

Biološka aktivnost bioaktivnih stakala u području inženjerstva tkiva

Martinović, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:620976>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anamaria Martinović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Anamaria Martinović**

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Dajana Milovac Lerga, viša asistentica, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Leonard Bauer, poslijedoktorand, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Marica Ivanković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 21. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anamaria Martinović

BIOLOŠKA AKTIVNOST BIOAKTIVNIH STAKALA U PODRUČJU INŽENJERSTVA
TKIVA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anamarija Rogina

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Anamarija Rogina

dr. sc. Dajana Milovac Lerga

dr. sc. Leonard Bauer

Zagreb, rujan 2023.

Ponajprije, zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Anamariji Rogini na prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu i susretljivosti prilikom izrade ovog završnog rada.

Beskrajno sam zahvalna i višoj asistentici dr. sc. Dajani Milovac Lerga na pruženoj pomoći i razumijevanju, brojnim poticajnim i konstruktivnim savjetima i ohrabrenjima koji su mi učinili pisanje ovog rada nezamislivo ljepšim i lakšim.

Veliko hvala i svim profesorima i kolegama koji su nesebično dijelili znanje, ulagali vrijeme za pomoć pri savladavanju poteškoća i pružali ohrabrenje u teškim trenucima. Osobito hvala mojim prijateljicama koje su mi, uz mnogo smijeha i suza, podrške i pomoći, uljepšale ovo razdoblje.

Hvala mojoj obitelji na požrtvornosti, brojnim odricanjima, ljubavi i bezuvjetnoj podršci tijekom mog života i školovanja. Hvala mom najdražem A., što mi je kroz naš zajednički put kroz preddiplomski studij bio najveći oslonac i motivator.

SAŽETAK

Inženjerstvo koštanog tkiva interdisciplinarno je područje koje razvija materijale i metode za liječenje, popravljavanje i zamjenu oštećenog koštanog tkiva. Bioaktivno staklo je materijal koji pokazuje odlična svojstva za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Bioaktivnost, osteoinduktivnost i osteoproduktivnost svojstva su koja mu omogućuju stvaranje direktne veze s tkivom. Reakcijom bioaktivnog stakla u fiziološkom okruženju dolazi do razgradnje stakla i otpuštanja iona koji potiču okoštavanje i aktiviraju bitne gene. Optimiranjem karakteristika bioaktivnog stakla poput sastava, mikrostrukture i makrostrukture može se značajno utjecati na bioaktivna svojstva materijala. Posebice je zanimljiva raznolikost u sastavu što se tiče odabira kemijskih elemenata, udjela i koncentracija pojedinih komponenata, koji se pažljivo optimiraju kako bi se postigla željena svojstva. Ovim završnim radom dan je uvid u strukturu i svojstva bioaktivnih stakala koja se primjenjuju u području inženjerstva koštanog tkiva, a osobito onih koja imaju najvažniju ulogu u stvaranju direktne veze s koštanim tkivom.

Ključne riječi: inženjerstvo tkiva, bioaktivna stakla, bioaktivnost.

Biological activity of bioactive glasses in the field of tissue engineering

ABSTRACT

Bone tissue engineering is an interdisciplinary field that develops methods to treat, repair, and replace damaged bone tissue. Bioactive glass is a material that shows excellent properties for use in bone tissue engineering. Bioactivity, osteoinductivity and osteoconductivity are properties that enable it to form a direct bond with the tissue. The reaction of bioactive glass in a physiological environment leads to the degradation of glass and the release of ions that promote ossification and activate relevant genes. By optimizing the characteristics of bioactive glass, such as composition, microstructure and macrostructure, the bioactive properties can be significantly influenced. The variety in the composition is particularly interesting as regards the selection of chemical elements, the ratio and concentration of individual components, which are carefully optimized in order to achieve the desired properties. This paper provides insight into the structure and properties of bioactive glasses that are used in the field of bone tissue engineering, especially those that play the most important role in creating a direct bond with bone tissue.

Key words: tissue engineering, bioactive glasses, bioactivity.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Struktura stakla.....	6
2.2. Bioaktivno staklo.....	9
2.3. Mehanizam vezivanja s kosti	10
2.4. Određivanje bioaktivnosti	12
2.4.1. Čimbenici koji utječu na bioaktivnost	13
2.5. Vrste bioaktivnih stakala	18
2.5.1. Silikatna stakla	18
2.5.2. Boratna stakla	20
2.5.3. Fosfatna stakla.....	22
2.6. Dopiranje biostakla	24
3. ZAKLJUČAK	26
4. LITERATURA	27

1. UVOD

Bioaktivna stakla (biostakla) donijela su značajan doprinos inženjerstvu tkiva primjenom kao okosnice za obnovu koštanog tkiva, posebice kod koštanih defekata kao posljedice teških ozljeda, tumora, prirođenih anomalija i bolesti. Bioaktivno staklo razvija se kao trodimenzijska porozna struktura koja pruža podršku za rast, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Smatra se kako bioaktivna stakla utječu na stanice na sljedeće načine:

- 1) njihova povoljna površina potiče adsorpciju proteina iz tjelesnih tekućina i vezanje stanica
- 2) slobodni ioni iz procesa otapanja u reakciji s tjelesnom tekućinom utječu na proliferaciju, diferencijaciju i aktivaciju gena.

Glavna zadaća u inženjerstvu materijala za primjenu kao nadomjestaka koštanom tkivu, bilo da se radi o biostaklu ili bilo kojem drugom materijalu, je optimirati kemijski sastav, značajne toplinske i okolišne procesne parametre (pH vrijednost, lokalni ionski sastav i koncentraciju, protok tjelesnih tekućina, brzinu razgradnje prikladnu vrsti i zahtjevima koštanog tkiva, adsorpciju proteina, prisutnost određenih faktora rasta i sl.) prikladne za fiziološko okruženje u kojemu će se materijal naći ugradnjom. Izvanredna svojstva poput bioaktivnosti, osteokonduktivnosti, osteoinduktivnosti, ali i antibakterijskog djelovanja te izostanka genotoksičnosti čine ovaj materijal odličnim kandidatom za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Za razliku od klasičnih, inertnih biomaterijala, bioaktivno staklo stvara direktnu vezu s tkivom prilikom razgradnje u fiziološkom okruženju. Uslijed navedene razgradnje, dolazi do otpuštanja iona čija prezasićenost uzrokuje taloženje hidroksiapatita na površini stakla te utječe na procese okoštavanja i aktivaciju bitnih gena. Prethodno navedenu razgradnju važno je kontrolirati, budući da se njome otpušta niz iona esencijalnih za organizam, poput natrijevih, kalcijevih, magnezijevih kationa te fosfatnih i silikatnih aniona. Osim toga, brzina razgradnje vrlo je značajan čimbenik bioaktivnosti jer bi brzina trebala odgovarati brzini rasti kosti *in vivo*.

Ovaj literaturni pregled usmjeren je na strukturu i svojstva bioaktivnih stakala koja se primjenjuju u području inženjerstva koštanog tkiva, a osobito onih koji imaju najvažniju ulogu u stvaranju direktne veze s koštanim tkivom.

2. OPĆI DIO

Inženjerstvo tkiva relativno je novija disciplina bioinženjerstva koja je procvat doživjela 1990-ih godina, nastojeći doskočiti problemu manjka donora tkiva i organa. Prema definiciji dvaju predvodnika, Vacantija i Langerera [1], inženjerstvo tkiva je „interdisciplinarno područje koje primjenjuje znanja iz inženjerskih i prirodnih znanosti s ciljem razvoja bioloških nadomjestaka za obnavljanje, održavanje i poboljšanje funkcije oštećenog tkiva ili cijelog organa“. Inženjerstvo koštanog tkiva posebno je područje unutar inženjerstva tkiva koje se bavi kreiranjem koštanog nadomjestka, 3D okosnice (engl. *scaffold*), koja se ugrađuje na mjesta kritičnih koštanih defekata koji se ne mogu samostalno zaliječiti. Okosnice služe kao predložak za stvaranje tkiva (graft), a na njih se mogu nasaditi stanice, npr. matične, koje to tkivo stvaraju, potpomognute biološki aktivnim signalnim molekulama poput faktora rasta, citokina i dr. Uzgoj graftova se provodi u *in vitro* uvjetima, tj. bioreaktorima, u kojima je moguće održavati idealne uvjete i regulaciju rasta stanica kako bi se dobilo tkivo odgovarajuće kvalitete. Nakon *in vitro* uzgoja graft se ugrađuje na mjesto oštećenja koštanog tkiva pacijenta [2], [3].

Koštani sustav ključni je dio anatomije tijela kao mehanička potpora tijelu i zaštita bitnih organa poput pluća, mozga i srca. Stoga je vrlo bitno, ukoliko dođe do defekta i gubitka kosti, biti u mogućnosti koštano tkivo zamijeniti ili obnoviti. Pritom je osobito važno uzeti u obzir područje primjene okosnice, kao i karakteristike pojedinca (dob, anamneza, fizičko stanje i razina aktivnosti) [4]. U posljednje vrijeme, intenzivno se istražuju materijali koji su po svom sastavu slični prirodnoj anorganskoj sastavnici kosti, tj. mineralu hidroksiapatitu, formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Što je materijal sličnije strukture, morfologije i funkcije kosti, to je bolja konsolidacija materijala s okolnim tkivom.

Materijali koji se koriste za popravak ili zamjenu živog tkiva nazivaju se biomaterijali, a njihova je glavna karakteristika biokompatibilnost, odnosno svojstvo da materijal bude prihvaćen od organizma, da ispunjava namjenu te da nema toksično ili koje drugo štetno djelovanje na organizam. S obzirom na karakteristike materijala razlikujemo tri generacije biomaterijala.

Prva generacija biomaterijala predstavlja sintetičke materijale čiji je cilj smanjenje imunološke reakcije na materijal kao strano tijelo. To je postignuto odabirom inertnih materijala koji podliježu gotovo neznatnim promjenama prilikom izlaganja fiziološkom okruženju, tj. ne mijenjaju svoja fizička i kemijska svojstva. Korišteni su materijali poput

metala i metalnih legura (titanij, nehrđajući čelik, Co-Cr), keramike metalnih oksida (Al_2O_3 , ZrO_2) i polimera. Međutim, iako su takvi materijali pružali zadovoljavajuću mehaničku potporu, s vremenom se pokazalo kako imaju problema s povezivanjem s okolnim tkivom, razgradnjom uslijed korozije i otpuštanjem metalnih iona u tkivo [5].

Šezdesetih godina 20. st., razvija se pristup temeljen na obnovi tkiva, a s time i razvoj druge generacije materijala za koje je nađeno da u kontaktu s okolnim koštanim tkivom tvore čvrstu kemijsku vezu.

Istražuju se i primjenjuju materijali poput keramičkih bioaktivnih prevlaka, bioaktivnog stakla, staklo-keramike i biorazgradljivih polimera (poli(glikolna kiselina), poli(mliječna kiselina)). Unutar ove generacije materijala razvijeni su prvi bioaktivni materijali, definirani kao „materijali koji uzrokuju specifičan biološki odgovor na međufaznoj površini materijala koji rezultira stvaranjem veze između tkiva i materijala“ [6].

Bioaktivno staklo je prvi materijal koji je pokazao sposobnost vezanja s kosti. Razvijen je na Sveučilištu u Floridi 1969. godine pod vodstvom Larry-a Hencha i njegovih suradnika. Glavna hipoteza za istraživanje biostakla bila je Henchova pretpostavka da materijal koji ima sposobnost stvaranja hidroksiapatitnog sloja, glavne sastavnice koštanog minerala, vjerojatno neće uzrokovati odbacivanje od strane organizma [7]. Ovo staklo, masenih sastava 45% SiO_2 , 24,5 % CaO 24,5% Na_2O i 6% P_2O_5 , registrirano je kao Bioglass®, a specifično je po tome što je pokazalo jačinu povezanosti s kosti na tolikoj razini da navedenu vezu nije moguće prekinuti bez puknuća kosti [7].

Hench i Paschall razvili su metodologiju *in vivo* i *in vitro* testova i objasnili detaljan mehanizam vezivanja bioaktivnog stakla s kosti, koristeći različite sastave bioaktivnih stakala (silikatnih, boratnih i fosfatnih) [8]. Opširnije će o samom mehanizmu vezanja biti riječi u daljnjim poglavljima ovog rada.

