak s 50 % HAp-a nakon 16 tjedana. Dodatak hidroksiapatitnih nanočestica u nosače ubrzao je gubitak mase kompozita i povećao kapacitet adsorpcije vode tijekom početnog stupnja degradacije. Tijekom ispitivanja pH vrijednost ostala je stabilna, između 7,2 – 7,3.

Park i sur. [162] nasadili su mezenhimske matične stanice zuba na PCL/ β -TCP nosač. Primjenom nosača na defektu zečje čeljusti primijećen je nastanak guste koštane mase nakon 12 tjedana. Spalthoff i sur. [160] su u ispitivanju ponašanja PCL/TCP nosača *in vivo* na lopatici i čeonom režnju ovce pokazali da je veliki udio nosača razgrađen i zamijenjen živom kosti nakon 6 mjeseci. Wu i sur. [172] su korištenjem magnezijevih fosfata postigli brži stupanj degradacije PCL-a. Lin i sur. [161] pripremili su kompozitne membrane koje sadrže 20 mas. % kobaltom supstituiranog hidroksiapatita. Pokazalo se da takvi nosači imaju dobra antibakterijska svojstva, smanjuju infekciju i upalu te da značajno potiču proliferaciju stanica i stvaranje depozita kalcija.

2.6. Ispitivanje bioloških svojstava *in vitro*

Testiranja biomaterijala uključuju ispitivanje odaziva lokalnog tkiva, sistematski toksikološki odaziv te alergenski, pirogeni, kancerogeni i teratogeni odaziv. Tri razine testiranja prije postupka dobivanja regulatornog komercijalnog odobrenja su [173]:

- (i) toksikološko testiranje ispitivanjima *in vitro* i *in vivo*
- (ii) testiranje na životinjama na mjestima gdje će se biomaterijal koristiti
- (iii) klinička ispitivanja na ljudima.

Kako bi se smanjila potreba testiranja na pokusnim životinjama i osiguralo učinkovito liječenje pacijenata *in vivo*, potrebno je provesti niz sistematskih ispitivanja *in vitro* kojima se procjenjuje citotoksičnosti i biokompatibilnosti pripremljenih nadomjestaka. Svrha provođenja istraživanja *in vitro*, izvan živog organizama i normalnog biološkog okruženja, jest dobivanje informacija o biološkom odazivu izoliranih stanica u kontaktu s testiranim materijalom pri kontroliranim eksperimentalnim uvjetima. Cilj je brzim i relativno jeftinim metodama ispitati životnu aktivnost stanica u doticaju s materijalom, vidjeti prijanjaju li stanice na materijal, mogu li migrirati po površini i kroz nosač, umnažati se i diferencirati te postoje li nusprodukti biološke razgradnje koji su toksični.

2.6.1. Ispitivanje stanične vijabilnosti

Test citotoksičnosti prvi je, osnovni i neophodni korak evaluacije biokompatibilnosti materijala koji teže primjeni u biomedicinskom području te pokazuje sposobnost preživljenja i življenja stanica (vijabilnosti) u kontaktu s materijalom. Citotoksičnost je svojstvo tvari da inducira staničnu smrt. Stanice su osjetljivije na toksičnost u uvjetima *in vitro* nego u ljudskom organizmu, *in vivo* [174]. Stoga je toksičnost *in vitro* vrlo osjetljiv pokazatelj potencijalne toksičnosti u okruženju *in vivo*.

MTT test najčešće je primjenjiva metoda za procjenu stanične vijabilnosti te tako posljedično i citotoksičnosti testiranih biomaterijala. MTT testom na citotoksičnost ispituje se respiratorna aktivnost mitohondrija, ukazuje na stanični energetske kapacitet stanica i tako pokazuje životna aktivnost stanica. U prisustvu toksičnih tvari aktivnosti mitohondrija prestaju i to je nepovratan korak u odumiranju stanica. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

bromid (MTT) reducira se enzimskom aktivnosti mitohondrija u netopljive ljubičaste kristale formazana koji se nakupljaju unutar stanične stijenke. Otapanjem formazana dobiva se ljubičasto obojenje, koje kvantifikacijom kolorimetrijskim metodama, ukazuje na aktivnost i broj živih stanica [175]. Dobivene vrijednosti uspoređuju se s pozitivnom kontrolom koja daje ponovljivi citotoksični odgovor, te se može smatrati pozadinskim signalom korištene metode, i negativnom kontrolom koja ne posjeduje štetan utjecaj na stanice.

2.6.2. Ispitivanje bioaktivnosti

Bioaktivnim materijalom definira se onaj koji izaziva specifični odaziv na površini materijala i rezultira formiranjem veze između tkiva i materijala [176]. Bioaktivnost materijala najčešće se određuje kulturama *in vitro* testiranjem ponašanja mezenhimskih matičnih stanica u kontaktu s materijalom. Prati se utjecaj materijala na prianjanje, umnažanje, utjecaj na diferencijaciju matičnih stanica u koštane te njihove normalne stanične funkcije. Korištenjem imunoloških fluorescentnih metoda bojenja, histološkog snimanja biomaterijala i kvantitativnim određivanjem specifičnih proteina kao indikatora stupnja osteogeneze dobiva se uvid u ponašanje i razvoj matičnih stanica [174]. Aktivnost *in vitro* indikacija je da bi testirani materijal mogao biti bioaktivan u kontaktu u specifičnim uvjetima primjene *in vivo*.

2.6.2.1. Uloga mezenhimskih stanica u osteogenezi

Migracija i diferencijacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica (engl. *human mesenchymal stem cells*, hMSC) dva su važna fiziološka procesa formiranja kosti. Migracija hMSC-a prvi je korak prema nastanku koštanog tkiva. hMSC migriraju do površine kosti i diferenciranjem pridonose procesu formiranja kosti [177]. Koštana srž i pokosnica osnovni su izvori hMSC-a koji sudjeluju u razvoju kosti [178]. Kost nastaje pomoću dva različita načina okoštavanja, intermembranskim okoštavanjem i enhondralnim okoštavanjem.

Intermembranskim okoštavanjem (engl. *intermembranous ossification*) hMSC prolaze stupanj proliferacije i diferencijacije u osteoblaste direktno bez formiranja hrskavice. Migracija mezenhimskih matičnih stanica i preosteoblasta dio su procesa i pod utjecajem su mnogih faktora *in vivo* i *in vitro*. Mezenhimske matične stanice diferenciraju u preosteoblaste koji proliferiraju (umnažaju se) u blizini koštane površine i luče alkalnu fosfatazu, ALP. Potom

postaju zreli osteoblasti i tvore osteocite koji se smještaju unutar izvanstanične matrice (engl. *extracellular matrix*). Ostali faktori koji reguliraju intermembransko okoštavanje jesu različiti faktori rasta poput Runx2, adenozin trifosfatom bogati protein za vezanje DNA proteina (SATB 2), osteriks i BMP (engl. *bone morphogenic proteins*) [177,179].

Enhondralnim okoštavanjem (engl. *endochondral ossification*), pri oblikovanju kosti iz hrskavice, mezenhimske matične stanice prvo tvore hrskavicu. Proces je vođen BMP-om. Dio hMSC diferencira u hondroците (hrskavične stanice) i luči izvanstaničnu hrskavičnu matricu. Ostale periferne hMSC tvore perihondrij, vlaknastu ovojnicu koja okružuje gustu nakupinu matičnih stanica, koju karakterizira ekspresija kolagena tipa I i važnih faktora poput proteoglikana i ALP-a. Hrskavične stanice prolaze brzi korak umnažanja, sazrijevaju i diferenciraju u osteoblaste. Enhondralno okoštavanje kontroliraju faktori rasta, transformacijski faktor rasta- β (TGF- β), Sox9 i brojne interakcije između stanica [177,179].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U pripravi kompozitnih nosača korištene su sljedeće kemikalije:

- Natrijev hipoklorit (NaClO , 13 % aktivnog klora, Gram-mol)
- Amonij dihidrogenfosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 99 %, Fisher Scientific)
- Magnezij klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, Ph.Eur.9.0, Kemig)
- Magnezij perklorat ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, 99 %, Sigma Aldrich)
- Stroncij nitrat ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, 99+ %, ACS reagent, Acros Organics)
- Poli(ϵ -kapolakton) ($M_n=45\ 000$, Sigma Aldrich)
- Kloroform (CHCl_3 , p.a., Kemika)

3.2. Priprava kompozitnih nosača

3.2.1. Sinteza poroznih CaP nosača

Sipina kost (lat. *Sepia Officinalis L.* iz Jadranskog mora) polazni je materijal za hidrotermalnu sintezu visokoporozne kalcij-fosfatne strukture. Korištene su sipine kosti duljine 15 ± 1 cm. Upotreba organizama iste veličine iz bliskog i poluzatvorenog morskog okruženja Jadranskog mora omogućuje dobivanje poroznih nosača usporedive mikrostrukture (poroznosti i veličine pora). Nakon mehaničkog odstranjivanja leđnog kalcitnog oklopa sipine kosti unutarnja lamelarna struktura izrezana je u komadiće ($\approx 2\ \text{cm}^3$). Organska komponenta uklonjena je vodenom otopinom natrijeva hipoklorita pri sobnoj temperaturi u trajanju od 48 sati te naknadno višestruko ispirana kipućom demineraliziranom vodom. Očišćeni komadići stavljaju se u teflonski reaktor u koji se dodaje stehiometrijska količina $0,6\ \text{mol dm}^{-3}$ vodene otopine amonij dihidrogenfosfata uz zadovoljavanje omjera $\text{Ca/P} = 10/6$. Reaktor se nepropusno zatvara i stavlja u metalnu tlačnu posudu od nehrđajućeg čelika te stavlja u električnu peć zagrijanu na $200\ ^\circ\text{C}$. Reakcija se u trajanju od 48 sati odvija pri samogeneriranom tlaku vodene pare unutar reaktora koji dostiže do 20 bar. Reaktori se potom naglo hlade na sobnu temperaturu, otvaraju te se mjeri pH vrijednost zaostale otopine u reaktoru. Dobiveni komadići ispiru se kipućom demineraliziranom vodom radi uklanjanja reakcijske otopine, suše pri $105\ ^\circ\text{C}$ i spremaju za daljnju upotrebu i karakterizaciju.

3.2.2. Priprava metalnim ionima supstituiranih CaP nosača

Ugradnja iona u hidroksiapatit provodi se *in situ*, tijekom konverzije aragonita u hidroksiapatit, dodatkom određene količine iona u reaktor na početku reakcije uz zadovoljavanje uvjeta $(Ca + x)/P = 10/6$, gdje je $x = Mg$ i/ili Sr . Korišteni prekursori metalnih iona su magnezij klorid heksahidrat, magnezij perklorat i/ili stroncij nitrat. Proveden je niz sinteza korištenjem iona, M , s molarnim udjelima $x = 0,01; 0,025; 0,05; 0,10$. Svi izračuni stehiometrijskih omjera za pripremu početnih reakcijskih smjesa temeljeni su na formuli metalnim ionima supstituiranog hidroksiapatita, $Ca_{10-x}M_x(PO_4)_6(OH)_2$. Pripremljeni uzorak hidroksiapatita bez dodatka iona, ($x = 0$), imenovan je CaP. U slučaju supstitucije ionima magnezija, četiri pripremljena uzorka s molarnim udjelima $x_{Mg} = 0,01; 0,025; 0,05; 0,10$ imenovana su 1-Mg-CaP, 2,5-Mg-CaP, 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP. Prilikom supstitucije stroncijem s $x_{Sr} = 0,01; 0,025; 0,05; 0,10$ pripremljeni uzorci imenovani su 1-Sr-CaP, 2,5-Sr-CaP, 5-Sr-CaP i 10-Sr-CaP. Broj prije Mg-CaP, odnosno Sr-CaP označava nominalni mol. % iona koji se očekuje da će biti supstituiran umjesto kalcija u strukturu hidroksiapatita (tablica 2). Uzorci u koje su supstituirana oba iona imenuju se istim principom, npr. 1-Mg-5-Sr-CaP sadrži $x_{Mg} = 0,01$ i $x_{Sr} = 0,05$.

Tablica 2. Nominalni sastav i imenovanje pripremljenih uzoraka.

| Naziv uzorka | Mg/(Ca+Mg+Sr) (mol. %) | Sr/(Ca+Mg+Sr) (mol. %) | (Ca+Mg)/P |
|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| CaP | 0 | 0 | 10 / 6 |
| 1-Mg-CaP | 1 | 0 | 10 / 6 |
| 2,5-Mg-CaP | 2,5 | 0 | 10 / 6 |
| 5-Mg-CaP | 5 | 0 | 10 / 6 |
| 10-Mg-CaP | 10 | 0 | 10 / 6 |
| 1-Sr-CaP | 0 | 1 | 10 / 6 |
| 2,5-Sr-CaP | 0 | 2,5 | 10 / 6 |
| 5-Sr-CaP | 0 | 5 | 10 / 6 |
| 10-Sr-CaP | 0 | 10 | 10 / 6 |
| 1-Mg-1-Sr-CaP | 1 | 1 | 10 / 6 |
| 1-Mg-5-Sr-CaP | 1 | 5 | 10 / 6 |
| 5-Mg-1-Sr-CaP | 5 | 1 | 10 / 6 |
| 5-Mg-5-Sr-CaP | 5 | 5 | 10 / 6 |

3.2.3. Priprava kompozitnih nosača vakuumskom impregnacijom

Uzorci pripremljenih kalcij-fosfatnih nosača impregnirani su poli(ϵ -kaprolaktonom) korištenjem vakuumske impregnacije. Vakuumiranjem se uklanja zrak i osigurava da polimer uđe u pore uzorka. 10 % mas./vol. otopina poli(ϵ -kaprolaktona) pripremljena je miješanjem PCL peleta u kloroformu. Otopina PCL-a u menzuri spojena je pomoću cijevi s vakuumskom komorom uređaja za impregniranje (CitoVac, Struers). Uzorci pripremljenih kalcij-fosfatnih nosača stavljeni su u uređaj za vakuumsku impregnaciju i tlak je namješten na 0,10 bar. Nakon 10 minuta pri postignutom vakuumu otvoren je ventil i usisana je otopina PCL-a tako da prekrije materijale u posudi s uzorcima. Nosači su u polimernoj otopini ostavljeni 10 minuta pod vakuumom te potom izvađeni na atmosferski tlak kako bi polimerna otopina što bolje ušla u pore uzorka. Uzorci su izvađeni iz otopine polimera, stavljeni na mrežicu i vraćeni u vakuumsku komoru. Ponovnim uspostavljanjem vakuuma postignuto je uklanjanje viška otopine PCL-a i sušenje nosača.

3.3. Karakterizacija materijala

3.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Uzorci su karakterizirani XRD Shimadzu 6000 difraktometrom s Bragg-Brentano geometrijom, scintilacijskim detektorom, $\text{CuK}\alpha$ izvorom rendgenskog zračenja i radijusom goniometra od 185 mm. Korišteni divergencijski otvor (engl. *divergence slit*) i filter raspršenja (engl. *scattering slit*) su 1° u ulaznoj zruci, filteri aksijalne divergencije - kolimatori (engl. *soller slits*) $4,6^\circ$, dok je na sekundarnoj zruci korišten otvor (engl. *receiving slit*) od 0,30 mm i sekundarni grafitni monokromator. Uzorci su snimani u području difrakcijskih kuteva od 5 do 70° s 2θ korakom od $0,02^\circ 2 s^{-1}$ za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te $0,02^\circ 10 s^{-1}$ za utočnjavanje strukture hidroksiapatita. Za XRD mjerenja praškasti uzorci pripremljeni su mljevenjem cijelog trodimenzionalnog nosača. Prilikom dodatka poznatog udjela standarda silicija (NIST 640e) uzorci su mljeveni i homogenizirani u etanolu korištenjem ahatnog tučka i tarionika. Identifikacija prisutnih kristalografskih faza provedena je usporedbom eksperimentalno dobivenih XRD difraktograma korištenjem identifikacijskih kartica ICDD baze (engl. *International Centre for Diffraction Data*); 41-1475 za aragonit, 09-432 za HAp i 70-2064 za vitlokit.

Utočnjavanje strukture Rietveldovom metodom utočnjavanja provedeno je korištenjem programa DIFFRAC.SUITE TOPAS v.5.0 (Bruker) [180]. Pozadina je opisana Chebyshevom polinomnom jednadžbom petog stupnja. Oblik pika opisan je pseudo-Voigt funkcijom. Struktura Holly Springs HAp-a [42] korištena je kao početni model za utočnjavanje strukture hidroksiapatita, gdje se u obzir ne uzima ugradnja CO_3^{2-} u strukturu. Utočnjeni su parametri jedinične ćelije, parametri pozicije pojedinih atoma unutar kristalne rešetke (engl. *positional parameters*) i njihovi faktori zauzeća (engl. *occupancies*) [181]. Strukture sintetskog vitlokita, $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$ [182] i aragonita [183] korištene su kao modeli za preostale kristalne faze.

3.3.1.1. TOPAS i Rietveldova metoda

Topas je komercijalni računalni program za opisivanje profila (engl. *profile fitting software*) zasebnog-pojedinog pika (engl. *single peak*), određenog raspona pikova (engl. *local pattern*) i cijelog difraktograma praha (engl. *whole powder pattern fitting*). Proračuni se temelje na nelinearnoj metodi najmanjih kvadrata za utočnjavanje sustava (engl. *general non-linear least squared fitting system*). U program s grafičkim sučeljem ugrađeni su različiti tipovi modela za analizu rezultata difrakcije X-zraka i neutronske difrakcije. Najvažnije značajke su simulatno utočnjavanje bilo kojeg difraktograma praha s bilo kojim brojem podatkovnih točaka, pikovi se mogu pripisati kristalografskim fazama za daljnje obrađivanje poput određivanja veličine kristalita i određivanje naprezanja, kvantitativne analize, određivanje strukture i Rietveldove strukturne karakterizacije. Korištenjem parametara instrumenta, ili njihovim određivanjem, određuje se instrumentalni doprinos na izgled difraktograma [180].

Rietveldova metoda [184] temelji se na analizi cijelog difraktograma kristalnih materijala i njegovom opisivanju kao sume doprinosa efekata uzorka i instrumenta. U Rietveldovoj metodi utočnjavanje se provodi metodom najmanjih kvadrata (engl. *nonlinear least squares refinement*) sve dok se ne postigne najbolje slaganje između cijelog izmjenjenog difraktograma i modelom izračunatog difraktograma. Izračunati difraktogram modelira se korištenjem strukturnih parametara vezanih uz kristalografske parametre materijala, profilnih parametara ovisnih o instrumentu i pripremljenom uzorku te parametara koji opisuju baznu liniju.

Iako je razlika izračunatog i eksperimentalnog profila difraktograma vjerojatno najbolji način praćenja i vođenja Rietveldovog utočnjavanja, slaganje izračunatog profila i izmjenjenih

podataka može se opisati numerički. Vrijednost numeričkog slaganja obično se iskazuje u vidu parametara slaganja ili R vrijednosti. Težinska vrijednost slaganja profila R_{wp} (engl. *resultant weighted-profile factor*) definira se jednadžbom 2,

$$R_{wp} = \{\sum_i w_i [y_i(obs) - y_i(calc)]^2 / \sum_i w_i [y_i(obs)]^2\}^{1/2} \quad (2)$$

gdje je $y_i(obs)$ izmjereni intenzitet pri koraku i , $y_i(calc)$ izračunati intenzitet i w_i težinski faktor. Izraz u brojniku vrijednost je koja se minimizira tijekom Rietveldova utočnjavanja. Konačne R_{wp} vrijednosti neutronske podataka obično su značajno manje (npr. nekoliko %) u odnosu na one dobivene na laboratorijskim uređajima (npr. ~ 10 %), primarno kao posljedica postojanja vrijednosti pozadinskog šuma (engl. *background*) [180,185,186].

3.3.2. Vibracijska spektroskopija

Infracrveni spektri s Fourierovim transformacijama (FTIR) praškastih uzoraka snimljeni su ATR-FTIR spektrofotometrom s dijamantnim kristalom (Bruker Vertex 70) pri 20 °C u mjernom području valnog broja od 400 do 4000 cm^{-1} rezolucijom od 4 cm^{-1} i 32 ponavljanja.

3.3.3. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza (TGA) provedena je na uređaju Netzsch STA 409 u atmosferi sintetskog zraka konstantnog protoka 30 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, brzinom grijanja od 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ u temperaturnom području od 40 do 1200 $^\circ\text{C}$.

3.3.4. Elektronska pretražna mikroskopija

Morfologija nosača istražena je elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM Tescan Vega III Easyprobe). Energijski razlučujuća rendgenska analiza (engl. *Energy Dispersive X-ray*, EDX) spojena na elektronski pretražni mikroskop (SEM ISIDS-130) korištena je za određivanje elementarnog sastava nosača. Prije SEM i EDX analize uzorci su 120 sekundi neparivani zlatom i paladijem.

3.3.5. Određivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva (tlačna čvrstoća i modul elastičnosti) odabranih uzoraka određena su pri tlačnom opterećenju korištenjem Microtest standard instrumenta (Microtest S.A.) s maksimalnim opterećenjem od 500 N i brzinom tlačenja (engl. *cross head velocity*) $0,2 \text{ mm min}^{-1}$. Uzorci nosača ($n = 9$) veličine $4 - 6 \times 4 - 6 \times 4 - 6 \text{ mm}$ ispitani su pri atmosferskim uvjetima (engl. *dry test*). Tlačno opterećenje primijenjeno je okomito na lamele svakog uzorka. Modul elastičnosti određen je kao nagib na inicijalno linearno područje krivulje naprezanje-deformacija.

3.4. Određivanje bioloških svojstava staničnim kulturama *in vitro*

Ispitivanjima *in vitro* odredio se utjecaj vrste i količine iona te postupka impregnacije površine nosača poli(ϵ -kaprolaktonom) na biološka svojstva pripremljenih nosača.

MTT test vijabilnosti odradio se staničnom kulturom gdje su stanice hranjene ekstraktom biološkog medija dobivenog namakanjem pripremljenih kalcij-fosfatnih uzoraka tijekom perioda od 7 dana. Na temelju rezultata vijabilnosti odabrani kalcij-fosfatni uzorci supstituirani magnezijem testirani su staničnom kulturom s ljudskim mezenhimskim matičnim stanicama. Prikazani su rezultati imunohistokemijske detekcije kolagena tipa I i osteokalcina te bojenja depozita kalcija alizarinskim crvenilom. Izoliran je ukupan RNA i provedena kvantifikacija alkalne fosfataze (ALP), koštanog sijaloproteina (BSP) i proteina matrice dentina (DMP1).

Na temelju cjelokupnih rezultata karakterizacije odabrani su uzorci ionima supstituiranih kalcij-fosfatnih nosača, impregnirani poli(ϵ -kaprolaktonom) i testirani novom staničnom kulturom s hMSC. Za kompozitne nosače prikazani su rezultati detekcije kolagena tipa I, bojenja staničnog tkiva hematoksilin-eozinom te su kvantificirani ALP i DMP1.

Značajna razlika između dviju grupa podataka određena je statističkom analizom korištenjem jednosmjerne analize varijance (engl. *one-way ANOVA test*) gdje su $p < 0,05$ i $p < 0,01$ vrijednosti uzete kao statistički značajne.

3.4.1. Citotoksičnost

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) test vijabilnosti korišten je za određivanje potencijalnog citotoksičnog utjecaja pripremljenih kalcij-fosfatnih nosača. Test je proveden kulturom s indirektnim kontaktom, gdje je ekstrakt biološkog medija dobiven namakanjem pripremljenih uzoraka služio za ispitivanje citotoksičnosti na ljudskim embrionalnim bubrežnim stanicama (engl. *human embryonic kidney*, HEK293). Stanice su nasadene gustoćom od 3000 stanica u 200 μL u triplikatima u mikrotitarsku tretiranu pločicu s 96 bunarčića (engl. *tissue-culture treated 96-well plate*) (Sarsted) u biološkom mediju za uzgajanje s 4500 mg L^{-1} glukoze (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM-high glucose*) (Lonza) koji sadrži 10 % govedeg seruma (engl. *fetal bovine serum, FBS*) (Gibco), 100 U mL^{-1} penicilina i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomocina (Sigma-Aldrich).

Prethodno pripremanju ekstrakata uzoraka u mediju, prah uzoraka je 4 sata dezinficiran u etanolu (96 % vol.), centrifugiran 5 minuta na 1500 x G, i tri puta ispran sterilnom otopinom fosfatnog pufera (engl. *sterile phosphate-buffered saline, PBS*). Tako dezinficirani uzorci suspendirani su u biološkom mediju s koncentracijom 10 mg mL^{-1} i inkubirani pri 4 °C kroz 7 dana. Nakon inkubacijskog perioda, ekstrakti su centrifugirani 5 minuta pri 1500 x G i korišteni za test vijabilnosti.

Nakon jednog dana stanične kulture, medij za uzgajanje zamijenjen je ekstraktima i inkubiran 72 h u atmosferi zraka s 5 % CO_2 pri 37 °C. Svježi medij za uzgajanje dodan je netretiranim kontrolnim stanicama, koje su definirane kao 100 % vijabilne. Nakon inkubacijskog perioda, 40 μL MTT (Sigma-Aldrich) dodano je u svaki bunarčić s koncentracijom od 0,5 mg mL^{-1} . Nakon 4 h pri 37 °C, kristali formazana otopljeni su dodavanjem 170 μL DMSO u svaki bunarčić. Nakon 20 minuta pri sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena na mikrotitarskom čitaču (GloMax-Multi detekcijski sustav, Promega) pri valnoj duljini od 560 nm. Postotak vijabilnih stanica uzgojenih s ekstraktima uzoraka izračunat je u odnosu na netretirane stanice.

3.4.2. Kultura hMSC *in vitro* u trodimenzionalnim statičnim uvjetima

Nasađivanje *in vitro* provedeno je na trima cilindričnim replikama nosača CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP s ljudskim mezenhimskim matičnim stanicama u periodu od 14 i 21 dan. Nakon završetka kulture osteogeni odaziv matičnih stanica na nosačima procijenjen je imunohistokemijskim bojenjem kolagena tipa I i osteokalcina, a depoziti kalcija detektirani su bojenjem alizarinskim crvenilom.

Osteogeni odaziv matičnih stanica na kompozitnim nosačima 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL nakon 21 dana ispitan je naknadnim ispitivanjem *in vitro*. Provedeno je imunohistokemijsko bojenje kolagena tipa I i bojenje staničnog tkiva hematoksilin-eozinom.

RT-qPCR analizom (engl. *reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction analysis*) kvantificirani su proteini specifični za različite stadije osteogeneze na kalcij-fosfatnim i kompozitnim uzorcima.

3.4.2.1. Izolacija i proliferacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica

Provedeni postupak primarne izolacije i kulture ljudskih mezenhimskih matičnih stanica detaljno je opisan u literaturi [22,187]. Ukratko, aspirat koštane srži dodan je u biološki medij za uzgajanje s 1000 mg L⁻¹ glukoze (DMEM-*low glucose*, Lonza) s 10 % FBS (Gibco), 100 U mL⁻¹ penicilina i 100 µg mL⁻¹ streptomicina (Lonza). Suspenzija je centrifugirana, stanice isprane u PBS-u te potom profiltrane (70 µm *cell strainer*, BD Biosciences). Izolirane stanice nasađene su gustoćom od 1 × 10⁸ u proliferacijskom mediju (DMEM-*low glucose*), nadopunjenim s 10 % FBS-a, 100 U mL⁻¹ penicilina, 100 µg mL⁻¹ streptomicina i 10 ng mL⁻¹ ljudskim faktorom rasta (engl. *human fibroblast growth factor 2*, FGF2) (Gibco) te čuvane u inkubatoru u atmosferi ovlaženog zraka pri 37 °C i 5 % CO₂. Medij je zamijenjen nakon 24 h adhezije i rasta stanica. Kad hMSC postanu 80 % konfluentne, odvajaju se s 0,25 % tripsin/EDTA otopinom (Sigma-Aldrich) i premještaju za ekspanziju. Proliferacijski medij je mijenjan svaka 2 – 3 dana.

3.4.2.2. Osteogena diferencijacija hMSC

Prije nasadivanja stanica, nosači su sterilizirani γ -zrakama (25 kGy). Stanice su nasadene na nosače (izrezani u 6 mm promjera okomito na lamelarnu strukturu) s gustoćom od 5×10^5 stanica u 200 μ L proliferacijskog medija u mikrotitartsku netretiranu pločicu s 96 bunarčića (Sarsted) u triplicatima. Nakon 24 sata proliferacijski medij zamijenjen je medijem za osteogenu indukciju (engl. *Minimum Essential Medium-Alpha Eagle*, α -MEM) (Lonza) s 10 % FBS, 1 % penicilina/streptomocina, 50 μ g mL⁻¹ askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich), 4 mmol L⁻¹ β -glicerofosfata (Sigma-Aldrich) i 1×10^{-7} mol L⁻¹ deksametazona (Sigma-Aldrich). Medij je mijenjan svaka 2 dana tijekom kulture u trajanju od 14 i 21 dana.

