

Struktura i svojstva kationima dopiranog hidroksiapatita za biomedicinsku primjenu - literaturni pregled

Marjanović, Valeria

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:371686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valeria Marjanović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I INŽENJERSTVA
MATERIJALA

Valeria Marjanović

**STRUKTURA I SVOJSTVA KATIONIMA DOPIRANOG
HIDROKSIAPATITA U BIOMEDICINSKE SVRHE
(literaturni pregled)**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

prof. dr. sc. Marica Ivanković

izv. prof. dr. sc. Nevenka Vrbos

Zagreb, rujan 2018.

Zahvaljujem se profesoru H. Ivankoviću na stručnom vodstvu i mogućnosti izrade završnog rada. Također se zahvaljujem asistentici A. Ressler na prijedlozima i korisnim savjetima. Posebna zahvala obitelji, prijateljima i kolegama koji su bili velika potpora i oslonac tijekom mog studija.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva | 2 |
| 2.2. Građa kostiju | 4 |
| 2.3. Hidroksiapatit | 6 |
| 2.3.1. Metode dobivanja hidroksiapatita | 7 |
| 3. DOPIRANJE HIDROKSIAPATITA | 12 |
| 3.1. Hidroksiapatit dopiran cinkom | 14 |
| 3.2. Hidroksiapatit dopiran stroncijem | 16 |
| 3.3. Hidroksiapatit dopiran magnezijem..... | 18 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 20 |
| 5. LITERATURA | 21 |
| 6. ŽIVOTOPIS..... | 25 |

SAŽETAK

Kosti svih kralježnjaka su prirodni kompozitni materijali, građeni od karbonatnog hidroksiapatita koji zauzima 65 % ukupne koštane mase, a ostatak mase su organske tvari i voda. U prirodni karbonatni hidroksiapatit ugrađeni su mnogobrojni metalni ioni u različitim masenim postotcima. Mnoga istraživanja usmjerena su na dopiranje hidroksiapatita cinkovim, stroncijevim i magnezijevim ionima u svrhu povećanja osteogenih svojstava umjetno dobivenih materijala za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva.

U ovom radu objašnjena je važnost sinteze metalnim ionima dopiranog hidroksiapatita za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Objašnjena su svojstva, kristalna struktura, način sinteze, uloga u organizmu te mehanizam supstitucije hidroksiapatita cinkovim, stroncijevim i magnezijevim ionima.

Ključne riječi: inženjerstvo koštanog tkiva, hidroksiapatit, dopiranje

SUMMARY

The bones of all vertebrates are natural composite materials, where one of the components is carbonate hydroxyapatite. Carbonate hydroxyapatite amounts to 65 % of total bone mass, with the remaining mass formed by organic matter and water. Natural carbonate hydroxyapatite is doped with different metal ions at different mass percentages. Many studies have been focused on doping hydroxyapatite with zinc, strontium and magnesium ions to increase osteogenic properties of artificially made materials for the applications in bone tissue engineering.

This paper explains crystal lattice of hydroxyapatite, synthesis method, biological role and the mechanism of hydroxyapatite doped with zinc, strontium and magnesium ions. Additionally, explains the importance of the doped hydroxyapatite synthesis for bone tissue engineering.

Key words: bone tissue engineering, hydroxyapatite, doping

1. UVOD

Gubitak kostiju tijekom traume te potrebni kirurški zahvati, često dovode do kritične veličine defekata kostiju za čiji je oporavak potrebna ugradnja zamjenskih dijelova. Komplikacije povezane s konvencionalnim metodama presađivanja (imunološka reakcija, odbacivanje implantata, potreban dodatni kirurški zahvat vađenja implantata itd.) dovele su do istraživanja i razvoja biološki aktivnih okosnica. Poboljšanje biološke aktivnosti i mehaničke čvrstoće kosti mogu se postići primjenom okosnica od biokeramike [1]. Biokeramika je biokompatibilna i biološki aktivna uz mogućnost direktnog vezanja na prirodno koštano tkivo. Najčešće korištena biokeramika u inženjerstvu koštanog tkiva su kalcijevi fosfati (CaP) od kojih je najpoznatiji hidroksiapatit [2].

Hidroksiapatit je anorganska komponenta prirodnog koštanog tkiva, koja čini 65 % njegove ukupne mase. Koristi se u biomedicini za izradu okosnica za kontrolirano otpuštanje lijekova i inženjerstvu koštanog tkiva. Hidroksiapatit povećava biokompatibilnost, biološku aktivnost i osteogena svojstva umjetno dobivenih materijala. U inženjerstvu koštanog tkiva koristi se kao punilo, premaz na metalnim implantatima ili anorganska komponenta unutar polimerne matrice. Sinteza hidroksiapatita, koji oponaša prirodnu strukturu karbonatnog hidroksiapatita, izazov je zbog mnogobrojnih prisutnih anionskih i kationskih supstitucija unutar njegove kristalne strukture [3]. Anionsko i kationsko dopiranje kristalne strukture utječe na morfologiju, stabilnost, topljivost, mehanička i biološka svojstva sintetskog hidroksiapatita [4].

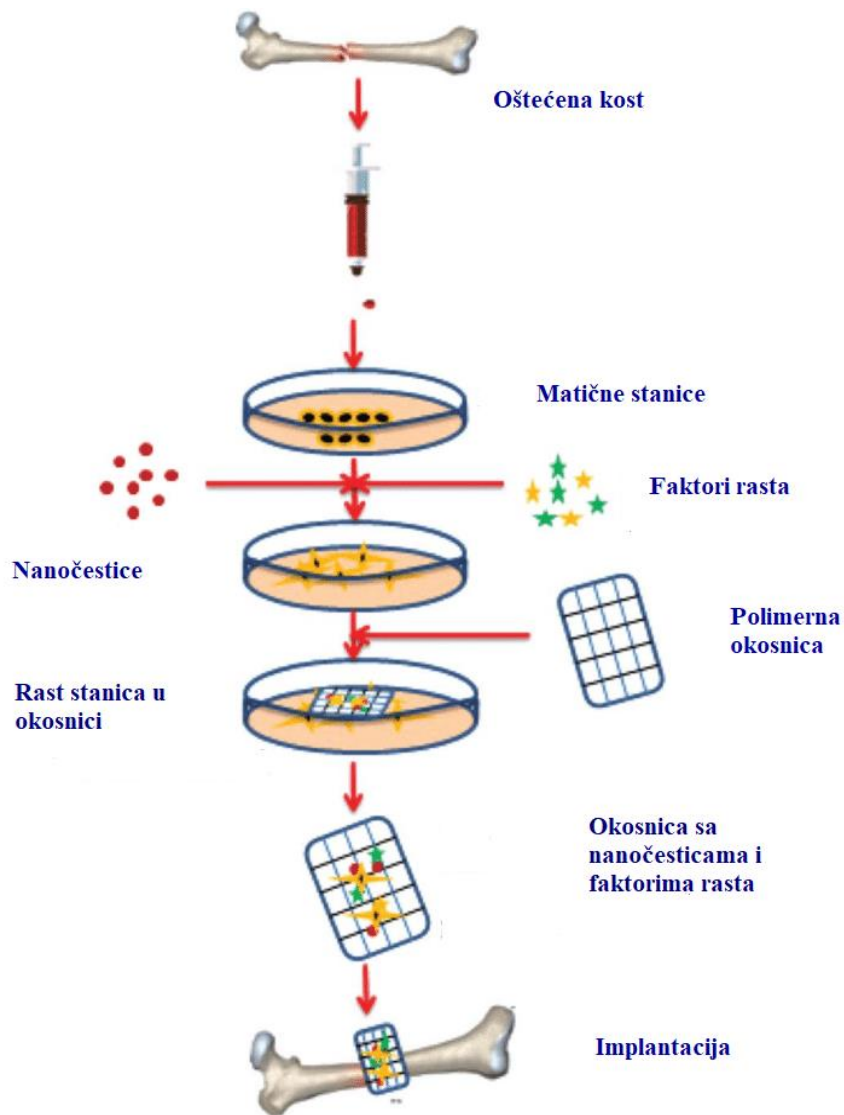
2. OPĆI DIO

2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo tkiva (engl. *tissue engineering*) je interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti, poput biologije i kemije, za razvijanje bioloških nadomjestaka koje bi vratile, zadržale ili poboljšale funkciju tkiva. Razne bolesti, traume i oštećenja koštanog tkiva potakla su razvoj inženjerstva koštanog tkiva (engl. *bone tissue engineering*). Mnoga istraživanja usmjerena su na razvoj strategija stvaranja novog koštanog tkiva koje uključuju ubrizgavanje stanica pacijenta ili donora na oštećeno mjesto tkiva (1) i primjenu umjetno stvorenih okosnica (2).