Provedena su i ispitivanja mehaničkih svojstava koja su pokazala kako je strukturna čvrstoća između biostakla i kosti nalik čvrstoći kosti domaćina. Time je otvorena mogućnost primjene biostakala kao potencijalnih prevlaka metalnih i keramičkih implantanta [9].

Osamdesetih godina 20. stoljeća razvijene su prve kliničke primjene, pod okriljem Wilsonove studije vezanja biostakla s mekim tkivom [10]. Zbog mehaničkih različitosti između tvrdog, krutog i krhkog stakla i fleksibilnog mekog tkiva, primjena biostakala kod mekih tkiva predstavljala je izazov. U navedenoj studiji, biostaklo je korišteno kao primarni materijal te se

pokazalo kako implantati koji koriste biostaklo nisu izazvali negativan imunološki odgovor u smislu pokazivanja toksičnosti.

Ovo istraživanje postavilo je znanstvene temelje za odobravanjem prvih kliničkih upotreba biostakla. Godine 1985., Američka agencija za nadzor hrane i lijekova odobrila je prvu kliničku primjenu biostakla, a radilo se o protezi srednjeg uha.

Sljedeća kronološka prekretnica u razvoju biostakla predstavlja Wilsonovo istraživanje 1993. godine [11]. Provedeno je na majmunima *Erythrocebus patus*, izabranima zbog anatomske sličnosti čovjeku. Bušenjem alveolarne kosti majmuna simulirani su prirodno nastali defekti, koji su zatim napunjeni bioaktivnim staklom različitih sastava i raspodjele veličina čestica. Navedeno istraživanje pokazalo je kako bioaktivno staklo ima obnavljajuće djelovanje na alveolarnu kost i periodontalni ligament. Također, značajno je što je u usporedbi s biokeramičkim materijalima korištenim u istraživanju poput hidroksiapatita i trikalcijevog fosfata, bioaktivno staklo imalo veću brzinu popunjavanja defekata. Navedeno zapažanje Wilson pripisuje osteokonduktivnom svojstvu biostakla. Osim toga, bioaktivno staklo, kao i hidroksiapatit, ima sposobnost vezanja s kolagenom u vezivnom tkivu, međutim biostaklo se znatno brže veže. Ovo istraživanje usmjerilo je znanstvenike prema razvoju bioaktivnog stakla u obliku čestica umjesto dotadašnjih monolita koji su se pokazali nepogodnim zbog teške prilagodljivosti anatomiji. Upravo takav materijal razvijen je 1995. godine pod nazivom Novabone®. Krajem 20. st. odobren je na američkom i europskom tržištu, a primjenu je pronašao kod parodontalnih bolesti gdje je pokazao odlične kliničke performanse.

Općenito, devedesete godine 20. st. razdoblje su u kojem je razvijeno mnogo kliničkih upotreba bioaktivnih stakala poput onih u liječenju onkoloških bolesnika, zacjeljivanja rana, kod oštećenja perifernih živaca i slično. Svakako, proširenju primjene bioaktivnih stakala pogodovao je razvoj sol-gel tehnike, o kojoj će više biti riječi u daljnjim dijelovima rada, a koja je omogućila proizvodnju stakla u mnogim raznim oblicima poput staklenog vlakna, pjenastog stakla i prevlaka. Rezultati istraživanja provedenog 1991. god. [12] ključni su za razvoj ove tehnike, budući da pokazuju kako bioaktivno staklo pripravljeno sol-gel metodom proširuje raspon sastava bioaktivno stakla.

Nadalje, istraživanje Oonishi-ja i sur. [13] pokazuje utjecaj različitih biomaterijala (bioaktivno staklo, bioaktivna keramika i bioaktivno staklo-keramika) iste veličine čestica na femoralnoj hrskavici zeca obzirom na brzinu stvaranja kosti. Rezultati su pokazali kako

različiti materijali potiču u različitoj mjeri obnovu kosti, od čega bioaktivno staklo djeluje u najvećoj mjeri.

U trećoj generaciji biomaterijala, inženjerstvo tkiva okreće se molekularnom krojenju materijala druge generacije u porozne strukture koje mogu aktivirati gene potrebne za pobuđivanje obnove koštanog tkiva. Svakako, za razvoj takvih materijala neophodno je prvenstveno detaljno istražiti biološki aspekt i ograničavajuće faktore na toj razini, a zatim i dizajnirati materijale koji će svojom strukturom i svojstvima zadovoljiti tražene kriterije. Smatra se kako idealna okosnica mora zadovoljavati niz uvjeta: biokompatibilnost, ostekonduktivnost i osteoproduktivnost, mehanička svojstva, zadovoljavajuću poroznost za rast tkiva i vaskularizaciju [14].

Početak 21. st., odgovoreno je na jedno od najrelevantnijih nedoumica o stimulativnom mehanizmu biostakla na molekularno-biološkoj razini pod okriljem *in vitro* istraživanja Xynosa i suradnika [15]. Utvrđeno je kako otopljeni ioni kalcija i silicija iz biostakla imaju stimulirajuće i kontrolirajuće djelovanje na stanični ciklus. Tijekom ovog razdoblja, ali i u proteklom dijelu 21. st. napravljena su mnoga istraživanja koja daju uvid u biološki aspekt djelovanja bioaktivnog stakla na staničnoj razini, no ona nisu žarišna točka ovog rada.

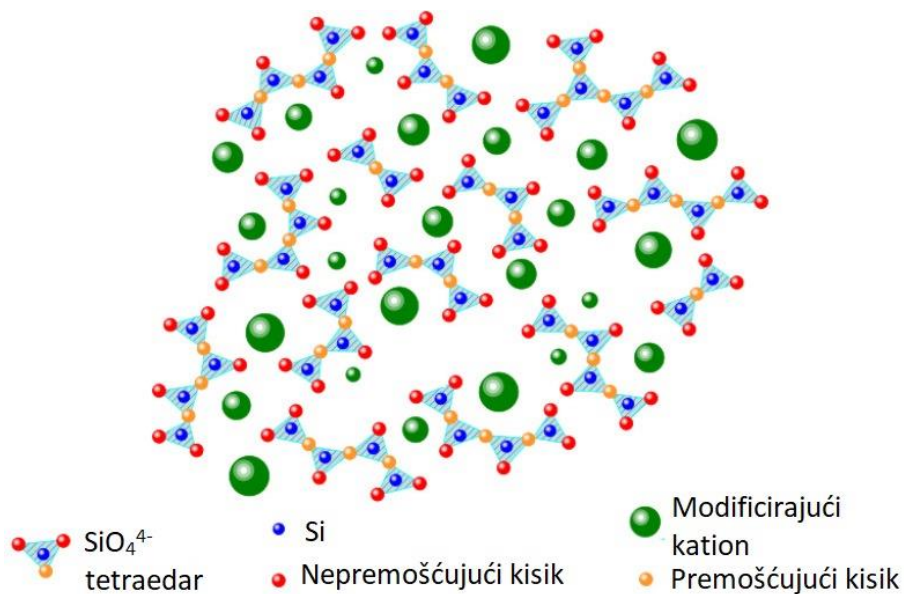
S aspekta inženjerstva materijala, ovo stoljeće obilježilo je nastojanje razvoja metoda pripreme bioaktivnih stakla koja će omogućiti postizanje pogodnih poroznih struktura. Primjerice, Sepulveda i suradnici 2001. godine u svome radu [16] daju temelje za popularizaciju bioaktivne pjene kao produkt kombinacije sol-gel tehnike i tehnike pjenjenja.

Razvijaju se i metode poput *bottom up* sol-gel metode kojim se izbjegava nepoželjno sinteriranje ili metoda naglog hlađenja taljenjem kojom se ono kontrolira [17].

Kako bi se poboljšala inače slaba mehanička svojstva, u zadnjih desetak godina razvijaju se i kompozitni materijali biostakla i polimera, kao npr. želatine, kitozana, poliesteri [18]–[20]. Također, u strukturu biostakla ugrađuju se i komponente s terapijskim djelovanjem [21].

2.1. Struktura stakla

Iako se, poput kristala, staklo sastoji od osnovnih građevnih jedinica i trodimenzijske je strukture, izostaje mu periodički raspored atoma i nema uređenosti dalekog doseg. Prema Zachariasenu i njegovoj teoriji mreže [22] prostorno neuređena beskonačna mreža u staklu građena je od malih poliedara, npr. SiO_4 – tetraedra u SiO_2 staklu, s kisikovim atomima u vrhovima preko kojih se poliedri povezuju.



Slika 1. Struktura stakla [23]

Pritom vrijede sljedeća pravila:

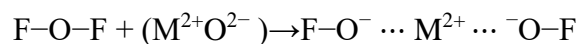
- oksid ili spoj teži tvorbi stakla kada lako tvori malene poliedre kao osnovne građevne jedinice,
- dva takva poliedra ne smiju imati više od jednog zajedničkog ugla,
- anion, npr. O^{2-} , S^{2-} ili F^- , smije biti povezan s najviše dva centralna atoma poliedra. Na taj način anioni tvore mostove između sva poliedra,
- broj uglova poliedra mora biti < 6 ,
- najmanje tri ugla poliedra moraju preko mostovih aniona biti povezani sa susjednim poliedrima.

Osim toga, svi kationi koji sudjeluju u izgradnji stakla mogu se podijeliti na:

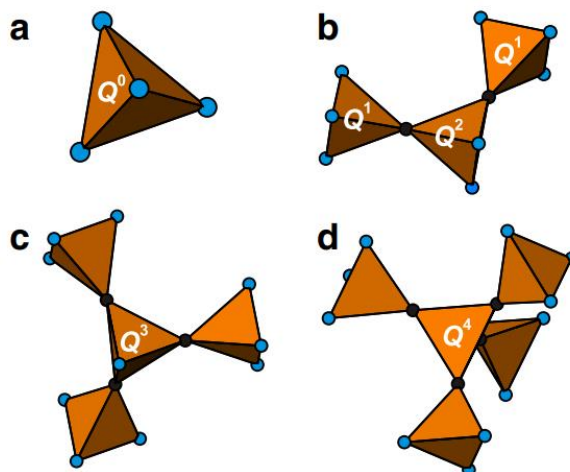
- a) mrežotvorce (Si, B, P, Ge, As i dr.)
- b) modifikatore mreže (Na, K, Ca, Ba, i dr.)
- c) intermedijerne katione (Al, Mg, Zn, Pb i dr.).

Oksidi modifikatora i intermedijernih kationa mogu stabilizirati mrežu ili dodatno narušiti mrežu, te se njihovim udjelom u odnosu na mrežotvorca može utjecati na brojna svojstva stakla.

Građevna jedinica mrežotvorca (F) i kisika naziva se Q^n - jedinica, gdje n predstavlja broj premošćujućih kisika. Kisik prema svojoj elektronskoj konfiguraciji ima šest valentnih elektrona, zbog čega može tvoriti kovalentne veze s dva atoma mrežotvorca, ili pak jednu kovalentnu vezu sa atomom mrežotvorca i jednu ionsku vezu s modifikatorom mreže. Dodatkom modifikatora mreže (M), oksida pretežito većeg koordinacijskog broja (6 i više) s jednim valentnim elektronom, dolazi do promjena koje se očituju smanjenom polimerizacijom mreže. Pritom dolazi i do promjena u karakteru veza unutar mreže, gdje premošćujući kisik iz kovalentne veze stvara nove veze ionskog karaktera s novonastalim kationima modifikatora koji su kisiku donirali valentni elektron, a kisik posljedično prelazi u nepremošćujući kisik:



Ova promjena uočljiva je i u samoj geometriji mreže, budući da se njihova geometrija depolimerizacijom mijenja iz tetraedarske trodimenzijske strukture mreže u lančastu, planarnu strukturu, pa sve do pojedinačnih tetraedarskih osnovnih jedinica. To se očituje smanjenjem kvaternih premošćujućih atoma, tj. atoma povezanih kovalentnom vezom s atomima mrežotvorca, a povećanjem nepremošćujućih atoma. Pri tome se eksponent Q broja smanjuje, kao što je vidljivo na slici 2 gdje su plavo označeni nepremošćujući, a crno premošćujući atomi kisika. No, važno je napomenuti kako se n broj također mijenja i drugim promjenama u sastavu, tlaku ili temperaturi [24].