3.4.2.3. Imunohistokemijska detekcija kolagena tipa I i osteokalcina

Ekspresije osteogenih markera kolagena I i osteokalcina odabrane su za imunohistokemijsku analizu da bi se procijenio kapacitet osteogene diferencijacije hMSC na nosačima. Priprema sekcija i tretiranja provedena je kao u radu Rogina i sur. [22]. Nakon 14 i 21 dana osteogene diferencijacije, nosači su izvađeni iz medija i fiksirani u 4 % paraformaldehidu. Nakon postizanja ravnoteže u puferu PBS-a i 30 % saharoze kroz 48 h, uzorci su uklopljeni u krio-zaštitni medij (engl. *optimal cutting temperature medium*) (*O.C.T. compound*, Sakura, CA, USA) i smrznuti na - 80 °C. Uzorci su izrezani na tanke filmove debljine 10 μ m (cryostat, Leica, Wetzlar, Germany) i postavljeni na stakalca (*Superfrost Plus slides*, Thermo Fisher Scientific). Nosači bez stanica pri istim uvjetima kulture korišteni su kao kontrole. Sekcije su podvrgnute otkrivanju antigena proteinazom K (*Proteinase K Ready to use*, Dako, Togo) na 3 minute pri sobnoj temperaturi.

Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je s 3 % H₂O₂ u PBS-u kroz 3 – 6 minuta. Nespecifična mjesta blokirana su 10 % otopinom kozjeg seruma (Dako) u PBS-u na 60 minuta pri sobnoj temperaturi. Obradjeni tanki filmovi uzoraka inkubirani su primarnim antitijelom, anti-kolagen I (Abcam, Cambridge, UK), razrijeđenim 1 : 400 ili anti-osteokalcin (FL-100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) razrijeđenim 1 : 50, u 1 % kozjem serumu u PBS preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja, signal obojenja detektiran je s *EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse* (Dako). Hematoksilin je korišten kao kontrastno bojilo. Negativne kontrole obrađene se na isti način uz izostavljanje primarnog antitijela. Ljudska kost korištena je kao pozitivna kontrola. Svi obojeni filmovi snimljeni su korištenjem Olympus BX51 mikroskopa na kojeg je spojena digitalna kamera.

3.4.2.4. *Histološka analiza*

Razvoj kalcificirane izvanstanične matrice hMSC-a na nosačima procijenjen je nakon 14 i 21 dana kulture korištenjem Alizarin Red S (Sigma Aldrich) seta za bojenje. Uzorci su bojani 2 minute s 2 % mas./vol. otopinom alizarinskog crvenila (pH 4,4), dehidrirani i stavljeni na stakalca korištenjem Biognost medija za montiranje. Hematoksilin-eozin bojenjem obojeno je nastalo tkivo na nosačima. Hematoksilin je bazična boja koja staničnim jezgrama daje plavo-ljubičasto obojenje. Eozin bazičnim komponentama, citoplazmi i izvanstaničnoj matrici, daje crveno-ružičasto obojenje. Fotomikrografi snimljeni su digitalnom kamerom na Olympus BX51 mikroskopu.

3.4.2.5. *Izolacija ukupnog RNA i RT-qPCR analiza*

Ukupni RNA prikupljen je s tkiva nakon 14 i 21 dana kulture korištenjem TRIzol reagensa (Invitrogen Life Technologies) prema proizvođačevim uputama. Ukratko, uzorci su isprani u hladnom PBS-u, homogenizirani u 1 mL TRIzol reagesa (Thermo Fisher) korištenjem tresilice (Retsch) pri 15 Hz u trajanju od 3 minute i pomiješani s kloroformom. U gornju vodenu fazu koja sadrži RNA dodano je 50 mmol L⁻¹ EDTA nakon čega slijedi RNA precipitacija izopropanolom. 0,5 µg ukupne RNA tretirano je s DNase I dodatkom 10 × DNase I reakcijskog pufera i 50 mmol L⁻¹ EDTA (Applied Biosystems). Potom je DNase I-tretirani RNA upotrebljen za sintezu cDNA uz korištenje seta *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems). Reverzna transkripcija provedena je miješanjem u termomikseru (Eppendorf) pri sljedećim uvjetima: 10 minuta pri 25 °C, 120 minuta pri 37 °C i 5 minuta pri 85 °C.

Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) korišten je za analizu ekspresije komercijalno dostupnih primera (Sigma-Aldrich) za alkalnu fosfatazu (engl. *alkaline phosphatase*, ALPL), koštanog sijaloproteina (engl. *bone sialoprotein*, BSP) i proteina matrice dentina (engl. *dentin matrix protein 1*, DMP1). RT-qPCR proveden je na 7500 Fast Real-Time PCR System uređaju (Applied Biosystems). Uvjeti PCR reakcije su 10 minuta pri 95 °C za 1 ciklus, 15 sekundi pri 95 °C i 1 minuta pri 57 °C za 40 ciklusa. Ekspresija je normalizirana prema β -aktinu. Relativna ekspresija ciljanih gena izračunata je korištenjem $\Delta\Delta C_t$ method.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Magnezijem supstituirani hidroksiapatit

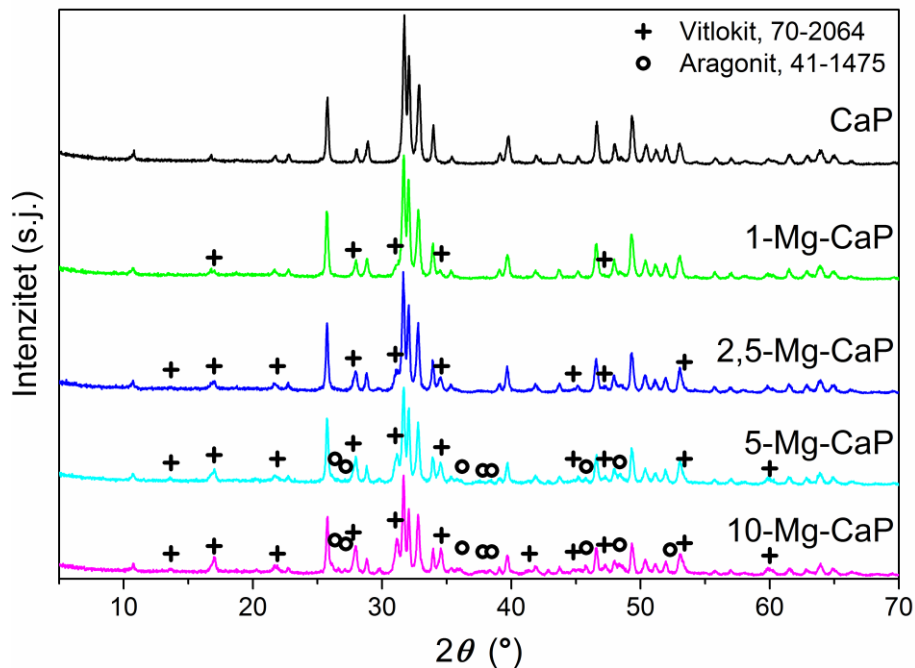
Korištenjem dvaju različitih prekursora, magnezij klorid heksahidrata i magnezij perklorata *in situ* hidrotermalnom transformacijom sipine kosti uspješno su pripremljeni uzorci magnezijem supstituiranih kalcij-fosfatnih nosača (slika 13). Kako je pristup karakterizaciji materijala jednak za sve pripravljene uzorke, ukoliko nema primjetne razlike između rezultata dobivenih s dva različita prekursora magnezija, u sljedećim poglavljima karakterizacije magnezijem supstituiranih nosača biti će prikazani rezultati karakterizacije nosača pripremljenih korištenjem magnezijevog perklorata. Primjetne razlike između materijala sintetiziranih pomoću dva različita prekursora magnezija, vidljive kod kvantitativne analize rendgenske difrakcije praha i MTT testa na vijabilnost, biti će jasno naglašene.



Slika 13. Kalcij-fosfatni nosači dobiveni hidrotermalnom sintezom sipine kosti.

4.1.1. Rendgenska difrakcijska analiza

XRD difraktogrami nesupstituiranog i magnezijem supstituiranih nosača prikazani su na slici 14.



Slika 14. XRD difraktogrami pripremljenih CaP i Mg-CaP uzoraka. 2θ pozicije vitlokita i aragonita redom su označene s (+) i (o). Svi pikovi CaP uzorka pripisuju se HAp-u (ICDD 09-432), a pozicije nisu označene zbog preglednosti grafa.

XRD difraktogram CaP uzorka pokazuje dobro slaganje s identifikacijskom karticom HAp-a (ICDD 09-432) – svi difrakcijski maksimumi pripisani su hidroksiapatitu. Nesupstituirani CaP nosač u potpunosti je transformiran u hidroksiapatit, što je u skladu s literaturnim podacima [14].

Uzorak 1-Mg-CaP identificiran je kao dvofazna smjesa hidroksiapatita i vitlokita, s dobrim slaganjem za HAp i identifikacijskom karticom vitlokita (ICDD 70-2064). U uzorcima 2,5-Mg-CaP, 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP, uz HAp i WH, dodatno su vidljivi pikovi niskog intenziteta koji se poklapaju s difrakcijskim maksimumima aragonita (ICDD 41-1475). Prisutnost male količine netransformiranog aragonita ne bi trebala imati nepovoljan utjecaj na svojstva nosača jer pojedini radovi iznose da nosači temeljeni na aragonitu imaju osteogeni kapacitet i primijenjeni su kao biomedicinski materijali [188–190].

4.1.1.1. *Kvantitativna analiza i utočnjavanje strukture*

Analiza Rietveldovom metodom provedena je na XRD difraktogramima pripremljenih uzoraka i određeni su parametri kristalne rešetke, veličine kristalita i maseni udio prisutnih faza. Što se tiče utočnjavanja strukture hidroksiapatita, s obzirom na vrijednosti P1, O1, O2 i O3 faktora zauzeća (PO_4 grupe), i/ili H1 i O4 faktora zauzeća (OH grupe), u obzir je uzeto nekoliko različitih pretpostavki i ograničenja. Razmotrene su dvije opcije utočnjavanja faktora zauzeća PO_4 grupe, ograničenje da svi faktori poprimaju istu vrijednost te da svaki faktor zauzeća može zasebno zaprimiti svoju vrijednost. Kod OH grupe faktori zauzeća poprimaju istu vrijednost.

U literaturi nema konsenzusa oko precizne lokacije i konfiguracije dvovalentnog planarnog CO_3^{2-} iona prilikom supstitucije trovalentnog tetraedarnog fosfatnog iona u B-tip karbonatnim apatitima [191]. Kako predloženi modeli supstitucije karbonata nisu u potpunosti pouzdani i dobiveni su indirektno najboljim slaganjem s difraktogramima rendgenske difrakcije praha na temelju ograničenog broja sintetskih uzoraka [191], provedeno je utočnjavanje strukturnog modela bez eksplicitne ugradnje CO_3^{2-} iona u strukturu hidroksiapatita. Dodatni razlog zašto karbonatna grupa nije uključena u utočnjavanje jest mala razlika između atomskog faktora raspršenja C i P. Atomi ugljika i fosfora jasno se ne razlikuju, osobito kada je udio ugljika malen [192].

Primjenom različitih kombinacija pretpostavki i ograničenja u grafičkom slaganju eksperimentalno izmjenjenog i modelom izračunatog difraktograma, u vrijednosti slaganja R_{wp} i u stabilnosti proračuna nije uočeno značajno odstupanje ili poboljšanje. Konačno primijenjeni princip utočnjavanja za strukturu hidroksiapatita jest onaj gdje su vrijednosti faktora zauzeća pozicija atoma PO_4 grupe utočnjeni neovisno jedan o drugome, a vrijednosti OH grupe su ograničeni na istu vrijednost od 0,5.

Struktura hidroksiapatita utočnjena je na temelju difraktograma CaP uzorka, difraktograma jednofaznog uzorka koji sadrži samo hidroksiapatit, a vrijednosti dobivenih parametara prikazani su u tablici 3. Tako utočnjena struktura korištena je kao inicijalna za proračune magnezijem i stroncijem supstituiranih uzoraka, gdje su utočnjavani samo parametri jedinične ćelije.

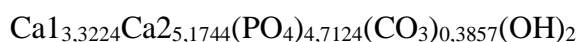
Tablica 3. Broj atoma unutar jedinične ćelije (Np), vrijednosti pozicijskih parametara (x , y , z) i faktora zauzeća (engl. *occupancies*, *Occ.*) pojedinih atoma unutar strukture hidroksiapatita utočnjene Rietveldovom metodom na temelju difraktograma CaP uzorka uz dodatak silicij standarda (NIST 640e).

| Atom | Np | x | y | z | <i>Occ.</i> |
|-------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Ca1 | 4 | 1/3 | 2/3 | 0,0009 | 0,8306 |
| Ca2 | 6 | 0,2469 | 0,9920 | 1/4 | 0,8624 |
| P1 | 6 | 0,3956 | 0,3673 | 1/4 | 0,7854 |
| O1 | 6 | 0,3307 | 0,4818 | 1/4 | 0,8744 |
| O2 | 6 | 0,5794 | 0,4613 | 1/4 | 0,8643 |
| O3 | 12 | 0,3371 | 0,2537 | 0,0697 | 0,8198 |
| O4 | 4 | 0 | 0 | 0,1809 | 0,5000 |
| H1 | 4 | 0 | 0 | 0,0050 | 0,5000 |

Prilikom pripreme uzorka za snimanje rendgenske difrakcijske analize praha u CaP uzorak dodan je poznati maseni udio unutarnjeg standarda silicija (NIST 640e). Standard služi za provjeru odstupanja difrakcijskih maksimuma uslijed sistematskog utjecaja difrakcijskog uređaja i postupka pripreme uzorka. Dodatak poznatog udjela standarda u uzorak koji se analizira rendgenskom difrakcijom omogućuje određivanje udjela amorfne faze unutar uzorka. Za uzorak CaP procijenjeni udio amorfne faze iznosi samo 2,63 %.

Izračunati molarni omjer Ca/P utočnjene strukture hidroksiapatita iznosi 1,80, što je nešto više od stehiometrijske vrijednosti (1,667) i ukazuje na nedostatak PO_4^{3-} i prisutnost karbonatnog iona u strukturi, što je kasnije potvrđeno analizom FTIR podataka. Kako FTIR rezultati ukazuju da pojava i povećanje udjela vitlokita (tj. smanjenje udjela hidroksiapatita) u pripremljenim uzorcima smanjuje intenzitet CO_3^{2-} vibracijskih vrpca, pretpostavlja se da je CO_3^{2-} uglavnom smješten u apatitnoj fazi.

Količina ugrađenog CO_3^{2-} u strukturu HAp-a izračunata je pod pretpostavkom da je omjer kalcijevih pozicija po jediničnoj ćeliji 10 : 6 u odnosu na sumu pozicija PO_4^{3-} i CO_3^{2-} . Formula jedinične ćelije hidroksiapatita dobiven utočnjavanjem jest:



Izračunati naboj CaP uzorka, čistog HAp-a, ukazuje da je struktura blago pozitivno nabijena (+0,085). Dobivena vrijednost znatno je manja u odnosu na literaturne podatke sličnih struktura dobivenih Rietveldovim utočnjavanjem [13], koji pokazuju površinski naboj od 0,21 i gdje se nebalans naboja kompenzira povećanjem udjela OH^- iona, s 2,33 na 2,54.

Rezultati kvantitativne analize uzoraka pripremljenih iz dva različita prekursora magnezija prikazani su u tablici 4. Dodatak magnezija u reakcijsku smjesu rezultira smanjenjem udjela HAp-a i povećanjem udjela vitlokita te netransformiranog aragonita. Udio amorfne faze u svim uzorcima kreće se između 2,63 i 7,68 mas. %.

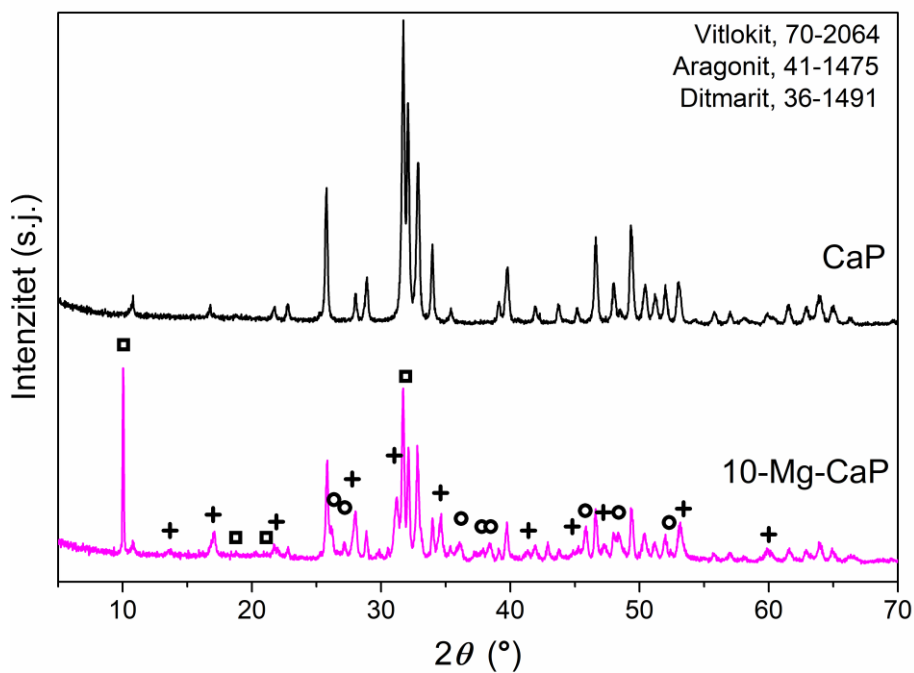
Kod uzoraka sintetiziranih s magnezij klorid heksahidratom kao prekursorom pri 1 i 2,5 mol. % dodanog magnezija zabilježen je veći maseni udio vitlokita, a pri 5 i 10 mol. % veći udio neizreagiralog aragonita u odnosu na uzorke u kojima je prekursor magnezij perklorat. Dodatno, uzorci 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP sintetizirani korištenjem magnezij klorid heksahidrata pokazuju novi pik visokog intenziteta na $2\theta = 10,0^\circ$, koji se pripisuje (0 1 0) *hkl*-u ditmarita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, ICDD 34-1491). Usporedba difraktograma uzorka CaP i 10-Mg-CaP uz korištenje magnezij klorid heksahidrata kao prekursora prikazana je na slici 15. Ostali difrakcijski maksimumi ditmarita nisu prisutni zbog izrazite preferirane orijentacije kristala ditmarita u smjeru (0 1 0) plohe i vrlo malog masenog udjela faze (manje od 1 mas. % određeno kvantitativnom analizom). Kristali ditmarita formiraju se na površini nosača ili u reakcijskoj otopini kao precipitat. Pojava ditmarita objašnjava se činjenicom da je korišteni prekursor fosfata amonijev dihidrogenfosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Amonijak kao plinovita faza u reaktoru, pri uvjetima visokog tlaka i temperature, u prisustvu magnezija, koji se sporo ugrađuje u strukturu apatita, tvori ditmarit [193,194].

Provedena Rietveldova utočnjavanja završila su faktorom slaganja (engl. *resultant weighted profile factor*, R_{wp}) u rasponu od 6 do 11 % (tablica 4). R_{wp} vrijednosti ukazuju na dobro slaganje između izračunatih i eksperimentalnih podataka, što slike 16 a) i b) potvrđuju dobrim grafičkim slaganjem izmjerenog i izračunatog difraktograma.

Tablica 4. Rezultati kvantitativne analize XRD rezultata provedene Rietveldovom metodom za uzorke supstituirane magnezijem iz dva različita prekursora magnezija, magnezij perklorata, odnosno magnezij klorid heksahidrata.

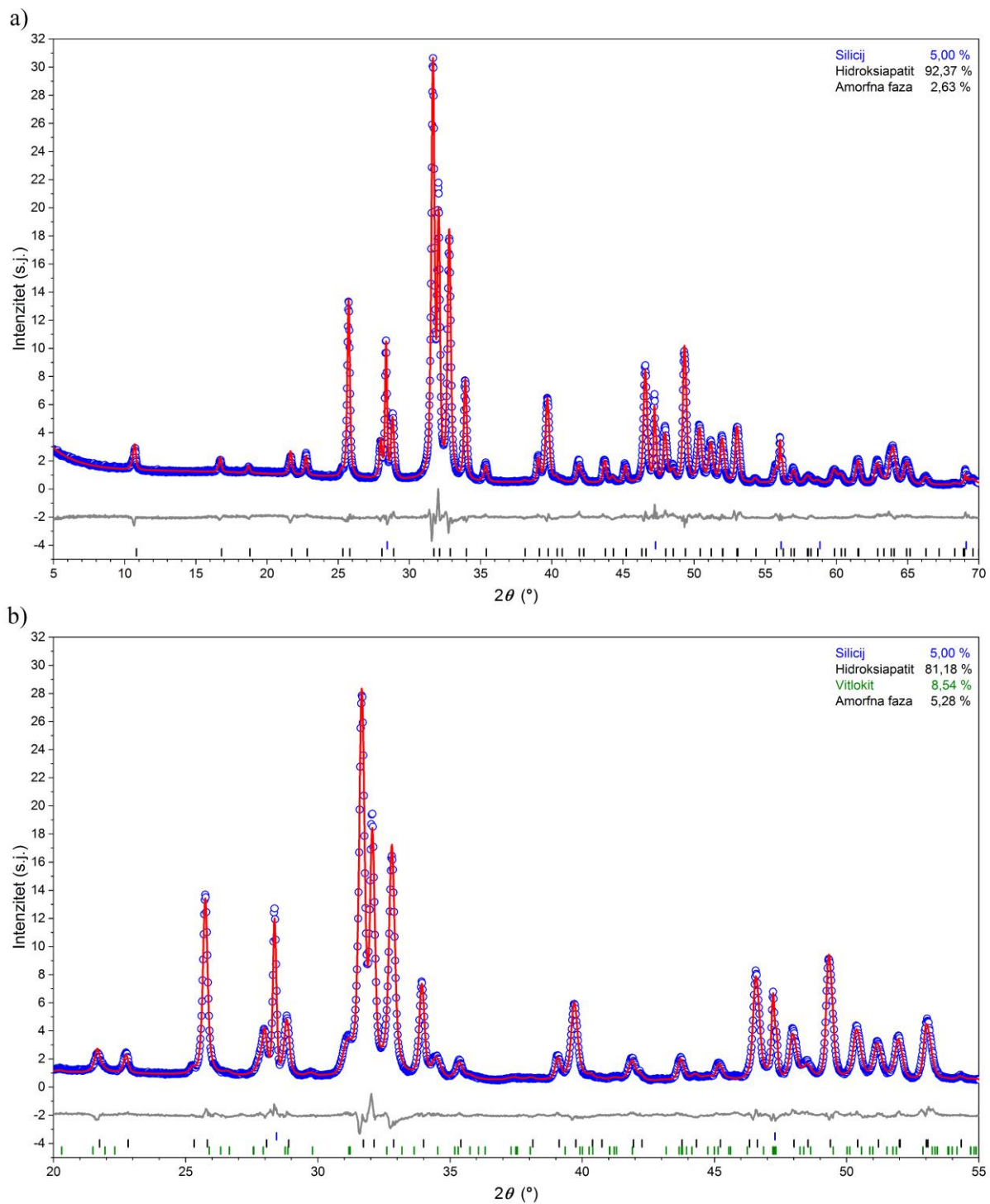
| Prekursor | Magnezij perklorat | | | Magnezij klorid heksahidrat | | | | |
|------------|--------------------|--------|----------|-----------------------------|--------|-------|----------|----------|
| | | mas. % | | R_{wp} | mas. % | | | R_{wp} |
| Uzorak | HAp | WH | Aragonit | | HAp | WH | Aragonit | |
| CaP | 100 | 0 | 0 | 5,98 | | | | |
| 1-Mg-CaP | 90,48 | 9,52 | 0 | 6,06 | 87,10 | 12,90 | 0 | 6,65 |
| 2,5-Mg-CaP | 87,03 | 11,19 | 1,78 | 6,41 | 79,10 | 20,20 | 0,70 | 7,87 |
| 5-Mg-CaP | 69,25 | 28,84 | 1,91 | 7,05 | 72,14 | 23,23 | 4,63 | 7,67 |
| 10-Mg-CaP | 53,61 | 38,64 | 7,75 | 7,24 | 55,76 | 31,85 | 11,95* | 11,03 |

* w (ditmarit) = 0,44 %



Slika 15. XRD difraktogrami CaP i 10-Mg-CaP uzoraka uz korištenje magnezij klorid heksahidrata. 2θ pozicije vitlokita, aragonita i ditmarita redom su označene s (+), (o) i (□). Svi pikovi CaP uzorka pripisuju se HAp-u (ICDD 09-432), a pozicije nisu označene zbog preglednosti grafa.

Veći udio neizreagiranog aragonita i pojava ditmarita prilikom dodatka veće količine magnezij klorid heksahidrata kao prekursora, ukazuje na potpuniju hidrotermalnu konverziju aragonita prilikom korištenja magnezij perklorata kao prekursora magnezija.



Slika 16. Grafički prikaz Rietveldove metode utočnjavanja na difraktogramu uzorka a) CaP i b) 1-Mg-CaP, uz dodatak 5 mas. % Si standarda. Puna crvena linija pokazuje slaganje modelom izračunatog profila, dok plavi kružići prikazuju eksperimentalno dobivene podatke. Razlika između eksperimentalnih i modelom dobivenih podataka pokazana je ispod difraktograma sivim kružićima. Linije na dnu slike označuju položaje Braggovih refleksija za standard silicij (plave linije), hidroksiapatit (crne linije) i vitlokrit (zelene linije).

Tablica 5. Parametri jedinične ćelije HAp faze dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja difraktograma uzoraka CaP i Mg-CaP (prekursor magnezij perklorat).

| Uzorak | Hidroksiapatit | | | |
|-------------------|---|--------------|---------------------------|---------------------------------|
| | Parametri jedinične ćelije (P6 ₃ /m) | | | Veličina kristalita |
| | <i>a</i> (Å) | <i>c</i> (Å) | Volumen (Å ³) | <i>L</i> _{vol-IB} (nm) |
| CaP | 9,4330 | 6,8981 | 531,573 | 55,633 |
| 1-Mg-CaP | 9,4325 | 6,8964 | 531,382 | 67,307 |
| 2,5-Mg-CaP | 9,4297 | 6,8987 | 531,238 | 70,922 |
| 5-Mg-CaP | 9,4340 | 6,8944 | 531,400 | 91,867 |
| 10-Mg-CaP | 9,4361 | 6,8903 | 531,315 | 74,950 |

Kao što je vidljivo iz tablice 5, parametri i volumen jedinične ćelije HAp-a ne pokazuju sistematsku promjenu s povećanjem udjela magnezija u uzorcima. Očekivalo se da će Rietveldovo utočnjavanje dati više informacija o ugradnji magnezijeva iona u strukturu hidroksiapatita. Pronađeno je da različite pretpostavke nemaju značajan utjecaj na sastav i dimenzije jedinične ćelije. Rezultati ukazuju na izostanak ugradnje ili vrlo malu ugradnju Mg²⁺ iona u HAp strukturu. Prijašnja istraživanja [80,81] pokazala su da se supstitucija Mg²⁺ za Ca²⁺ u hidroksiapatitnoj strukturi odvija samo kroz ograničeni raspon sastava (do oko 10 mas. %), gdje je većina površinski povezana ili se nalazi u zasebnoj kristalografskoj fazi.

Rietveldova metoda utočnjavanja nije bila dovoljno osjetljiva za određivanje supstitucije Mg²⁺ iona u obje kristalografske faze, hidroksiapatitu i vitlokitu. Ispitano je utočnjavanje strukture hidroksiapatita i vitlokita uz ugradnju Mg²⁺ iona na odgovarajuće Ca pozicije unutar kristalne strukture. Mg faktori zauzeća unutar strukture HAp težili su vrijednosti nula, i na preferiranoj Ca(II) poziciji, i na Ca(I) poziciji. Stoga su Mg faktori zauzeća izuzeti iz postupka utočnjavanja. Što se tiče utočnjavanja kristalne faze vitlokita, postignute su vrijednosti faktora zauzeća magnezija od 0,9363, 0,9863, 1,054 i 1,053 redom za uzorke 1-, 2,5-, 5- i 10-Mg-CaP. Uzimajući u obzir promjene na razini parametara jedinične ćelije, utočnjeni parametri vitlokita prikazani u tablici 6 ukazuju da se Mg²⁺ ioni preferirano ugrađuju u vitlokite.

Tablica 6. Parametri jedinične ćelije vitlokit faze dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja difraktograma uzoraka CaP i Mg-CaP.