1. Dopušteno je ubrizgavanje samo onih stanica koje osiguravaju potrebnu funkciju i umnažanje stanica prije ubrizgavanja. Prednost ove metode je minimalni kirurški zahvat, a ograničenja uključuju neuspjeh ubrizganih stanica da zadrže svoju funkciju u primatelju, imunološko odbacivanje i primjena na koštanim oštećenjima malih dimenzija.
2. Regeneracija koštanog tkiva umjetno dobivenim okosnicama moguća je ugradnjom okosnice na oštećeno mjesto u cilju usmjeravanja regeneracije koštanog tkiva (stanice domaćina migriraju i razmnožavaju se na okosnici) ili okosnice služe kao nosači prethodno umnoženih i nasađenih stanica. Okosnice mogu biti građene od prirodnih (kolagen, fibrin, kitozan, želatina) ili sintetskih polimera (polimlječna kiselina, poliglikolna kiselina, poli(ϵ -kapolakton)) [5, 6].

Posljednjih godina intenzivno se istražuje stvaranje idealne koštane okosnice koja bi zamijenila oštećen dio koštanog tkiva [7]. Okosnica namijenjena za inženjerstvo koštanog tkiva mora biti izgrađena od biokompatibilnog i biorazgradivog materijala koji će osigurati mehaničku potporu [8]. Koncept inženjerstva koštanog tkiva pomoću umjetno dobivenih okosnica temelji se na izolaciji matičnih stanica pacijenta, poticanju njihove proliferacije uz faktore rasta i nanočestice kalcijско-fosfatnih faza te ugradnji stanica u polimernu okosnicu (slika 1.). Tako pripremljena okosnica ugrađuje se u oštećen dio koštanog tkiva kako bi se potakla njegova obnova.

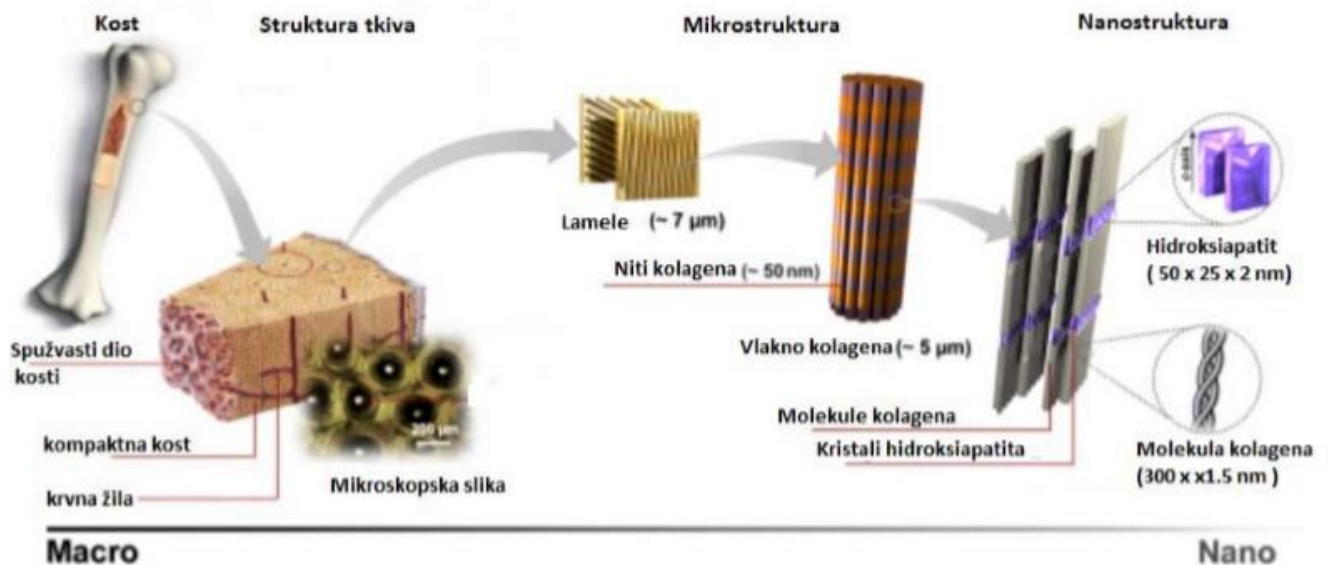


Slika 1. Koncept provedbe inženjerstva koštanog tkiva [8].

Mnoga istraživanja usmjerena su na *in situ* sintezu hidroksiapatita unutar polimerne matrice kao materijala za regeneraciju koštanog tkiva, zbog njegove kemijske sličnosti s anorganskom fazom (karbonatnim hidroksiapatitom) prirodnog mineralnog tkiva.

2.2. Građa kostiju

Kosti kralježnjaka prirodni su kompozitni materijali, građeni od karbonatnog hidroksiapatita (CHA) koji zauzima 65 % ukupne koštane mase, a ostatak čine kolagen i voda. Molekule kolagena tvore vlakna, makroskopske strukture, između kojih se nalaze nanokristali CHA [2]. Kristali CHA daju kosti čvrstoću dok vlakna kolagena daju fleksibilnost [9]. Kompaktan dio kosti tvori tvrdi vanjski sloj (kortikalni) koji pruža snažnu potporu ljudskom tijelu. Veće je gustoće i čini 80 % ukupne mase kostiju. Spužvasti (trabekularni) dio kosti sastoji se od malih prostornih šupljina u kojima se izmjenjuju hranjive tvari [10]. Na slici 2. je prikazana struktura kosti pri različitim uvećanjima, od makroskopske do nanometarske razine.



Slika 2. Struktura kosti pri različitim uvećanjima [11].

Kalcij fosfatna faza prirodnog koštanog tkiva je karbonatni hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona (engl. *calcium-deficient hydroxyapatite*, CDHA) s omjerom Ca/P oko 1,5 dok stehiometrijskom hidroksiapatitu odgovara omjer $\text{Ca/P} = 1,67$ [13]. Struktura prirodnog CDHA supstituirana je različitim ionima, a količina supstituiranih iona kreće se od većih (CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , F^- , Cl^-) do manjih udjela (Zn^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , SiO_4^{4-}) [12].

Prisutnost kationa i aniona u strukturi rešetke hidroksiapatita potiče vezanje stanica, proliferaciju osteoblasta i normalnu funkciju metabolizma koštanog tkiva [14]. U tablici 1. prikazan je kemijski sastav CDHA.

Tablica 1. Kemijski sastav prirodnog karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijeva iona [12].

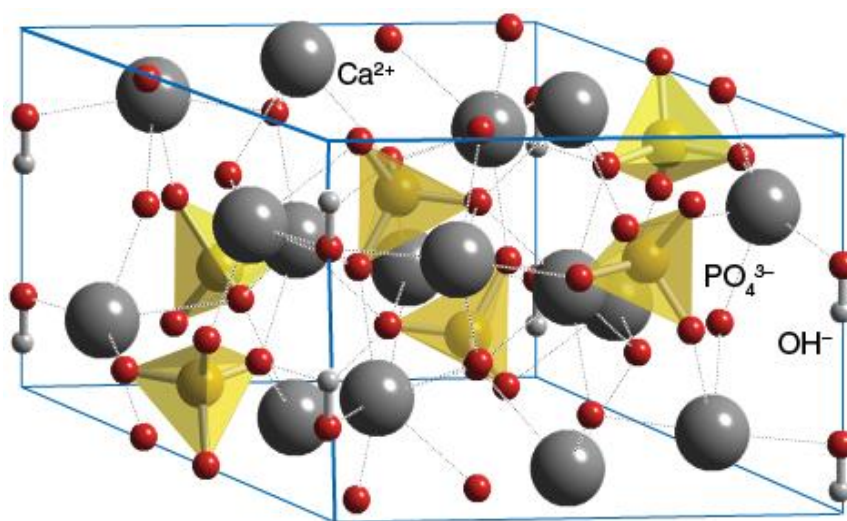
| Element | Ca | P | CO₃ | Na | K | Mg | Sr | Cl | F |
|----------------|-----------|----------|-----------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <i>wt/%</i> | 36,6 | 17,1 | 4,8 | 1,0 | 0,07 | 0,6 | 0,6 | 0,05 | 0,1 |

| Element | Zn | Cr | Co | Mn | Si |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Ppm</i> | 39,0 | 0,33 | <0,025 | 0,17 | 500 |