Slika 2. Nomenklatura Q^n jedinica za tetraedarski koordinirane katione [24]

Iako su nastale ionske veze slabije od kovalentne veze, presudne su u stabilizaciji stakla, budući da novonastale elektrostatske interakcije stabiliziraju naboj sveukupne strukture, a poželjne su i u procesima ionske izmjene i otpuštanja iona unutar tjelesne tekućine. U prilog tome govori činjenica kako u 4S5S biostaklu, samo trećinu atoma kisika čine nepremošćujući atomi [25].

Uzevši u obzir da je staklo neravnotežno stanje koje postoji samo u određenom rasponu temperatura, bitno je dobro poznavati i istražiti to područje. Postoje različiti strukturalni modeli, poput onih usmjerenih na koordinacijski broj, vrstu ili jačinu veze, ili pak direktno Coloumbove sile između kationa i aniona, koji tumače mogućnost stvaranja stakla, a samim time i načine postizanja određenih poželjnih svojstava.

Hill je smatrao kako je moguće predvidjeti bioaktivnost određenog bioaktivnog stakla prema njegovom sastavu i strukturi. Pri tome je strukturu smatrao osobito važnom, povezujući bioaktivnost fosfatnih i fosfosilikatnih stakala s tzv. povezanošću mreže (engl. *Network connectivity*, *NC*). Povezanost mreže predstavlja stupanj polimerizacije silikatne mreže, a opisuje se prosječnim brojem premošćujućih atoma kisika po jedinici mrežotvorca (primjerice silicija) danom formulom:

$$NC_{Si} = \frac{4*SiO_2 + 6*P_2O_5 - 2*(M_2O + M'_2O)}{SiO_2} \quad (1)$$

gdje su M_2O i M'_2O modifikatori mreže [26]. Obzirom da je mrežotvorac silicij, pretpostavlja se maksimalno četiri premošćujuća atoma kisika po atomu silicija.

Povezanost mreže za bioaktivna stakla najčešće iznosi između 2 i 3, a kako bi staklo bilo bioaktivno, smatra se da *NC* vrijednost mora iznositi između 1,9 i 2,6 [27], [28].

2.2. Bioaktivno staklo

Bioaktivno staklo je višekomponentni sustav sastavljen od različitih udjela oksida i to najčešće mrežotvoraca poput SiO_2 , P_2O_5 i B_2O_3 . Topljivost biostakla ovisi o udjelima glavnih komponenti, kao i o modifikacijama kojima se ciljano utječe i na ostala svojstva biostakla.

Prvo komercijalizirano biostaklo 45S5Bioglass® karakterizira visoka bioaktivnost, zbog čega se u primjeni zadržalo sve do danas, bez obzira na razvoj brojnih novih sastava. Osim osnovnih komponenti, SiO_2 – Na_2O – CaO , u 45S5 često se dodaju oksidi alkalijskih i zemnoalkalijskih metala poput MgO , K_2O , CaF_2 , ali i prijelaznih metala poput Al_2O_3 i FeO .

Ovisno o vrsti biološkog odgovora koji potiču, bioaktivni materijali se mogu općenito podijeliti u dvije kategorije [29]:

Klasa A: bioaktivnost se očituje osteokonduktivnim (izvanstanične reakcije) i osteoproduktivnim djelovanjem (unutarstanične i izvanstanične reakcije)

Klasa B: bioaktivnost se očituje samo osteokonduktivnim djelovanjem.

Bioaktivno staklo ima osteokonduktivno svojstvo, vezujući se s čvrstim tkivom i stimulirajući rast koštanog tkiva na njegovoj površini, čime pruža funkciju nosača kao strukturne podrške za prodiranje koštanog tkiva [30]. Osteoproduktivno djelovanje očituje se stimulacijom rasta novog koštanog tkiva na materijalu koji se ne nalazi na samoj površini između kosti i implantata, a specifično je po tome što omogućuje vezivanje i s mekim i s čvrstim tkivom [31].

Za razliku od standardnih, kristalinih krutina, staklo nema jednoznačnu i jedinstvenu temperaturu taljenja, već se njegov prelazak iz krutine u kapljevinu (staklasti prijelaz) zbiva u određenom rasponu temperatura definiran kao staklište (T_g) [32]. Ovo svojstvo ima značajan utjecaj na mehanička i procesna svojstva, ali i na razgradnju i biološku aktivnost stakala.

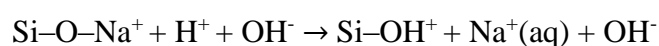
Razgradnjom bioaktivnog stakla u tjelesnoj tekućini dolazi do stvaranja sloja biomimetičkog apatita kemijski sličnog mineralnoj komponenti koštane matrice, koji potiče adheziju, umnožavanje i razvoj koštanih stanica. Ovi procesi omogućuju bioaktivnom staklu stvaranje direktne kemijske veze s kosti. Pokazalo se kako su produkti otapanja ioni kalcija, kalija, magnezija, natrija i fosfata koji se već prirodno nalaze u ljudskom tkivu te pomažu u procesu okoštavanja i vaskularizacije.

2.3. Mehanizam vezivanja biostakla s kosti

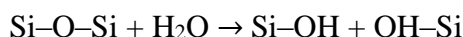
Interakcije bioaktivnog stakla i organizma dijele se na izvanstanične i unutarstanične. Kod izvanstaničnih reakcija, dolazi do vremenski ovisne modifikacije površine koja prethodi adsorpciji proteina i vezanju stanica. Nakon adsorpcije proteina, novonastali ligandi povezuju se sa staničnim površinskim receptorima i uzrokuju adheziju stanice i određeni stanični odgovor, što čini unutarstanične reakcije.

Poznato je kako bioaktivno staklo u organizmu inducira vremenski ovisnu modifikaciju površine. Osnovni procesi koje se odvijaju tijekom izvanstanične reakcije biostakla s tkivom jesu ionska izmjena, otapanje i taloženje. Hench [33] je mehanizam reakcije biostakla u organizmu opisao sljedećim koracima:

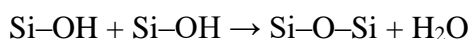
1. Pod utjecajem difuzije dolazi do ionske izmjene iona alkalijskih metala s vodikovim i oksonijevim ionima iz otopine:



2. Dolazi do stvaranja silanolnih skupina kao posljedice pucnja Si-O-Si veza:



3. Susjedne silanolne skupine međusobno se povezuju i kondenziraju, a kasnije i polimeriziraju, čime nastaju siloksanske strukture:

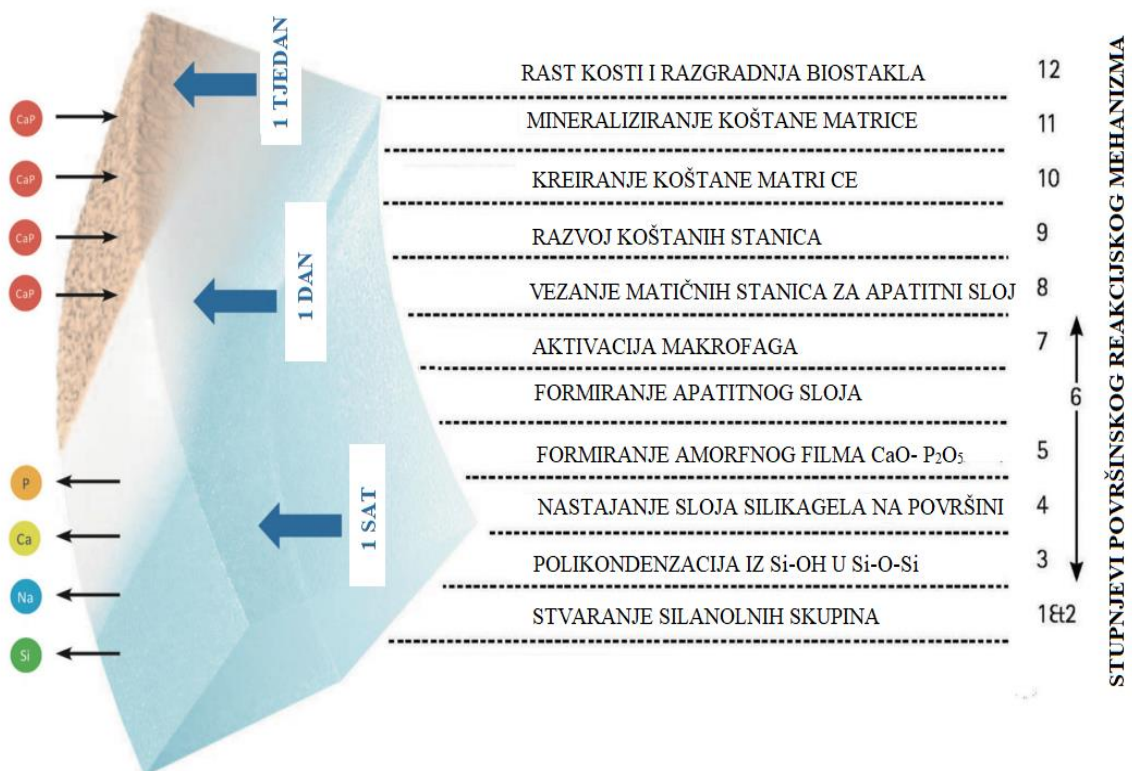


4. Novonastale strukture stvaraju trodimenzijsku mrežu i nastaje sloj silikagela na površini.

5. Disocirani ioni alkalijskih metala i fosfatni ioni iz fiziološke otopine talože se na površini silikagela i stvaraju amorfni sloj $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, prekursor kristaličnog hidroksiapatita.

6. Amorfni sloj s hidroksidnim, karbonatnim i fluoridnim ionima iz otopine stvara sloj hidroksiapatita.
7. Novonastali apatitni sloj zahvaljujući osteoproduktivnom svojstvu potiče adsorpciju faktora rasta na površini i aktivaciju makrofaga.
8. Djelovanje makrofaga potiče migraciju matičnih stanica i stanica koštanih progenitora i vezanje za apatitni sloj.
9. Matične stanice i stanice koštanih progenitora razvijaju se u osteogene stanice, osnovne vrste stanica koštanog tkiva.
10. Kreiranje koštane matrice taloženjem kolagena tipa 1.
11. Kolagen i hidroksiapatitni kristali u koštanoj matrici se mineraliziraju.
12. Dolazi do rasta kosti i razgradnje bioaktivnog stakla.

Međutim, novija istraživanja [34] ukazuju kako se fizikalno-kemijski procesi i stanično posredovane reakcije ne odvijaju međusobno posljedično, već paralelno s ciljem stvaranja reakcijskog sloja.



Slika 3. Stupnjevi reakcijskog mehanizma [35]

2.4. Određivanje bioaktivnosti

Eksperimentalno, bioaktivnost se mjeri kao udio nastalog hidroksiapatita *in vitro*, odnosno kao udio stvorene kosti *in vivo* [36].

Za *in vivo* testiranja značajni su koraci 6 – 11 opisani u poglavlju 2.3. Mehanizam vezanja s kosti, budući da upravo u tim koracima dolazi do stvaranja veze bioaktivnog stakla s tkivom, ali i njegove apsorpcije. Testiranja *in vivo* provode se na životinjskim modelima čija anatomija nalikuje ljudskoj, najčešće štakorima i zečevima. Bioaktivno staklo implantira se u organizam pri čemu se prati njegova interakcija s okolnim tkivom (tjedno ili mjesečno). Pritom se najčešće primjenom rentgenskih metoda analizira integracija i stvaranje kosti oko implantata, pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) proučava morfologija biostakla, spektrometrom rentgenske fluorescencije uz disperziju energije (EDXRF) daje uvid u sastav biostakla i mineralizaciju okolnog tkiva, a metodama histološke analize proučava debljina nastalog sloja hidroksiapatita, umnožavanje stanica i općenito odgovor tijela na ugradnju biostakla kao implantata.