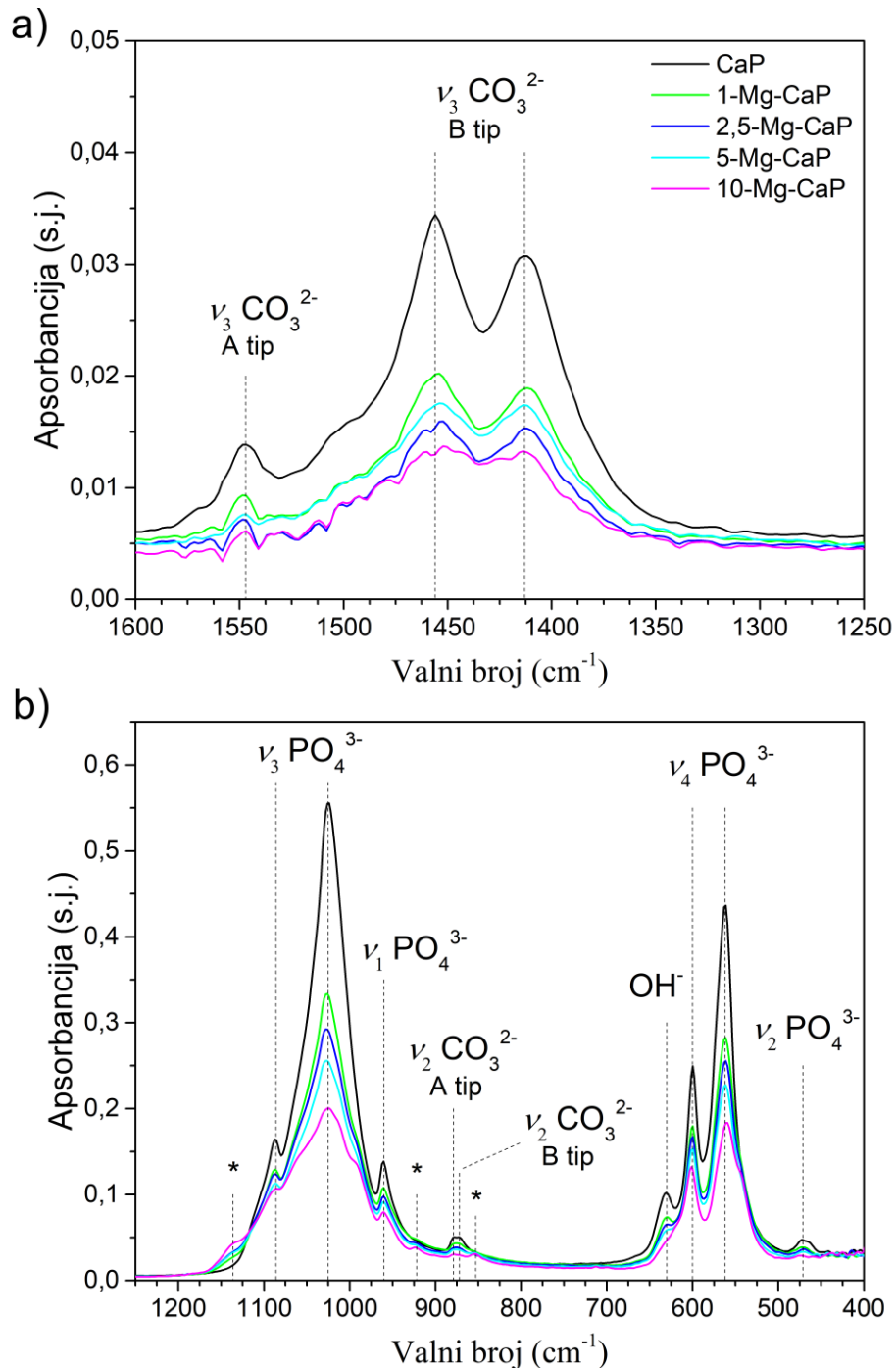
| Vitlokit | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|---------------------------|---------------------|
| Uzorak | Parametri jedinične ćelije (R3C) | | | Veličina kristalita |
| | a (Å) | c (Å) | Volumen (Å ³) | L_{vol-IB} (nm) |
| CaP | - | - | - | - |
| 1-Mg-CaP | 10,3795 | 37,2133 | 3472,044 | 24,680 |
| 2,5-Mg-CaP | 10,3751 | 37,2076 | 3468,537 | 23,682 |
| 5-Mg-CaP | 10,3716 | 37,2386 | 3469,069 | 22,631 |
| 10-Mg-CaP | 10,3570 | 37,2020 | 3455,939 | 25,010 |

Utočnjavanje strukture vitlokita ukazuje na smanjenje parametara jedinične ćelije a i c , te volumena jedinične ćelije s povećanjem udjela magnezija. Uzorak 5-Mg-CaP pokazuje blago odstupanje od pravilnosti. Supstitucija iona kalcija, ionskog radijusa 0,99 Å, ionom magnezija, manjeg ionskog radijusa od 0,65 Å, utječe na kontrakciju jedinične ćelije vitlokita.

Veličina kristalita hidroksiapatita u pripremljenim uzorcima kreće se od 55 do 96 nm. Veličina kristalita CaP-a (čistog HAp-a) slična je onima dobivenim u prethodnim radovima [13], dok su Rocha i suradnici [128] zabilježili raspon veličine HAp kristalita između 20 i 50 nm. Jako mala razlika u veličini kristalita (između 22 i 25 nm) dobivena je za WH fazu u svim pripremljenim uzorcima s magnezijem.

4.1.2. Vibracijska spektroskopija

Identifikacija pripremljenih uzoraka infracrvenom spektroskopijom prikazana je na slikama 17 a) i b).



Slika 17. FTIR spektri nesupstituiranog CaP uzorka i uzoraka supstituiranih magnezijem a) područje valnih brojeva 1600 – 1250 cm⁻¹ b) područje valnih brojeva 1250 – 400 cm⁻¹.

Najintenzivnije vrpce na 1086 i 1022 cm^{-1} pripisuju se asimetričnim vibracijama istezanja (engl. *antisymmetric vibrations*, ν_3) P-O veze. Signali pri 598 i 563 cm^{-1} pripadaju vibracijama savijanja (engl. *bending vibrations*, ν_4) O-P-O grupe. Pik pri 963 cm^{-1} posljedica je simetričnog istezanja (engl. *symmetric vibration*, ν_1) P-O veze. Vrpca na 473 cm^{-1} pripada ν_2 domeni zbog savijanja O-P-O grupe. Spomenute vibracije karakteristične su za PO_4 grupu i dobro su definirane u spektru čistog hidroksiapatita.

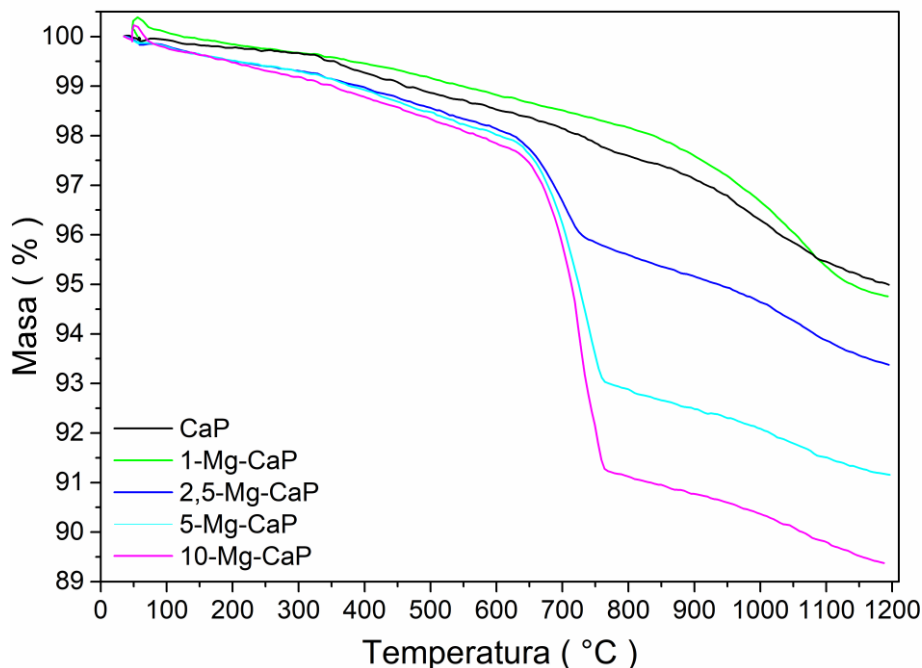
Povećanje udjela magnezija u Mg-CaP uzorcima rezultiralo je širenjem fosfatnih vrpca i značajnim smanjenjem intenziteta što može biti povezano sa smanjenjem relativnog udjela HAp faze i smanjenjem kristalnosti uzorka. Ugradnja Mg^{2+} destabilizira strukturu hidroksiapatita i stabilizira kristalnu fazu vitlokita. Smanjenje intenziteta vibracijskih vrpca OH^- na 3572 i 630 cm^{-1} u skladu je s literaturnim podacima [195,196]. FTIR spektri uzoraka s većim udjelom magnezija, 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP, pokazuju pojavu ramena (engl. *shoulders*) na otprilike 1060 cm^{-1} i 990 cm^{-1} . Pojava vrpca niskog intenziteta pri 1136, 922 i 853 cm^{-1} (označenih zvjezdicom, *, na slici 17 b) u skladu je s formiranjem i povećanjem udjela vitlokita [111], što je i potvrđeno rezultatima XRD analize.

Jedna od prednosti vibracijskih spektroskopija u odnosu na XRD jest relativno jednostavna mogućnost identifikacije finih strukturnih detalja. U analizi apatita to se odražava u mogućnosti određivanja smještanja karbonatne grupe na različitim pozicijama unutar apatitne strukture. Vibracijske vrpce na 1456 i 1413 cm^{-1} pripisane su ν_3 modu istezanja CO_3^{2-} grupe, dok je vrpca pri 872 cm^{-1} karakteristična za ν_2 savijanje CO_3^{2-} , čime je potvrđena supstitucija karbonata B-tipa, karakteristična za biološke apatite, gdje karbonatna grupa dominantno zauzima kristalografske pozicije PO_4^{3-} grupe u apatitnoj rešetci [64,197–199]. Detaljna analiza FTIR spektra ukazuje i na prisutnost malog udjela A-tip supstituiranog hidroksiapatita, gdje CO_3^{2-} supstituira hidroksilni ion (OH^- grupu). Vrpca na 1549 cm^{-1} i vrlo slabi signal na 879 cm^{-1} odgovaraju ν_3 i ν_2 vibracijama CO_3^{2-} grupe, svojstvene za A-tip karbonatnog hidroksiapatita [197,200,201].

Kako je karbonatni HAp kemijskim sastavom sličniji sastavu minerala prirodne ljudske kosti nego čisti stehiometrijski HAp [192], i eksperimentalno je pokazano poboljšanje biokompatibilnosti [50,202], sintetizirani hidroksiapatitni nosači s dominantnom karbonatnom supstitucijom B-tipa pokazuju dobra svojstva za primjenu materijala za koštani nadomjestak. Očito je da dodatak magnezija smanjuje intenzitet karbonatnih vibracijskih vrpca kod Mg-CaP uzoraka u odnosu na CaP, na temelju čega se može pretpostaviti da se karbonatni ion ne ugrađuje u strukturu vitlokita.

4.1.3. Termogravimetrijska analiza

Rezultati termogravimetrijske analize pripremljenih uzoraka prikazani su na slici 18.



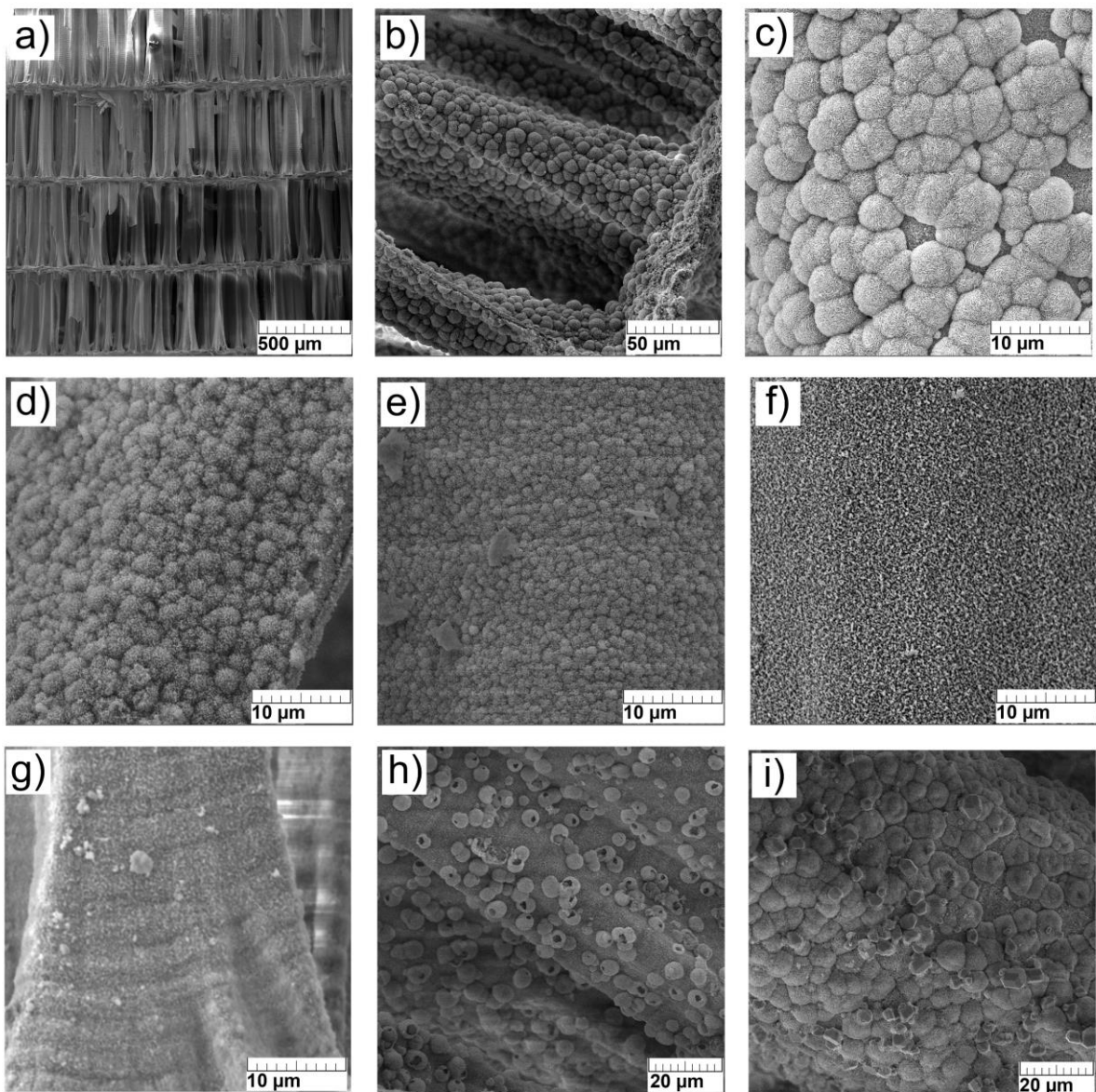
Slika 18. Rezultati termogravimetrijske analize CaP i Mg-CaP uzoraka u atmosferi sintetičkog zraka, temperaturnog raspona od 40 do 1200 °C i brzine grijanja 10 °C min⁻¹.

Nosači CaP i 1-Mg-CaP pokazuju sličnu toplinsku stabilnost i ukupni gubitak mase je 5,0 i 5,3 %. Povećanjem udjela magnezija raste ukupni gubitak mase i iznosi 6,6, 8,8 i 10,7 % redom za uzorke 2,5-Mg-CaP, 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP. Gubitak mase na otprilike 350 °C može se pripisati gubitku fizikalno adsorbirane i strukturno vezane vode. Daljnji postepeni gubitak mase CaP nosača pripisuje se oslobađanju CO₂ zbog raspada karbonatnog iona (iznad 550 °C) koji se supstituira na mjesto fosfatne grupe unutar hidroksiapatitne strukture i čija je prisutnost potvrđena FTIR spektroskopijom.

Toplinska analiza nosača 2,5-Mg-CaP, 5-Mg-CaP i 10-Mg-CaP pokazuje brz gubitak mase pri temperaturi od 700 °C zbog oslobađanja vode koja nastaje kondenzacijom HPO₄²⁻ iona ugrađenih u strukturu vitlokita. Vitlokite, (Ca₁₈Mg₂(HPO₄)₂(PO₄)₁₂) dehidracijom gubi HPO₄²⁻ i transformira se u β-trikalcij-fosfat (β-Ca_{3-x}Mg_x(PO₄)₂) [84,86,88,89,182].

4.1.4. Analiza mikrostrukture

Mikrostruktura pripremljenih nosača istražena je SEM analizom. Na slici 19 a) vidljiva je slojevita kvazi-periodična međupovezana struktura sipine kosti koja je u potpunosti očuvana nakon hidrotermalne sinteze. Struktura se sastoji od lamela razdvojenih mnogim stupovima visine 400 μm koji međusobno tvore povezane kanale širine između 50 i 100 μm . Pri većim povećanjima na površini lamela i stupova CaP nosača (slike 19 b - c) vide se nepravilne nakupine mikrosfera koje nalikuju na morfologiju cvjetače i karakteristične su za hidroksiapatit.



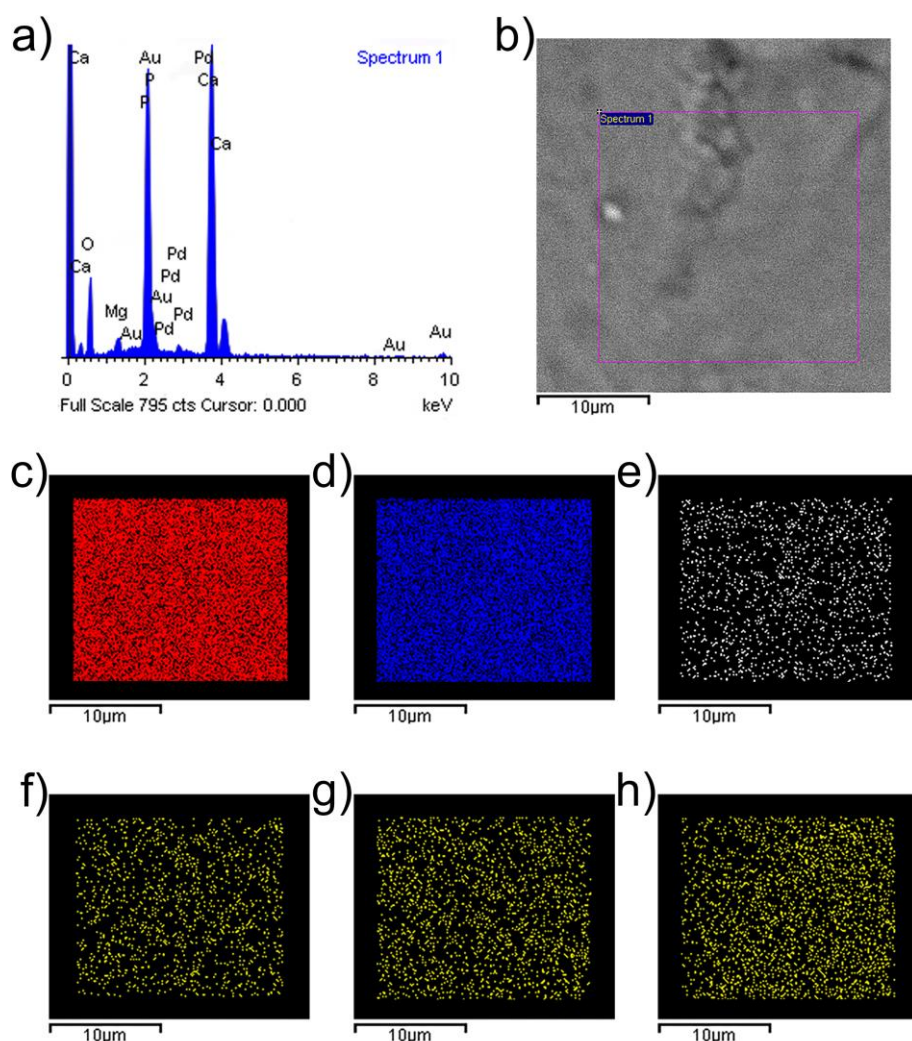
Slika 19. SEM mikrografi površine nosača a) – c) CaP, d) 1-Mg-CaP, e) 2,5-Mg-CaP, f) 5-Mg-CaP te g) – i) 10-Mg-CaP.

Optimalna veličina pora nosača za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva tema je mnogih rasprava. Za uspješan proces regeneracije kosti minimalna veličina pora je između 100 i 150 μm , dok nosači s veličinom pora većom od 300 μm poboljšavaju formiranje kosti i vaskularizaciju [203]. Sintetizirani nosači visoke poroznosti ($\sim 90\%$) i porama veličine od 50 do 500 μm zadovoljavaju spomenuti kriterij.

Dodatak Mg^{2+} iona utjecao je na promjenu morfologije površine Mg-CaP uzoraka. Povećanjem udjela magnezija mikrosfere postaju manje, što je vidljivo usporedbom slike 19 d) – f). Slični rezultati pronađeni su i u literaturi [204]. SEM mikrografi 10-Mg-CaP nosača, s najvećim udjelom vitlokita, pokazuju nehomogena područja koja tvore različite oblike aglomerata. Šuplje nepravilne mikrosfere vidljive na slici 19 h) primijećene su za WH i HAp faze [205,206]. Qi i sur. [205] pripremili su šuplje sfere WH konvencionalnom hidrotermalnom analizom i hidrotermalnom sintezom potpomognutom mikrovalovima. Slične šuplje sfere primijećene su prethodno na površini HAp nosača, nakon namakanja u Hankovoj uravnoteženoj solnoj otopini (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) [17]. Kao što je izneseno u poglavlju 4.1.1., Rietveldovo utočnjavanje XRD difraktograma uzorka 10-Mg-CaP ukazuje na visoki udio vitlokita (više od 38 mas. %) i mali udio neizreagiralog aragonita (otprilike 7 mas. %). Formiranje magnezijem bogatih kristala na površini nosača u skladu je s literaturnim pronalascima [80,207], koji pokazuju da magnezij u biološkim uvjetima koštanog tkiva teži tvorbi hidriranog sloja oko hidroksiapatitnih kristala ili da se nalazi na površini blizu lako izmjenjivih ionskih pozicija.

Energijski razlučujuća rendgenska analiza korištena je za određivanje sastava pripremljenih uzoraka. Ispitani su uzorci CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP. EDX spektar uzorka 5-Mg-CaP, slika 20 a), potvrđuje prisutnost kalcija, fosfora, kisika i magnezija, dok je odaziv zlata i paladija na spektru posljedica obrade uzoraka neparivanjem. Rezultati EDX mapiranja CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP uzoraka indiciraju da su kalcij, fosfor, ugljik i magnezij prisutni i homogeno raspoređeni unutar istraživanih područja.

Na slikama 20 c) – e) prikazani su rezultati uzorka 5-Mg-CaP, uzorak koji sadrži otprilike 70 mas. % hidroksiapatita i 30 mas. % vitlokita koji potvrđuju homogenu raspodjelu kalcija, fosfora i ugljika u dvofaznom sustavu. Uzorak 10-Mg-CaP nije uzet u obzir za EDX mapiranje jer se na temelju pojave različitih površinskih aglomerata na SEM mikrografima, slike 19 g) – i) može pretpostaviti nehomogenost nosača.



Slika 20. a) EDX spektar i b) SEM mikrograf mapirane površine uzorka 5-Mg-CaP. Prikaz EDX mapiranja atoma kalcija (c), fosfora (d) i ugljika (e) na uzorku 5-Mg-CaP. Rezultati EDX mapiranja magnezija u uzorcima CaP (f), 1-Mg-CaP (g) i 5-Mg-CaP (h).

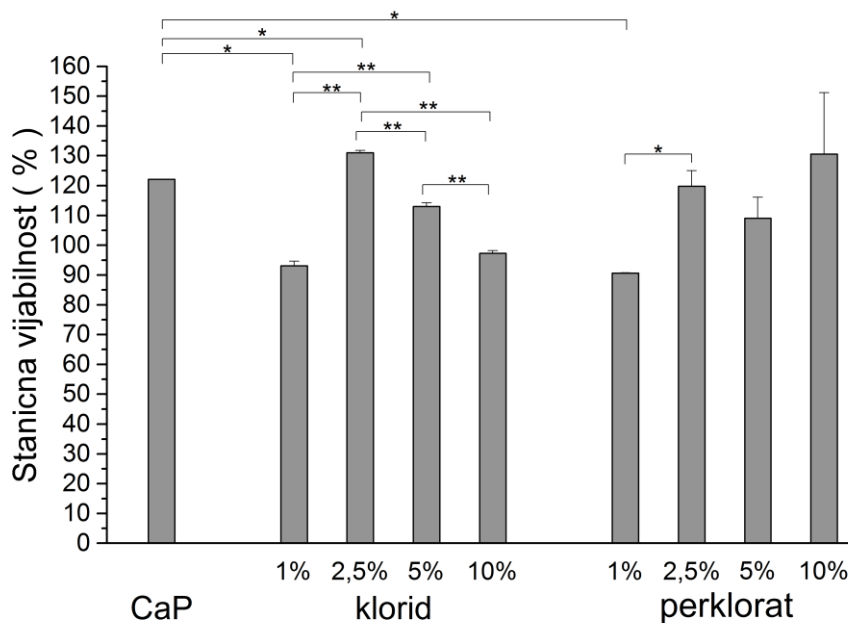
Na slikama 20 f) - h) prikazani su rezultati EDX mapiranja atoma magnezija u uzorcima CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP. Svi uzorci potvrđuju prisutnost i uniformnost raspodjele magnezija na testiranim površinama uzorka. Povećanjem udjela supstitucije magnezija povećava se gustoća raspodjele detektiranih magnezijevih iona u uzorcima.

EDX mapiranje ukazuje na prisutnost magnezija i u CaP nosaču (slika 20 f), uzorku kojem supstitucijom nije dodan magnezij ion. Navedeni rezultat može se objasniti korištenjem biogenog kalcij-karbonatnog prekursora (sipine kosti) koji sadrži magnezij kao element u tragovima, što je i potvrđeno ICP-MS-om (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) u istraživanju Ressler i sur. [25].

4.1.5. Određivanje bioloških svojstva

4.1.5.1. Određivanje citotoksičnosti

Citotoksičnost pripremljenih nosača ispitana je MTT testom na vijabilnost ljudskih embrionalnih bubrežnih stanica HEK293. Rezultati su prikazani na slici 21 kao postotak vijabilnosti stanica nakon 72 sata kontakta s ekstraktom medija dobivenog sedmodnevnim namakanjem uzoraka. Za pripravu ekstrakata medija kojim su hranjene stanice korišteni su CaP i Mg-CaP uzorci, dobiveni korištenjem magnezij klorida heksahidrata i magnezij perklorata kao prekursora. Procijenjena vijabilnost (između 90 i 130 % u odnosu na kontrolu) pokazuje da niti jedan nosač ne pokazuje štetan utjecaj na stanice unutar 72 sata. Kod uzoraka supstituiranih pomoću magnezijeva klorida pri većim koncentracijama magnezija vidljiv je trend smanjenja stanične vijabilnosti.