Iako koštane stanice čine manji dio volumena same kosti, one su presudne za njihovu funkciju. Unutar koštanog tkiva nalaze se četiri vrste stanica (osteoblasti, osteociti, osteoklasti i osteogene stanice) [9]. Proces nastajanja koštanog tkiva započinje aktivacijom osteoblasta. Osteoblasti sintetiziraju i otpuštaju kolagensku matricu, potrebnu za nastajanje osteoida (organske matrice koštanog tkiva). U zadnjem stadiju nastajanja koštanog tkiva, osteoid mineralizira kontroliranim taloženjem karbonatnog hidroksiapatita. Osteoblasti ostaju zarobljeni unutar mineralne faze te se razvijaju u osteocite koji kontinuirano zadržavaju aktivnost stvaranja kosti. Istovremeno, osteoklasti razaraju postojeće koštano tkivo stvarajući šupljine u koje se luči nova koštana matrica. Dinamički proces stvaranja i razgradnje kosti objašnjava rast tijekom razvojnih faza tijela, čuvajući oblik i konzistenciju te omogućujući regeneraciju nakon loma [2].

2.3. Hidroksiapatit

Apatiti su skupina spojeva opće formule $M_{10}(XO_4)_6Z_2$, gdje je M kation, a XO_4 i Z su anioni. Ime svakog apatita ovisi o kemijskim elementima i skupinama M, X i Z. Kemijska formula stehiometrijskog hidroksiapatita je $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ s Ca/P omjerom 1,67. Hidroksiapatit kristalizira u heksagonskoj jediničnoj ćeliji (slika 3.) s parametrima ćelije $a = b = 9,418 \text{ \AA}$ i $c = 6,884 \text{ \AA}$.



Slika 3. Kristalna rešetka hidroksiapatita [15].

Hidroksiapatit je pogodan biomaterijal za regeneraciju koštanog tkiva zbog biokompatibilnosti, biološke aktivnosti, sposobnosti direktnog vezivanja na prirodno koštano tkivo, poticanja osteokonduktivnih svojstava umjetno dobivenog materijala i daljnjeg rasta koštanog tkiva [1, 16, 17]. Biokompatibilnost i biološka aktivnost hidroksiapatita čine ga dobrim materijalom za koštane nadomjeske kao punilo, premaz ili anorganska faza u polimernoj matrici.

Kako bi se poboljšala fizikalno-kemijska i mehanička svojstva hidroksiapatita, istraživanja su usmjerena na modificiranje njegove strukture dopiranjem različitim metalnim ionima kako bi se po kemijskom sastavu približio prirodnom karbonatnom hidroksiapatitu.

Istraživanja su pokazala da dopiranjem strukture hidroksiapatita metalnih iona dolazi do promjene parametara kristalne rešetke, kristaliničnosti te drugih fizikalnih i kemijskih svojstava [18].

Struktura hidroksiapatita pogodna je za ionske supstitucije i stvaranje nestehiometrijskog hidroksiapatita s manjkom kalcijeva iona, čiji je Ca/P omjer niži od 1,67. Što je Ca/P omjer bliži 1.67, veća je stabilnost hidroksiapatita, dok sa smanjenjem omjera dolazi do povećanja topljivosti i bioaktivnosti. Tako se struktura i svojstva hidroksiapatita približavaju onima prirodnog karbonatnog hidroksiapatita [17]. Kalcijev ion unutar kristalne rešetke hidroksiapatita mogu supstituirati ioni Pb^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Li^+ , fosfatni ion supstituiraju CO_3^{2-} ili SiO_4^{4-} , dok hidroksidni ion supstituiraju F^- i Cl^- ioni [19].

2.3.1. Metode dobivanja hidroksiapatita

Veliki broj dosadašnjih istraživanja usmjeren je na metode pripreme hidroksiapatita koje se mogu podijeliti u nekoliko skupina:

Mokre metode

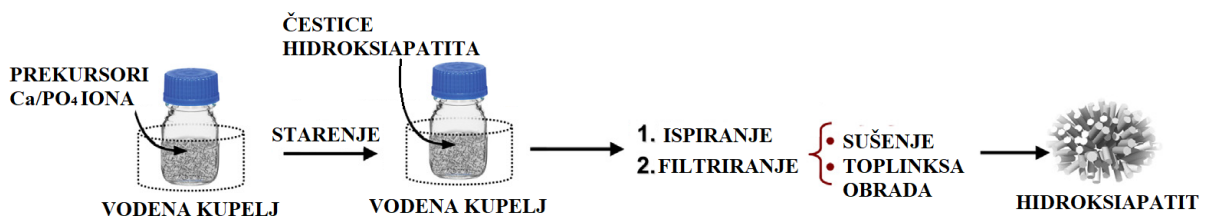
1. kemijsko taloženje
2. hidrotermalna metoda
3. sol-gel metoda
4. emulzijska metoda

Prednost mokrih metoda je mogućnost kontrole morfologije i veličine čestica dok su nedostaci niske temperature tijekom sinteze, zbog kojih se smanjuje stupanj kristalnosti i povećava mogućnost precipitacije drugih kalcij fosfatnih faza.

Kemijsko taloženje ili metoda precipitacije je najjednostavnija mokra metoda čija je prednost relativno velika količina dobivenog produkta u vodenom mediju. Reakcija precipitacije hidroksiapatita iz prekursora kalcijevih i fosfatnih iona uvjetovana je pH vrijednostima i niskom temperaturom (40-100°C). Zbog uvjeta sinteze kao produkt se dobiva hidroksiapatit niske kristalnosti [20].

Temperatura, pH i koncentracija prekursora moraju biti kontrolirani kako bi nastao homogeni produkt. Kako bi se povećao udio kristalne faze istaloženog kalcijevog fosfata, potrebna je naknadna toplinska obrada.

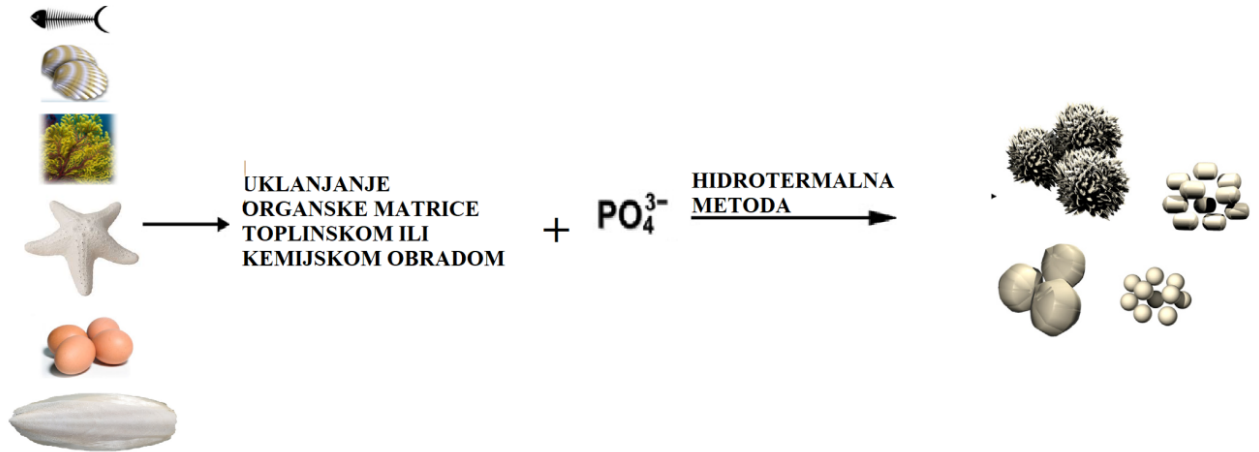
Kao izvor kalcijeva iona, Ca^{2+} , najčešće se koriste kalcijev hidroksid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) i kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), a fosfatnog iona, PO_4^{3-} , fosfatna kiselina (H_3PO_4) i diamonijev hidrogenfosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). U posljednjem koraku, dobivena suspenzija se ispiri, filtrira i suši [21]. Prednost metode precipitacije je mogućnost *in situ* sinteze hidroksiapatita unutar polimerne matrice što rezultira homogenom raspodjelom nanočestica unutar dobivene okosnice. Na slici 4. prikazan je postupak dobivanja hidroksiapatita metodom kemijskog taloženja.