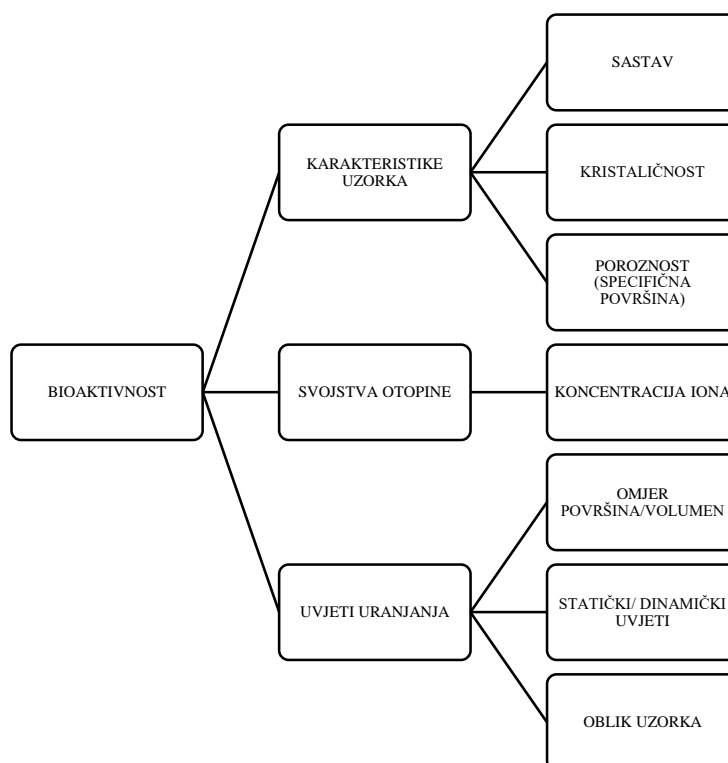
Međutim, iz etičkih, regulatornih i ekonomskih razloga glavni se fokus stavlja na istraživanja *in vitro*. Štoviše, pokazalo se kako su rezultati mjerenja otpuštanja iona *in vitro* u korelaciji sa stvaranjem reakcijskog sloja promatranog *in vivo* [37]. Rezultati brojnih istraživanja pokazuju sličnosti u brzini stvaranja mineralizirane izvanstanične matrice s brzinom rasta kosti *in vivo* [38]. Testovi *in vitro* provode se uranjanjem bioaktivnih stakala u otopine koje simuliraju fiziološko okruženje. Uobičajena metoda predstavlja korištenje simulirane tjelesne tekućine (engl. *Simulated Body Fluid* (SBF)), koja se sastoji od osnovnih anorganskih komponenti ljudske krvi, kationa natrija, kalija, magnezija i kalcija te kloridnih, hidrogenkarbonatnih, hidrogenfosfatnih i sulfatnih aniona, u koncentracijama sličnim krvnoj plazmi [39]. Nakon uranjanja, najznačajniji procesi za istraživanja *in vitro* predstavljaju koraci 1 – 5 opisani u poglavlju 2.3. Mehanizam vezivanja s kosti, odnosno koraci koji prethode kristalizaciji sloja kalcijeva fosfata u hidroksiapatitnu strukturu. Prema opisanom mehanizmu reakcije biostakla u organizmu, evidentno je kako uslijed reakcije biostakla dolazi do otpuštanja iona, ali i promjena u sastavu otopine kojom je okruženo bioaktivno staklo kao posljedice ionske izmjene i promjene pH vrijednosti. Nakon određenog vremena (najčešće 3, 7, 14, 21 dana) određuje se prisutnost nastalog hidroksiapatita razmatranjem promjena na razini stakla, točnije površinskoj morfologiji (metodom pretražne elektronske mikroskopije) i

težini stakla, ali i promjenama otopine, u vidu promjena u pH vrijednosti i koncentraciji iona (najčešće kalcija i fosfora) u otopini u svrhu određivanja kinetike stvaranja hidroksiapatita [40]. Ovakav oblik testiranja karakteriziraju statički uvjeti, a koristi se kada želimo dobiti uvid u samu reakciju i ponašanje bioaktivnog stakla, s prednošću lakog kontroliranja uvjeta. Međutim, tjelesna tekućina u ljudskom organizmu je u stalnoj cirkulaciji radi održavanja homeostaze i odvijanja nužnih biokemijskih procesa za funkcioniranje stanica i tkiva. Cirkulacija tjelesnih tekućina znatno se razlikuje primjerice u koštanoj srži, gdje je uspostavljena dobra cirkulacija, od slabe cirkulacije u zubnoj pulpi.

Ovisno o mjestu u organizmu, razlikuju se i pH vrijednost, koncentracija određenih iona i nutrijenata te mikrobiom. Stoga je, kako bi se u eksperimentima što bolje simulirali stvarni uvjeti u organizmu, potrebno istraživanja provoditi u dinamičkim uvjetima koji odgovaraju onima u kojima će se biostaklo implantirati. Usporedno istraživanje *in vitro* Zhang-a i suradnika [41] u statičkim i dinamičkim uvjetima pokazalo je kako u statičkim uvjetima, uslijed loših hidrodinamičkih uvjeta za proces difuzije, dolazi do visoke pH vrijednosti i stvaranja neravnomjernog reakcijskog sloja, dok je u dinamičkim uvjetima navedeni sloj homogen. Siekken i suradnici [42] istraživali su utjecaj dinamike izmjenjivanja koncentracije iona u otopini na stvaranje reakcijskog sloja. Rezultati pokazuju kako bilo koja promjena u lokalnoj koncentraciji iona u otopini utječe na otpuštanje iona iz bioaktivnog stakla i nastajanje reakcijskog sloja. Porastom lokalne koncentracije iona u otopini, smanjuje se otapanje stakla i nastajanje reakcijskog sloja. Također, čestice bioaktivnog stakla na vanjskoj površini znatno brže reagiraju nego u unutrašnjosti materijala, a smatra se kako je razlika u gibanju fluida posljedica takve neuniformne reakcije.

2.4.1. Čimbenici koji utječu na bioaktivnost

Kao što je već ranije spomenuto, na biološku aktivnost direktno utječe nastajanje apatitnog reakcijskog sloja. Obzirom da apatitni sloj nastaje kemijskom reakcijom čestica stakla s ionima iz okolne otopine, bila ona određena biomimetička otopina poput SBF-a ili tjelesna tekućina u samom organizmu, logično se nameće kako je potrebno razmotriti okolinu i uvjete u kojima se navedena reakcija odvija. Konkretnije, smatra se kako na bioaktivnost u najvećoj mjeri utječu svojstva bioaktivnih stakala i okolišni uvjeti predodređeni otopinom u koju se bioaktivna stakla uranjaju, kao što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Čimbenici koji utječu na bioaktivnost materijala *in vitro* [43]

1) Utjecaj sastava i strukture

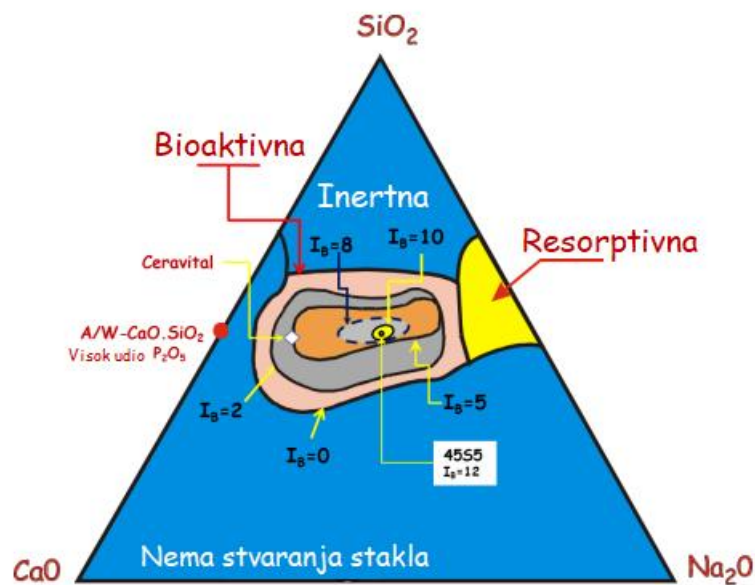
Bioaktivno staklo kao materijal dozvoljava brojne varijacije u sastavu i strukturi. Međutim, osobito je složeno optimirati ova dva parametra. Nekada se dodatkom određenih spojeva mogu poboljšati određena svojstva, dok će se istovremeno druga pogoršati. Takav slučaj poznat je kod zamjene kalcijevog oksida u bioaktivnom staklu s magnezijevim oksidom. Rezultati istraživanja pokazuju kako se ovakvom zamjenom poboljšava izdržljivost stakla, no dolazi do negativnog djelovanja na bioaktivna svojstva [43]. Dodatkom modifikatora mreže poput magnezija, raste broj nepremošćujućih kisika, čime se otvara mreža, međutim omogućavajući pritom prodor vode u strukturu. Time se remeti proces ionske izmjene, a posljedično i stvaranje apatitnog sloja [37]. Osim toga, može doći i do pretjeranog izlučivanja iona alkalijskih metala, potencijalno u toksičnim koncentracijama. Nasuprot tome, dodatak nekih iona može pozitivno djelovati na bioaktivnost, povećavajući terapijski raspon, što je detaljnije opisano u poglavlju 2.6.

Kod konvencionalnih bioaktivnih stakala u sustavu $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5$, bioaktivnost se može poboljšati podešavanjem omjera kalcija i fosfora na otprilike 1.67, koliko iznosi njihov omjer u hidroksiapatitu [44]. Obzirom da biomimetički sloj apatita nastaje upravo kao posljedica otpuštanja ovih iona, približavanjem omjera Ca/P onome u koštanom mineralu, poboljšat će se biomimetika. Pokazalo se kako udio fosfora u staklima ima značajan utjecaj na bioaktivnost. Postoje dvije faze u 45S5 staklu: silikatna faza i samostalna fosfatna faza u obliku ortofosfata. Modificirajući ioni u različitom se omjeru raspodjeljuju između ove dvije faze i kontroliraju brzinu otapanja stakla. Porastom fosfora u 45S5 tipu stakla, dolazi do stvaranja klastera ortofosfatnih Q^0_{P} tetraedara sa silikatnom mrežom u Q^1_{P} i Q^2_{P} jedinice uslijed stvaranja P–O–Si veza i posljedično smanjenja bioaktivnosti. Međutim, postoji li dovoljno modificirajućih iona za izjednačavanja naboja Q^0_{P} tetraedara i depolimerizaciju silikatne mreže, dodatak fosfora povećati će bioaktivnost. Općenito se smatra kako, uz uvjet prevladavanja ortofosfatnih Q^0_{P} jedinica fosfora te održavanje adekvatne polimerizacije silikatne mreže, porastom udjela fosfora bioaktivnost raste, neovisno o načinu pripreme [45].

Kao što je već ranije spomenuto, povezanost mreže (NC) u vezi je s bioaktivnošću stakla te se smatra kako gornja granična vrijednost iznosi 2,4, dok se pri većim vrijednostima smanjuje bioaktivnost. Uporište navedene korelacije obrazloženo je mehanizmom otapanja stakla. Otapanjem stakla dolazi do pucanja Si–O–Si veza, nastanka silanolnih skupina i posljedične polimerizacije. Porastom povezanosti mreže, raste broj premošćujućih kisika, odnosno broja Si–O–Si veza, pri čemu je potrebno više energije kako bi došlo do pucanja navedenih veza, a raste i polimerizacija koja u prevelikoj mjeri inhibira nastajanje apatitnog sloja na površini bioaktivnog stakla [46]. Polimerizacija u prevelikoj mjeri je nepoželjna jer se njome zatvara mreža stakla, čime se smanjuje pristup kalcijevim i natrijevim ionima tijekom ionske izmjene u otopini te prodor vode.

Održavajući vrijednost povezanosti mreže konstantnom, zamjena kalcijevog oksida natrijevim oksidom pokazuje povećanu topljivost, a zamjenom kalcija stroncijem pojačava se stvaranje apatitnog sloja. Također, dodavanje male količine fluorida pri istim uvjetima (stalna vrijednost NC) potiče nastanak apatitnog sloja. S druge strane, zamjena kalcijevih iona magnezijevima uzrokuje smanjeno stvaranje apatitnog sloja i povećanje povezanosti mreže. Općenito, pokazalo se kako prisutnost iona alkalijskih metala nije presudna za bioaktivnost, budući da se brzina stvaranja apatita ne razlikuje značajno kod stakla s prisutnim ionima alkalijskih metala i onima bez njih [26].