Slika 21. Rezultati MTT testa na citotoksičnost za ljudske embrionalne bubrežne stanice (HEK293) nakon 72 h kulture u prisustvu ekstrakata dobivenih sedmodnevnim namakanjem CaP i Mg-CaP uzoraka u hranjivom mediju. Korišteni su Mg-CaP uzorci supstituirani pomoću $MgCl_2 \times 6H_2O$ (klorid) i $Mg(ClO_4)_2$ (perklorat) prekursora. Podaci su izraženi kao postotak u odnosu na kontrolnu grupu, ekstraktom netretirane stanice koje se smatraju 100 %. Značajna razlika između dvije grupe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

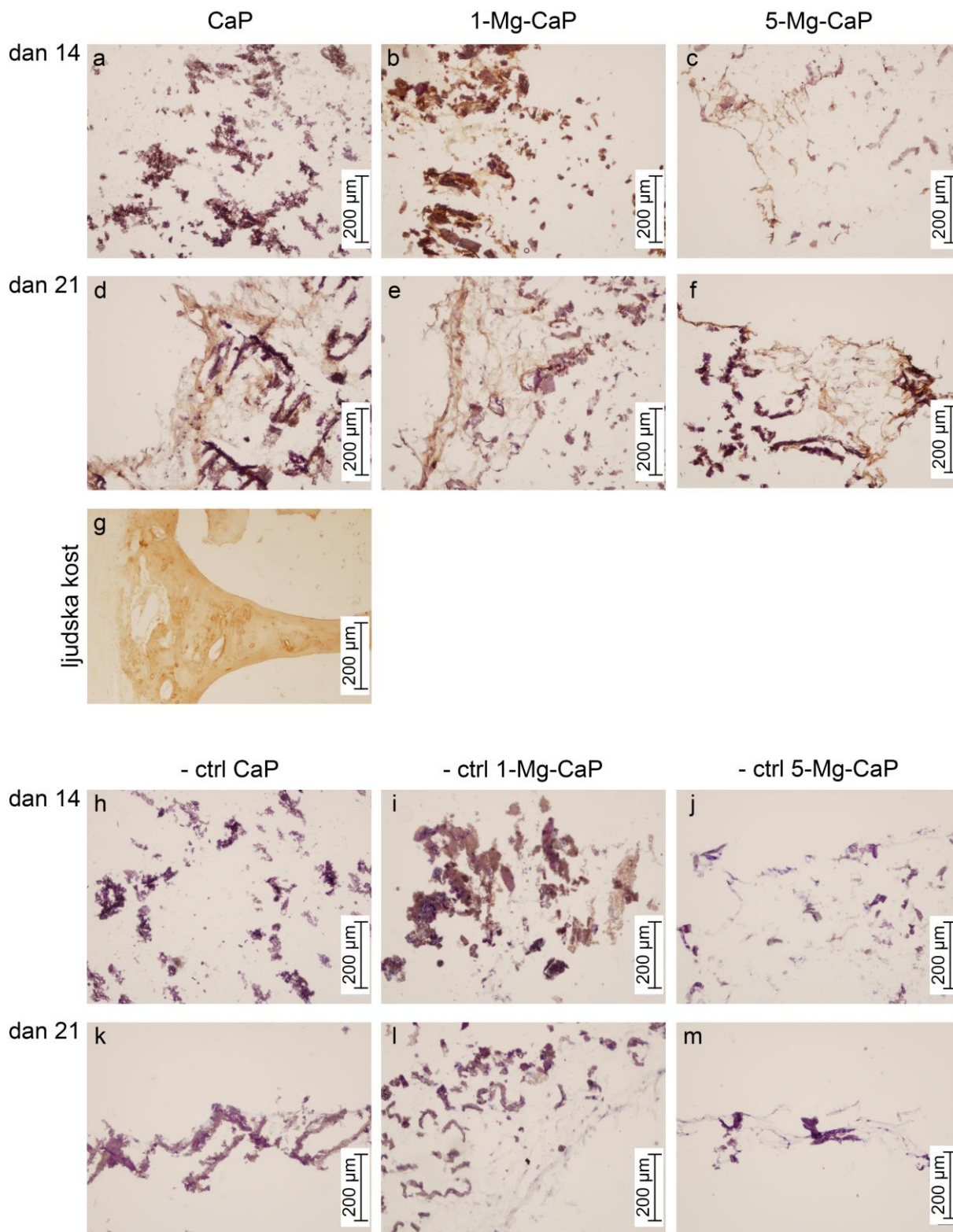
4.1.5.2. Imunološka ispitivanja diferencijacije ljudskih matičnih stanica

Kao što je dosad pokazano, potpunija hidrotermalna konverzija aragonita postignuta je korištenjem magnezij perklorata kao prekursora magnezija. Uzorci sintetizirani pomoću magnezij klorida pokazali su nešto nižu staničnu vijabilnost HEK293 stanica pri većim koncentracijama magnezija. Stoga, nosači pripremljeni korištenjem magnezij perklorata kao prekursora korišteni su u dužoj kulturi s ljudskim matičnim stanicama.

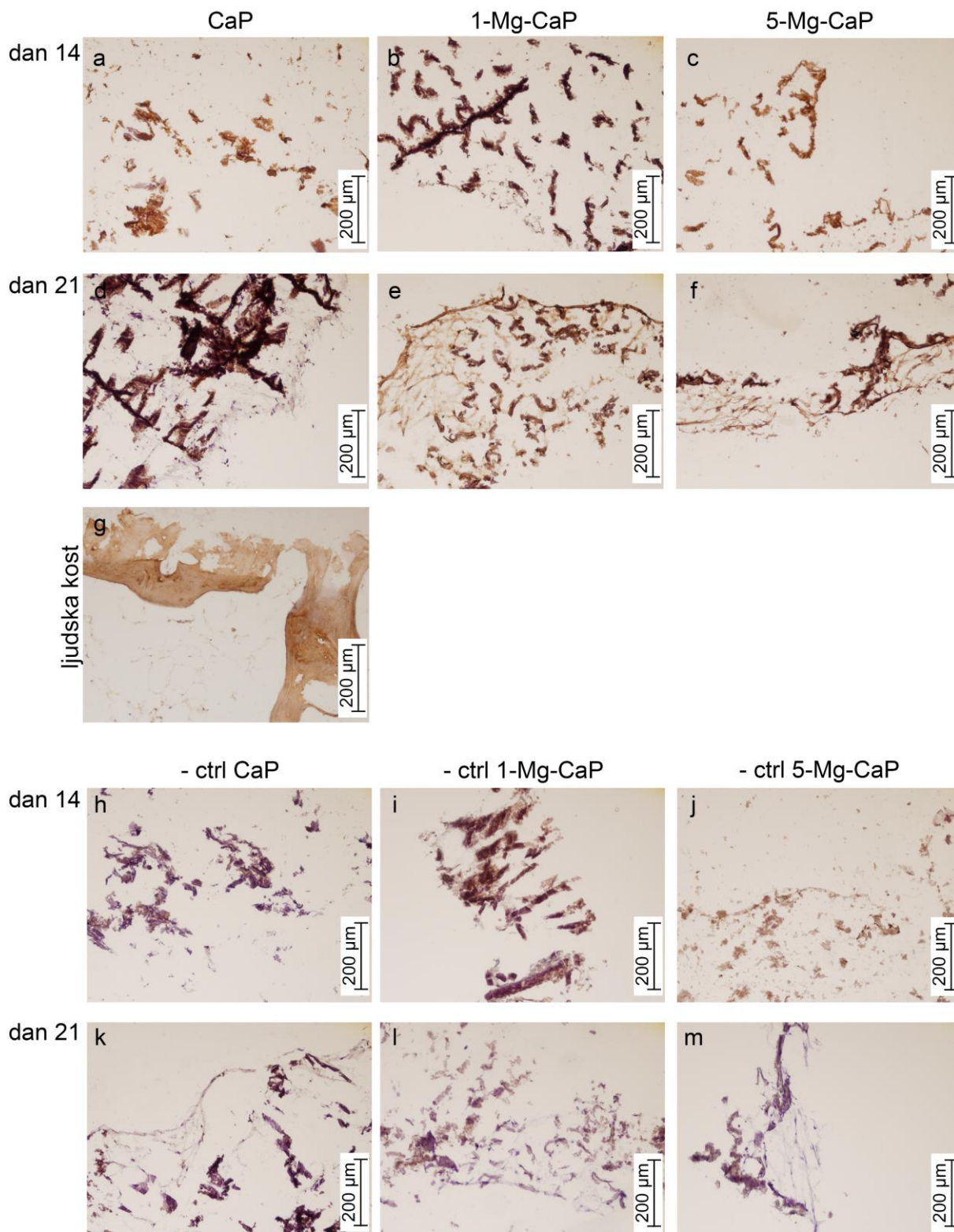
Reprezentativne slike imunohistološkog bojenja kolagena tipa I i osteokalcina na CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP uzorcima nakon 14 i 21 dana osteogene diferencijacije hMSC prikazane su na slikama 22 i 23. Sekcija ljudske kosti korištena je kao pozitivna kontrola, slike 22 g) i 23 g), i pokazuje kako izgleda karakteristično pozitivno smeđe obojenje kolagena i osteokalcina na koštanom tkivu. Negativne kontrolne sekcije, - ctrl, tanko odrezani filmovi nosača nakon stanične kulture snimljeni bez korištenja prikladnih antitijela za bojenje, predstavljaju interferenciju nastalu prilikom bojenja materijala nosača i trebaju se izuzeti prilikom usporedbe uzoraka.

Smeđe obojenje (slika 22) ukazuje na pojavu kolagena I. hMSC prijanjaju na površinu nosača, izlučuju kolagen i tako pripremaju izvanstaničnu matricu za mineralizaciju. Slabo bojenje kolagena tipa I može se vidjeti na CaP nosaču nakon 14 dana osteoindukcije (slika 22 a). Umjereno obojenje za dan 14 jače je na nosaču 1-Mg-CaP (slika 22 b) nego na 5-Mg-CaP (slika 22 c). Jači intenzitet bojenja može se primijetiti na svim nosačima nakon 21 dana osteogene kulture (slike 22 d - f). Nosač 1-Mg-CaP nakon 21 dana osteoindukcije izražava najveću pojavu kolagena koji tvori međupovezanu mrežastu strukturu izvanstanične matrice (slika 22 e).

Ekspresija osteokalcina (slika 23) usporediva je s pojavom izvanstanične matrice primijećenom obojenjem kolagena I na slici 22. Pri 14 danu nakon osteoindukcije na svim nosačima nema ili postoji samo jako slabo imunohistokemijsko obojenje osteokalcina (slike 23 a - c), što ukazuje da je mineralizacijski proces u ranom stadiju. Vidljivo je slabo obojenje CaP nosača nakon 21 dana osteoindukcije (slika 23 d), dok 5-Mg-CaP nosač pri 21 danu izražava osrednji intenzitet obojenja osteokalcina (slika 23 d). Izraženo obojenje osteokalcina može se primijetiti na sekciji 1-Mg-CaP nakon 21 dana stanične kulture (slika 23 e) i ukazuje na postojanje vlaknaste mrežaste strukture mineralizirane izvanstanične matrice.



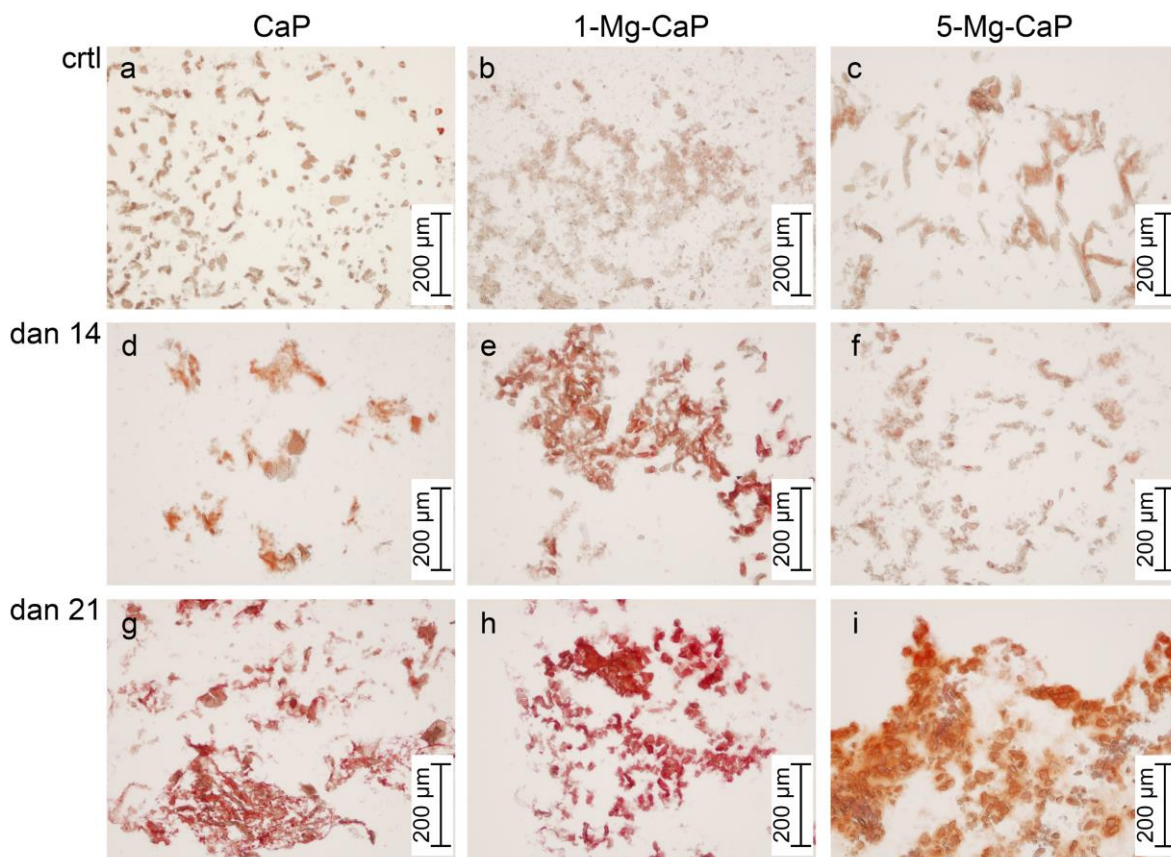
Slika 22. Imunohistokemijsko ispitivanje kolagena tipa I na CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP nosačima nakon 14 i 21 dana osteogene indukcije. Smeđe obojenje označava pojavu kolagena. Ljuska kost korištena je kao pozitivna kontrola (g). Kao negativne kontrole (- ctrl) korištene su sekcije svakog uzorka bez prikladnog antitijela (h, i, j, k, l, m).



Slika 23. Imunohistokemijsko ispitivanje osteokalcina na CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP nosačima nakon 14 i 21 dana osteogene indukcije. Smeđe obojenje označava pojavu osteokalcina. Ljudska kost korištena je kao pozitivna kontrola (g). Kao negativne kontrole (- ctrl) korištene su sekcije svakog uzorka bez prikladnog antitijela (h, i, j, k, l, m).

Bojenje alizarinskim crvenilom korišteno je za karakterizaciju izvanstaničnih mineralnih depozita kalcija nakon 14 i 21 dana kulture (slika 24). Nosači bez hMSC korišteni su kao negativna kontrola pa tako obojenje vidljivo na slikama 24 a) - c) dolazi od materijala nosača i treba se izuzeti prilikom razmatranja uzoraka s hMSC (slike 24 d - i).

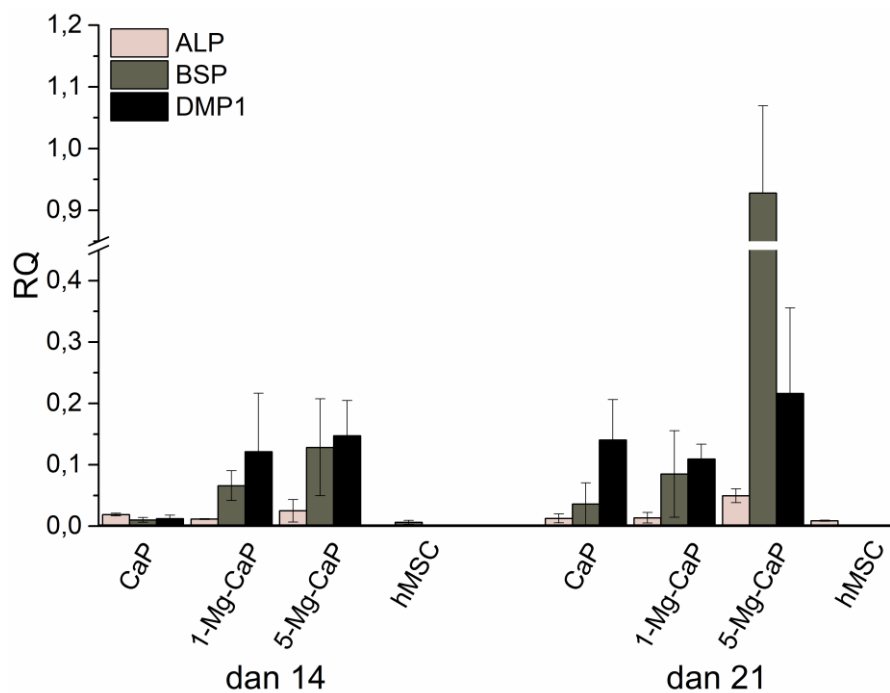
Crveno obojeni mineralizirani izvanstanični depoziti vidljivi su na svim uzorcima nakon 14 i 21 dana (slike 24 d – i). Jači intenzitet crvene boje i veće područje obojenja primjetno je na svim nosačima nakon 21 dana (slike 24 g - i) što ukazuje na naglašeno formiranje mineralizirane matrice s vremenom. 1-Mg-CaP nosači pri danu 14 i 21 (slike 24 e i h) pokazuje nešto veću količinu mineraliziranih kalcijevih depozita nego nosači CaP i 5-Mg-CaP.



Slika 24. Procjena mineralizacije ljudskih mezenhimskih matičnih stanica u osteogenom mediju na nosačima CaP, 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP nakon 14 i 21 dana kulture. Mineralizacija izvanstanične matrice u prisustvu kalcijevih precipitata vizualizirana je korištenjem Alizarin Red S seta za bojenje. Nosači bez hMSC korišteni su kao negativne kontrole (- ctrl).

4.1.5.3. Kvantitativna evaluacija osteoindukcije

Relativna ekspresija osteogenih markera (slika 25) pokazuje da CaP nosač nakon 14 dana stanične kulture ima nižu ekspresiju gena nego Mg-CaP nosači. Nakon 21 dana jača ekspresija gena vidljiva je na svim uzorcima. Uz iznimku ekspresije BSP pri danu 21 za uzorak 5-Mg-CaP, testirani nosači ne pokazuju značajnu razliku između kasnih markera osteoindukcije nakon 21 dana stanične kulture.



Slika 25. Relativna ekspresija (engl. *relative quantification*, RQ) osteogenih markera na nosačima CaP, 1-Mg-CaP i 5 Mg-CaP nosača nakon 14 i 21 dana osteogene indukcije. Kvantificirani osteogeni markeri su alkalna fosfataza (ALP), koštani sijaloprotein (BSP) i protein matrice dentina (DMP1). Razina ekspresije gena normalizirana je s pozitivnom kontrolom (ljudskom kosti). Nediferencirane hMSC predstavljaju negativnu kontrolu. Ekspresija je normalizirana prema β -aktinu. Relativna ekspresija ciljanih gena izračunata je korištenjem $\Delta\Delta C_t$ metode.

Uz to što moraju biti netoksični, nosači za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva moraju podupirati proliferaciju (umnažanje) matičnih stanica, njihovu diferencijaciju u osteoblaste i mineralizaciju izvanstanične koštane matrice. Jedan od ranijih stadija osteogene diferencijacije hMSC je proizvodnja kolagena tipa I [208] koji može stimulirati osteogenu diferencijaciju i pripremu izvanstanične matrice za mineralizacijski proces bez dodatka osteoinduktivnih faktora [209]. Sinteza kolagena I potvrđena je pozitivnim imunohistokemijskim obojenjem nakon 14 i 21 dana osteogene indukcije (slika 22). Prisustvo vitlokita u HAp/WH nosaču značajno je unaprijedilo osteogenu aktivnost hMSC. Slični rezultati viđeni su u prijašnjim istraživanjima [95].

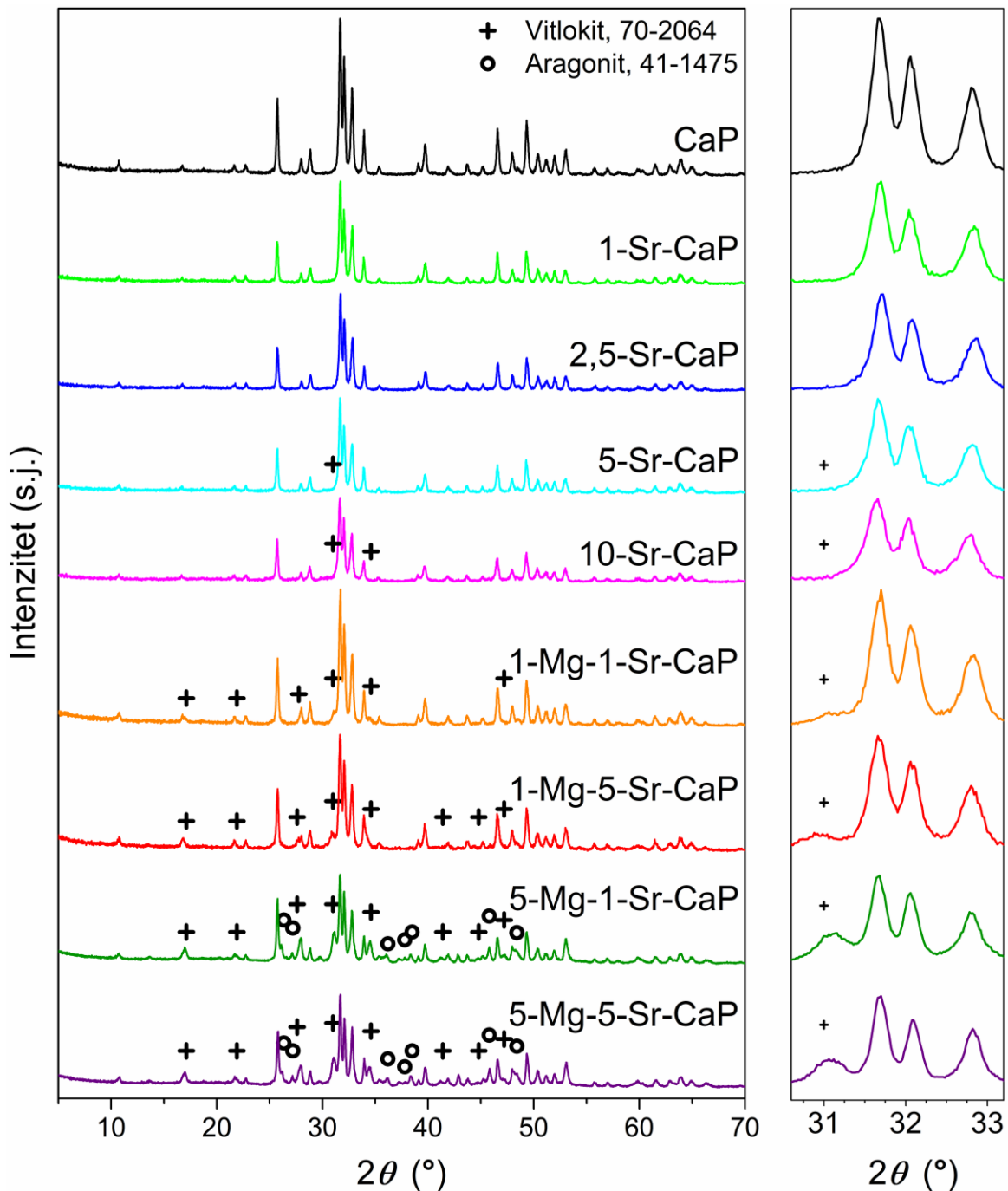
Ekspresija ostokalcina usporediva je s pojavom izvanstanične matrice primijećene obojenjem kolagena tipa I. Osteokalcin je izvanstanični protein kojeg proizvode osteoblasti te ukazuje na kasniji stadij osteogene diferencijacije i nastanak mineralizirane matrice [210–212]. Imunohistokemijsko bojenje osteokalcina nakon 21 dana kulture otkrilo je da je 1-Mg-CaP nosač, hidroksiapatitni nosač s 10 mas. % vitlokita, imao najpovoljniji utjecaj na osteogenezu. Rezultati se dobro slažu s mineralizacijom izvanstanične matrice određene bojenjem alizarinskim crvenilom.

Kvantitativna evaluacija osteoindukcije nadopunjava rezultate imunohistoloških bojenja kolagena I, osteokalcina i izvanstaničnih mineralnih depozita. Alkalna fosfataza (ALP) je tkivno nespecifični enzim koji sudjeluje u kemijskim reakcijama uklanjanja fosfatne skupine i ima bitnu ulogu u mineralizaciji skeleta i razvoju zubi i kosti zubi. ALP je visoko prisutan u ranom stadiju osteoindukcije i koristi se kao rani marker osteogeneze [213,214]. Smanjena aktivnost ALP nakon 21 dana kulture naznačava kasniji period osteogeneze. BMP i DMP1 su geni karakteristični za mineralizaciju i visoko su prisutni u osteocitima, stoga se klasificiraju kao kasniji markeri osteoindukcije [214,215]. Svi uzorci pokazuju veću ekspresiju gena s dužim periodom stanične kulture i pozitivan utjecaj dodanog magnezija od rane faze osteoindukcije. Gledajući sveukupne rezultate, RT-qPCR rezultati potvrđuju da magnezij u 1-Mg-CaP i 5-Mg-CaP pozitivno utječe na diferencijaciju ljudskih mezenhimskih matičnih stanica na poroznom trodimenzionalnom nosaču.

4.2. Supstitucija stroncijem i kosupstitucija magnezijem i stroncijem

4.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza

XRD difraktogrami stroncijem supstituiranih te magnezijem i stroncijem kosupstituiranih nosača prikazani su na slici 26.



Slika 26. XRD difraktogrami pripremljenih Sr-CaP i Mg-Sr-CaP uzoraka. 2θ pozicije vitlokita i aragonita redom su označene s (+) i (o). Svi pikovi CaP uzorka pripisuju se HAp-u (ICDD 09-432), a pozicije nisu označene zbog preglednosti grafa.

Svi difraktogrami pokazuju dobro slaganje s HAp (ICDD 09-432) identifikacijskom karticom. U uzorcima supstituiranim stroncijem nije potvrđena prisutnost aragonita, što ukazuje na potpunu hidrotermalnu transformaciju aragonitne sipine kosti. Na difraktogramima uzoraka kosupstituiranih s 5 % magnezija i 1 ili 5 % stroncija vidljive su refleksije karakteristične za aragonit. Uzorci kosupstituirani magnezijem i stroncijem pokazuju prisutnost difrakcijskih maksimuma vitlokita (ICDD 70-2064).

4.2.1.1. Kvantitativna analiza i utočnjavanje strukture

Rezultati kvantitativne analize uzoraka pripremljenih korištenjem stroncij nitrata kao prekursora stroncijevih iona prikazani su u tablici 7. Dodatak stroncija u reakcijsku smjesu rezultira nastajanjem hidroksiapatita u cijelom rasponu ispitanih koncentracija. Uzorci supstituirani stroncijem pri 5 i 10 mol. % pri $2\theta = 31,1^\circ$ naznačavaju pojavu najintenzivnijeg pika vitlokita. Pojava vitlokita u malom udjelu, do 1 mas. % kod dodatka 5 mol. % stroncija i do 2 mas. % za 10 mol. % dodanog stroncija, u uzorcima bez dodanog Mg^{2+} može se objasniti kao posljedica korištenja biogenog prekursora kalcija (sipina kost) koji sadrži određenu količinu magnezija (poglavlje 4.1.4.). Udio amorfne faze u uzorcima manji je od 11 %.

U tablici 8 prikazani su parametri jedinične ćelije i veličine kristalita hidroksiapatita u uzorcima Sr-CaP. Dodatak 1 – 10 mol. % stroncija prilikom sinteze hidroksiapatita ne pokazuje utjecaj na povećanje veličine kristalita. Izračunate vrijednosti veličine kristalita uzoraka kreću se između 49 i 55 nm. Dodatak stroncija unutar ispitivanog raspona molarnih udjela ne pokazuje utjecaj na promjenu parametara jedinične ćelije hidroksiapatita.

Kao što je spomenuto u poglavlju 2.3.2.2., supstitucija stroncija u strukturu apatita vođena je interakcijama metalnih iona i kisika na dvije različite kristalografske pozicije. Stroncij će se ugraditi na poziciju koja omogućava manju promjenu ionskih interakcija i dimenzija kristalne rešetke. Prema literaturi [100–104], pri udjelima manjima od 10 % stroncij se preferirano ugrađuje na poziciju Ca(I) gdje se smješta u kanal metalnih iona paralelnih s *c*-osi. Supstitucija iona kalcija ionskog radijusa 0,99 Å sa stroncijem ionskog radijusa 1,20 Å trebala bi utjecati na povećanje dimenzija *c*-kristalografske osi i povećanje volumena jedinične ćelije hidroksiapatita.

Supstitucijom s 10 mol. % parametar c povećao se samo 0,0074 Å u odnosu na čisti hidroksiapatit. Rezultati Zhu i sur. [101] pokazuju da se parametri jedinične ćelije linearno mijenjaju unutar cijelog raspona supstitucije kalcija sa stroncijem – unutar raspona supstitucije stroncijem od 0 do 100 %. a se povećava za ~ 0,3 Å i c za ~ 0,4 Å. Terra i sur. [102] i Capuccini i sur. [107] objavili su rezultate gdje se unutar prvih 10 mol. % supstitucije parametar a povećava za 0,0359 i 0,0242 Å, dok parametar c za 0,0339 i 0,0177 Å. Rezultati Bigi i sur. [100] pokazuju vrlo malu promjenu od 0,0074 Å za parametar a i 0,0099 Å za parametar c između uzoraka s 5 i 10 mol. % Sr. Takva vrlo mala promjena parametara pri niskim udjelima supstitucije može biti posljedica stabiliziranja hidroksiapatitne strukture koja je istovremeno supstituirana i drugim ionskim grupama poput CO_3^{2-} i HPO_4^{2-} .