Slika 4. Dobivanje hidroksiapatita metodom kemijskog taloženja [21].

Hidrotermalna metoda, uz metodu kemijskog taloženja, je najkorištenija metoda za pripremu hidroksiapatita. Zbog visoke temperature i tlaka koji se primjenjuju ovom metodom dobiveni stehiometrijski hidroksiapatit ima visoku kristalnost [22]. Hidrotermalna metoda često se koristi za prevođenje prirodnih bioloških struktura (npr. sipina kost, koralj, kost morske zvijezde) u hidroksiapatit uz očuvanje prirodne visokoporozne strukture [20]. Sipina kost je prirodan materijal zadovoljavajuće veličine i povezanosti pora. Očuvanje porozne strukture sipine kosti važno je za potencijalnu primjenu kao nadomjestak koštanom tkivu kako bi se omogućila difuzija kisika, hranjivih tvari i metaboličkog otpada kroz pripremljenu okosnicu [23]. Uz poroznu strukturu, hidroksiapatit dobiven iz biogenih izvora, sadrži karbonatne i metalne ione unutar kristalne strukture, koji se nalaze u biogenom prekursoru. Dobivanje hidroksiapatita sintezom iz biogenih izvora uključuje toplinsku ili kemijsku obradu pri kojoj se uklanjaju organske tvari iz biogenog izvora (Slika 5.) [21]. U pripremljene strukture moguće je naknadno impregnirati polimer kako bi se poboljšala mehanička svojstva pripremljenog hidroksiapatita.

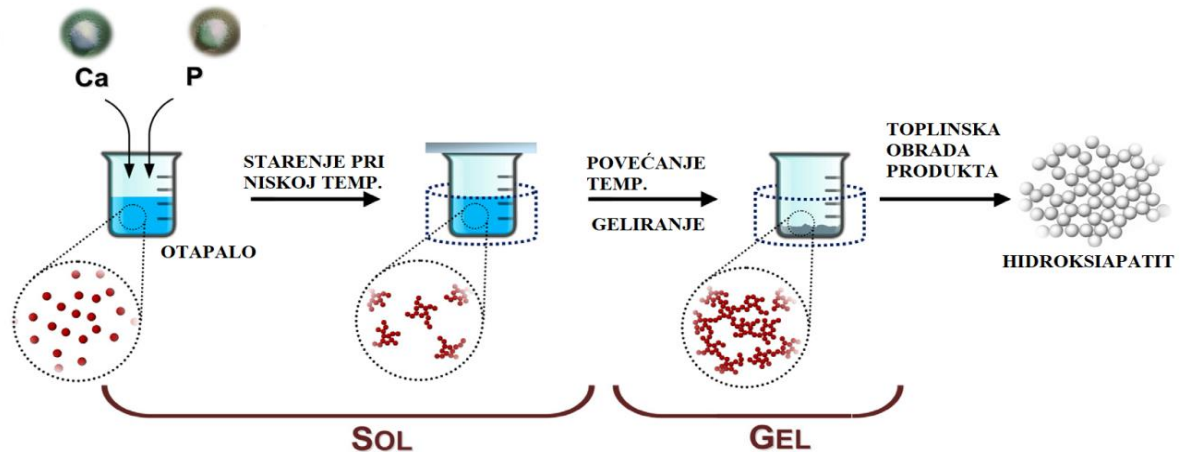
Tako pripremljen hidroksiapatit bolje je prihvaćen od strane ljudskog tijela zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava kao prirodni hidroksiapatit [20]. Dodatno, korištenje biogenih izvora je ekonomično i ekološki prihvatljivo. Međutim, ova metoda se ne može koristiti za *in situ* sintezu hidroksiapatita unutar polimerne matrice zbog uvjeta sinteze pri kojima dolazi do degradacije polimera.



Slika 5. Dobivanje hidroksiapatita iz biogenih izvora [21].

Prednosti *sol-gel metode* su niska temperatura sinteze te veća homogenost stehiometrijskog hidroksiapatita velike površine [20]. Prva faza je stvaranje „sola“ tj. disperzija krutih čestica (koloida) u kapljevine.

Prekursori (metalni alkoksidi i metalne soli, npr. kalcijev nitrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i fosforov V-oksidi, P_4O_{10}) se mehanički miješaju u otapalu pri pH vrijednosti koji onemogućuje taloženje. Reakcijama hidrolize i polikondenzacije monomerne jedinice se povezuju i tvore veze M – O – M unutar soli što uzrokuje povećanje viskoznosti i nastajanjem „gela“ [21, 22]. Sol-gel metoda sastoji se od miješanja prekursora u vodenom ili organskom otapalu pri čemu se prati starenje od sobne prema višim temperaturama. Nakon toga slijedi geliranje, sušenje na vrućoj ploči te uklanjanje organskih ostataka toplinskom obradom, kako bi se dobio konačan produkt, hidroksiapatit [21]. Na slici 6. prikazan je postupak dobivanja hidroksiapatita sol-gel metodom.



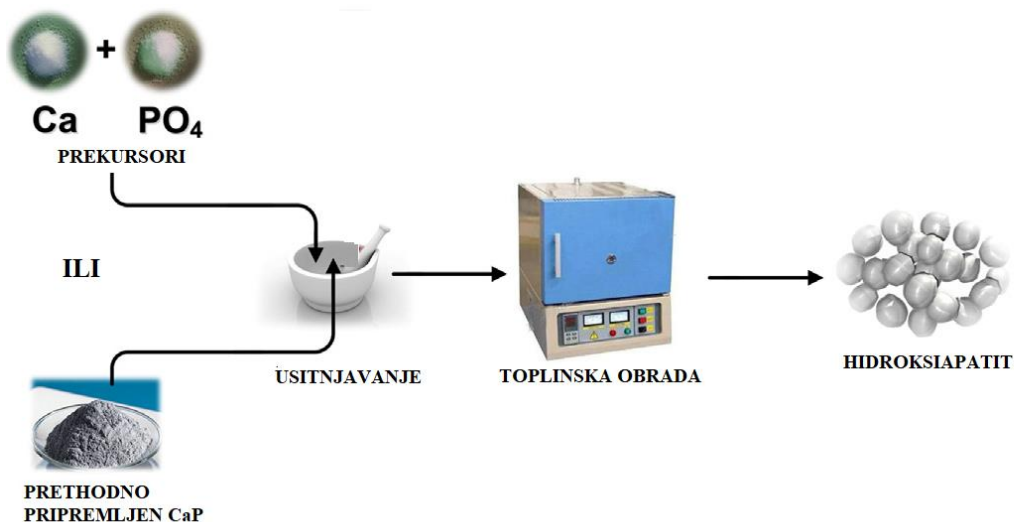
Slika 6. Dobivanje hidroksiapatita sol-gel metodom [21].

Emulzijska metoda provodi se pri niskim temperaturama uz mogućnost kontrole morfologije i veličine čestica hidroksiapatita. Prednost ove metode je sprječavanje aglomeracije čestica hidroksiapatita uz korištenje površinski aktivnih tvari. Veličina čestica hidroksiapatita ovisi o vrsti i koncentraciji površinski aktivne tvari. Međutim, zbog korištenja dodatnih tvari koje je potrebno naknadno ukloniti nije moguća *in situ* sinteza unutar polimerne matrice [20].