Sastav ima značajan utjecaj i na brzinu razgradnje. Modificiranje brzine razgradnje je važno jer bi ona trebala odgovarati brzini rasta kosti *in vivo*. Čest je slučaj, pogotovo kod boratnih i fosfatnih bioaktivnih stakala, prebrzo otapanje [47], [48]. U vidu sastava, na brzinu se može utjecati dodatkom onih jedinica u strukturu koje povećavaju povezanost mreže, budući da je poznato kako stakla s boljom povezanošću mreže sporije stvaraju apatitni sloj. Isto se može postići i dodatkom modifikatora u obliku oksida, primjerice Al_2O_3 [49]. Stakla istog sastava, ali različitog udjela pojedinih komponenti, mogu pokazati različitu bioaktivnost pa čak i do mjere da neka uopće neće reagirati s tkivom (slika 5).



Slika 5. Ternarni dijagram sposobnosti vezanja s tvrdim i mekim tkivom u ovisnosti o sastavu $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ sustava uz pripadajuće vrijednosti indeksa bioaktivnosti (I_B) [50]

S obzirom na sposobnost vezanja s tkivom u ovisnosti o sastavu, biostakla se dijele na tri kategorije [29]:

- Bioaktivna; vežu se s kosti, a neka i s mekim tkivom: 35 – 60 mol.% SiO_2 , 10 – 50 mol.% CaO , 5 – 40 mol.% Na_2O
- Bioaktivna; do resorpcije dolazi između 10 – 30 dana: >50 mol.% SiO_2 , <10 mol.% CaO , <35 mol.% Na_2O
- Nisu bioaktivna, praktički inertna: >65 mol.% SiO_2

2) Kristaličnost

Prilikom dobivanja biostakla, posebna se pažnja obraća na izbjegavanje kristalizacije tijekom sinteze ili tijekom daljnje obrade na visokim temperaturama. Vrlo je delikatno optimirati u kojoj će mjeri staklo kristalizirati, budući da se kristalizacijom dobiva mehanički povoljniji i stabilniji materijal (staklo-keramika), no nauštrb smanjenja bioaktivnosti [51]. Razlog tome je što će amorfnu strukturu puno brže otpuštati ione od uređene kristalne strukture. Pokazalo se kako dodatak SiO_2 smanjuje težnju kristalizaciji, no time se smanjuje brzina razgradnje i bioaktivnost. Iako se smatra kako je poželjna *NC* vrijednost do 2,4, stakla unutar tog područja karakteriziraju određena nestabilna područja (engl. „*floppy regions*“) uslijed lokalnih varijacija u strukturi sa smanjenom povezanošću, koja im posljedično omogućava nukleaciju i kristalizaciju. Općenito, očekuje se kako će težnja kristalizaciji značajno varirati u ovisnosti o povezanosti mreže. Pokazalo se kako porastom polimerizacije mreže dolazi do porasta razlike između temperature kristalizacije i temperature staklatog prijelaza, čime se smanjuje težnja kristalizaciji. Značajan utjecaj na kristalizaciju ima i udio alkalijskih metala, pri čemu se za izbjegavanje kristalizacije preferira manji udio iona alkalijskih metala [52].

3) Poroznost i specifična površina

Općenito je poznato kako su poroznost i specifična površina izravno povezani. Povećanjem poroznosti, raste i specifična površina, čime se ostvaruje veća dodirna površina za interakciju tekućine s bioaktivnim staklom. U aspektu bioaktivnih stakla kao nosača, odnosno okosnice za razvoj tkiva, šupljine pružaju dodatan prostor za nakupljanje stanica i širenje krvnih žila. Međutim, povećana poroznost narušava mehaničku čvrstoću stakla, stoga je bitno razmotriti mjesto ugradnje bioaktivnih stakala i kakva mehanička svojstva ono zahtijeva. Istraživanja brzine otapanja pokazuju kako se stakla s neporoznom površinom sporije otapaju i u manjoj mjeri potiču stvaranje apatitnog sloja [53].

4) Koncentracija iona u otopini

Za metode određivanja bioaktivnosti *in vitro*, koriste se biomimetičke otopine koje simuliraju fiziološke uvjete, pri čemu se najčešće imitira sastav tjelesnih tekućina. Koriste se otopine poput tris-puferirane otopine, simulirane tjelesne tekućine i medija za uzgoj stanica, a svaka od njih ima različiti sastav. Svojstva otopine koja najznačajnije utječu na bioaktivnost

jesu sastav otopine, pH vrijednost i kapacitet pufera [54]. Ova svojstva znatno utječu na kemijske reakcije otapanja i taloženja.

5) Omjer površina/volumen i oblik uzorka

Prema Sepulvedi i sur. [53], brzina otapanja, a posljedično i bioaktivnost može se kontrolirati veličinom čestica, vrstom stakla i volumnim udjelima komponenti. Ovi čimbenici znatno utječu na specifičnu površinu uzorka, a samim time i na omjer površine i volumena. Što su čestice manje veličine, veća je sveukupna specifična površina. Time se povećava i reakcijska površina, što promovira nastajanje apatitnog sloja. Istraživanja pokazuju kako pri višim omjerima površine i volumena dolazi do naglog porasta pH vrijednosti kao posljedice izmjene iona koji su odgovorni za nastanak tankog apatitnog sloja. Pri nižim omjerima površine i volumena, dolazi do nastanka znatno kvalitetnijeg sloja apatita, uz manju promjenu pH vrijednosti [55]. Neka istraživanja *in vivo* čak pokazuju kako bi debljina uzorka bioaktivnog stakla trebala biti dvostruko deblja od njegovog reakcijskog sloja [56]. Kako bi se postigli različiti oblici i veličine čestica, a posljedično i specifične površine, koriste se različite metode pripreme bioaktivnih stakala. Primjerice, rezultati usporedne fizikalne karakterizacije stakala pripremljenih taljenjem i sol-gel metodom pokazuju kako stakla dobivena sol-gel metodom imaju znatno veću poroznost te skoro 100 puta veću specifičnu površinu [57].

2.5. Vrste bioaktivnih stakala

2.5.1. Silikatna stakla

SiO₂ kao osnovni staklotvorac silikatnih stakala važan je sudionik metaboličkih procesa koji se odvijaju pri stvaranju i kalcificiranju koštanog tkiva.

Specifičnost silikatnih stakla je ravnoteža koja se uspostavlja između različitih Q jedinica, a prikazana je sljedećom jednadžbom:



Postizanje ravnoteže poželjno je jer se time omogućava stabilnost, a osim toga poznavanje ravnoteže omogućuje određivanje raspodjele Q jedinica koja ima znatnu ulogu u strukturnoj analizi kojom se mogu predvidjeti i bioaktivna svojstva biostakla.

Kod bioaktivnijih spojeva prevladavaju Q^2 jedinice, a kod onih niže bioaktivnosti Q^3 jedinice [36]. Također, udio SiO_2 ima važan utjecaj na bioaktivnost. Pokazalo se kako stakla s 42 – 53 mas.% SiO_2 dobivena taljenjem ostvaruju vezu s kosti i mekim tkivom u roku od nekoliko dana. Povećanjem udjela SiO_2 raste potrebno vrijeme za vezanje, a izostaje sposobnost vezanja s mekim tkivom. Tako bioaktivnim staklima s 54 – 60 mas.% SiO_2 treba 2 – 4 tjedna za vezanja s kosti uz nemogućnost vezanja s mekim tkivom, a kod onih s masenim udjelom većim od 60% SiO_2 nema nikakvog vezanja s kosti te je bioinertno [38].

Primjena sol-gel metode omogućila je dobivanje biostakla znatno povoljnijih svojstava, poput veće čistoće i homogenosti, veće bioaktivnosti, pripremu i obradu pri nižim temperaturama. Osim toga ova metoda omogućuje i dobivanje biostakla u obliku tankog filma, što omogućava prevlačenje metalnih i dentalnih implantata. Primjenom ove metode može se povećati udio SiO_2 u biostaklu. Povećanjem udjela SiO_2 , povećava se i količina nastanih silanolnih skupina koje će postati nukleacijska mjesta za stvaranje apatita, čineći staklo bioaktivnijim. Također, primjenom ove metode dobivaju se stakla porozne strukture, što uzrokuje znatno povećanje u specifičnoj površini i posljedično brže otapanje [58]. Odličnu inačicu silikatnih stakala predstavljaju mezoporozna silikatna stakla, čija su fizikalna svojstva i bioaktivnost znatno poboljšana, a njihova primjena razmatra se u vidu sustava za dostavu lijeka u organizam [59].

Glavni nedostatak silikatnih biostakala je problem s kristalizacijom koji je moguće izbjeći povećanjem temperaturnog intervala tijekom obrade stakla. Time se omogućava dovoljno vremena i dovoljno niska temperatura za stvaranje amorfnog sloja, a izbjegava kristalizacija. Kako bi se doskočilo tome, pribjegava se modificiranju sastava. Povećanjem broja komponenata stakla mogu se bolje kontrolirati njegova svojstva, obzirom da svaka komponentna unosi svoja već postojeća svojstva, poput brzine razgradnje, mehaničkih svojstava i određenog djelovanja na organizam i tkivo. Također, dodatak određene komponente može imati i sinergijsko djelovanje s nekom drugom komponentom te se općenito povećanjem broja komponentni povećava broj parametara koji se moraju i mogu kontrolirati [60]. Od modifikatora mreže, dodaju se najčešće natrij, kalcij i magnezij u obliku oksida. Povećanje udjela SiO_2 smanjuje težnju kristalizaciji i čini strukturu stabilnijom povećanjem povezanosti silikatne mreže, no dolazi do smanjenja brzine razgradnje što može nepovoljno utjecati na procese difuzije i razgradnju stakla. Tom problemu se pristupa na način da se nastoji održati ista povezanost mreže zamjenom kalcija i natrija drugim modifikatora

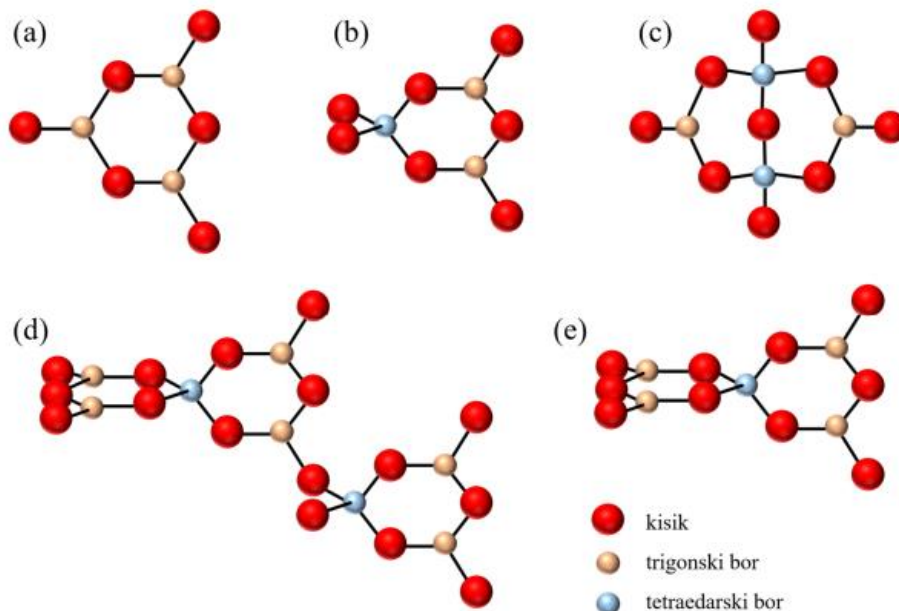
mreže. Pokazalo se da točno određeni udjeli alkalijskih metala proširuju interval obrade, bez značajnog utjecaja na bioaktivnost [61].

Glavni nedostatak silikatnih stakala je njihov dugi period razgradnje, budući da vrijeme potrebno kako bi se potpuno uklonilo iz organizma iznosi 1 do 2 godine, što može ograničiti bioaktivnost i ometati proces zacjeljivanja [62]. Stoga se znanstvenici okreću dopiranjju te drugim staklotvorcima poput bora i fosfora.