Tablica 7. Rezultati kvantitativne analize XRD rezultata provedene Rietveldovom metodom za uzorke supstituirane stroncijem i kosupstituirane magnezijem i stroncijem.

| Uzorak | HAp | mas. % | | R_{wp} |
|---------------|-------|--------|----------|----------|
| | | WH | Aragonit | |
| CaP | 100 | 0 | 0 | 5,98 |
| 1-Sr-CaP | 100 | 0 | 0 | 5,948 |
| 2,5-Sr-CaP | 100 | 0 | 0 | 5,976 |
| 5-Sr-CaP | 99,07 | 0,93 | 0 | 6,441 |
| 10-Sr-CaP | 97,92 | 2,08 | 0 | 6,556 |
| 1-Mg-1-Sr-CaP | 90,39 | 9,61 | 0 | 6,788 |
| 1-Mg-5-Sr-CaP | 87,96 | 12,04 | 0 | 6,977 |
| 5-Mg-1-Sr-CaP | 61,78 | 26,90 | 11,32 | 7,789 |
| 5-Mg-5-Sr-CaP | 63,19 | 25,29 | 11,52 | 8,295 |

Tablica 8. Parametri jedinične ćelije HAp faze dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja difraktograma uzoraka CaP, Sr-CaP i Mg-Sr-CaP.

| Uzorak | Hidroksiapatit | | | |
|---------------|---|---------|---------------------------|---------------------|
| | Parametri jedinične ćelije (P6 ₃ /m) | | | Veličina kristalita |
| | a (Å) | c (Å) | Volumen (Å ³) | L_{vol-IB} (nm) |
| CaP | 9,4330 | 6,8981 | 531,573 | 55,633 |
| 1-Sr-CaP | 9,4351 | 6,9002 | 531,962 | 49,611 |
| 2,5-Sr-CaP | 9,4305 | 6,9035 | 531,707 | 56,872 |
| 5-Sr-CaP | 9,4316 | 6,9037 | 531,847 | 55,664 |
| 10-Sr-CaP | 9,4323 | 6,9055 | 532,067 | 55,571 |
| 1-Mg-1-Sr-CaP | 9,4317 | 6,9014 | 531,674 | 62,115 |
| 1-Mg-5-Sr-CaP | 9,4369 | 6,9002 | 532,171 | 57,327 |
| 5-Mg-1-Sr-CaP | 9,4328 | 6,8965 | 531,429 | 70,278 |
| 5-Mg-5-Sr-CaP | 9,4345 | 6,8937 | 531,398 | 65,063 |

Rezultati kvantitativne analize uzoraka pripremljenih istovremenim dodatkom iona magnezija i stroncija u reakcijsku smjesu na početku hidrotermalne sinteze prikazani su u donjem dijelu tablice 7. Omjer WH : HAp kod 1-Mg-CaP uzorka iznosi 0,105, dok uzorci 1-Mg-1-Sr-CaP i 1-Mg-5-Sr-CaP s omjerima 0,106 i 0,137 pokazuju blago povećanje udjela vitlokita s povećanjem udjela stroncija. Kod uzoraka koji sadrže 5 mol. % magnezija dodatkom stroncija omjer vitlokita u odnosu na hidroksiapatit je konstantan, no zabilježeno je znatno povećanje udjela netransformiranog aragonita. Omjer WH : HAp za uzorak 5-Mg-CaP iznosi 0,416, za uzorak 5-Mg-1-Sr-CaP 0,435 i za uzorak 5-Mg-5-Sr-CaP 0,400. Udio aragonita u uzorku 5-Mg-CaP iznosi 1,91 % dok se prilikom dodatka stroncija povećava na 11 % (uzorci 5-Mg-1-Sr-CaP i 5-Mg-5-Sr-CaP).

Za razliku od parametara jedinične ćelije hidroksiapatita Mg-Sr-CaP uzoraka, tablica 8, koji su usporedivi s parametrima jedinične ćelije hidroksiapatita Mg-CaP uzoraka, parametri jedinične ćelije vitlokita u uzorcima Mg-Sr-CaP, tablica 9, pokazuju znatno povećanje vrijednosti u odnosu na parametre u uzorcima Mg-CaP.

U tablici 9 prikazani su parametri jedinične ćelije vitlokita u uzorcima Mg-CaP i Mg-Sr-CaP kako bi se istaknuo utjecaj dodatka stroncija na vrijednosti parametara. Najveći ispitani dodatak magnezija, 10 mol. % u 10-Mg-CaP uzorku, uzrokovao je smanjenje volumena jedinične ćelije za 16 \AA^3 u odnosu na uzorak 1-Mg-CaP. Dodatak 1 mol. % stroncija u kosupstituciji s 1 mol. % magnezija uzrokovao je povećanjem volumena jedinične ćelije od 20 \AA^3 u odnosu na 1-Mg-CaP. Kod uzorka kojem je uz 1 mol. % magnezija dodano i 5 mol. % stroncija vidljivo je značajno povećanje volumena jedinične ćelije 84 \AA^3 u odnosu na uzorak 1-Mg-CaP. Kod uzoraka koji u kosupstituciji sadrže 5 mol. % magnezija, dodatak 1 mol. % stroncija neutralizirao je utjecaj 5 mol. % magnezija na smanjenje volumena jedinične ćelije vitlokita, a dodatak 5 mol. % stroncija uzrokovao je povećanjem od 19 \AA^3 u odnosu na 1-Mg-CaP, odnosno 22 \AA^3 u odnosu na 5-Mg-CaP.

Povećanje parametara jedinične ćelije vitlokita prilikom kosupstitucije ionima magnezija i stroncija pokazuje da se stroncij ugrađuje u strukturu vitlokita, neutralizira utjecaj ugradnje magnezija i da ima značajan utjecaj na povećanje volumena jedinične ćelije. Stroncij, kao ion većeg radijusa od kalcija, prilikom zajedničke kosupstitucije s magnezijem ima znatno veći utjecaj na povećanje parametara nego što magnezij, ion manjeg ionskog radijusa, ima na smanjenje. Povećanje parametara jedinične rešetke vitlokita prilikom kosupstitucije magnezijem i stroncijem korištenjem precipitacije u vodenom mediju primijetili su i Aina i sur. [111].

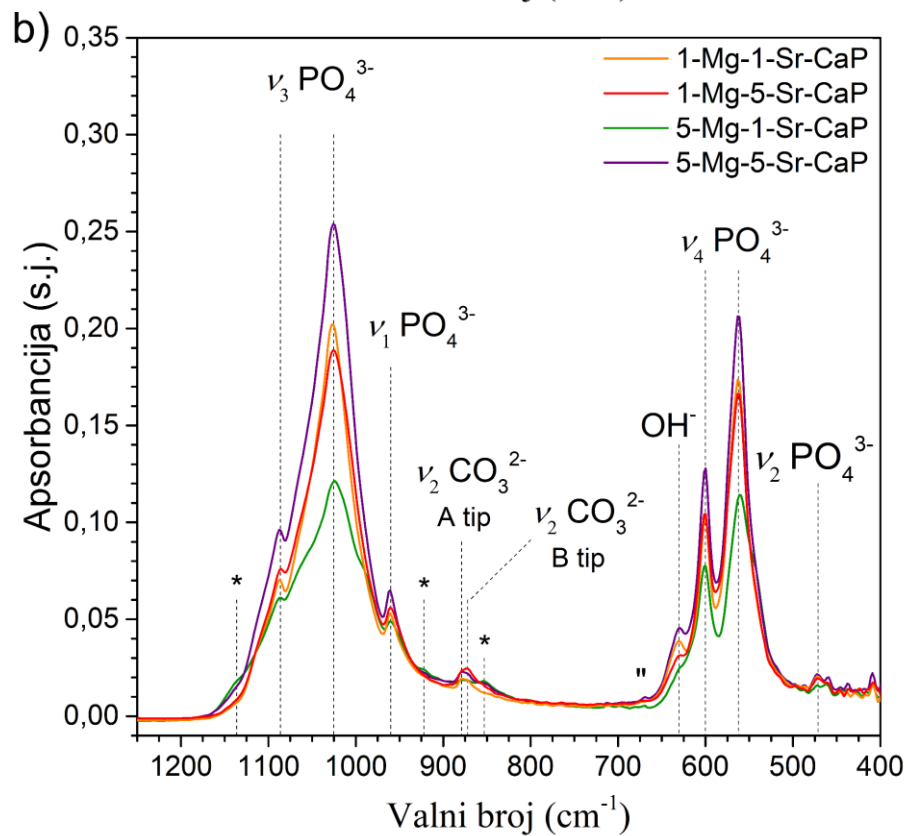
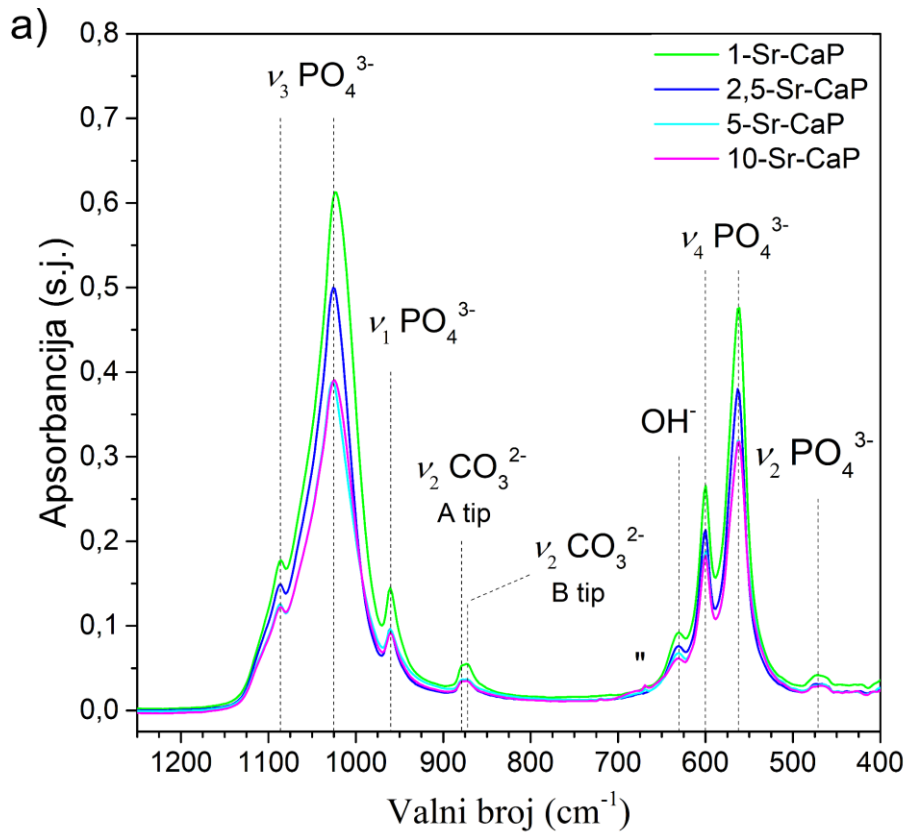
Tablica 9. Parametri jedinične ćelije vitlokita dobiveni Rietveldovom metodom utočnjavanja difraktograma uzoraka Mg-CaP i Mg-Sr-CaP.

| Uzorak | Vitlokit | | | Veličina kristalita L_{vol-IB} (nm) |
|----------------------|----------------------------------|----------------|---------------------------|--|
| | Parametri jedinične ćelije (R3C) | | | |
| | a (Å) | c (Å) | Volumen (Å ³) | |
| 1-Mg-CaP | 10,3795 | 37,2133 | 3472,044 | 24,680 |
| 2,5-Mg-CaP | 10,3751 | 37,2076 | 3468,537 | 23,682 |
| 5-Mg-CaP | 10,3716 | 37,2386 | 3469,069 | 22,631 |
| 10-Mg-CaP | 10,3570 | 37,2020 | 3455,939 | 25,010 |
| 1-Mg-1-Sr-CaP | 10,4021 | 37,2750 | 3492,903 | 19,489 |
| 1-Mg-5-Sr-CaP | 10,4630 | 37,5080 | 3556,050 | 16,553 |
| 5-Mg-1-Sr-CaP | 10,3720 | 37,2651 | 3471,265 | 18,486 |
| 5-Mg-5-Sr-CaP | 10,3918 | 37,3312 | 3491,242 | 19,466 |

4.2.2. Vibracijska spektroskopija

Rezultati karakterizacije infracrvenom spektroskopijom uzoraka Sr-CaP i Mg-Sr-CaP prikazani su na slikama 27 a) i b) i usporedivi su s rezultatima karakterizacije CaP i Mg-CaP uzoraka u poglavlju 4.1.2. Zabilježena je prisutnost vibracijskih vrpca karakterističnih za fosfatnu grupu hidroksiapatita – asimetričnog istezanja P-O veze, ν_3 na 1086 i 1022 cm^{-1} , savijanja O-P-O grupe, ν_4 na 598 i 563 cm^{-1} , simetričnog istezanja P-O veze pri 963 cm^{-1} i ν_2 savijanja PO_4 grupe na 473 cm^{-1} . Vibracijska vrpca OH^- vidljiva je na 630 cm^{-1} . Vrpce pri 872 i 879 cm^{-1} karakteristične su za ν_2 savijanje CO_3^{2-} grupe i karakteristične za B- i A-tip karbonatnog hidroksiapatita. Povećanje udjela iona u Sr-CaP i Mg-Sr-CaP uzorcima rezultiralo je smanjenjem intenziteta svih prisutnih vrpca što se može povezati sa smanjenjem udjela HAp-a i kristalnosti uzorka [111,114,216].

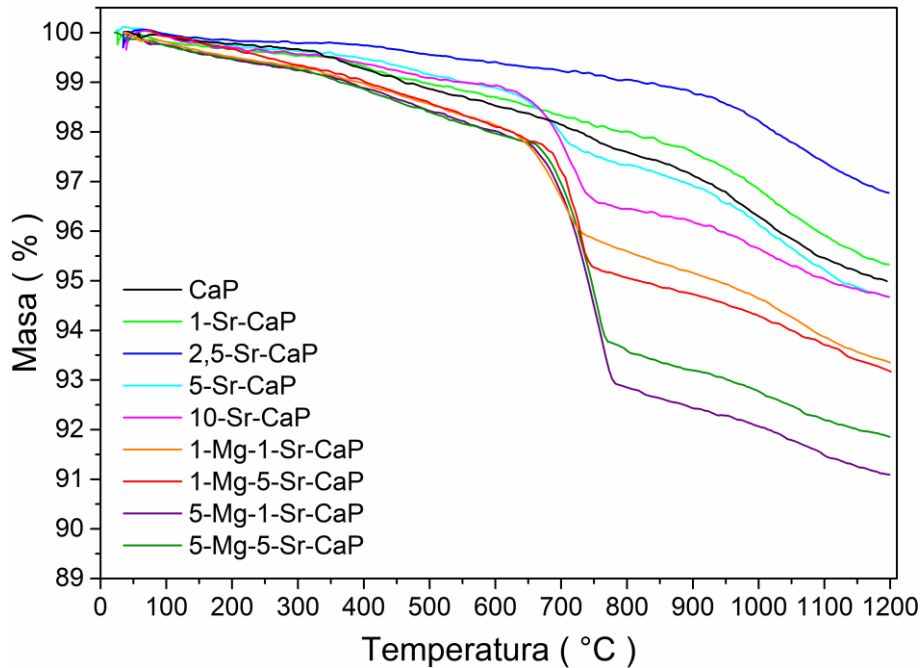
Pojava vrpca niskog intenziteta pri 1136, 922 i 853 cm^{-1} (označenih sa zvjezdicom, *, na slici 27 b) u skladu je s formiranjem i povećanjem udjela vitlokita. U uzorku 10-Sr-CaP te Mg-Sr-CaP uzorcima uočeno je pojavljivanje nove grupe vrpca vrlo slabog intenziteta pri valnim brojevima oko 670 cm^{-1} (označeno simbolom "). Aina i sur. [111] primijetili su pojavu istih vrpca u sličnim dvofaznim uzorcima hidroksiapatita kad su uz magnezij kosupstituirali više od 5 mol. % stroncija.



Slika 27. FTIR spektri uzoraka supstituiranih stroncijem (a) i uzoraka kosupstituiranih magnezijem i stroncijem (b) u području valnih brojeva 1250 – 400 cm^{-1} .

4.2.3. Termogravimetrijska analiza

Rezultati termogravimetrijske analize stroncijem supstituiranih (Sr-CaP) i kosupstituiranih Mg-Sr-CaP uzoraka prikazani su na slici 28.

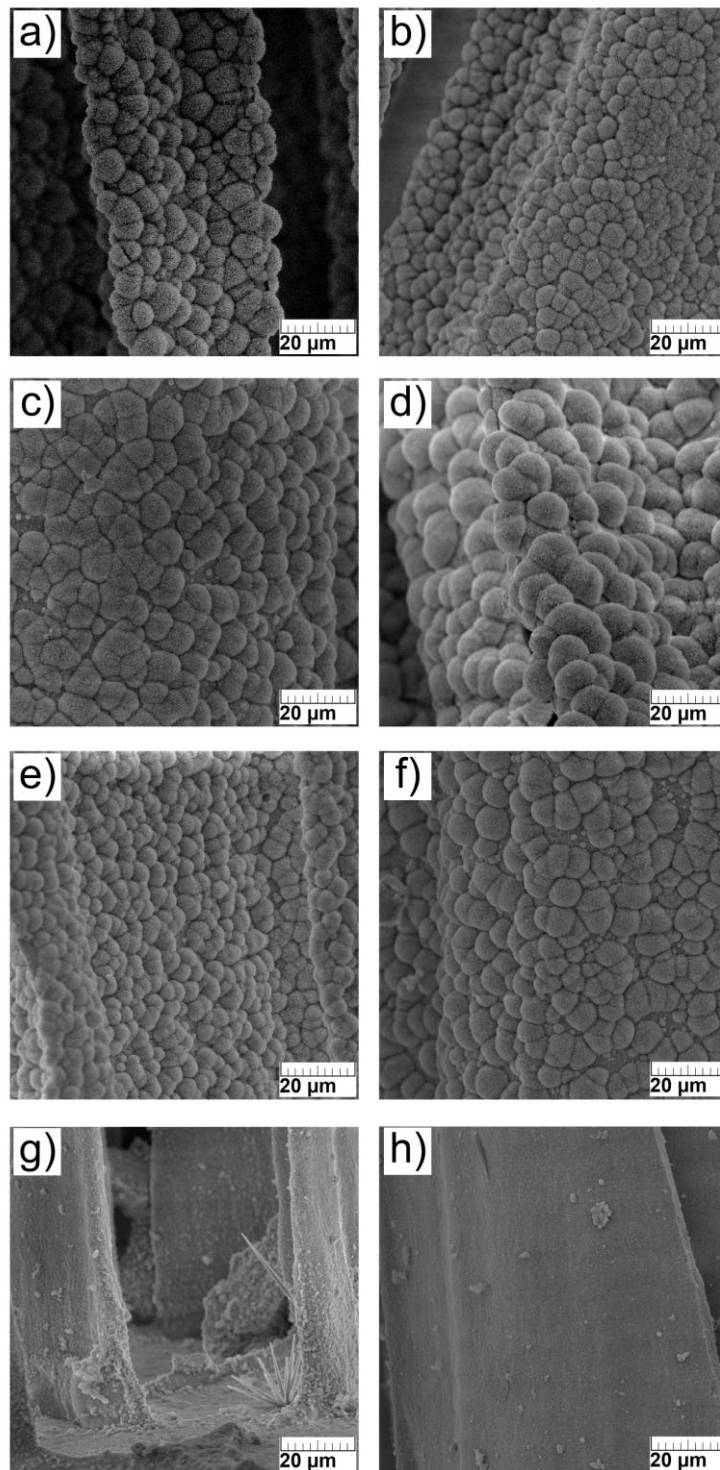


Slika 28. Rezultati termogravimetrijske analize CaP, Sr-CaP i Mg-Sr-CaP uzoraka u atmosferi sintetičkog zraka i temperaturnog raspona od 40 do 1200 °C s brzinom grijanja 10 °C min⁻¹.

Uzorci supstituirani stroncijem ne pokazuju značajnu razliku između TGA krivulja u odnosu na čisti HAp čiji je ukupni gubitak mase 5,0 %. Sr-CaP uzorci pri dodatku 1, 2,5, 5 i 10 mol. % stroncija redom gube 4,7, 3,2, 5,4 i 5,4 %. Nakon početnog gubitka adsorbirane vode na 350 °C, postepeni gubitak mase iznad 550 °C pripisuje se oslobađanju CO₂ zbog karbonatnih iona unutar hidroksiapatitne strukture. Uzorci 1-Mg-1-Sr-CaP i 1-Mg-Sr-5-CaP pokazuju ukupni gubitak 6,7 i 6,9 %. Uzorci 5-Mg-1-Sr-CaP i 5-Mg-5-Sr-CaP gube 8,2 i 8,9% ukupne mase do 1200 °C. Kao i kod uzoraka supstituiranih magnezijem, nagli gubitak mase pri temperaturi od 700 °C posljedica je dehidracije HPO₄²⁻ iona koji se nalazi unutar strukture vitlokita.

Početno povećanje toplinske stabilnosti Sr-CaP uzoraka može se pripisati većoj toplinskoj otpornosti stroncijem supstituiranog hidroksiapatita [216]. Kako je ciljana primjena nosača pripremljenih u ovom radu područje biomaterijala, razmatranje toplinske postojanosti služi kao dopuna strukturne karakterizacije materijala.

4.2.4. Analiza mikrostrukture

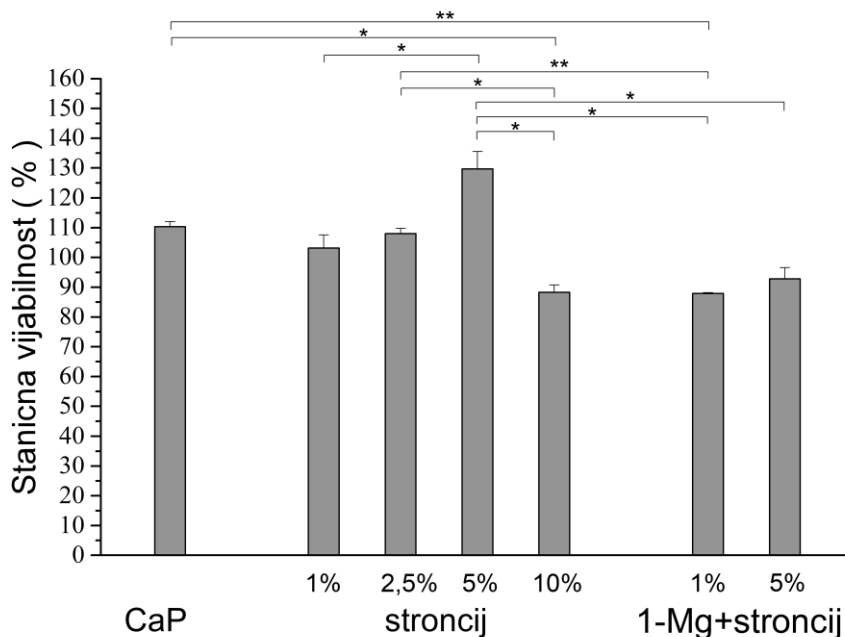


Slika 29. SEM mikrografi površine nosača a) 1-Sr-CaP, b) 2,5-Sr-CaP, c) 5-Sr-CaP, d) 10-Sr-CaP, e) 1-Mg-1-Sr-CaP, f) 1-Mg-5-Sr-CaP, g) 5-Mg-1-Sr-CaP, h) 5-Mg-5-Sr-CaP.

SEM mikrografi na slikama 29 a) – d) pokazuju da stroncij nema značajan utjecaj na izgled površine ili veličine karakterističnih nakupina hidroksiapatitinih mikrosfera Sr-CaP nosača. Izgled površine nosača 1-Mg-Sr-1-CaP (slika 29 e) i 1-Mg-5-Sr-CaP (slika 29 f) također je usporediv s površinom CaP (slika 19 c) i Sr-CaP nosača (slike 29 a – d).

Kosupstitucija stroncijem i 5 mol. % magnezija znatno mijenja izgled površine nosača. Pri istom povećanju kao i kod ostalih uzoraka na površini 5-Mg-1-Sr-CaP (slika 29 g) i 5-Mg-5-Sr-CaP (slika 29 h) vidljiva je glatka površina koja još jednom potvrđuje ključan utjecaj Mg na veličinu HAp mikrosfera i u skladu je s morfologijom prikazanom na slici 19 f). Nosači kosupstituirani s 5 mol. % Mg sadrže 11 mas. % aragonita i 25 – 27 mas. % vitlokita. Nažalost, na SEM mikrografima nije moguće razlučiti sve tri prisutne faze (HAp, WH i aragonit).

4.2.5. Citotoksičnost



Slika 30. Rezultati MTT testa na citotoksičnost za ljudske embrionalne bubrežne stanice (HEK293) nakon 72 h kulture u prisustvu ekstrakata dobivenih sedmodnevnim namakanjem CaP, Sr-CaP i Mg-Sr-CaP uzoraka u hranjivom mediju. Podaci su izraženi kao postotak u odnosu na kontrolnu grupu, ekstraktom netretirane stanice koje se smatraju 100 %. Značajna razlika između dvije grupe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Citotoksičnost nosača pripremljenih supstitucijom stroncijem i kosupstitucijom stroncijem i 1 mol. % magnezija ispitana je MTT testom na vijabilnost na ljudskim embrionalnim bubrežnim stanicama HEK293. Rezultati su prikazani na slici 30 kao postotak vijabilnosti stanica nakon 72 sata kontakta s ekstraktom medija dobivenog sedmodnevnim namakanjem uzoraka. Za pripremu ekstrakata medija kojim su hranjene stanice korišteni su CaP uzorak, svi Sr-CaP uzorci i Mg-Sr-CaP uzorci s 1 mol. % Mg. Uzorci kosupstituirani stroncijem i 5 mol. % magnezija odbačeni su iz ispitivanja na citotoksičnost jer su pokazali velik udio netransformiranog aragonita.

Procijenjena vijabilnost (između 90 i 130 % u odnosu na kontrolu) pokazuje da testirani nosači ne pokazuju štetan utjecaj na stanice unutar testiranog perioda od 72 sata.

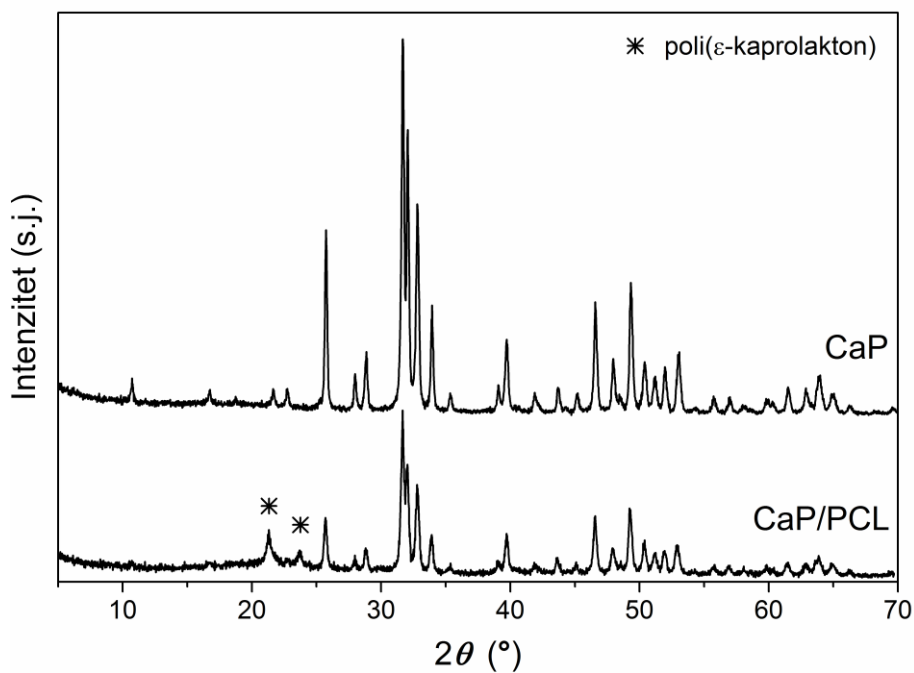
4.3. Karakterizacija kompozitnih nosača

Kako je prilikom određivanja bioloških svojstava Mg-CaP (poglavlje 4.1.5.) uzorak s 1 mol. % magnezija pokazao najpovoljniji utjecaj na osteogenenu diferencijaciju hMSC, 1-Mg-CaP jedan je od uzoraka korištenih za pripremu kompozitnih nosača.

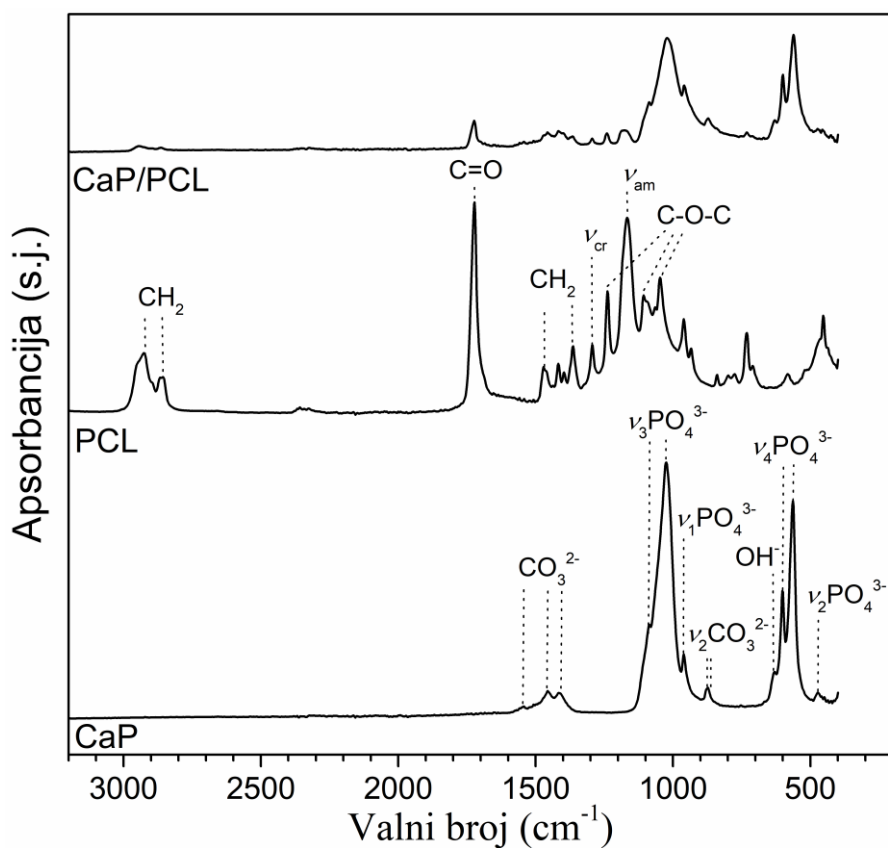
Izračunati omjer masenog udjela vitlokita i hidroksiapatita kod 1-Mg-CaP, 1-Mg-1-Sr-CaP i 1-Mg-5-Sr-CaP (poglavlje 4.2.1.) iznosi otprilike 10 : 90. Zbog sličnosti sastava i svojstava kalcij-fosfatnih struktura navedeni uzorci odabrani su kao najpovoljniji kosupstituirani kalcij-fosfatni nosači za pripremu kompozitnih nosača.