Suhe metode

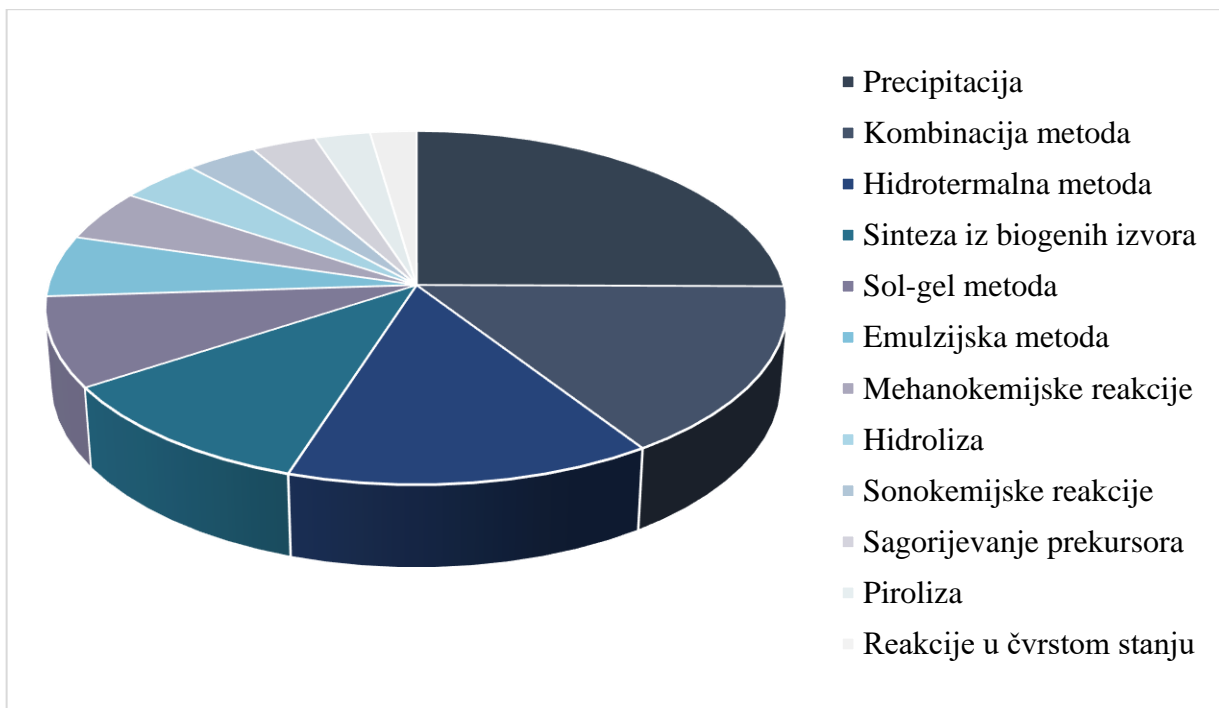
1. Reakcije u čvrstom stanju
2. Mehanokemijske reakcije

Za razliku od mokrih metoda, kod suhih metoda ne koristi se otapalo. Prekursori kalcijevih i fosfatnih iona se usitnjavaju i homogeniziraju, a zatim toplinski obrađuju na visokim temperaturama (Slika 7.).



Slika 7. Dobivanje hidroksiapatita suhim metodama [21].

Međutim, ova metoda se rijetko koristi zbog spore reakcije i mogućnosti nastanka drugih kalcij fosfatnih faza uz hidroksiapatit. Suhim metodama dobiva se hidroksiapatit uz prisutnost drugih kalcij fosfatnih faza te se zbog loše čistoće produkta rijetko koriste [21]. Na slici 8. prikazana je učestalost korištenja pojedinih metoda dobivanja hidroksiapatita.



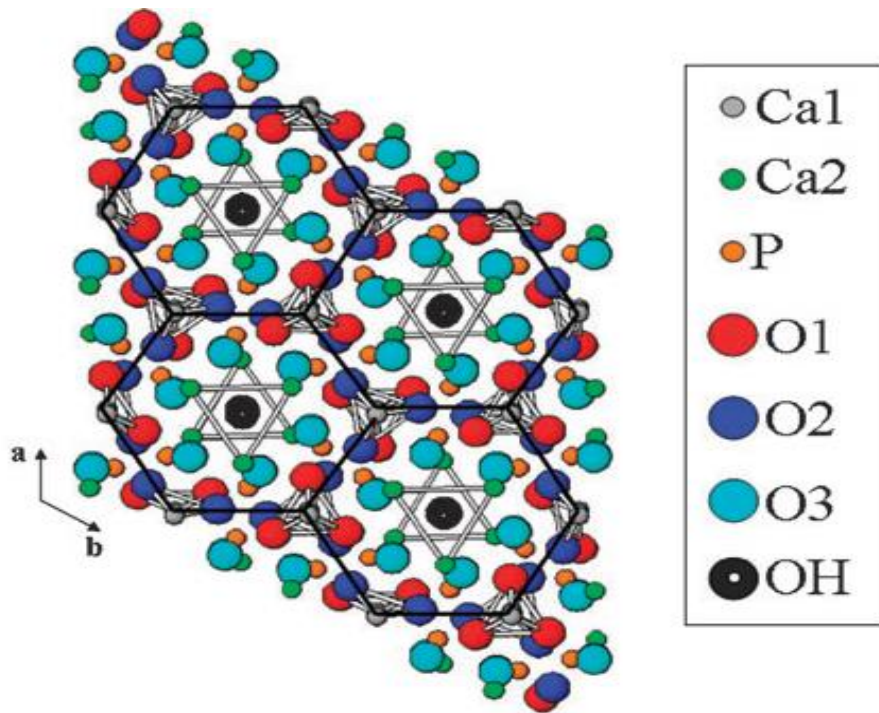
Slika 8. Prikaz učestalosti korištenja pojedine metode dobivanja hidroksiapatita [21].

3. DOPIRANJE HIDROKSIAPATITA

Kako bi se poboljšala osteogena svojstva, farmaceutici i faktori rasta (BMP-2, engl. *bone morphogenetic protein-2*) dodaju se u CaP. Međutim, novija istraživanja pokazala su moguće negativne posljedice takvih tvari primijenjenih za regeneraciju koštanog tkiva. Farmaceutici i faktori rasta su najčešće adsorbirani na površini čestica CaP i karakterizira ih brzo otpuštanje u okolno tkivo. Takve tvari uzrokuju rast koštanog tkiva na neželjenom mjestu ili prebrzi rast tkiva što može dovesti do oštećenja zdravog tkiva prilikom naprezanja. Zbog navedenog, sve se manje koriste faktori rasta i farmaceutici za poticanje osteogenih svojstava umjetno dobivenih materijala za regeneraciju koštanog tkiva te se traži zamjena tom pristupu.

Alternativni pristup je dopiranje strukture hidroksiapatita metalnim ionima prisutnima u prirodnom hidroksiapatitu (npr. Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , SiO_4^{4+} , Sr^{2+}). Elementi u tragovima su neophodni za stvaranje, rast i obnavljanje prirodnog koštanog tkiva. Dosadašnja istraživanja pokazala su da elementi u tragovima potiču stvaranje faktora rasta BMP-2 na prirodan način [24]. Dopiranjem strukture hidroksiapatita metalnim ionima poboljšavaju se njegova fizikalno-kemijska i mehanička svojstva [18]. Hidroksiapatit ima mogućnost supstitucije Ca^{2+} , PO_4^{3-} i OH^- iona metalnim i nemetalnim ionima uz zadržavanje heksagonske kristalne rešetke prostorne grupe $P6_3/m$ [25]. Mehanizam supstitucije ovisi o veličini zamjenskog iona, kinetici ionske izmjene i uvjetima reakcije [26]. Dopiranje hidroksiapatita metalnim ionima dovodi do promjena parametara kristalne rešetke, stupnja kristalnosti, morfologije i topljivosti bez promjene u simetriji [18]. Kalcijevi ioni u hidroksiapatitu pojavljuju se na dva različita položaja: Ca1 i Ca2 (Slika 9.), dok supstituirani metalni ioni mogu pretežno supstituirati jedan od njih ili istovremeno oba [27].

S obzirom na različite položaje koje zauzimaju atomi kalcija i kisika u prostornoj grupi $P6_3/m$, kemijska formula hidroksiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ može se pisati $\text{Ca}_4\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Tetraedar PO_4^{3-} grupe tvori osnovnu strukturnu jedinicu, a koordinacijom oko različitih Ca položaja definira $\text{Ca}_1\text{O}_3\text{O}_2$ metaprizmu i iskrivljeni $\text{Ca}_2\text{O}_1\text{O}_2\text{O}_3$ poliedar [25].



Slika 9. Ca1 i Ca2 položaj kalcija u hidroksiapatitu [25].