2.5.2. Boratna stakla

Boratna stakla su stakla čiji je staklotvorac B_2O_3 , a građevne jedinice su $[BO_3]^-$ skupine, trigonske planarne strukture. Međusobnim povezivanjem triju jedinica nastaju šesteročlani prsteni [63], koji čine osnovnu strukturu boratnog stakla kao što je vidljivo na slici 6(a).

Kod čistih boratnih stakala, koordinacijski broj bora iznosi tri. Dodatkom alkalijskih metala dolazi do porasta koordinacijskog broja (4) uslijed djelovanja bora kao Lewisove kiseline, pri čemu bor prima elektronski par s kisika i prelazi u tetraedarsku $[BO_4]^-$ jedinicu s delokaliziranim nabojem, kao što je vidljivo na slikama 6(b)-(e).



Slika 6. Osnovne strukturne boratne jedinice; (a) šesteročlani prsten, (b) triborat, (c) diborat, (d) tetraborat, (e) pentaborat [63]

Već je ranije u radu spomenuto da kation alkalijskog metala stabilizira naboj boratnih iona. Porastom koncentracije iona alkalijskih metala, pri više od 20 mol.% alkalijskih oksida, dolazi do promjena u koordinaciji strukturnih jedinica, no izostaje očekivano stvaranje nepremošćujućih kisika. Posljedica toga je povećana povezanost mreže, a s time i porast viskoznosti. Ova specifičnost naziva se boratna anomalija, a uzročnik je porasta staklišta i smanjenja koeficijenta toplinskog širenja boratnih stakla [64].

Boratna stakla s dodatkom kalcijevih oksida, kada se nađu u okolini bogatoj fosfatnim iona (tjelesna tekućina), imaju mogućnost taloženja u hidroksiapatit i kalcijeve spojeve poput kalcijevog karbonata. Istraživanja pokazuju kako okosnice na bazi kalcijevog karbonata u odnosu na hidroksiapatitne u većoj mjeri promoviraju okoštavanje [65]. Razgradnja kalcijevog karbonata *in vivo* brža je od razgradnje hidroksiapatita, što je izrazito povoljno budući da je kalcijev karbonat također prekursor hidroksiapatita. Na taloženje kalcijevog karbonata može se utjecati dodatkom elemenata u tragovima poput bakra, cinka i stroncija [66].

Za razliku od silikatnih stakala, prilikom reakcije boratnih stakala s otopinom, ne dolazi do boratnog sloja, već direktno nastaje sloj hidroksiapatita na površini stakla.

Istraživanja [67]–[69] pokazuju slabu kemijsku otpornost boratnih stakala sastava $6\text{Na}_2\text{O} \cdot 8\text{K}_2\text{O} \cdot 8\text{MgO} \cdot 22\text{CaO} \cdot 18x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot (54-18x)\text{SiO}_2 \cdot 2\text{P}_2\text{O}_5$ mol%, gdje je x jednak 0,1,2 ili 3, uslijed čega u fiziološkom mediju (0.02 M otopina K_2HPO_4), nakon niza reakcija taloženja i otapanja, fosfatni ioni iz otopine reagiraju s kalcijevim ionima i nastaje hidroksiapatit. Pokazalo se kako je navedena reakcija znatno brža nego kod silikatnih stakala, iako su te reakcije po mehanizmu slične onima kod silikatnih stakala. Međutim, pokazalo se kako je taloženje u hidroksiapatit potpuno za čista boratna stakla (stakla koja ne sadrže SiO_2) zbog izostanka difuzijskog sloja kod boratnih stakala, čime raste i pH otopine. Porastom udjela SiO_2 u boratnom staklu smanjuje se taloženje hidroksiapatita, a dolazi do stvaranja filma bogatog SiO_2 [67].

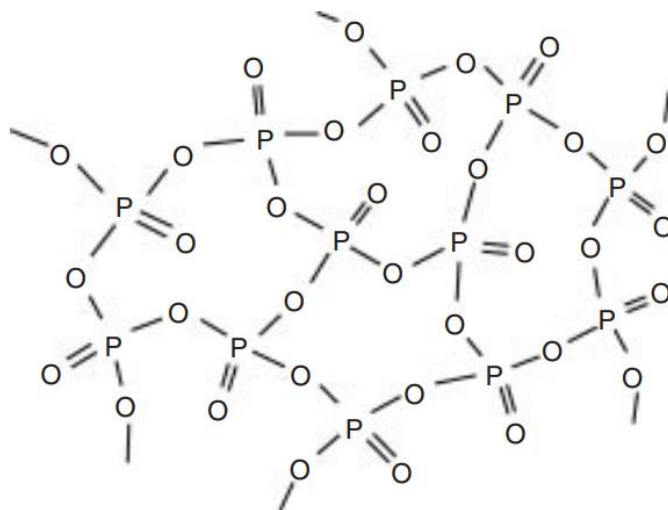
Iako je bor jedan od esencijalnih minerala, pojedini sastavi boratnih bioaktivnih stakala pokazuju citotoksičnost *in vitro* pri statičkim uvjetima, i to u koncentracijama iznad 0,65 mM boratnih iona. Međutim, toksično djelovanje je moguće izbjeći prevlačenjem boratnih stakala slojem hidroksiapatita čime se smanjuje lokalna koncentracija boratnih iona u otopini prilikom razgradnje biostakla [70].

2.5.3. Fosfatna stakla

Čista fosfatna stakla su manje značajna od silikatnih ili borosilikatnih zbog male kemijske otpornosti i visoke higroskopnosti, pa se u većoj mjeri proizvode stakla koja su kombinacija fosfatnih, silikatnih, boratnih i drugih osnovnih stakala na taj način se mogu očuvati vrijedna svojstva fosfatnih stakala, a istovremeno postići bolja kemijska otpornost.

Uobičajena metoda pripreme fosfatnih stakala je taljenje fosfata u obliku prašaka, oksida ili karbonata pri temperaturama između 800 i 1300°C, ovisno o sastavu, a ponekad i direktno iz fosforne kiseline. U zadnje vrijeme, veći fokus stavlja se na razvoj fosfatnih stakala dobivenih sol-gel metodom, koju je potrebno još doraditi kako bi se izbjegla krhkost koja karakterizira silikatna stakla pripravljena ovom metodom [71].

Kod fosfatnih stakala glavni staklotvorac je P_2O_5 , odnosno osnovne građevne jedinice su $[PO_4]^-$ tetraedri koji su međusobno povezani preko tri premošćujuća atoma kisika, dok je četvrti atom kisika povezan s atomom fosfora dvostrukom vezom, kao što je vidljivo na slici 7.



Slika 7. Osnovna struktura fosfatnih stakala [71]

Njihova struktura najviše ovisi o udjelu P_2O_5 , ali i o modifikatorima mreže (CaO , Na_2O), pa tako postoje ultrafosfatna, metafosfatna i polifosfatna stakla. Ultrafosfatna stakla imaju > 50 mol.% P_2O_5 i karakterizira ih dvodimenzijaska i trodimenzijaska fosfatna mreža.

Polifosfatna stakla sastoje se od < 50 mol.% P_2O_5 , a strukturu im čine fosfatni prstenovi i lanci. Metafosfatna stakla sadrže točno 50 mol.% P_2O_5 te se sastoje od beskonačno mnogo prstena povezanih u lanac, no zbog poteškoća u postizanju ovako striktnog udjela, metafosfatna stakla su zapravo dugolančana polifosfatna stakla. Osim ovih, postoje i inverzna (pirofosfatna) stakla, koja sadrže manje od 33,33 mol.% P_2O_5 , no njihova struktura je u odnosu na ostale znatno poremećena te ju čine ortofosfatne (PO_4^{3-}) i pirofosfatne ($P_2O_7^{4-}$) skupine u interakciji s kationima modifikatora mreže (Ca^{2+} , Na^+).

Glavni razlog zašto fosfatna stakla mogu naći primjenu kao biomaterijali je njihova sposobnost otapanja na netoksične produkte. Udio P_2O_5 utječe i na topljivost, koja znatno raste povećanjem udjela P_2O_5 . Otapanjem fosfatnih stakala dolazi do sniženja pH vrijednosti, efekta koji se znatno pojačava što je udio P_2O_5 u staklu veći. Smanjenjem pH vrijednosti raste brzina razgradnje, stoga je za kontrolirano otpuštanje važno održavati pH neutralnim. To se provodi optimiranjem omjera stakla i otopine, uvjeta izmjene otopine te kapacitetu pufera otopine. Osim toga, otpuštanje se može kontrolirati putem modifikatora, obzirom da je poznato kako veći omjer naboja prema veličini kationa smanjuje topljivost [72]. Pokazalo se kako vrijeme razgradnje za fosfatna stakla iznose između nekoliko sati i nekoliko tjedana, ovisno o sastavu [62]. Primjerice, istraživanjima kojima je određivana topljivost polifosfatnih stakala, jasno je uočena njihova proporcionalna korelacija, budući da se smanjenjem molnog udjela P_2O_5 s 50 % na 45 % količina otopljenih oksida (P_2O_5) smanjila za dva reda veličine [73]. Međutim, osobito je problematična prebrza topljivost fosfatnih stakla, pogotovo polifosfatnih gdje je udio fosfata veći od 45 mol.%, budući da je brzina otapanja prevelika kako bi odgovarala brzini rasta kosti, uzrokujući pritom prebrze promjene u pH vrijednosti.

Posebno su za koštano inženjerstvo zanimljiva stakla u sustavu $CaO-Na_2O-P_2O_5$ zbog sličnosti sa sastavom anorganske komponente kosti. Ova stakla karakterizira jednoliko otapanje u vodenim otopinama [74] prilikom čega se otpuštaju ioni koji se nalaze u organizmu (kalcijevi i fosfatni ioni) koji potiču taloženje hidroksiapatita, za razliku od jednostavnijih silikatnih stakala gdje dolazi do selektivnog izlučivanja (engl. *leaching*). Međutim, i ovaj sustav stakala karakterizira pretjerana topljivost, koja osobito raste zamjenom kalcija natrijem, te općenito porastom udjela alkalijskih metala.

Rezultati niza istraživanja *in vitro* i *in vivo* govore u prilog povećanju bioaktivnosti kod stakala koja sadrže fosfor. Međutim, zahvaljujući mogućnosti ugrađivanja iona poput stroncijevih, cinkovih i fluoridnih u njihovu strukturu, njihova potencijalna primjena nije

zamijećena samo u vidu implantata, već i u prevenciji infekcija i liječenju rana, budući da navedeni ioni pokazuju terapijski efekt.

2.6. Dopiranje biostakla

S ciljem modifikacije i poboljšanja specifičnih svojstava biostakla (reaktivnosti, brzine otapanja i otpuštanja iona), biostaklo se može dopirati, odnosno u njegovu strukturu unijeti modificirajući oksidi, najčešće alkalijskih metala, ovisno o željenoj primjeni. Pokazalo se kako se, osim korištenja kalcija i fosfora koji su sastavni dio anorganske faze kosti i učestale komponente biostakla, dodavanjem iona u tragovima poput stroncija, cinka, srebra, bakra i magnezija također može pozitivno djelovati na bioaktivnost. Mnogi od ovih metala čine i elemente u tragovima važnim za pravilno funkcioniranje organizma.

Stroncij ima mogućnost ugrađivanja u kristalnu rešetku hidroksiapatita, do čega dolazi prilikom njegovog otpuštanja u otopinu iz biostakla dopiranog stroncijem uslijed procesa ionske izmjene, a što se pokazalo naročito pogodnim zbog terapijskog i anaboličkog djelovanja stroncija na koštane stanice i stvaranje kosti *in vivo* [75].

Magnezij kao zemnoalkalijski metal pokazuje već prije spomenuto djelovanje na polimerizaciju mreže. Osim toga, u masenim udjelima preko 1,2% dodanog magnezija, povećava se debljina površinskog sloja silikagela te usporava kristalizacija [76]. Mali ionski polumjer magnezija utječe na povećanje jakosti električnog polja. Prema Dietzelu, kationi s povećanom jakosti električnog polja u mogućnosti su stvarati snažnije veze, što rezultira stabilnijom amorfnom strukturom, otpornijom na kristalizaciju hlađenjem [77].