Osnovni cilj pripreme kompozitnih nosača postupkom vakuumske impregnacije poboljšanje je mehaničkih svojstava nanošenjem tankog površinskog filma poli(ϵ -kaprolaktona) na kalcij-fosfatne strukture. Pripremom kompozitnih nosača CaP/PCL, 1-Mg-CaP/PCL, 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL i 1-Mg-5-Sr-CaP/PCL omogućeno je istraživanje eventualnog sinergijskog učinka kosupstitucije kalcijevih fosfata ionima magnezija i stroncija i PCL prevlake na mehaničkih svojstava nosača.

Na slici 31 prikazan je difraktogram CaP/PCL kompozitnog nosača i uspoređen s odgovarajućom kalcij-fosfatnim nosačem, CaP. Uz prisutnost pikova karakterističnih za hidroksiapatit, kompozitni nosač pokazuje dva dodatna difrakcijska maksimuma pri $2\theta = 21,3^\circ$ i $23,8^\circ$ koji se pripisuju (1 1 0) i (2 0 0) kristalografskim plohama kristalastog poli(ϵ -kaprolaktona) [217].



Slika 31. XRD difraktogrami CaP i CaP/PCL nosača. Pikovi CaP uzorka pripisani su hidroksiapatitu, (ICDD 09-432). Karakteristični pikovi PCL-a označeni su simbolom „*“.



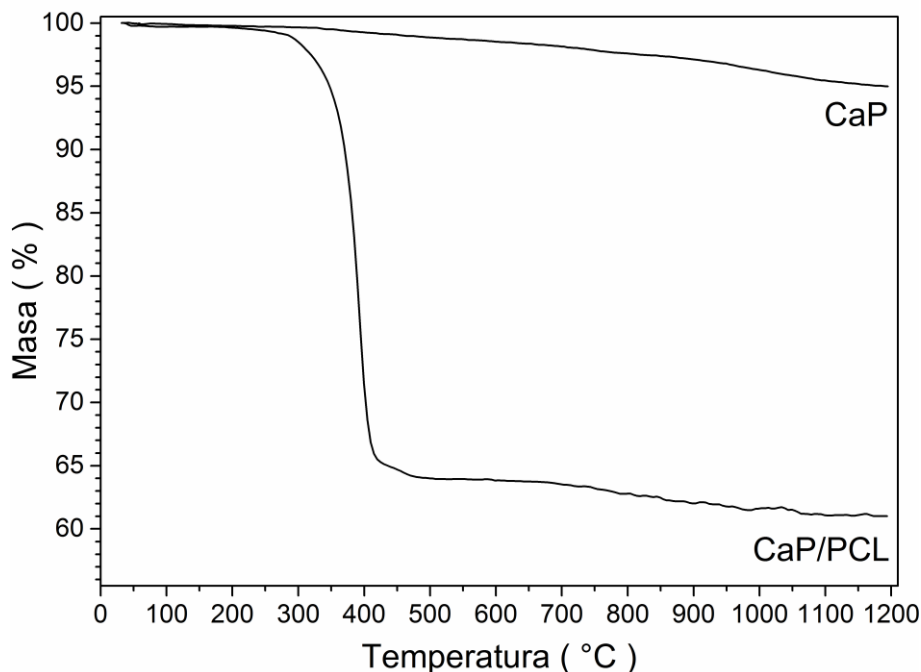
Slika 32. FTIR spektri CaP uzorka, poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) i kompozita CaP/PCL u području valnih brojeva 3200 – 400 cm^{-1} .

Slika 32 prikazuje FTIR spektar kompozitnog nosača CaP/PCL. Radi lakše analize spektra kompozitnog materijala prikazan je karakterističan spektar čistog hidroksiapatita (CaP) i čistih peleta poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL).

Snimljeni infracrveni spektar poli(ϵ -kaprolaktona) pokazuje karakteristične vibracijske vrpce za C=O istezanje pri 1725 cm^{-1} , grupu vibracijskih vrpce karakterističnih za savijanje CH_2 između valnih brojeva 1473 i 1361 cm^{-1} te vrpce asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 pri 2942 i 2862 cm^{-1} . Vrpce pri valnim brojevima 1233 , 1107 i 1042 cm^{-1} pripisuju se asimetričnom C-O-C istezanju, O-C-O istezanju i simetričnom C-O-C istezanju [218,219]. ν_{am} pri 1157 cm^{-1} je vibracijska vrpca koja se pripisuje C-O i C-C istezanjima u amorfnoj fazi PCL-a. Pri valnom broju 1293 cm^{-1} s ν_{cr} označen je pik koji pripada C-O i C-C istezanjima unutar kristalne faze PCL-a [219].

FTIR spektar kompozitnog nosača CaP/PCL superpozicija je spektra čistog poli(ϵ -kaprolaktona) i hidroksiapatitnog uzorka, čije su karakteristične vibracijske vrpce fosfatne, hidroksilne i karbonatne grupe detaljno opisane u poglavlju 4.1.2. Nije primijećena pojava novih pikova ili pomak valnih brojeva karakterističnih skupina, što ukazuje da nije došlo do kemijske reakcije između HAp-a i PCL-a.

Izraziti gubitak mase CaP/PCL nosača do temperature od $500\text{ }^\circ\text{C}$, vidljiv na slici 33, pripisuje se degradacijskom procesu PCL-a. PCL se iznad $430\text{ }^\circ\text{C}$ u potpunosti razgrađuje na ugljikov dioksid, vodu, ugljikov monoksid i kratko-lančane karboksilne kiseline [218,220]. Ukupni gubitak mase CaP/PCL uzorka iznosi 39% , što uz 5% gubitak mase CaP uzorka ukazuje da CaP/PCL uzorak sadrži otprilike 34 mas. \% PCL-a. Termogravimetrijskom analizom svih pripremljenih kompozitnih uzoraka utvrđeno je da se korištenjem 10 \% mas./vol. otopine PCL-a u kloroformu postupkom vakuumske impregnacije dobivaju nosači koji sadrže $32,7 \pm 1,8\text{ mas. \%}$ PCL-a. Udio polimera u ukupnoj masi nosača usporediv je s rezultatima dobivenim na sličnim kompozitnim nosačima [17,23]. Nosači temeljeni na nesupstituiranom hidroksiapatitu sintetiziranom iz sipine kosti uz korištenje 10% mas./vol. otopine PCL/PLA [23] i 20 \% mas./vol. otopine PCL [17] u kloroformu sadržavali su $27 - 38\text{ mas. \%}$, odnosno $48,7 \pm 0,1\text{ mas. \%}$ polimera.

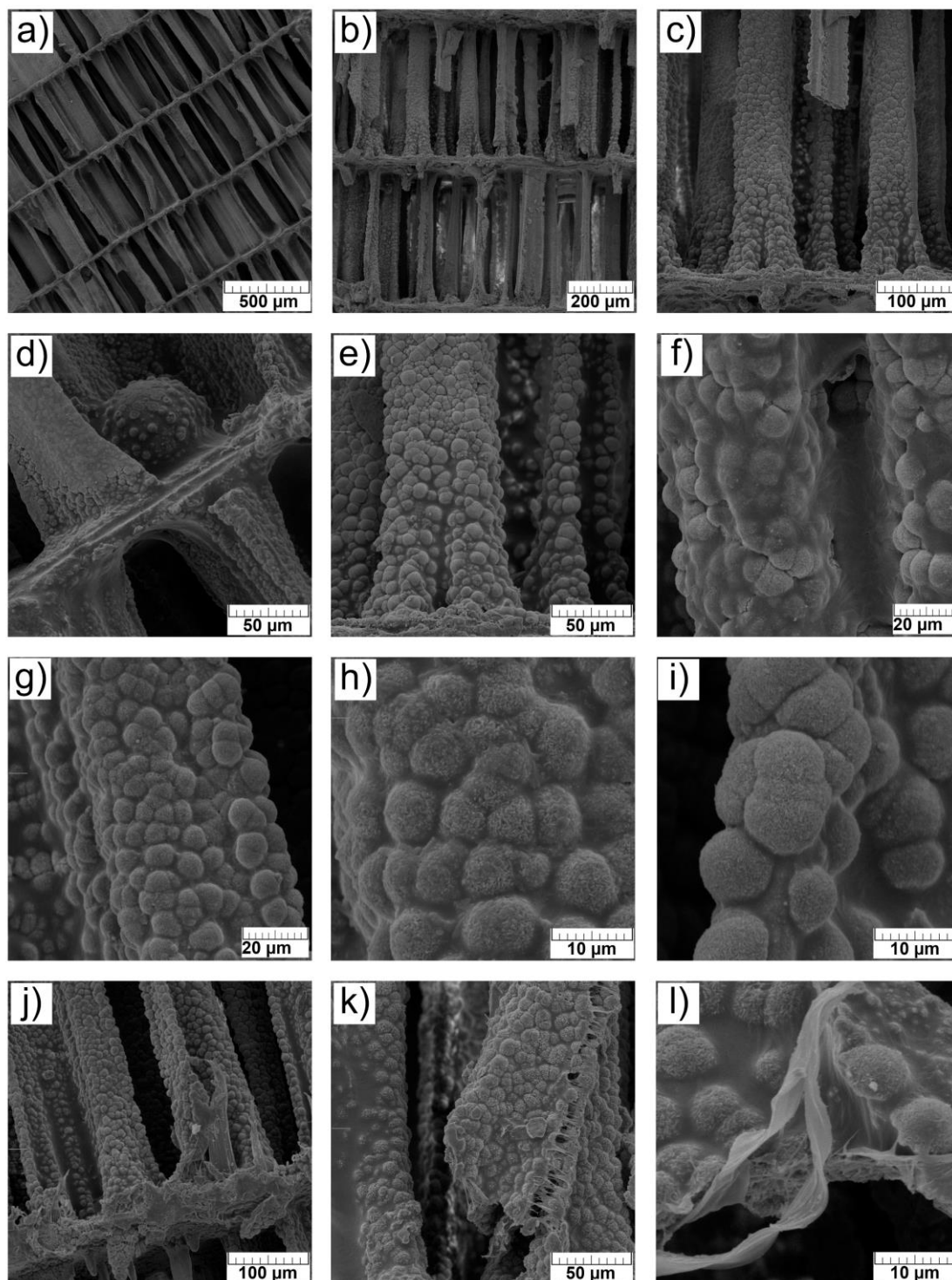


Slika 33. Rezultati termogravimetrijske analize CaP i CaP/PCL uzorka u atmosferi sintetičkog zraka unutar temperaturnog raspona od 40 do 1200 °C s brzinom grijanja 10 °C min⁻¹.

Slika 34 prikazuje SEM mikrografe površine kompozitnih nosača CaP/PCL (slike 34 b, c, e, i, k), 1-Mg-CaP/PCL (slike 34 f, g, h, j, l) i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL (slike 34 a, d) pri različitim povećanjima. Kako uzorci imaju jednaku morfologiju kalcij-fosfatne površine, pažnja je usmjerena na prikazivanje načina prekrivanja površine PLC-om.

Nakon postupka vakuumske impregnacije očuvana je visoko porozna struktura i nije primijećeno zatvaranje lamelarne matrice sipine kosti (slike 34 a – d). Prevlačenje površine polimerom lakše je uočljivo u području spajanja potpornih stupova s lamelarnom podlogom, slika 34 d), nego u sredini potpornih stupova, slika 34 e). Pri povećanjima od 2000 puta, slike 34 f) i g), te 5000 puta, slike 34 h) i i), vidljivo je da PCL ravnomjerno prekriva površinu i ulazi u šupljine mikrosfera karakterističnih za biološki hidroksiapatit.

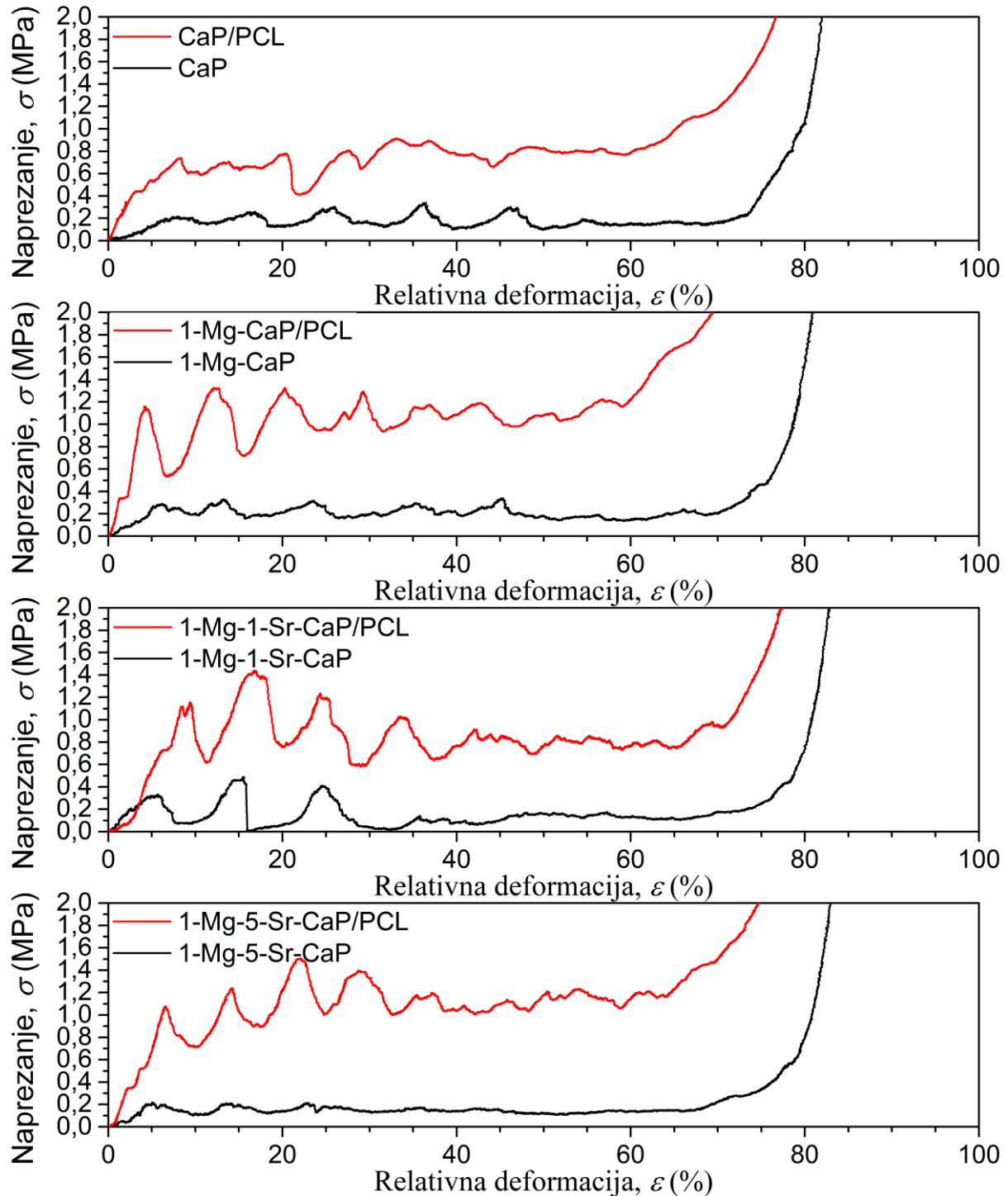
Prilikom priprave nosača za snimanje na elektronskom mikroskopu nosači su rezani i na slikama 34 j) – k) vidljiv je površinski polimerni film nakon utjecaja mehaničke sile. Na spojevima stupova s lamelarnom podlogom mogu se primijetiti vlaknaste nakupine otkinutog polimera, slika 34 j). Prilikom loma nastaju pukotine povezane mrežom PCL-a (slika 34 k). Tanki polimerni površinski film odvojen nakon odlamanja CaP matrice vidljiv je na slici 34 l).



Slika 34. SEM mikrografi površine kompozitnih nosača CaP/PCL (b, c, e, i, k), 1-Mg-CaP/PCL (f, g, h, j, l) i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL (a, d) pri različitim povećanjima. Međupovezanost visoko porozne strukture očuvana je nakon postupka vakuumske impregnacije otopinom polimera (a – d). Polimerni film PCL-a ravnomjerno prekriva nakupine mikrosfera karakterističnih za biološki hidroksiapatit (e – i). Izgled PCL filma nakon utjecaja mehaničke sile (j – k).

4.4. Određivanje mehaničkih svojstva

Mehanička svojstva Ca-P, 1-Mg-CaP, 1-Mg-1-Sr-1-CaP, 1-Mg-5-Sr-CaP nosača i pripadajućih kompozita s poli(ϵ -kapolaktonom) procijenjena su ispitivanjem tlačnog opterećenja okomito na lamele svakog uzorka. Svaki nosač ispitan je u minimalno 9 replika. Za svaki od ispitanih nosača na slici 35 prikazana je jedna od krivulja naprezanje-deformacija.



Slika 35. Krivulje naprezanje-deformacija pripremljenih kalcij-fosfatnih nosača (crna linija) i pripadajućih kompozitnih nosača dobivenih impregnacijom površine PCL-om (crvena linija).

Karakteristična krivulja naprezanje-deformacija visokoporoznih nosača temeljenih na sipinoj kosti sastoji se od početnog linearnog elastičnog dijela gdje za malu promjenu deformacije potrebno naprezanje naglo raste. Nakon postizanja kritičnog iznosa naprezanja slijedi duži ravniji dio krivulje unutar kojeg su vidljive periodičke promjene na krivulji. Periodičke promjene unutar tog područja pripisuju se urušavanju sipine lamelarne strukture. Primjena naprezanja uzrokuje lomljenje strukture sipine kosti sloj po sloj, lamelu po lamelu, sve dok ne dođe do završnog lomljenja čitavog poroznog nosača i stlačivanja kompaktnog materijala, što se na krivulji očituje naglim povećanjem naprezanja pri gotovo konstantnoj vrijednosti deformacije [17].

Usporedbom krivulja naprezanje-deformacija kalcij-fosfatnih uzoraka (crne krivulje na slici 35) s krivuljama kompozitnih nosača (crvene krivulje na slici 35) vidljivo je povećanje tlačne čvrstoće kod svih pripremljenih kompozitnih nosača. Vrijednosti tlačne čvrstoće kalcij-fosfatnih nosača kreću se između 0,20 i 0,35 MPa, dok nakon impregnacije kompozitni nosači temeljeni na supstituiranim strukturama postižu vrijednosti iznad 1,1 MPa. Impregnacija površine tankim filmom PCL-a uzrokovala je poboljšanje tlačne čvrstoće pripremljenih visokoporoznih nosača. Rezultati su usporedivi s onima Milovac i sur. [17] gdje je hidroksiapatitni nosač pokazao tlačnu čvrstoću od $0,15 \pm 0,09$ MPa, a nakon impregniranja površine PCL-om $0,88 \pm 0,11$ MPa.

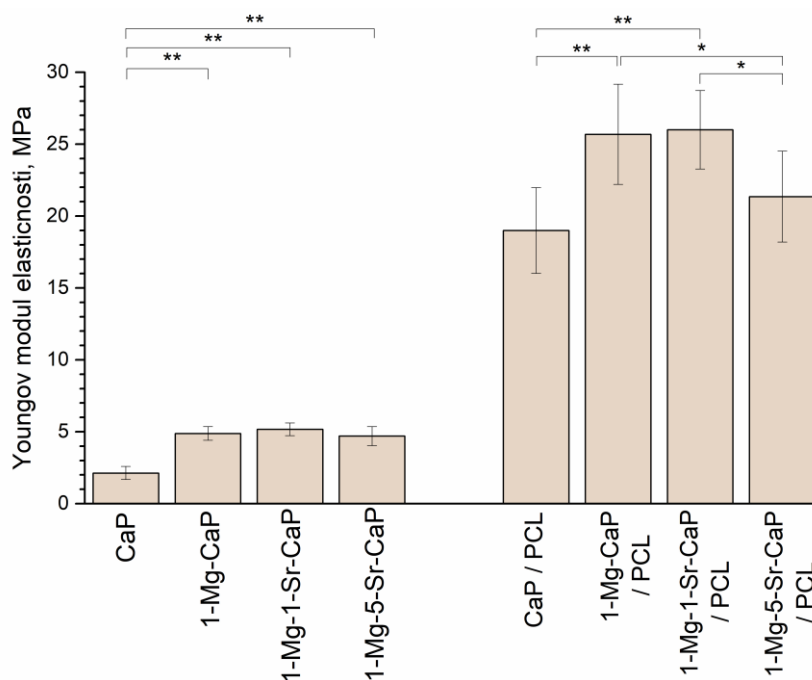
Mehanička svojstva Ca-P, 1-Mg-CaP, 1-Mg-1-Sr-1-CaP, 1-Mg-5-Sr-CaP nosača i pripadajućih kompozita s poli(ϵ -kapolaktonom) detaljnije su procijenjena izračunom Youngovog kompresijskog elastičnog modula (tablica 10 i slika 36).

Tablica 10. Vrijednosti Youngovog modula elastičnosti pripremljenih kalcij-fosfatnih i kompozitnih nosača dobivenih impregnacijom površine poli(ϵ -kapolaktonom).

| | Youngov elastični modul (MPa) | |
|--------------------------|-------------------------------|------------|
| CaP | 2,14 | $\pm 0,46$ |
| 1-Mg-CaP | 4,89 | $\pm 0,48$ |
| 1-Mg-1-Sr-CaP | 5,18 | $\pm 0,44$ |
| 1-Mg-5-Sr-CaP | 4,70 | $\pm 0,66$ |
| CaP/PCL | 19,00 | $\pm 2,98$ |
| 1-Mg-CaP/PCL | 25,69 | $\pm 3,48$ |
| 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL | 26,01 | $\pm 2,73$ |
| 1-Mg-5-Sr-CaP/PCL | 21,36 | $\pm 3,16$ |

Unatoč težnji pripreme uzoraka reprezentativne strukture i izbjegavanja anizotropnosti slojevite periodičke strukture prilikom primjene tlačnog opterećenja, utjecaj korištenja biogenog izvora materijala vidljiv je u vrijednostima standardne devijacije. Uzorak nesupstituiran metalnim ionima pokazuje odstupanje od $\pm 21\%$, dok kod supstituiranih i kompozitnih nosača standardna devijacija iznosi $8 - 15\%$.

Moduli elastičnosti nosača supstituiranih ionima pokazuju dvostruko povećanje u odnosu na vrijednost elastičnog modula CaP nosača. Značajno povećanje modula elastičnosti s $2,14\text{ MPa}$ za uzorak od čistog hidroksiapatita na $4,89$, $5,18$ te $4,70\text{ MPa}$ dodatkom iona magnezija ili magnezija i stroncija može se pripisati prisutnosti vitlokita. Dodatno, kod Mg-CaP uzoraka uočeno je da karakteristične nakupine mikrosfera na površini postaju manje dodatkom magnezija. Dvofazni sustav HAp/WH i drugačija morfologija površine utječu na poboljšanje mehaničkih svojstava. Ovakvi rezultati mogu se usporediti s rezultatima Jang i sur. [90], čiji biokeramički kompaktni tabletirani i sinterirani materijali potvrđuju da vitlokit ima bolja mehanička svojstva od hidroksiapatita, tlačnu čvrstoću $0,90\text{ GPa}$ u odnosu na $0,42\text{ GPa}$.



Slika 36. Vrijednosti Youngovog modula elastičnosti kalcij-fosfatnih nosača i kompozitnih nosača dobivenih impregnacijom površine kalcij-fosfatnih nosača poli(ϵ -kapolaktonom). Značajna razlika između dvije grupe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Glavni nedostatak nosača temeljnih na biokeramici jesu slaba mehanička svojstva, posebno krhkost i niska žilavost. Unatoč poboljšanju svojstava dodatkom iona, potrebna su daljnja poboljšanja mehaničkih svojstava. Nanošenjem tankog sloja poli(ϵ -kaprolaktona) na površinu nosača CaP, postignuto je poboljšanje modula elastičnosti za jedan red veličine. Youngov modul elastičnosti CaP nosača iznosi $2,14 \pm 0,46$ MPa, dok je vrijednost CaP/PCL nosača $19,00 \pm 2,98$ MPa.

Postignuto poboljšanje usporedivo je s rezultatima Milovac i sur. [17], gdje je elastični modul hidroksiapatitnog nosač $0,7 \pm 0,3$ MPa, a kompozitnog nosača hidroksiapatita i PCL-a $15,5 \pm 1,2$ MPa. Razliku između vrijednosti elastičnih modula kompozitnih nosača hidroksiapatita i PCL-a moguće je pripisati korištenju različitih koncentracija polimernih otopina. Milovac i sur. koristili su 20 % mas./vol. otopinu PCL-a u kloroformu i maseni udio polimera u kompozitnom nosaču iznosio je $48,7 \pm 0,1$. Prilikom pripreve ovih nosača korištena je 10 % mas./vol. otopina. Upotrebom polimerne otopine manje koncentracije kompozitni nosači sadrže $32,7 \pm 1,8$ mas. % PCL-a, no manja viskoznost otopine vjerojatno je uzrokovala dubljim prodiranjem polimera u površinu nosača i rezultirala poboljšanjem mehaničkih svojstava.

Youngovi moduli elastičnosti kompozitnih nosača, unatoč prisutnosti devijacija unutar replika, zadržavaju trend poboljšanja vrijednosti dodatkom iona prilikom hidrotermalne sinteze. 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL kompozitni nosači s vrijednostima od $25,69 \pm 3,48$ MPa i $26,01 \pm 3,16$ MPa pokazuju veće vrijednosti modula elastičnosti u odnosu na nesupstituirani CaP/PCL nosač ($19,00 \pm 2,98$ MPa) i 1-Mg-5-Sr-CaP/PCL ($21,36 \pm 3,16$ MPa).

Unatoč znatnom poboljšanju vrijednosti, modul elastičnosti prirodnih tvorevina ljudske kosti kreće se u vrijednostima od desetak GPa [39]. Pripremljeni visokoporozni kompozitni nosači oponašaju strukturu spužvastog dijela kosti i mogu pronaći primjenu na mjestima s malim mehaničkim opterećenjem. Višestrukim nanošenjem polimernog sloja na nosač moguće je daljnje poboljšanje mehanička svojstva, no istovremeno dolazi do kompromisa u smanjenju poroznosti strukture, produljenja vremena biorazgradnje i manje površinske dostupnosti bioaktivnog kalcij-fosfatnog materijala [137,142–145].