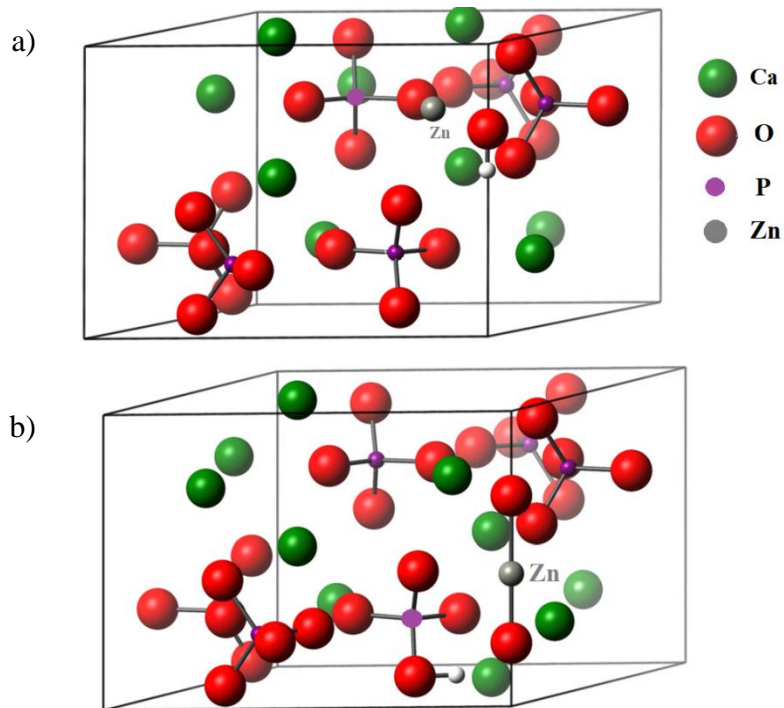
Cink, stroncij i magnezij u prirodnom koštanom tkivu potiču osteogenezu (rast i regeneraciju prirodnog koštanog tkiva). Zbog pozitivnog utjecaja na regeneraciju tkiva, sve je više istraživanja usmjereno na dopiranje strukture hidroksiapatita metalnim kationima.

3.1. Hidroksiapatit dopiran cinkom

Cink ima važnu ulogu u metaboličkom procesu prirodnog koštanog tkiva. Od ukupne količine cinka u ljudskom tijelu 30 % se nalazi u koštanom tkivu. Nedostatak cinka u tijelu dovodi do smanjenja gustoće koštanog tkiva što povećava rizik od prijeloma i oštećenja [18, 26, 28]. Dopiranje strukture hidroksiapatita cinkom (HAp-Zn) do 5 mol % povećavaju se antibakterijska svojstva, dok veće koncentracije uzrokuju toksičnost materijala. Cink potiče mineralizaciju (taloženje CaP) i stvaranje novog koštanog tkiva, a smanjuje njegovu resorpciju [26]. Dopiranjem strukture hidroksiapatita cinkom poboljšavaju se fizikalno-kemijska svojstva umjetno dobivenog materijala za primjene u biomedicini. Dolazi do promjene u morfologiji, stabilnosti, topljivosti, mehaničkim i biološkim svojstvima. Veća topljivost HAp-Zn rezultira bržim otpuštanjem Ca^{2+} i Zn^{2+} iona u okolno tkivo te tako povećava biološku aktivnost i osteokonduktivna svojstva biomaterijala [4].

HAp-Zn najčešće se sintetizira metodom kemijskog taloženja. Kao prekursor cinkova iona koristi se cinkov oksid (ZnO) i cinkov nitrat heksahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), kalcijeva iona kalcijeva lužina ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), a fosfatnih iona fosfatna kiselina (H_3PO_4) i diamonijev hidrogenfosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Cinkov ion ($0,74 \text{ \AA}$) ima manji radijus od kalcijeva iona ($0,99 \text{ \AA}$) te nakon supstitucije cinkovim ionom trebalo bi doći do smanjenja parametara elementarne rešetke. Međutim, prema literaturi rijetko dolazi do smanjenja parametara elementarne ćelije sa sve većim udjelom supstitucije cinkovim ionom [24]. U većini istraživanja dolazi do rasta parametara elementarne ćelije povećanjem udjela cinka, što se objašnjava supstitucijom OH^- grupa molekulama H_2O [30]. Friederichs i sur. [26] su uz moguće Ca1 i Ca2 položaje supstitucije, iznijeli mogućnost supstitucije cinkova iona na mjesto šupljina u strukturi hidroksiapatita. Položaj na c osi koji se nalazi između dva kisikova atoma naziva se 2b položaj te se, zbog malog radijusa cinkova iona, supstitucija može dogoditi na tom mjestu u strukturi hidroksiapatita (Slika 10.). Ukoliko dolazi do supstitucije na 2b položaju, duljina c osi raste sve većim udjelom cinka u strukturi jer cinkov ion povećava udaljenost između dva kisikova iona uzduž osi. Širenje c osi utječe na kisikove atome PO_4 grupe što rezultira smanjenjem a osi. Ukoliko dolazi do supstitucije na 2b položaj, rezultati infracrvene spektroskopske analize s Fourierovim transformacijama (FTIR) pokazuju karakterističnu vrpču za O – Zn – O vezu pri $736 - 740 \text{ cm}^{-1}$.

Međutim, prema Tang i sur. smanjenje a osi može biti posljedica supstitucije cinkova iona na Ca2 položaju, gdje dolazi do približavanja cinkova i hidroksidna iona [43]. Na slici 10. prikazana je supstitucija kalcijeva s cinkovim ionom na položaju Ca1 (a) i supstitucija cinka na 2b položaju uzduž c osi (b).



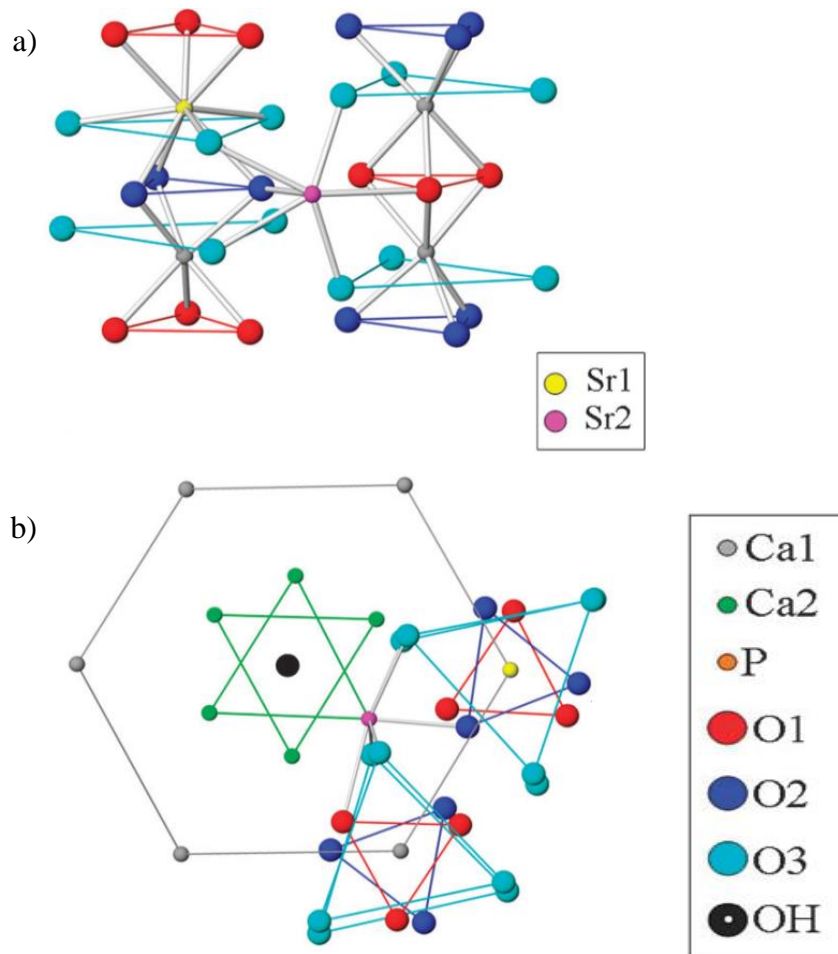
Slika 10. Supstitucija kalcijeva s cinkovim atomom na Ca1 položaju (a) i 2b položaju duž c osi između dva kisikova atoma (b) [26].

Cinkovi ioni inhibiraju kristalizaciju hidroksiapatita, a kataliziraju nastajanje drugih Zn-CaP faza [29]. Povećanjem koncentracije cinka, pikovi na difraktogramu dobiveni XRD analizom (engl. *X-ray diffraction*) postaju širi, zbog smanjenja kristaliničnosti povećanjem udjela cinka u strukturi hidroksiapatita. Sve većim udjelom cinka u strukturi hidroksiapatita smanjuje se Ca/P omjer te se na taj način približava Ca/P omjeru prirodnog hidroksiapatita koji iznosi oko 1,50 [4, 13, 29]. Deepa i sur. [30] pokazali su da HAp-Zn ima inhibirajući učinak na razvoj bakterija u odnosu na HAp te se kao takav može koristiti kao premaz metalnih nadomjestaka, smanjujući rizik upalnih reakcija i njihova odbacivanja [18].