Prema proturječnim rezultatima brojnih istraživanja, utjecaj cinka na bioaktivnost još uvijek je predmet dvojbe. Iako su brojnim istraživanjima dokazana pozitivna djelovanja cinka na koštani metabolizam, postoje i ona kojima se pokazalo kako dodatak cinka nema nikakav značajan učinak (u koncentracijama od 0,20, 0,65 i 2,62 mg/L), pa čak i inhibicijski efekt. Prema istraživanjima Haimija i suradnika [78], stakla dopirana cinkom ostvaruju sporiji profil razgradnje. Istraživanja provedena korištenjem bioloških medija poput Dulbeccovog minimalnog esencijalnog medija (engl. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*, DMEM) i simulirane tjelesne tekućine (SBF) pokazuju kako stakla dopirana cinkom u biološkim medijima izazivaju pojačano stvaranje sloja kalcijevog fosfata.

Što se prijelaznih metala tiče, bakar se ističe kao ključan element u procesu stvaranja krvnih žila. Navedeni proces ima značajnu ulogu u procesu okoštavanja, upravo zbog čega se bakar ugrađuje u bioaktivna stakla [79]. Osim toga, kao osobito povoljno svojstvo pokazalo se sinergijsko antibakterijsko djelovanje u kombinaciji sa kalcijem, standardnom komponentom biostakla [80].

Srebro se također pokazalo kao predmet interesa zbog poznatog antibakterijskog djelovanja. Zbog navedenog, razmatraju se primjene bioaktivnih stakla dopiranih srebrom u oblogama za rane [81]. Međutim, optimiranje koncentracije srebra i tehnika obrade takvih stakla još uvijek je predmet istraživanja.

Feromagnetsko svojstvo željeza primjenjuje se u inženjerstvu koštanog tkiva za liječenje raka kostiju, prilikom čega se principom magnetske indukcije dovodi toplina kako bi se povećala temperatura tkiva i prouzrokovalo uništenje tumorskih stanica. Biostakla dopirana željezom razmatraju se za ovu primjenu budući da se uslijed toplinskog djelovanja ne djeluje samo na tumorske, već i sve ostale stanice okolnog tkiva, pa tako i koštane, a obnavljajuća svojstva bioaktivnog stakla mogu pomoći u njihovom obnavljanju. Osim toga, pokazalo se kako dodatak željeza u fosfatno-silikatna stakla uzrokuje smanjenje temperature kristalizacije, kao i toplinske stabilnosti [82]. Međutim, vrlo je važno kontrolirati otpuštanje željeza obzirom na njegovo citotoksično djelovanje.

Zlato je također element koji se razmatra za korištenje u biostaklu i njegovom dopiranju, no ima potencijalno citotoksično djelovanje. Naime, nanočestice zlata pokazuju citotoksično djelovanje pri promjerima između 1 – 2 nm [83]. Iako se ne radi o dopiranju, korištenje nanočestica zlata većeg promjera u biostaklu povećalo je specifičnu površinu [84] bioaktivnog stakla te posljedično pozitivno djelovalo i na osteokonduktivost [85].

3. ZAKLJUČAK

Svojstva bioaktivnog stakla poput bioaktivnosti, osteoproduktivnosti i ostekonduktivnosti čine bioaktivno staklo odličnim kandidatom za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Osim toga, odlikuju se raznolikošću u sastavu što se tiče odabira kemijskih elemenata, udjela i koncentracija pojedinih komponenata, što im omogućuje bolje kontroliranje i postizanje željenih svojstva. Reakcijom biostakla u fiziološkom okruženju dolazi do vremenski ovisne modifikacije površine, pri čemu se otpuštaju ioni ključni za kontroliranje procesa okoštavanja i aktivacije bitnih gena te dolazi do stvaranja hidroksiapatitnog sloja. Nastali hidroksiapatitni sloj pruža direktnu vezu s tkivom.

Dva su ključna uvjeta kako bi materijal bio bioaktivan: prisutnost silanolnih i drugih hidroksilnih skupina koje služe za nukleaciju hidroksiapatita te prezasićenost kalcijevim i fosfatnim ionima u blizini površine materijala. Kada se navedeni uvjeti postignu, čimbenici poput kemijskog sastava, mikrostrukture i makrostrukture mogu utjecati na bioaktivnost u smislu ubrzavanja ili usporavanja procesa kristalizacije.

Obzirom da se fiziološki uvjeti znatno razlikuju ovisno o mjestu u organizmu, vrlo je bitno razmotriti ne samo svojstva materijala, poput prethodno navedenog sastava te mikro- i makrostrukture, već i uvjete u kojima će se materijal naći ugrađivanjem u živi organizam. Pritom se uzima u obzir protok okolne tjelesne tekućine, koncentracija iona, prokrvljenost, pH vrijednost, dostupnost nutrijenata i slično. Sve navedeno ukazuje kako je dizajniranje i optimiranje bioaktivnih stakala kompleksan proces koji uključuje uzimanje u obzir niz parametara uz provedbu brojnih ispitivanja *in vivo* i *in vitro* s ciljem dobivanja materijala kao okosnice za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva.

4. LITERATURA

- [1] R. Langer i J. P. Vacanti, „Tissue Engineering“, *Science (1979)*, sv. 260, izd. 5110, str. 920–926, svi. 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [2] R. S. Katari, A. Peloso, i G. Orlando, „Tissue Engineering“, *Adv Surg*, sv. 48, izd. 1, str. 137–154, ruj. 2014, doi: 10.1016/j.yasu.2014.05.007.
- [3] H. A. Awad, R. J. O’Keefe, C. H. Lee, i J. J. Mao, „Bone Tissue Engineering“, u *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2014, str. 1733–1743. doi: 10.1016/B978-0-12-398358-9.00083-5.
- [4] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, i A. P. Tomsia, „Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives“, *Materials Science and Engineering: C*, sv. 31, izd. 7, str. 1245–1256, lis. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.04.022.
- [5] N. Eliaz, „Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review“, *Materials*, sv. 12, izd. 3, str. 407, sij. 2019, doi: 10.3390/ma12030407.
- [6] L. L. Hench i T. Kokubo, „Properties of bioactive glasses and glass-ceramics“, u *Handbook of Biomaterial Properties*, Boston, MA: Springer US, 1998, str. 355–363. doi: 10.1007/978-1-4615-5801-9_22.
- [7] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, i T. K. Greenlee, „Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials“, *J Biomed Mater Res*, sv. 5, izd. 6, str. 117–141, stu. 1971, doi: 10.1002/jbm.820050611.
- [8] L. Hench, „Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle“.
- [9] G. Piotrowski, L. L. Hench, W. C. Allen, i G. J. Miller, „Mechanical studies of the bone bioglass interfacial bond“, *J Biomed Mater Res*, sv. 9, izd. 4, str. 47–61, srp. 1975, doi: 10.1002/jbm.820090408.
- [10] J. Wilson, G. H. Pigott, F. J. Schoen, i L. L. Hench, „Toxicology and biocompatibility of bioglasses“, *J Biomed Mater Res*, sv. 15, izd. 6, str. 816–817, stu. 1981, doi: 10.1002/jbm.820150605.

- [11] L. 'Hench i J. 'Wilson, „Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants“, *J Oral Implantol*, 1993.
- [12] R. Li, A. E. Clark, i L. L. Hench, „An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing“, *Journal of Applied Biomaterials*, sv. 2, izd. 4, str. 231–239, 1991, doi: 10.1002/jab.770020403.
- [13] H. Oonishi *i ostali*, „Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes“, *J Biomed Mater Res*, sv. 44, izd. 1, str. 31–43, sij. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199901)44:1<31::AID-JBM4>3.0.CO;2-9.
- [14] D. Mohamad Yunos, O. Bretcanu, i A. R. Boccaccini, „Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds“, *J Mater Sci*, sv. 43, izd. 13, str. 4433–4442, srp. 2008, doi: 10.1007/s10853-008-2552-y.
- [15] I. D. Xynos, M. V. J. Hukkanen, J. J. Batten, L. D. Buttery, L. L. Hench, i J. M. Polak, „Bioglass ®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering“, *Calcif Tissue Int*, sv. 67, izd. 4, str. 321–329, lis. 2000, doi: 10.1007/s002230001134.
- [16] P. Sepulveda, J. R. Jones, i L. L. Hench, „Bioactive sol-gel foams for tissue repair“, *J Biomed Mater Res*, sv. 59, izd. 2, str. 340–348, velj. 2002, doi: 10.1002/jbm.1250.
- [17] I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, i R. G. Hill, „Structural analysis of bioactive glasses“, *J Non Cryst Solids*, sv. 351, izd. 2, str. 173–183, sij. 2005, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2004.07.067.
- [18] O. Mahony *i ostali*, „Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration“, *Adv Funct Mater*, sv. 20, izd. 22, str. 3835–3845, stu. 2010, doi: 10.1002/adfm.201000838.
- [19] C. Pandis *i ostali*, „Porous Polylactic Acid-Silica Hybrids: Preparation, Characterization, and Study of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation“, *Macromol Biosci*, sv. 15, izd. 2, str. 262–274, velj. 2015, doi: 10.1002/mabi.201400339.
- [20] Y. Shirosaki *i ostali*, „In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes“, *Biomaterials*, sv. 26, izd. 5, str. 485–493, velj. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.056.

- [21] V. Miguez Pacheco, D. Greenspan, L. Hench, i A. Boccaccini, „Bioactive glasses in soft tissue repair“, 2015.
- [22] W. Voger, *Kemija stakla*. Zagreb: SKTH, Kemija u industriji, 1985.
- [23] C. Calahoo i L. Wondraczek, „Ionic glasses: Structure, properties and classification“.
- [24] M. Edén, „The split network analysis for exploring composition–structure correlations in multi-component glasses: I. Rationalizing bioactivity-composition trends of bioglasses“, *J Non Cryst Solids*, sv. 357, izd. 6, str. 1595–1602, ožu. 2011, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2010.11.098.
- [25] A. Tilocca, „Structural models of bioactive glasses from molecular dynamics simulations“, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, sv. 465, izd. 2104, str. 1003–1027, tra. 2009, doi: 10.1098/rspa.2008.0462.
- [26] D. S. Brauer, „Bioactive Glasses-Structure and Properties“, *Angewandte Chemie International Edition*, sv. 54, izd. 14, str. 4160–4181, ožu. 2015, doi: 10.1002/anie.201405310.
- [27] E. Fiume, J. Barberi, E. Verné, i F. Baino, „Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies“, *J Funct Biomater*, sv. 9, izd. 1, str. 24, ožu. 2018, doi: 10.3390/jfb9010024.
- [28] F. Hmood, O. Goerke, i F. Schmidt, „Chemical Composition Refining of Bioactive Glass for Better Processing Features, Part I“, *Biomedical Glasses*, sv. 4, izd. 1, str. 82–94, kol. 2016, doi: 10.1515/bglass-2018-0008.
- [29] L. L. Hench, „Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications“, *New Journal of Glass and Ceramics*, sv. 03, izd. 02, str. 67–73, 2013, doi: 10.4236/njgc.2013.32011.
- [30] M. Ivanković, H. Ivanković, M. Antunović, A. Rogina, A. Ressler, i L. Bauer, „Preparation of 3D Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering“, *Kemija u industriji*, sv. 68, izd. 9–10, str. 457–468, 2019, doi: 10.15255/KUI.2019.030.
- [31] J. R. JONES, „Scaffolds for tissue engineering“, u *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, Elsevier, 2005, str. 201–214. doi: 10.1533/9781845690861.4.201.