4.5. Ispitivanje osteogenih svojstava kompozitnih nosača

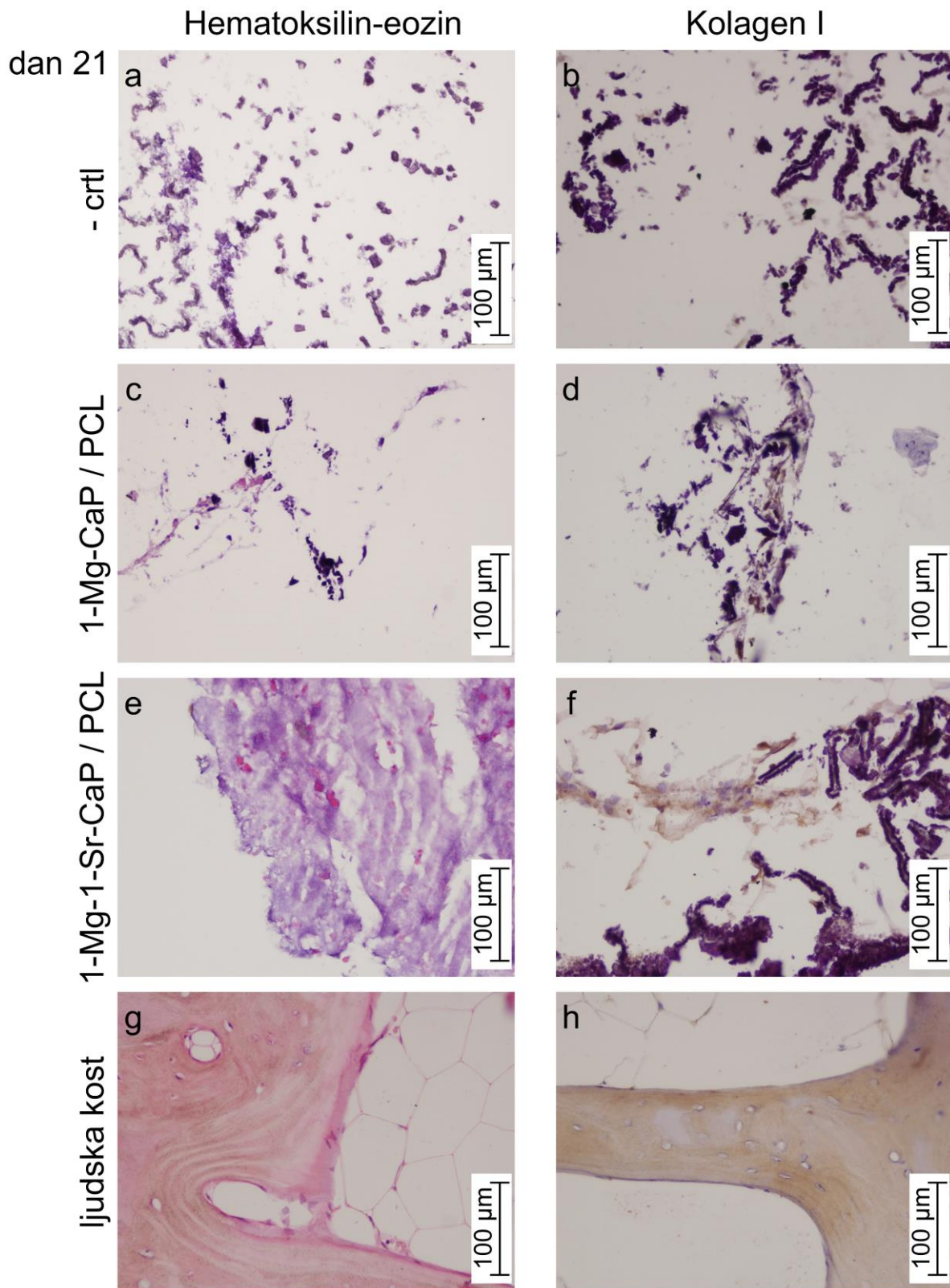
U prijašnjim radovima Milovac i sur. [17,18] ispitivanjima *in vitro* potvrđeno je da hidroksiapatitna struktura impregnirana tankim slojem PCL-a potiče mineralizaciju biološkog apatita na površini nosača, nije citotoksična te potiče prijanjanje, umnažanje i diferencijaciju preosteoblastnih stanica.

Prilikom određivanja bioloških svojstava magnezijem supstituiranih uzoraka staničnom kulturom *in vitro* u poglavlju 4.1.5., uzorak s 1 mol. % magnezija (1-Mg-CaP) pokazao je najpovoljniji utjecaj na osteogenu diferencijaciju hMSC. Zbog sličnosti i dobrih svojstava kalcij-fosfatnih i kompozitnih struktura, kompozitni nosači 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL odabrani su kao najpovoljniji za ispitivanje utjecaja kosupstitucije magnezijem i stroncijem na osteogeni odaziv hMSC u statičnoj kulturi *in vitro*.

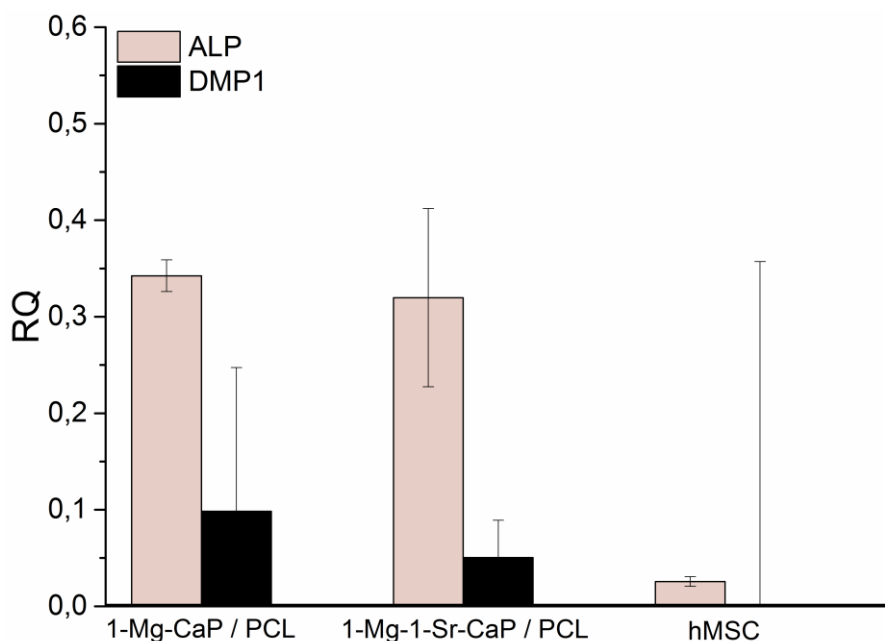
Rezultati detekcije staničnih depozita hematoksilin-eozin bojenjem i imunohistokemijskog bojenja kolagena tipa I na 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL prikazani su na slici 37. Slika 37 g) pokazuje pozitivno hematoksilin-eozin obojenje koštanog tkiva gdje se ružičasto boji izvanstanična matrica i citoplazma, a plavo-ljubičasto stanične jezgre. Slika 37 h) pokazuje karakteristično pozitivno smeđe obojenje kolagena na presjeku ljudske kosti. Negativne kontrolne sekcije (- ctrl, slike 37 a i b), predstavljaju interferenciju nastalu bojenjem materijala nosača i trebaju se izuzeti prilikom usporedbe uzoraka s hMSC.

Fotomikrografi histološke analize hematoksilin-eozinom nakon 21 dana stanične kulture hMSC pokazuju vrlo slab intenzitet obojenja. Blago ružičasto obojena mrežasta struktura na lijevom dijelu slike 37 c) naznačava početak stvaranja izvanstanične matrice kod nosača 1-Mg-CaP/PCL. Bojenje 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL nosača hematoksilinom i eozinom (slika 37 e) pokazuje da se materijal usitnio i stopio s blagim ružičastim obojenjem tkiva. Može se primijetiti nekoliko intenzivno ružičastih točaka koje jasnije indiciraju nastanak tkiva.

Sinteza kolagena tipa I potvrđena je imunohistokemijskim bojenjem nakon 21 dana osteogene indukcije (slika 37). Slabo smeđe obojenje kolagena tipa I može se vidjeti na 1-Mg-CaP/PCL nosaču nakon 21 dana osteoindukcije (slika 37 d). Nosač 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL (slika 37 f) pokazuje izraženije smeđe obojenje kolagena koje tvori mrežastu strukturu na većem području snimljenog mikrografa. Na temelju bolje ekspresije kolagena I kompozitnog nosača 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL u odnosu na 1-Mg-CaP/PCL, pokazano je da kosupstitucija stroncijem i magnezijem povoljnije utječe na osteogenu aktivnost ljudskih mezenhimskih matičnih stanica.



Slika 37. Histološka analiza hematoksilin-eozin bojenjem nosača c) 1-Mg-CaP/PCL i e) 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL. Imunohistokemijsko ispitivanje kolagena tipa I na nosaču d) 1-Mg-CaP/PCL i f) 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL. Ljudska kost korištena je kao pozitivna kontrola (g, h). Kao negativne kontrole korištene su sekcije svakog uzorka bez korištenja prikladnog bojila (a, b).



Slika 38. Relativna ekspresija (engl. *relative quantification*, RQ) osteogenih markera 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL nosača nakon 21 dana osteogene indukcije. Kvantificirani osteogeni markeri su alkalna fosfataza (ALP) i protein matrice dentina (DMP1). Razina ekspresije gena normalizirana je prema pozitivnoj kontroli (ljudskoj kosti) i β -aktinu. Nediferencirane hMSC predstavljaju negativnu kontrolu. Relativna ekspresija ciljanih gena izračunata je korištenjem $\Delta\Delta C_t$ metode.

Relativna ekspresija osteogenih markera (slika 38) pokazuje da testirani kompozitni nosači pokazuju ekspresiju ALP i DMP1 nakon 21 dana stanične kulture. Između uzoraka 1-Mg-CaP/PCL i 1-Mg-1-Sr-CaP/PCL nije uočena razlika između ekspresije ALP i DMP1. Veća ekspresija ALP-a u odnosu na DMP1 marker ukazuje na rani stupanj osteogene diferencijacije hMSC. Prisutnost ranog i kasnog markera osteogeneze potvrđuje osteogenu aktivnost ljudskih mezenhimskih matičnih stanica na poroznim trodimenzionalnim kompozitnim nosačima.

Relativna ekspresija osteogenih markera kalcij-fosfatnih nosača (slika 25, poglavlje 4.1.5.3.) pokazala je veću ekspresiju kasnih markera osteogeneze u odnosu na rani ALP marker, tj. prisutnost kasnijeg stadija osteogene diferencijacije. Visoka kvantificirana vrijednost ALP-a kod kompozitnih nosača pokazuje veću aktivnost stanica u ranom stadiju osteoindukcije. Prekrivenost bioaktivne kalcij-fosfatne površine prevlakom poli(ϵ -kaprolaktona) usporava

otpuštanje iona kalcij-fosfatnog materijala, tj. smanjuje brzinu resorpcije, što posljedično utječe na zadržavanje ljudskih menzenhimskih matičnih stanica u ranom stadiju diferencijacije.

Ovakvi rezultati u skladu su s istraživanjem Milovac i sur. [18] gdje je kod kompozitnog PCL/CaP nosača potvrđena viša ekspresija ALP enzima u odnosu na CaP nosač. Prekrivenost bioaktivne kalcij-fosfatne površine prevlakom poli(ϵ -kaprolaktona) poboljšava aktivnost stanica, no istovremeno produljuje period diferencijacije ljudskih menzenhimskih matičnih stanica u koštane stanice. Potrebna su duža ispitivanja *in vitro* kako bi se ukazalo na kasniju diferencijaciju na kompozitnim nosačima i njihov povoljniji utjecaj na nastanak koštanog tkiva u odnosu na kalcij-fosfatne nosače.

5. ZAKLJUČAK

Hidrotermalnom konverzijom sipine kosti uz očuvanje visokoporozne međupovezane strukture sintetizirani su porozni nosači dvofazne smjese karbonatnog hidroksiapatita i vitlokita. Na omjer HAp : WH faza u dvofaznom nosaču može se utjecati udjelom Mg iona u početnoj otopini. Mg ioni se preferirano ugrađuju u kristalnu strukturu vitlokita i imaju utjecaj na smanjenje sferičnih površinskih nakupina karakterističnih za hidroksiapatit. Magnezij perklorat se zbog potpunije konverzije aragonita i homogenije površine nosača pokazao kao bolji prekursor magnezija od magnezij klorid heksahidrata. Dodatak Sr iona nema značajan utjecaj na omjer HAp : WH faze, no bitno utječe na povećanje dimenzija jedinične ćelije vitlokita.

Staničnim kulturama s HEK293 stanicama pokazano je da magnezijem i stroncijem supstituirani nosači nisu citotoksični. Staničnom kulturom *in vitro* potvrđena je osteogena diferencijacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica na kalcij-fosfatnim nosačima. U usporedbi s hidroksiapatitnim i magnezijem supstituiranim nosačima, nosač supstituiran 1 mol. % magnezija i masenim omjerom HAp : WH 90 : 10 pokazuje najpovoljniji utjecaj na osteogenu diferencijaciju hMSC.

Korištenjem vakuumske impregnacije dobiveni su kompozitni nosači gdje tanki sloj poli(ϵ -kaprolaktona) ravnomjerno prekriva površinu kalcij-fosfata čija struktura zadržava međupovezanost i visoku poroznost. Dodatak Mg^{2+} i Sr^{2+} iona dvostruko poboljšava vrijednosti Youngovih modula elastičnosti dvofaznih smjesa HAp/WH u odnosu na nosač od karbonatnog hidroksiapatita. Površinski film PCL-a poboljšava Youngov modul elastičnosti kompozitnih nosača za jedan red veličine u odnosu na nosač od karbonatnog hidroksiapatita (CaP).

Kompozitni nosači supstituirani 1 mol. % magnezija i kosupstituirani 1 mol. % magnezija i 1 mol. % stroncija pokazuju osteogenu aktivnost hMSC nakon 21 dana stanične kulture *in vitro*. Dodatak stroncija u kompozitnom kosupstituiranom nosaču pokazuje pozitivan utjecaj na rani stupanj osteogene diferencijacije i nastanak izvanstanične matrice.

Pripremljeni trodimenzionalni visokoporozni kompozitni nosači, s anorganskom matricom od biološki sličnog karbonatnog hidroksiapatita te magnezijem i stroncijem kosupstituirane kristalne faze vitlokita, površinskim filmom poli(ϵ -kaprolaktona), poboljšanim mehaničkim svojstvima i povoljnijim utjecajem na osteogenu diferencijaciju matičnih stanica u odnosu na hidroksiapatit, ukazuju na potencijal primjene kao materijala za nadomjestak oštećenog koštanog tkiva.

6. LITERATURA

- [1] S. Dorozhkin, Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine, Materials (Basel). 2 (2009) 399–498.
- [2] S. V. Dorozhkin, Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates, Acta Biomater. 6 (2010) 715–734.
- [3] L. Wang, G.H. Nancollas, Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution, Chem. Rev. 108 (2008) 4628–4669.
- [4] R. Geros, Calcium phosphate-based osteoinductive materials, Chem Rev 108 (2008) 4742–4753.
- [5] S.H. Park, A. Llinás, V.K. Goel, J.C. Keller, Hard tissue replacements: Bone repair and joint implants, u J.B. Park, J.D. Bronzino (Ur.), Biomater. Princ. Appl., CRC Press, Boca Raton, Florida, 2000, str. 173–194.
- [6] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, Acta Biomater. 6 (2010) 1882–1894.
- [7] J.H. Shepherd, D. V. Shepherd, S.M. Best, Substituted hydroxyapatites for bone repair, J. Mater. Sci. Mater. Med. 23 (2012) 2335–2347.
- [8] M. Šupová, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, Ceram. Int. 41 (2015) 9203–9231.
- [9] T. Tite, A.-C. Popa, L. Balescu, I. Bogdan, I. Pasuk, J. Ferreira, G. Stan, Cationic Substitutions in Hydroxyapatite: Current Status of the Derived Biofunctional Effects and Their In Vitro Interrogation Methods, Materials (Basel). 11 (2018) 2081.
- [10] S.H. Lin, W.J. Zhang, X.Q. Jiang, Applications of bioactive ions in bone regeneration, Chin. J. Dent. Res. 22 (2019) 93–104.
- [11] J.T.B. Ratnayake, M. Mucalo, G.J. Dias, Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 105 (2017) 1285–1299.
- [12] Y. Li, Q. Li, S. Zhu, E. Luo, J. Li, G. Feng, Y. Liao, J. Hu, The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats, Biomaterials 31 (2010) 9006–9014.
- [13] H. Ivankovic, G. Gallego Ferrer, E. Tkalcec, S. Orlic, M. Ivankovic, Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone, J. Mater. Sci. Mater. Med. 20 (2009) 1039–1046.
- [14] H. Ivankovic, E. Tkalcec, S. Orlic, G. Gallego Ferrer, Z. Schauerl, Hydroxyapatite formation from cuttlefish bones: Kinetics, J. Mater. Sci. Mater. Med. 21 (2010) 2711–2722.
- [15] A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković, Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, Mater. Sci. Eng. C 33 (2013) 4539–4544.
- [16] E. Tkalčec, J. Popović, S. Orlić, S. Milardović, H. Ivanković, Hydrothermal synthesis and thermal evolution of carbonate-fluorhydroxyapatite scaffold from cuttlefish bones, Mater. Sci. Eng. C 42 (2014) 578–586.
- [17] D. Milovac, G. Gallego Ferrer, M. Ivankovic, H. Ivankovic, PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity, Mater. Sci. Eng. C 34 (2014) 437–445.
- [18] D. Milovac, T.C. Gamboa-Martínez, M. Ivankovic, G. Gallego Ferrer, H. Ivankovic, PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: In vitro cell culture studies, Mater. Sci. Eng. C 42 (2014) 264–272.
- [19] A. Rogina, P. Rico, G.G. Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, Effect of in situ formed hydroxyapatite on microstructure of freeze-gelled chitosan-based biocomposite

- scaffolds, *Eur. Polym. J.* 68 (2015) 278–287.
- [20] A. Rogina, P. Rico, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, In Situ Hydroxyapatite Content Affects the Cell Differentiation on Porous Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds, *Ann. Biomed. Eng.* 44 (2016) 1107–1119.
- [21] A. Rogina, A. Ressler, I. Matic, G. Gallego Ferrer, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Cellular hydrogels based on pH-responsive chitosan-hydroxyapatite system, *Carbohydr. Polym.* 166 (2017) 173–182.
- [22] A. Rogina, M. Antunović, L. Pribolšan, K. Caput Mihalić, A. Vukasović, A. Ivković, I. Marijanović, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation Regulated by Hydroxyapatite Content within Chitosan-Based Scaffolds under Perfusion Conditions, *Polymers (Basel)*. 9 (2017) 387.
- [23] A. Rogina, M. Antunović, D. Milovac, Biomimetic design of bone substitutes based on cuttlefish bone-derived hydroxyapatite and biodegradable polymers, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 107 (2019) 197–204.
- [24] A. Rogina, A. Lončarević, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Tuning physicochemical and biological properties of chitosan through complexation with transition metal ions, *Int. J. Biol. Macromol.* 129 (2019) 645–652.
- [25] A. Ressler, M. Cvetnić, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 108 (2020) 1697–1709.
- [26] A. Rogina, D. Vidović, M. Antunović, M. Ivanković, H. Ivanković, Metal ion-assisted formation of porous chitosan-based microspheres for biomedical applications, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* (2020) 1–9.
- [27] A. Rogina, I. Košić, M. Antunović, M. Ivanković, H. Ivanković, The bioactivity of titanium-cuttlefish bone-derived hydroxyapatite composites sintered at low temperature, *Powder Metall.* 63 (2020) 300–310.
- [28] A. Ressler, A. Gudelj, K. Zadro, M. Antunović, M. Cvetnić, M. Ivanković, H. Ivanković, From bio-waste to bone substitute: Synthesis of biomimetic hydroxyapatite and its use in chitosan-based composite scaffold preparation, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 34 (2020) 59–71.
- [29] L. Bauer, M. Antunović, A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković, Bone-mimetic porous hydroxyapatite/whitlockite scaffolds: preparation, characterization and interactions with human mesenchymal stem cells, *J. Mater. Sci.* 56 (2021) 3947–3969.
- [30] A. Rogina, M. Pušić, L. Štefan, A. Ivković, I. Urlić, M. Ivanković, H. Ivanković, Characterization of Chitosan-Based Scaffolds Seeded with Sheep Nasal Chondrocytes for Cartilage Tissue Engineering, *Ann. Biomed. Eng.* (2021) 1–15.
- [31] D.F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, u *Williams Dict. Biomater.*, Liverpool University Press, Liverpool, 1999, str. 42.
- [32] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials* 30 (2009) 5897–5909.
- [33] S. Dorozhkin, Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics, *Materials (Basel)*. 6 (2013) 3840–3942.
- [34] S. Mann, *Biomimetic Materials Chemistry*, Wiley, Oxford, UK, 1995.
- [35] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, *Science (80-.)*. 260 (1993) 920–926.
- [36] Z. Artzi, M. Weinreb, N. Givol, M.D. Roherer, C.E. Nemcovsky, H.S. Prasad, H. Tal, Biomaterial restorability and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta tricalcium phosphate in the canine: A 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis, *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 19 (2004) 357–368.
- [37] F. Akter, J. Ibanez, *Bone and Cartilage Tissue Engineering*, u F. Akter (Ur.), *Tissue Eng. Made Easy*, Elsevier Inc., 2016, str. 77–97.
- [38] R. Setiawati, P. Rahardjo, *Bone Development and Growth*, u H. Yang (Ur.),

- Osteogenes. Bone Regen., IntechOpen, 2019, str. 2–20.
- [39] V.-R. Maria, D. Acros, Biological apatites in bone and teeth, u Biomim. Nanoceramics Clin. Use From Mater. to Appl., R. Soc. Chem., Cambridge, 2008, str. 1–24.
- [40] S. V. Bhat, Orthopaedic Implants, u Biomaterials, Springer Netherlands, Dordrecht, 2002, str. 171–193.
- [41] P.J. Bishop, S.A. Hocknull, C.J. Clemente, J.R. Hutchinson, A.A. Farke, B.R. Beck, R.S. Barrett, D.G. Lloyd, Cancellous bone and theropod dinosaur locomotion Part I-an examination of cancellous bone architecture in the hindlimb bones of theropods, PeerJ 6 (2019) e5778.
- [42] R.Y. K Sudarsanan, Significant precision in crystal structural details: holly springs hydroxyapatite, Acta Crystallogr B 25 (1969) 1534–1543.
- [43] K. Momma, F. Izumi, VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data, J. Appl. Crystallogr. 44 (2011) 1272–1276.
- [44] W.S. Vanden Berg-Foels, L. Scipioni, C. Huynh, X. Wen, Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network, J. Microsc. 246 (2012) 168–176.
- [45] R. Florencio-Silva, G.R.D.S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, Biomed Res. Int. 2015 (2015) 1–17.
- [46] A.M. Mohamed, An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation, Malays. J. Med. Sci. 15 (2008) 4–12.
- [47] M. Kitamura, C. Ohtsuki, S. Ogata, M. Kamitakahara, M. Tanihara, Microstructure and Bioresorbable Properties of α -TCP Ceramic Porous Body Fabricated by Direct Casting Method, Mater. Trans. 45 (2004) 983–988.
- [48] D. Kawagoe, K. Ioku, H. Fujimori, S. Goto, Transparent BETA-Tricalcium Phosphate Ceramics Prepared by Spark Plasma Sintering, J. Ceram. Soc. Japan 112 (2004) 462–463.
- [49] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, D. Grossin, G. Bertrand, J. Soulié, 111 Bioactive Calcium Phosphate Compounds: Physical Chemistry, u P. Ducheyne (Ur.), Compr. Biomater. II, Elsevier, 2017, str. 244–290.
- [50] B. Wopenka, J.D. Pasteris, J.P. B Wopenka, A mineralogical perspective on the apatite in bone, 25 (2005) 131–143.
- [51] P.M. Piccoli, P.A. Candela, Apatite in Igneous Systems, Rev. Mineral. Geochemistry 48 (2002) 255–292.
- [52] A.J. Salinas, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair, Biomater. Sci. 1 (2013) 40–51.
- [53] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements, Injury 31 (2000) 37–47.
- [54] Y. Huang, H. Zhang, H. Qiao, X. Nian, X. Zhang, W. Wang, X. Zhang, X. Chang, S. Han, X. Pang, Anticorrosive effects and in vitro cytocompatibility of calcium silicate/zinc-doped hydroxyapatite composite coatings on titanium, Appl. Surf. Sci. 357 (2015) 1776–1784.
- [55] W. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, J. Mater. Res. 13 (1998) 94–117.
- [56] C. Stähli, M. Bohner, M. Bashoor-Zadeh, N. Doebelin, G. Baroud, Aqueous impregnation of porous β -tricalcium phosphate scaffolds, Acta Biomater. 6 (2010) 2760–2772.
- [57] S.R. Paital, N.B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, Mater. Sci. Eng. R Reports 66

- (2009) 1–70.
- [58] M. Kon, K. Ishikawa, Y. Miyamoto, K. Asaoka, Development of calcium phosphate based functional gradient bioceramics, *Biomaterials* 16 (1995) 709–714.
- [59] L.H. Wong, B. Tio, X. Miao, Functionally graded tricalcium phosphate/fluoroapatite composites, *Mater. Sci. Eng. C* 20 (2002) 111–115.
- [60] A.S. Posner, A. Perloff, A.F. Diorio, Refinement of the hydroxyapatite structure, *Acta Crystallogr.* 11 (1958) 308–309.
- [61] R.A. Young, W.E. Brown, Structures of Biological Minerals, u G.H. Nancollas (Ur.), *Biol. Miner. Deminer.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1982, str. 101–141.
- [62] Z. Evis, T.J. Webster, Nanosize hydroxyapatite: doping with various ions, *Adv. Appl. Ceram.* 110 (2011) 311–321.
- [63] R.Z. Legeros, R. Kijkowska, C. Bautista, J.P. Legeros, Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites, *Connect. Tissue Res.* 33 (1995) 203–209.
- [64] R.R.Z. Legeros, Calcium phosphates in oral biology and medicine, *Monogr. Oral. Sci* 15 (1991) 109–111.
- [65] A. Laskus, J. Kolmas, Ionic Substitutions in Non-Apatitic Calcium Phosphates, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2542.
- [66] M. Yamaguchi, H. Oishi, Y. Suketa, Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 4007–4012.
- [67] A. Bigi, E. Foresti, R. Gregorini, A. Ripamonti, N. Roveri, J.S. Shah, The role of magnesium on the structure of biological apatites, *Calcif. Tissue Int.* 50 (1992) 439–444.
- [68] F.C.M. Driessens, R.M.H. Verbeeck, P. Kiekens, Mechanism of Substitution in Carbonated Apatites, *J. Inorg. Chem. Gen. Chem* 504 (1983) 195–200.
- [69] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher, Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 251–258.
- [70] S.A. Redey, M. Nardin, D. Bernache-Assolant, C. Rey, P. Delannoy, L. Sedel, P.J. Marie, Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 353–364.
- [71] A. Yasukawa, S. Ouchi, K. Kandori, T. Ishikawa, Preparation and characterization of magnesium-calcium hydroxyapatites, *J. Mater. Chem.* 6 (1996) 1401–1405.
- [72] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, S. Sprio, Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 239–247.
- [73] F. Ren, Y. Leng, R. Xin, X. Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2787–2796.
- [74] A. Farzadi, F. Bakhshi, M. Solati-Hashjin, M. Asadi-Eydivand, N.A. abu Osman, Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization, *Ceram. Int.* 40 (2014) 6021–6029.
- [75] X. Yuan, B. Zhu, G. Tong, Y. Su, X. Zhu, Wet-chemical synthesis of Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles by step reaction and ion exchange processes, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 6551.
- [76] S.C. Cox, P. Jamshidi, L.M. Grover, K.K. Mallick, Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation, *Mater. Sci. Eng. C* 35 (2014) 106–114.
- [77] L. Stipnice, K. Salma-Ancane, N. Borodajenko, M. Sokolova, D. Jakovlevs, L.