3.2. Hidroksiapatit dopiran stroncijem

Zbog fizikalne i kemijske sličnosti kalciju, najveća količina stroncija u tijelu nalazi se u koštanom tkivu gdje je 0,035 % Ca^{2+} supstituirano Sr^{2+} ionom. Mnoga istraživanja usmjerena su na dopiranje strukture hidroksiapatita stroncijem zbog boljih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava u odnosu na čisti, nedopirani hidroksiapatit. *In vitro* istraživanja pokazala su da stroncij povećava vezanje, proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta te smanjuje aktivnost osteoklasta. Iz tog razloga biokeramika dopirana stroncijem potiče stvaranje koštanog tkiva i smanjuje njegovu resorpciju. Zbog navedenih svojstava stroncij ima ključnu ulogu u rastu kosti te se koristi za liječenje osteoporoze u obliku stroncijeve renalata [31, 32, 36].

Većina istraživača svojim su rezultatima pokazali da povećanjem koncentracije stroncija dolazi do povećanja parametara rešetke a i c , dok stupanj kristaliničnosti opada [34]. Zbog većeg ionskog radijusa stroncija (1,12 Å) u odnosu na kalcij (0,99 Å), veća je udaljenosti Sr – O u $\text{Sr}_1\text{O}_1\text{O}_3\text{O}_2\text{O}_3$ i $\text{Sr}_2\text{O}_1\text{O}_2\text{O}_3\text{O}_4(\text{OH})$ poliedru. Duljina Ca1 – O1 veze nedopiranog hidroksiapatita iznosi 2,40 Å, Ca1 – O2 2,43 Å, a Ca2 – O 2,33 Å. Duljina Sr1 – O1 i Sr1 – O2 veze stroncijem dopiranog hidroksiapatita iznosi 2,54 Å, a Sr2 – O veze 2,66 Å. Kao rezultat dulje veze dolazi do porasta parametara elementarne ćelije hidroksiapatita sa povećanjem udjela stroncija u strukturi. Pri nižim koncentracijama stroncij zauzima Ca1 položaj (do 3,5 %), a pri većim koncentracijama (≥ 6 %) zauzima Ca2 položaj. Zauzimanje položaja stroncija povezano je s geometrijom Ca1 i Ca2 položaja [25]. Na slici 11. shematski je prikaz supstitucije stroncijevim ionom na Ca1 i Ca2 položaju. Supstitucija je prikazana na dva načina: bočno (a) i odozgo (b).



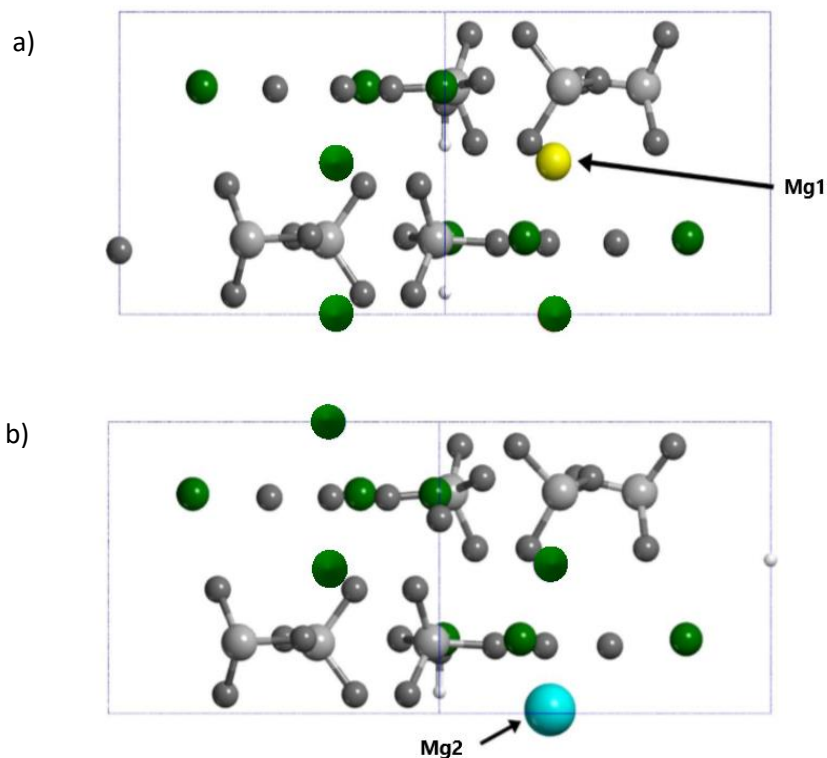
Slika 11. Prikaz supstitucije Sr1 i Sr2 položaja bočno (a) i odozgo (b) [25].

Istraživanja pokazuju da se stroncij može uspješno dopirati u strukturu hidroksiapatita do 15 mol % [33]. Hidroksiapatit koji je dopiran stroncijem je najčešće sintetiziran metodom kemijskog taloženja i sol-gel metodom. Kao prekursor stroncijevog iona koristi se stroncijev nitrat ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) i stroncijev oksid (SrO), kalcijeva iona kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), a fosfatnih iona diamonijev hidrogenfosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) [25, 31]. Topljivost hidroksiapatita raste, a toplinska stabilnost se smanjuje s povećanjem količine stroncija zbog narušene kristalne strukture. Ugrađivanjem stroncija u hidroksiapatitnu strukturu dolazi do formiranja čistog, ali nestehiometrijskog hidroksiapatita s niskim Ca/P omjerom [35].

3.3. Hidroksiapatit dopiran magnezijem

Magnezij je jedan od bitnih elemenata za žive organizme. Njegova količina u kostima i zubima je 60 - 65 % ukupne količine magnezija u ljudskom tijelu. Preostalih 35 - 40 % magnezija nalazi se u mišićnom tkivu, živčanim i drugim mekim tkivima te tjelesnim tekućinama. Magnezij sudjeluje u aktivnosti mišića, živčanog sustava, održavanju zdravlja kostiju (smanjenje rizika osteoporoze) te održavanju stabilnih otkucaja srca. Nedostatkom magnezija u organizmu nije moguća potpuna adsorpcija kalcija što rezultira smanjenjem gustoće kostiju i nastanka osteoporoze. Unatoč niskim koncentracijama u kosti (0.72 wt.%) magnezij ima odlučujuću ulogu u njegovom metabolizmu. Prema literaturi, upotreba magnezijem supstituiranih CaP za regeneraciju koštanog tkiva osigurati će se brži i učinkovitiji oporavak oštećene kosti [37].

Struktura hidroksiapatita sa supstituiran magnezijem na Ca2 položaju stabilnija je nego li na Ca1 položaju zbog niže energije. Supstitucija magnezija uzrokuje smanjenje parametara ćelije zbog čega dolazi do promjene u kutovima rešetke koje pridonose promjeni $P6_3/m$ simetrije [40]. Na slici 12. prikazana je supstitucija magnezija na Ca1 (a) i Ca2 (b) položaju.



Slika 12. Supstitucija magnezija na Ca1 (a) i Ca2 (b) položaju [40].

Prema literaturi, istraživanja se najčešće provode do 10 wt% supstitucije magnezijem. Manji radijus magnezija (0,72 Å) od radijusa kalcija (0,99 Å) uzrokuje smanjenje parametara elementarne ćelije hidroksiapatita. Zbog povećanja brzine nukleacije smanjuje se veličina kristala, to jest stupanj kristalnosti. Prisutnost atoma manjeg radijusa (magnezij i cink) inhibira kristalizaciju i smanjuje veličinu kristala. Magnezijem dopiran hidroksiapatit povećava proliferaciju i aktivnost osteoblasta, dok njegov nedostatak utječe na sve faze metabolizma kosti uzrokujući prestanak rasta i krhkost kostiju te smanjenje aktivnosti osteoblasta i osteoklasta [38, 41, 42]. Najčešće metode dobivanja magnezijem dopiranog hidroksiapatita su kemijska precipitacija i sol-gel metoda. Kao prekursor magnezijevog iona koristi se magnezijev nitrat heksahidrat ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i magnezijev klorid (MgCl_2), kalcijeva iona kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), a fosfatnih iona diamonijev hidrogenfosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) [38, 39].