- [32] A. G. Clare, „The Unique Nature of Glass“, u *Bio-Glasses*, Wiley, 2012, str. 1–12. doi: 10.1002/9781118346457.ch1.
- [33] L. L. Hench, „Bioceramics: From Concept to Clinic“, *Journal of the American Ceramic Society*, sv. 74, izd. 7, str. 1487–1510, srp. 1991, doi: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [34] S. Radin, P. Ducheyne, B. Rothman, i A. Conti, „The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass“, *J Biomed Mater Res*, sv. 37, izd. 3, str. 363–375, pros. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19971205)37:3<363::AID-JBM7>3.0.CO;2-J.
- [35] A. C. PROFETA i G. M. PRUCHER, „Bioactive-glass in periodontal surgery and implant dentistry“, *Dent Mater J*, sv. 34, izd. 5, str. 559–571, 2015, doi: 10.4012/dmj.2014-233.
- [36] A. Tilocca, A. N. Cormack, i N. H. de Leeuw, „The Structure of Bioactive Silicate Glasses: New Insight from Molecular Dynamics Simulations“, *Chemistry of Materials*, sv. 19, izd. 1, str. 95–103, sij. 2007, doi: 10.1021/cm061631g.
- [37] D. S. Brauer i L. Hupa, „Glass as a biomaterial: strategies for optimising bioactive glasses for clinical applications“, *Comptes Rendus. Géoscience*, sv. 354, izd. S1, str. 185–197, pros. 2022, doi: 10.5802/crgeos.134.
- [38] L. L. Hench, „The story of Bioglass®“, *J Mater Sci Mater Med*, sv. 17, izd. 11, str. 967–978, stu. 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [39] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, i T. Yamamuro, „Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid“, *J Mater Sci Mater Med*, sv. 3, izd. 2, str. 79–83, ožu. 1992, doi: 10.1007/BF00705272.
- [40] S. K. Nandi, A. Mahato, B. Kundu, i P. Mukherjee, „Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration“, u *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, InTech, 2016, str. 288–289. doi: 10.5772/63266.
- [41] D. Zhang, M. Hupa, H. T. Aro, i L. Hupa, „Influence of fluid circulation on in vitro reactivity of bioactive glass particles“, *Mater Chem Phys*, sv. 111, izd. 2–3, str. 497–502, lis. 2008, doi: 10.1016/j.matchemphys.2008.04.055.

- [42] M. Siekkinen, O. Karlström, i L. Hupa, „Effect of local ion concentrations on the in vitro reactions of bioactive glass 45S5 particles“, *Int J Appl Glass Sci*, sv. 13, izd. 4, str. 695–707, lis. 2022, doi: 10.1111/ijag.16579.
- [43] S. S. Danewalia i K. Singh, „Bioactive glasses and glass–ceramics for hyperthermia treatment of cancer: state-of-art, challenges, and future perspectives“, *Mater Today Bio*, sv. 10, str. 100100, ožu. 2021, doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100100.
- [44] R. K. Singh i A. Srinivasan, „Magnetic properties of bioactive glass-ceramics containing nanocrystalline zinc ferrite“, *J Magn Magn Mater*, sv. 323, izd. 3–4, str. 330–333, velj. 2011, doi: 10.1016/j.jmmm.2010.09.029.
- [45] M. Edén, „The split network analysis for exploring composition–structure correlations in multi-component glasses: I. Rationalizing bioactivity-composition trends of bioglasses“, *J Non Cryst Solids*, sv. 357, izd. 6, str. 1595–1602, ožu. 2011, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2010.11.098.
- [46] A. N. Cormack, „The Structure of Bioactive Glasses and Their Surfaces“, u *Bio-Glasses*, Wiley, 2012, str. 65–74. doi: 10.1002/9781118346457.ch5.
- [47] Manupriya i ostali, „Compositional dependence of in-vitro bioactivity in sodium calcium borate glasses“, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, sv. 70, izd. 8, str. 1137–1141, kol. 2009, doi: 10.1016/j.jpcs.2009.05.025.
- [48] W. Liang, C. Rüssel, D. E. Day, i G. Völksch, „Bioactive comparison of a borate, phosphate and silicate glass“, *J Mater Res*, sv. 21, izd. 1, str. 125–131, sij. 2006, doi: 10.1557/jmr.2006.0025.
- [49] Manupriya, K. S. Thind, K. Singh, G. Sharma, i V. Rajendran, „Influence of addition of Al₂O₃ on physical, structural, acoustical and in-vitro bioactive properties of phosphate glasses“, *physica status solidi (a)*, sv. 206, izd. 7, str. 1447–1455, srp. 2009, doi: 10.1002/pssa.200824426.
- [50] A. Shearer, M. Montazerian, i J. C. Mauro, „Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics“, *J Non Cryst Solids*, sv. 608, str. 122228, svi. 2023, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122228.

- [51] S. S. Danewalia i K. Singh, „Magnetic and bioactive properties of MnO₂/Fe₂O₃ modified Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ glasses and nanocrystalline glass-ceramics“, *Ceram Int*, sv. 42, izd. 10, str. 11858–11865, kol. 2016, doi: 10.1016/j.ceramint.2016.04.108.
- [52] D. S. Brauer, „Bioactive Glasses-Structure and Properties“, *Angewandte Chemie International Edition*, sv. 54, izd. 14, str. 4160–4181, ožu. 2015, doi: 10.1002/anie.201405310.
- [53] P. Sepulveda, J. R. Jones, i L. L. Hench, „In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses“, *J Biomed Mater Res*, sv. 61, izd. 2, str. 301–311, kol. 2002, doi: 10.1002/jbm.10207.
- [54] A. Nommeots-Nomm, L. Hupa, D. Rohanová, i D. S. Brauer, „A review of acellular immersion tests on bioactive glasses—influence of medium on ion release and apatite formation“, *Int J Appl Glass Sci*, sv. 11, izd. 3, str. 537–551, srp. 2020, doi: 10.1111/ijag.15006.
- [55] D. C. Greenspan, J. P. Zhong, i G. P. LaTorre, „Effect of Surface Area to Volume Ratio on In Vitro Surface Reactions of Bioactive Glass Particulates“, u *Bioceramics*, Elsevier, 1994, str. 55–60. doi: 10.1016/B978-0-08-042144-5.50012-1.
- [56] A. M. Gatti, G. Valdrè, i Ö. H. Andersson, „Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue“, *Biomaterials*, sv. 15, izd. 3, str. 208–212, velj. 1994, doi: 10.1016/0142-9612(94)90069-8.
- [57] P. Sepulveda, J. R. Jones, i L. L. Hench, „Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses“, *J Biomed Mater Res*, sv. 58, izd. 6, str. 734–740, 2001, doi: 10.1002/jbm.10026.
- [58] J. Huang, „Design and Development of Ceramics and Glasses“, u *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, Elsevier, 2017, str. 315–329. doi: 10.1016/B978-0-12-802734-9.00020-2.
- [59] C. Wu i J. Chang, „Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application“, *Interface Focus*, sv. 2, izd. 3, str. 292–306, lip. 2012, doi: 10.1098/rsfs.2011.0121.
- [60] Ö. H. Andersson i K. H. Karlsson, „On the bioactivity of silicate glass“, *J Non Cryst Solids*, sv. 129, izd. 1–3, str. 145–151, ožu. 1991, doi: 10.1016/0022-3093(91)90090-S.

- [61] F. Hmood, O. Goerke, i F. Schmidt, „Chemical Composition Refining of Bioactive Glass for Better Processing Features, Part I“, *Biomedical Glasses*, sv. 4, izd. 1, str. 82–94, kol. 2016, doi: 10.1515/bglass-2018-0008.
- [62] E. A. Abou Neel, D. M. Pickup, S. P. Valappil, R. J. Newport, i J. C. Knowles, „Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses“, *J. Mater. Chem.*, sv. 19, izd. 6, str. 690–701, 2009, doi: 10.1039/B810675D.
- [63] K. Sklepić Kerhač, „Utjecaj miješanih staklotvoraca na električni prijenos u alkalijским germano(boro)fosfatnim staklima“, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2020.
- [64] J. E. SHELBY, „Thermal Expansion of Alkali Borate Glasses“, *Journal of the American Ceramic Society*, sv. 66, izd. 3, str. 225–227, ožu. 1983, doi: 10.1111/j.1151-2916.1983.tb10023.x.
- [65] S. Jung, „Borate based bioactive glass scaffolds for hard and soft tissue engineering“, MISSOURI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2010.
- [66] S. B. Jung, „Bioactive Borate Glasses“, u *Bio-Glasses*, Wiley, 2012, str. 75–95. doi: 10.1002/9781118346457.ch6.
- [67] A. Yao, D. Wang, W. Huang, Q. Fu, M. N. Rahaman, i D. E. Day, „In Vitro Bioactive Characteristics of Borate-Based Glasses with Controllable Degradation Behavior“, *Journal of the American Ceramic Society*, sv. 90, izd. 1, str. 303–306, sij. 2007, doi: 10.1111/j.1551-2916.2006.01358.x.
- [68] X. Liu i ostali, „Bioactive borosilicate glass scaffolds: in vitro degradation and bioactivity behaviors“, *J Mater Sci Mater Med*, sv. 20, izd. 6, str. 1237–1243, lip. 2009, doi: 10.1007/s10856-009-3691-7.
- [69] W. Huang, D. E. Day, K. Kittiratanapiboon, i M. N. Rahaman, „Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions“, *J Mater Sci Mater Med*, sv. 17, izd. 7, str. 583–596, srp. 2006, doi: 10.1007/s10856-006-9220-z.
- [70] D. Ege, K. Zheng, i A. R. Boccaccini, „Borate Bioactive Glasses (BBG): Bone Regeneration, Wound Healing Applications, and Future Directions“, *ACS Appl Bio Mater*, sv. 5, izd. 8, str. 3608–3622, kol. 2022, doi: 10.1021/acsabm.2c00384.

- [71] D. S. Brauer, „Phosphate Glasses“, u *Bio-Glasses*, Wiley, 2012, str. 45–64. doi: 10.1002/9781118346457.ch4.
- [72] D. S. Brauer, „Phosphate Glasses“, u *Bio-Glasses*, Wiley, 2012, str. 45–64. doi: 10.1002/9781118346457.ch4.
- [73] Brauer Delia, „Degradable Phosphate Glasses and Composite Materials for Biomedical Applications“, 2005.
- [74] B. C. Bunker, G. W. Arnold, i J. A. Wilder, „Phosphate glass dissolution in aqueous solutions“, *J Non Cryst Solids*, sv. 64, izd. 3, str. 291–316, svi. 1984, doi: 10.1016/0022-3093(84)90184-4.
- [75] P. J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, i C. Rey, „Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone“, *Calcif Tissue Int*, sv. 69, izd. 3, str. 121–129, ruj. 2001, doi: 10.1007/s002230010055.
- [76] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, i M. Mami, „*In vitro* bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium“, *J Biomed Mater Res A*, sv. 88A, izd. 4, str. 1087–1096, ožu. 2009, doi: 10.1002/jbm.a.31901.
- [77] A. Dobрева i I. Gutzow, „Kinetics of vitrification under electric fields“, *J Non Cryst Solids*, sv. 220, izd. 2–3, str. 235–242, stu. 1997, doi: 10.1016/S0022-3093(97)00280-9.
- [78] S. Haimi *i ostali*, „Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation“, *Acta Biomater*, sv. 5, izd. 8, str. 3122–3131, lis. 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.04.006.
- [79] A. Hoppe *i ostali*, „*In vitro* reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering“, *J Mater Chem B*, sv. 1, izd. 41, str. 5659, 2013, doi: 10.1039/c3tb21007c.
- [80] L. Esteban-Tejeda, F. Malpartida, A. Esteban-Cubillo, C. Pecharromán, i J. S. Moya, „Antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing copper nanoparticles“, *Nanotechnology*, sv. 20, izd. 50, str. 505701, pros. 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/50/505701.

- [81] S. A. Jones, P. G. Bowler, M. Walker, i D. Parsons, „Controlling wound bioburden with a novel silver-containing HydrofiberR dressing“, *Wound Repair and Regeneration*, sv. 12, izd. 3, str. 288–294, lip. 2004, doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012304.x.
- [82] J. Kuczek, J. Sułowska, R. Lach, i M. Szumera, „The glass formation and crystallization studies on iron phosphate–silicate glasses“, *J Therm Anal Calorim*, sv. 138, izd. 3, str. 1953–1964, stu. 2019, doi: 10.1007/s10973-019-08523-y.
- [83] J. Coulter, „Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles“, *Int J Nanomedicine*, str. 2673, lip. 2012, doi: 10.2147/IJN.S31751.
- [84] V. Aina i ostali, „Gold-containing bioactive glasses: a solid-state synthesis to produce alternative biomaterials for bone implantations.“, *J R Soc Interface*, sv. 10, izd. 82, str. 20121040, svi. 2013, doi: 10.1098/rsif.2012.1040.
- [85] A. Dreanca i ostali, „Bioactive glass-biopolymers-gold nanoparticle based composites for tissue engineering applications“, *Materials Science and Engineering: C*, sv. 123, str. 112006, tra. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112006.