- Berzina-Cimdina, Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method, *Ceram. Int.* 40 (2014) 3261–3267.
- [78] W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, V.F. Janas, K.S. TenHuisen, Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method, *Biomaterials* 25 (2004) 4647–4657.
- [79] U. Batra, S. Kapoor, S. Sharma, Influence of Magnesium Ion Substitution on Structural and Thermal Behavior of Nanodimensional Hydroxyapatite, *J. Mater. Eng. Perform.* 22 (2013) 1798–1806.
- [80] W.F. Neuman, B.J. Mulryan, Synthetic hydroxyapatite crystals, *Calcif. Tissue Res.* 7 (1971) 133–138.
- [81] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, A. Ripamonti, M. Gazzano, N. Roveri, Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization, *J. Inorg. Biochem.* 49 (1993) 69–78.
- [82] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials* 32 (2011) 1826–1837.
- [83] C.M. Serre, M. Papillard, P. Chavassieux, J.C. Voegel, G. Boivin, Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 626–633.
- [84] H.L. Jang, K. Jin, J. Lee, Y. Kim, S.H. Nahm, K.S. Hong, K.T. Nam, Revisiting Whitlockite, the Second Most Abundant Biomineral in Bone: Nanocrystal Synthesis in Physiologically Relevant Conditions and Biocompatibility Evaluation, *ACS Nano* 8 (2014) 634–641.
- [85] H.L. Jang, H.K. Lee, K. Jin, H.-Y. Ahn, H.-E. Lee, K.T. Nam, Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 1342–1349.
- [86] J.C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [87] F.C. Driessens, R. Verbeeck, *Biominerals*, CRC Press, Florida, 1990.
- [88] R.G. C Calvo, Crystal-structure of whitlockite from Palermo Quarry, *Am Miner.* 60 (1975) 120–133.
- [89] R. Gopal, C. Calvo, Structural Relationship of Whitlockite and $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, *Nat. Phys. Sci.* 237 (1972) 30–32.
- [90] H.L. Jang, G. Bin Zheng, J. Park, H.D. Kim, H.-R. Baek, H.K. Lee, K. Lee, H.N. Han, C.-K. Lee, N.S. Hwang, J.H. Lee, K.T. Nam, In Vitro and In Vivo Evaluation of Whitlockite Biocompatibility: Comparative Study with Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 128–136.
- [91] H.D. Kim, H.L. Jang, H.-Y. Ahn, H.K. Lee, J. Park, E. Lee, E.A. Lee, Y.-H. Jeong, D.-G. Kim, K.T. Nam, N.S. Hwang, Biomimetic whitlockite inorganic nanoparticles-mediated in situ remodeling and rapid bone regeneration, *Biomaterials* 112 (2017) 31–43.
- [92] S. Yoshizawa, A. Brown, A. Barchowsky, C. Sfeir, Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells, *Connect. Tissue Res.* 55 (2014) 155–159.
- [93] A.A. Chaudhry, J. Goodall, M. Vickers, J.K. Cockcroft, I. Rehman, J.C. Knowles, J.A. Darr, Synthesis and characterisation of magnesium substituted calcium phosphate bioceramic nanoparticles made via continuous hydrothermal flow synthesis, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 5900–5908.
- [94] J.H. Luna-Domínguez, H. Téllez-Jiménez, H. Hernández-Cocoletzi, M. García-Hernández, J.A. Melo-Banda, H. Nygren, Development and in vivo response of hydroxyapatite/whitlockite from chicken bones as bone substitute using a chitosan

- membrane for guided bone regeneration, *Ceram. Int.* 44 (2018) 22583–22591.
- [95] H. Cheng, R. Chabok, X. Guan, A. Chawla, Y. Li, A. Khademhosseini, H.L. Jang, Synergistic interplay between the two major bone minerals, hydroxyapatite and whitlockite nanoparticles, for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Acta Biomater.* 69 (2018) 342–351.
- [96] S.G. Dahl, P. Allain, P.J. Marie, Y. Mauras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas, C. Christiansen, Incorporation and distribution of strontium in bone, *Bone* 28 (2001) 446–453.
- [97] P.J. Marie, Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) S7–S10.
- [98] P. Ammann, Strontium ranelate: A novel mode of action leading to renewed bone quality, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) S11–S15.
- [99] J.Y. Reginster, O. Bruyère, A. Sawicki, A. Rocas-Varela, P. Fardellone, A. Roberts, J.P. Devogelaer, Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: Results at 8 years, *Bone* 45 (2009) 1059–1064.
- [100] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorganica Chim. Acta* 360 (2007) 1009–1016.
- [101] K. Zhu, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method, *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 509–513.
- [102] J. Terra, E.R. Dourado, J.G. Eon, D.E. Ellis, G. Gonzalez, A.M. Rossi, The structure of strontium-doped hydroxyapatite: An experimental and theoretical study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 568–577.
- [103] M. Kikuchi, A. Yamazaki, R. Otsuka, M. Akao, H. Aoki, Crystal Structure of Sr-Substituted Hydroxyapatite Synthesized by Hydrothermal Method, *J. Solid State Chem.* 113 (1994) 373–378.
- [104] A. Bigi, G. Falini, M. Gazzano, N. Roveri, E. Tedesco, Structural refinements of strontium substituted hydroxylapatites, *Mater. Sci. Forum* 278–281 (1998) 814–819.
- [105] H.B. Pan, Z.Y. Li, W.M. Lam, J.C. Wong, B.W. Darvell, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1678–1685.
- [106] E. Landi, S. Sprio, M. Sandri, G. Celotti, A. Tampieri, Development of Sr and CO₃ co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications, *Acta Biomater.* 4 (2008) 656–663.
- [107] C. Capuccini, P. Torricelli, E. Boanini, M. Gazzano, R. Giardino, A. Bigi, Interaction of Sr-doped hydroxy apatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 89 (2009) 594–600.
- [108] K. Qiu, X.J. Zhao, C.X. Wan, C.S. Zhao, Y.W. Chen, Effect of strontium ions on the growth of ROS17/28 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 1277–1286.
- [109] C.T. Wong, W.W. Lu, W.K. Chan, K.M.C. Cheung, K.D.K. Luk, D.S. Lu, A.B.M. Rabie, L.F. Deng, J.C.Y. Leong, In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (sr-HA) bioactive cement, *J. Biomed. Mater. Res.* 68A (2004) 513–521.
- [110] G. Boivin, P. Deloffre, B. Perrat, G. Panczer, M. Boudeulle, Y. Mauras, P. Allain, Y. Tsouderos, P.J. Meunier, Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration, *J. Bone Miner. Res.* 11 (1996) 1302–1311.
- [111] V. Aina, G. Lusvardi, B. Annaz, I.R. Gibson, F.E. Imrie, G. Malavasi, L. Menabue, G. Cerrato, G. Martra, Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the

- effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2867–2879.
- [112] M.P. Moreira, G.D. De Almeida Soares, J. Dentzer, K. Anselme, L.Á. De Sena, A. Kuznetsov, E.A. Dos Santos, Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium, *Mater. Sci. Eng. C* 61 (2016) 736–743.
- [113] S. Kannan, F. Goetz-Neunhoeffler, J. Neubauer, S. Pina, P.M.C. Torres, J.M.F. Ferreira, Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted β -tricalcium phosphate, *Acta Biomater.* 6 (2010) 571–576.
- [114] Z. Geng, R. Wang, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, B. Huijing, X. Li, Q. Huo, Z. Liu, X. Yang, Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite, *J. Biomater. Appl.* 31 (2016) 140–151.
- [115] L.M. Rodríguez-Lorenzo, M. Vallet-Regí, Controlled crystallization of calcium phosphate apatites, *Chem. Mater.* 12 (2000) 2460–2465.
- [116] K.A. Gross, C.C. Berndt, Biomedical application of apatites, u Phosphates Geochemical, *Geobiol. Mater. Importance*, De Gruyter Mouton, 2019, str. 631–672.
- [117] H. Monma, T. Kamiya, Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite, *J. Mater. Sci.* 22 (1987) 4247–4250.
- [118] E. Tkalec, M. Sauer, R. Nonninger, H. Schmidt, Sol-gel-derived hydroxyapatite powders and coatings, *J. Mater. Sci.* 36 (2001) 5253–5263.
- [119] M. Yoshimura, H. Suda, Hydrothermal processing of hydroxyapatite: past, present, and future, u P.W. Brown, B. Constantz (Ur.), *Hydroxyapatite Relat. Mater.*, CRC Press, Florida, 1994, str. 45–72.
- [120] D.M. Roy, S.K. Linnehan, Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange, *Nature* 247 (1974) 220–222.
- [121] D.J. Sartoris, D.H. Gershuni, W.H. Akeson, R.E. Holmes, D. Resnick, Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes: Preliminary report of radiographic evaluation, *Radiology* 159 (1986) 133–137.
- [122] P.J. Walsh, F.J. Buchanan, M. Dring, C. Maggs, S. Bell, G.M. Walker, Low-pressure synthesis and characterisation of hydroxyapatite derived from mineralise red algae, *Chem. Eng. J.* 137 (2008) 173–179.
- [123] Y. Yang, Q. Yao, X. Pu, Z. Hou, Q. Zhang, Biphasic calcium phosphate macroporous scaffolds derived from oyster shells for bone tissue engineering, *Chem. Eng. J.* 173 (2011) 837–845.
- [124] J.H.G. Rocha, A.F. Lemos, S. Kannan, S. Agathopoulos, J.M.F. Ferreira, Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 5007–5011.
- [125] C.Y. Ooi, M. Hamdi, S. Ramesh, Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone, *Ceram. Int.* 33 (2007) 1171–1177.
- [126] S.C. Wu, H.K. Tsou, H.C. Hsu, S.K. Hsu, S.P. Liou, W.F. Ho, A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite, *Ceram. Int.* 39 (2013) 8183–8188.
- [127] U. Boonyang, P. Chaopanich, A. Wongchaisuwat, P. Senthongkaew, S. Siripaisarnpipa, Effect of phosphate precursor on the production of hydroxyapatite from crocodile eggshells, *J. Biomim. Biomater. Tissue Eng.* 5 (2010) 31–37.
- [128] J.H.G. Rocha, A.F. Lemos, S. Agathopoulos, S. Kannan, P. Valério, J.M.F. Ferreira, Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 77A (2006) 160–168.
- [129] L.L. Hench, Bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705–1728.

- [130] M. Peroglio, L. Gremillard, J. Chevalier, L. Chazeau, C. Gauthier, T. Hamaide, Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating, *J. Eur. Ceram. Soc.* 27 (2007) 2679–2685.
- [131] H.W. Kim, J.C. Knowles, H.E. Kim, Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials* 25 (2004) 1279–1287.
- [132] H.W. Kim, J.C. Knowles, H.E. Kim, Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 189–195.
- [133] A. Boyde, A. Corsi, R. Quarto, R. Cancedda, P. Bianco, Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: Evidence for a complementary integration and disintegration mechanism, *Bone* 24 (1999) 579–589.
- [134] O. Barou, S. Mekraldi, L. Vico, G. Boivin, C. Alexandre, M.H. Lafage-Proust, Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study, *Bone* 30 (2002) 604–612.
- [135] S. Dorozhkin, T. Ajaal, Toughening of porous bioceramic scaffolds by bioresorbable polymeric coatings, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 223 (2009) 459–470.
- [136] H.W. Kim, J.C. Knowles, H.E. Kim, Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 70 (2004) 240–249.
- [137] J. Zhao, K. Duan, J.W. Zhang, X. Lu, J. Weng, The influence of polymer concentrations on the structure and mechanical properties of porous polycaprolactone-coated hydroxyapatite scaffolds, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 4586–4590.
- [138] T. Tian, D. Jiang, J. Zhang, Q. Lin, Fabrication of bioactive composite by developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold, *Mater. Sci. Eng. C* 28 (2008) 51–56.
- [139] X. Miao, D.M. Tan, J. Li, Y. Xiao, R. Crawford, Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid), *Acta Biomater.* 4 (2008) 638–645.
- [140] J. Zhao, L.Y. Guo, X.B. Yang, J. Weng, Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 2942–2946.
- [141] C. Wu, Y. Ramaswamy, P. Boughton, H. Zreiqat, Improvement of mechanical and biological properties of porous CaSiO₃ scaffolds by poly(D,L-lactic acid) modification, *Acta Biomater.* 4 (2008) 343–353.
- [142] B. Kim, H.J. Kang, J. Lee, Improvement of the compressive strength of a cuttlefish bone-derived porous hydroxyapatite scaffold via polycaprolactone coating, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 101 (2013) 1302–1309.
- [143] Y. Kang, A. Scully, D.A. Young, S. Kim, H. Tsao, M. Sen, Y. Yang, Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated β -TCP composite scaffold for load-bearing applications, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 1569–1577.
- [144] Q.Z. Chen, A.R. Boccaccini, Poly(D,L-lactic acid) coated 45S5 Bioglass®-based scaffolds: Processing and characterization, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 77A (2006) 445–457.
- [145] S.-I. Roohani-Esfahani, S. Nouri-Khorasani, Z. Lu, R. Appleyard, H. Zreiqat, The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites, *Biomaterials* 31 (2010) 5498–5509.
- [146] R. Dwivedi, S. Kumar, R. Pandey, A. Mahajan, D. Nandana, D.S. Katti, D. Mehrotra, Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 10 (2020) 381–388.

- [147] Y. You, B.M. Min, S.J. Lee, T.S. Lee, W.H. Park, In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide), *J. Appl. Polym. Sci.* 95 (2005) 193–200.
- [148] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 273–279.
- [149] C. Bordes, V. Fréville, E. Ruffin, P. Marote, J.Y. Gauvrit, S. Briançon, P. Lantéri, Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process, *Int. J. Pharm.* 383 (2010) 236–243.
- [150] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798.
- [151] R.S. Bezwada, D.D. Jamiolkowski, I.Y. Lee, V. Agarwal, J. Persivale, S. Trenka-Benthin, M. Erneta, J. Suryadevara, A. Yang, S. Liu, Monocryl® suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture, *Biomaterials* 16 (1995) 1141–1148.
- [152] X. Fu, R.L. Sammons, I. Bertóti, M.J. Jenkins, H. Dong, Active screen plasma surface modification of polycaprolactone to improve cell attachment, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 100B (2012) 314–320.
- [153] M. Domingos, F. Intranuovo, A. Gloria, R. Gristina, L. Ambrosio, P.J. Bártolo, P. Favia, Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5997–6005.
- [154] J.M. Sobral, S.G. Caridade, R.A. Sousa, J.F. Mano, R.L. Reis, Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1009–1018.
- [155] J. Jiang, J. Xie, B. Ma, D.E. Bartlett, A. Xu, C.H. Wang, Mussel-inspired protein-mediated surface functionalization of electrospun nanofibers for pH-responsive drug delivery, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1324–1332.
- [156] E. Díaz, I. Sandonis, M.B. Valle, In vitro degradation of poly(caprolactone)/nHA composites, *J. Nanomater.* 185 (2014).
- [157] A. Yeo, B. Rai, E. Sju, J.J. Cheong, S.H. Teoh, The degradation profile of novel, bioresorbable PCL–TCP scaffolds: An in vitro and in vivo study, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 84A (2008) 208–218.
- [158] Y. Wang, L. Liu, S. Guo, Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro, *Polym. Degrad. Stab.* 95 (2010) 207–213.
- [159] X. Xiao, R. Liu, Q. Huang, X. Ding, Preparation and characterization of hydroxyapatite/polycaprolactone-chitosan composites, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 2375–2383.
- [160] S. Spalthoff, R. Zimmerer, J. Dittmann, P. Korn, N.C. Gellrich, P. Jehn, Scapula pre-augmentation in sheep with polycaprolactone tricalcium phosphate scaffolds, *J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.* 120 (2019) 116–121.
- [161] W.C. Lin, C. Yao, T.Y. Huang, S.J. Cheng, C.M. Tang, Long-term in vitro degradation behavior and biocompatibility of polycaprolactone/cobalt-substituted hydroxyapatite composite for bone tissue engineering, *Dent. Mater.* 35 (2019) 751–762.
- [162] J.H. Park, S.Y. Jung, C. Lee, M.J. Ban, S.J. Lee, H.Y. Kim, H.J. Oh, B.K. Kim, H.S. Park, S. Jang, H.S. Kim, A 3D-printed polycaprolactone/ β -tricalcium phosphate mandibular prosthesis: A pilot animal study, *Laryngoscope* 130 (2020) 358–366.
- [163] I. Engelberg, J. Kohn, Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study, *Biomaterials* 12 (1991) 292–304.
- [164] T. Suyama, Y. Tokiwa, P. Ouichanpagdee, T. Kanagawa, Y. Kamagata, Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as

- biodegradable plastics, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 5008–5011.
- [165] F. Li, D. Yu, X. Lin, D. Liu, H. Xia, S. Chen, Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) by a new *Penicillium oxalicum* strain DSYD05-1, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 2929–2935.
- [166] A. Kulkarni, J. Reiche, J. Hartmann, K. Kratz, A. Lendlein, Selective enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) containing multiblock copolymers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 46–56.
- [167] C.G. Pitt, F.I. Chasalow, Y.M. Hibionada, D.M. Klimas, A. Schindler, Aliphatic polyesters I The degradation of poly(ϵ -caprolactone) in vivo, *J. Appl. Polym. Sci.* 26 (1981) 3779–3787.
- [168] J. Peña, T. Corrales, I. Izquierdo-Barba, A.L. Doadrio, M. Vallet-Regí, Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids, *Polym. Degrad. Stab.* 91 (2006) 1424–1432.
- [169] A.P.D. Elfick, Poly(ϵ -caprolactone) as a potential material for a temporary joint spacer, *Biomaterials* 23 (2002) 4463–4467.
- [170] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 1–23.
- [171] Y. Ikada, H. Tsuji, Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromol. Rapid Commun.* 21 (2000) 117–132.
- [172] F. Wu, C. Liu, B. O’Neill, J. Wei, N. Yung, Fabrication and properties of porous scaffold of magnesium phosphate/polycaprolactone biocomposite for bone tissue engineering, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 7589–7595.
- [173] N.A. Peppas, R. Langer, New challenges in biomaterials, *Science* (80-.). 263 (1994) 1715–1720.
- [174] M. Cregger, A.J. Berger, D.L. Rimm, Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130 (2006) 1026–1030.
- [175] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [176] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, *Ceram. Int.* 22 (1996) 493–507.
- [177] P. Su, Y. Tian, C. Yang, X. Ma, X. Wang, J. Pei, A. Qian, Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2343.
- [178] X. Wang, Y. Wang, W. Gou, Q. Lu, J. Peng, S. Lu, Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review, *Int. Orthop.* 37 (2013) 2491–2498.
- [179] M. Fakhry, Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts, *World J. Stem Cells* 5 (2013) 136.
- [180] TOPAS V5: General profile and structure analysis software for powder diffraction data, User’s Manual, Bruker AXS (2014).
- [181] A. Coelho, Whole profile structure solution from powder diffraction data using simulated annealing, *J Appl Cryst* 33 (2000) 899–908.
- [182] R. Gopal, C. Calvo, J. Ito, W.K. Sabine, Crystal Structure of Synthetic Mg-Whitlockite, *Ca₁₈Mg₂H₂(PO₄)₁₄*, *Can. J. Chem.* 52 (1974) 1155–1164.
- [183] E.N. Caspi, B. Pokroy, P.L. Lee, J.P. Quintana, E. Zolotoyabko, On the structure of aragonite, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 61 (2005) 129–132.
- [184] H.M. Rietveld, Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement, *Acta Crystallogr.* 22 (1967) 151–152.
- [185] B.H. Toby, R factors in Rietveld analysis: How good is good enough?, *Powder Diffr.* 21 (2006) 67–70.
- [186] L.B. Mccusker, R.B. Von Dreele, D.E. Cox, D. Louër, P. Scardi, Rietveld refinement guidelines, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 36–50.

- [187] I. Matic, M. Antunovic, S. Brkic, P. Josipovic, K. Caput Mihalic, I. Karlak, A. Ivkovic, I. Marijanovic, Expression of OCT-4 and SOX-2 in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 4 (2016) 9–16.
- [188] Y. Shi, R. He, X. Deng, Z. Shao, D. Deganello, C. Yan, Z. Xia, Three-dimensional biofabrication of an aragonite-enriched self-hardening bone graft substitute and assessment of its osteogenicity in vitro and in vivo, *Biomater. Transl.* 1 (2020) 69.
- [189] C. Matta, C. Szűcs-Somogyi, E. Kon, D. Robinson, T. Neufeld, N. Altschuler, A. Berta, L. Hangody, Z. Veréb, R. Zákány, Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is enhanced by an aragonite scaffold, *Differentiation* 107 (2019) 24–34.
- [190] R. González, N. Merino, P. Rodríguez, V.M. Rodríguez, In vivo transformation of a calcium carbonate (aragonite) based implant's biomaterial to bone A histological, chemical and FT-IR study, *Revisita CENIC* 35 (2014) 7–13.
- [191] T. Leventouri, Synthetic and biological hydroxyapatites: crystal structure questions, *Biomaterials* 27 (2006) 3339–3342.
- [192] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. Noris Suarez, L. Moro, Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone, *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 45–51.
- [193] A.K. Sarkar, Hydration/dehydration characteristics of struvite and dittmarite pertaining to magnesium ammonium phosphate cement systems, *J. Mater. Sci.* 26 (1991) 2514–2518.
- [194] B.E.I. Abdelrazig, J.H. Sharp, Phase changes on heating ammonium magnesium phosphate hydrates, *Thermochim. Acta* 129 (1988) 197–215.
- [195] Z. Zyman, M. Tkachenko, M. Epple, M. Polyakov, M. Naboka, Magnesium-substituted hydroxyapatite ceramics, *Materwiss. Werksttech.* 37 (2006) 474–477.
- [196] M. Mehrjoo, J. Javadpour, M.A. Shokrgozar, M. Farokhi, S. Javadian, S. Bonakdar, Effect of magnesium substitution on structural and biological properties of synthetic hydroxyapatite powder, *Mater. Express* 5 (2015) 41–48.
- [197] H. El Feki, C. Rey, M. Vignoles, Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the 4CO_3 domain, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 269–274.
- [198] J.C. Elliott, D.W. Holcomb, R.A. Young, Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, *Calcif. Tissue Int.* 37 (1985) 372–375.
- [199] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I.R. Dickson, M.J. Glimcher, The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study, *Calcif. Tissue Int.* 45 (1989) 157–164.
- [200] G. Bonel, Contribution a l'étude de la carbonation des apatites - I Synthesis and physicochemical properties of type A carbonated apatites, *Ann. Chim.* 7 (1972) 65–88.
- [201] G. Bonel, Contribution a l'étude de la carbonation des apatites - II Synthesis and study of physicochemical properties of type-B carbonated apatites; III Synthesis and study of physicochemical properties of apatites containing carbonate in both types of sites I, *Ann. Chim.* 7 (1972) 127–144.
- [202] L.G. Ellies, J.M. Carter, J.R. Natiella, J.D.B. Featherstone, D.G.A. Nelson, Quantitative analysis of early in vivo tissue response to synthetic apatite implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 137–148.
- [203] D.K. V Karageorgiou, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (2005) 5474–5491.
- [204] A. Tampieri, G.C. Celotti, E. Landi, M. Sandri, Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization, *Key Eng. Mater.* 264–268 (2004) 2051–2054.

- [205] C. Qi, F. Chen, J. Wu, Y.-J. Zhu, C.-N. Hao, J.-L. Duan, Magnesium whitlockite hollow microspheres: a comparison of microwave-hydrothermal and conventional hydrothermal syntheses using fructose 1,6-bisphosphate, and application in protein adsorption, *RSC Adv.* 6 (2016) 33393–33402.
- [206] C. Qi, Y.-J. Zhu, B.-Q. Lu, X.-Y. Zhao, J. Zhao, F. Chen, J. Wu, Hydroxyapatite Hierarchically Nanostructured Porous Hollow Microspheres: Rapid, Sustainable Microwave-Hydrothermal Synthesis by Using Creatine Phosphate as an Organic Phosphorus Source and Application in Drug Delivery and Protein Adsorption, *Chem. - A Eur. J.* 19 (2013) 5332–5341.
- [207] V. Mouriño, J.P. Cattalini, A.R. Boccaccini, Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments, *J. R. Soc. Interface* 9 (2012) 401–419.
- [208] Y. Takeuchi, M. Suzawa, T. Kikuchi, E. Nishida, T. Fujita, T. Matsumoto, Differentiation and Transforming Growth Factor- β Receptor Down-regulation by Collagen- $\alpha 2\beta 1$ Integrin Interaction Is Mediated by Focal Adhesion Kinase and Its Downstream Signals in Murine Osteoblastic Cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29309–29316.
- [209] A.K. Kundu, A.J. Putnam, Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 347–357.
- [210] G.S. Stein, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. Van Wijnen, M. Montecino, Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 593–629.
- [211] G.S. Stein, J.B. Lian, A.J. Wijnen, J.L. Stein, The osteocalcin gene: a model for multiple parameters of skeletal-specific transcriptional control, *Mol. Biol. Rep.* 24 (1997) 185–196.
- [212] C.M. Gundberg, Biochemical Markers of Bone Formation, *Clin. Lab. Med.* 20 (2000) 489–502.
- [213] E.E. Golub, K. Boesze-Battaglia, The role of alkaline phosphatase in mineralization, *Curr. Opin. Orthop.* 18 (2007) 444–448.
- [214] M. Rezai Rad, D. Liu, H. He, H. Brooks, M. Xiao, G.E. Wise, S. Yao, The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs), *Arch. Oral Biol.* 60 (2015) 546–556.
- [215] J.A.R. Gordon, C.E. Tye, A. V. Sampaio, T.M. Underhill, G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro, *Bone* 41 (2007) 462–473.
- [216] Z. Geng, Z. Cui, Z. Li, S. Zhu, Y. Liang, W.W. Lu, X. Yang, Synthesis, characterization and the formation mechanism of magnesium- and strontium-substituted hydroxyapatite, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3738–3746.
- [217] H. Bittiger, R.H. Marchessault, W.D. Niegisch, Crystal structure of poly- ϵ -caprolactone, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 26 (1970) 1923–1927.
- [218] E.M. Abdelrazek, A.M. Hezma, A. El-khodary, A.M. Elzayat, Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 3 (2016) 10–15.
- [219] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, P. Dumas, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 273 (2004) 381–387.
- [220] A. Elzubair, C.N. Elias, J.C.M. Suarez, H.P. Lopes, M.V.B. Vieira, The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation, *J. Dent.* 34 (2006) 784–789.

Životopis

Leonard Bauer

[REDACTED]

● RADNO ISKUSTVO

10/05/2017 – TRENUTAČNO
ASISTENT - DOKTORAND HRVATSKE ZAKLADE ZA ZNANOST
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Projekt Hrvatske zaklade za znanost
"Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva"

Zavod za fizikalnu kemiju
Trg Marka Marulića 19, 10000, Zagreb, Hrvatska

● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

09/2014 – 09/2016 – Zagreb, Hrvatska
MAGISTAR INŽENJER KEMIJSKOG INŽENJERSTVA (mag. ing. cheming.)
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Diplomski studij: Kemijsko inženjerstvo Modul: Kemijsko procesno inženjerstvo
Diplomski rad: Određivanje interakcijskih parametara u vodenim dvofaznim sustavima
na Zavodu za fizikalnu kemiju, mentor prof. dr. sc. Marko Rogošić

29/02/2016 – 22/07/2016 – 4 Allée Emile Monso, Toulouse, Francuska
ERASMUS+ STRUČNA PRAKSA – Institut National Polytechnique de Toulouse - Laboratoire de Génie Chimique

Organska sinteza u mikrojelektrode kao studija u razvoju metodologije za efikasnu determinaciju kemijske kinetike

09/2011 – 09/2014 – Zagreb, Hrvatska
SVEUČILIŠNI PRVOSTUPNIK (BACCALAUREUS) INŽENJER KEMIJSKOG INŽENJERSTVA
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Završni rad: Eutektici masnih kiselina kao fazno promjenjivi materijali za pohranu topline
na Zavodu za fizikalnu kemiju, mentor prof. dr. sc. Marko Rogošić

09/2007 – 07/2011 – Vrbovec, Hrvatska
OPĆA GIMNAZIJA VRBOVEC

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

Drugi jezici:

| | RAZUMIJEVANJE | | GOVOR | | PISANJE |
|-----------------|---------------|---------|--------------------|---------------------|---------|
| | Slušanje | Čitanje | Govorna produkcija | Govorna interakcija | |
| ENGLJSKI | B2 | B2 | B2 | B2 | B2 |

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Microsoft Office™ Origin Matlab TOPAS Adobe Photoshop

Vozačka dozvola: A

Vozačka dozvola: B

KONFERENCIJE I SEMINARI

18/02/2016 – 19/02/2016 – Zagreb, Hrvatska

XI. Susret mladih kemijskih inženjera

L. Bauer, M. Rogošić, **Modeliranje ravnoteže kapljevina-kapljevina u vodenom dvofaznom sustavu**, priopćenje na posteru

02/06/2019 – 08/06/2019 – Hamburg, Njemačka

International Summer School of Crystallography 2019

09/04/2019 – 12/04/2019 – Šibenik, Hrvatska

26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera - HSKIKI

L. Bauer L., A. Rogina, M. Antunović, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, **Priprema magnezijem supstituiranog hidroksiapatitnog nosača - utjecaj na *in vitro* kulturu s ljudskim mezenhimskim matičnim stanicama**, postersko priopćenje *Knjiga sažetaka* / Galić, N.; Rogošić, M. (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2019. str. 212-212

12/09/2018 – 15/09/2018 – Madrid, Španjolska

XLV ESAO Congress Madrid 2018 – New organs for life

L. Bauer, M. Antunović, I. Marijanović, D. Milovac, A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković, **Preparation of highly porous magnesium-doped hydroxyapatite from cuttlefish bone as bioactive material**, postersko priopćenje *Abstracts from the 45th ESAO Congress, 12–15 September 2018, Madrid, Spain, Int. J. Artif. Organs 41 (2018) 610-611*

29/08/2018 – 02/09/2018 – Bari, Italija

AIC International Crystallography School 2018: Powder Diffraction: Theory, Software and Application

27/06/2018 – 29/06/2018 – Vela Luka, Hrvatska

International Conference MATRIB 2018, Materials, Tribology, Recycling

L. Bauer, M. Ivanković, H. Ivanković, **Magnesium- substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally synthesized from cuttlefish bone**, postersko priopćenje

18/06/2018 – 23/06/2018 – Trento, Italija

Comprehensive Summer School on Tissue Engineering

PUBLIKACIJE

L. Bauer, M. Antunović, A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković,
Bone-mimetic porous hydroxyapatite/whitlockite scaffolds: preparation, characterization and interactions with human mesenchymal stem cells

Journal of material science, **56** (2021), 5; 3947-3969

<https://doi.org/10.1007/s10853-020-05489-3>

S. Kurajica, I.K. Munda, G. Dražić, V. Mandić, K. Mužina, L. Bauer, G. Matijašić,
Manganese-doped, hydrothermally-derived ceria: The occurrence of birnessite and the distribution of manganese

Ceramics international, **46** (2020), 18; 29388-29401

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.05.025>

M. Ivanković, L. Bauer, A. Ressler, A. Rogina, M. Antunović, H. Ivanković,
Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva

Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske, **68** (2019), 9-10; 437-447

<https://doi.org/10.15255/KUI.2019.030>

L. Bauer, M. Ivanković, H. Ivanković,
Magnesium substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally synthesized from cuttlefish bone

Proceedings of International Conference MATRIB 2018

Šnajdar Musa, Mateja ; Sakoman, Matija (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, 2018. str. 21-34

https://www.bib.irb.hr/953791/download/953791.Bauer_-_MATRIB_2018_06062018.pdf