4. ZAKLJUČAK

Prisutnost metalnih kationa u hidroksiapatitu poboljšava fizikalno-kemijska i biološka svojstva materijala za regeneraciju koštanog tkiva. Dopiranje strukture hidroksiapatita metalnim ionima alternativa je materijalima u koje se dodaju farmaceutici i faktori rasta.

Dodatno, korištenjem prekursora iz biogenih izvora (morski izvori) struktura hidroksiapatita dopirana je ionima prisutnima u moru. Glavni problem metalnih kationa u strukturi hidroksiapatita je koncentracija, koja ako je previsoka može biti toksična i negativno utjecati na okolno tkivo.

Teško je odrediti na kojem položaju dolazi do supstitucije metalnih kationa u kristalnoj rešetki hidroksiapatita. Položaj osim o vrsti i veličini iona, ovisi i o uvjetima sinteze (temperatura, tlak, pH). Daljnja istraživanja moraju biti usmjerena na određivanje optimalnog udjela supstitucije i najviša koncentracije metalnih kationa koja nema negativan utjecaj na okolno tkivo i pacijenta.

5. LITERATURA

1. Dhivya S., Saravanan S., Sastry T. P., Selvamurugan N., Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo, *J. Nanobiotechnol.*, **13** (2015) 15-40.
2. Vallet-Regi, M., González-Calbet, J. M., Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Ch.*, **32** (2004) 1-31.
3. Noor Z., Nanohydroxyapatite Application to Osteoporosis Management, *Journal of Osteoporosis*, (2013) 1-6.
4. Menghao W., Qun W., Xiong L., Kefeng W., Fuzeng R., Computer Simulation of Ions Doped Hydroxyapatite: A Brief Review, **32** (2017) 978-987.
5. Langer, R., Vacanti, J. P., Tissue Engineering, *Science*, **260** (1993) 920-926.
6. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D. S., Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *Int. J. Polym. Sci.*, (2011) 1-19.
7. Andrades J. A., Narváez-Ledesma L., Cerón-Torres L., Cruz-Amaya A. P., López-Guillén D., Mesa-Almagro M. L., Moreno-Moreno J. A., Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, (2013), 615-642.
8. Shukla A., Dasgupta N., Ranjan S., Singh S., Chidambaram R., Nanotechnology towards prevention of anemia and osteoporosis:from concept to market, *Biotechnol. Biotec. Eq.*, **31** (2017) 863-879.
9. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/6-3-bone-structure/> (pristup 11. travnja 2018.)
10. https://bodytomy.com/spongy-bone-vs-compact-bone_ (pristup 11. travnja 2018.)
11. Sdat-Shojai, M., Khorasani, M-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.*, **9** (2013) 7591-7621.
12. Boanini E., Gazzano M., Bigi A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.*, **6** (2010) 1882-1894.

13. Siddharthan A., Seshadri S. K., Sampath Kumar T .S., Rapid Synthesis of Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles by Microwave Irradiation, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **18** (2005) 110-113.
14. Zhou H., Multi-functions of carbonated calcium deficient hydroxyapatite (CDHA), *Dissertations And Theses*, 2012, str. 106
15. www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm (pristup 11. travnja 2018.)
16. www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=41625 (pristup 11. travnja 2018.)
17. Rivera-Muñoz E.M., Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization, *InTech*, 2011., str. 75.
18. Popa C.L., Deniaud A., Michaud-Soret I., Guégan R., Motelica-Heino M., Predoi D., Structural and Biological Assessment of Zinc Doped Hydroxyapatite Nanoparticles, *J. Nanomater.*, (2016) 1-10.
19. Ptáček P., Substituents and Dopants in the Structure of Apatite, Apatites and their Synthetic Analogues, *InTech*, 2016., str. 289.
20. www.slideshare.net/ahmedmostafahusseini/synthesis-of-hydroxyapatite-nanoparticles (pristup 11. travnja 2018.)
21. Sadat-Shojai M., Mohammad-Taghi K., Dinpanah-Khoshdargi E., Jamshidi A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures, *Acta Biomater.*, **9** (2013) 7591-7621.
22. Cox C. S., Synthesis methods of hydroxyapatite, (2014), 1-10
23. Milovac D., Gallego Ferrer G., Ivanković M., Ivanković H., PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity, *Material Science and Engineering C* **34** (2014) 437-445
24. Susmita B., Fielding G., Tarafder S., Bandyopadhyay A., Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics, *Trends Biotechnol.*, **31** (2013) 594-605.

25. Terra J., Dourado E. R., Eon J.-G., Ellis D. E., Gonzalez G., Rossi A. M., The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11** (2008) 568-577.
26. Friederichs R. J., Chappell H. F., Shepard D. V., Best S. M., Synthesis, characterization and modelling of zinc and silicate co-substituted hydroxyapatite, *J. R. Soc. Interface*, **12** (2015) 1-12.
27. www.electronicstructure.wikidot.com/cation-substitutions-in-hydroxyapatite (pristup 20.05.2018.)
28. Hyun-Ju S., Young-Eun C., Taewan K., Hong-In S., In-Sook K., Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells, **4** (2010) 356-361.
29. Fuzeng R., Renlong X., Xiang G., Yang L., Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites, *Acta Biomater.*, **5** (2009) 3141-3149.
30. Deepa C., Nishara Begum A., Aravindan S., Preparation and antimicrobial observations of zinc doped nanohydroxyapatite, *Nanosystems: Phys. Chem. Math.*, **4** (2013) 370 -377.
31. Özbek Y. Y., Bastan F. E., Üstel F., Synthesis and characterization of strontium-doped hydroxyapatite for biomedical applications, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **125** (2016) 745-750.
32. Zhang W., Shen Y., Pan H., Lin K., Liu X., Darvell B. W., Lu W. W., Chang J., Deng L., Wang D., Huang W., Effects of strontium in modified biomaterials, *Acta Biomater.*, **7** (2011) 800-808.
33. Mardziah C. M., Sopyan I., Ramesh S., Strontium-Doped Hydroxyapatite Nanopowder via Sol-Gel Method: Effect of Strontium Concentration and Calcination Temperature on Phase Behavior, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **23** (2009) 106-113.
34. O'Donnell M. D., Fredholm Y., de Rouffignac A., Hill R. G., Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites, *Acta Biomater.*, **4** (2008) 1455-1464.
35. Curran D. J., Fleming T. J., Towler M. R., Hampshire S., Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **4** (2011) 2063-2073.

36. Sila-Asna, Monnipha/Bunyaratvej, Ahnond/Maeda, Sakan/Kitaguchi, Hiromichi/Bunyaratavej, Narong, Osteoblast Differentiation and Bone Formation Gene Expression in Strontium-inducing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, *Kobe J. Med. Sci.*, **53** (2007) 25-35.
37. Stipniece L., Salma-Ancane K., Borodajenko N., Sokolova M., Jakovlevs D., Berzina-Cimdina L., Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method, *Ceram.Int.*, **40** (2014) 3261-3267.
38. Ziani S., Meski S., Khireddine H., Characterization of Magnesium-Doped Hydroxyapatite Prepared by Sol-Gel Process, *Int. J. Appl. Ceram. Tec.*, **11** (2014) 83-91.
39. Farzadi A., Bakhshi F., Solati-Hashjin M., Asadi-Eydivand M., Azuan abu Osman N., Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization, *Ceram. Int.*, **40** (2014) 6021-6029.
40. Imrie F. E., Corno M., Ugliengo P., Gibson I. R., Computational Studies of Magnesium and Strontium Substitution in Hydroxyapatite, *Key Eng. Mat.*, **529-530** (2013) 123-128.
41. Tampieri A., Celotti G., Landi E., Sandri M., Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization, *Key Eng. Mat.*, **264-268** (2004) 2051-2054.
42. Aina V., Lusvardi G., Annaz B., Gibson I. R., Imrie F. E., Malavasi G., Menabue L., Cerrato G., Martra G., Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of dopings on the structure and chemi-physical properties, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **23** (2012) 2867-2879.
43. Tang Y.Z., Chappell H.F., Dove M.T., Reeder R.J., Lee Y. J., 2009, Zinc incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials*, **30** (2009) 2864-2872.

6. ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnu školu sam završila 2010. godine nakon čega sam upisala Gimnaziju Sisak. Godine 2014. godine upisala sam preddiplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.