

In situ sinteza metalnim ionima dopiranog hidroksiapatita u polimernoj matrici kitozana

Paun, Helena

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:869122>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



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

Helena Paun

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

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

Helena Paun

***IN SITU* SINTEZA METALNIM IONIMA DOPIRANOG HIDROKSIAPATITA
U POLIMERNOJ MATRICI KITOZANA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

prof. dr. sc. Juraj Šipušić

dr. sc. Anamarija Rogina, poslijedoktorandica

Zagreb, rujan 2018.

Zahvale

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću na prihvaćenom mentorstvu i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Iskreno se zahvaljujem mag. ing. cheming. Antoniji Ressler na vodstvu, strpljenju i izdvojenom vremenu tijekom izrade rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji što mi je omogućila studij te na podršci i razumijevanju tijekom cijelog školovanja. Hvala i prijateljima koji su svojom prisutnošću uljepšali ovu etapu života.

Sažetak

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje usmjereno na razvoj biomaterijala za izradu trodimenzijskih okosnica koje oponašaju prirodno koštano tkivo. Okosnica se ugradnjom na oštećeno područje kosti sjedinjuje s okolnim tkivom, potiče njegovu regeneraciju, te se istovremeno razgrađuje i osigurava mjesto za rast novog koštanog tkiva. Okosnice koje oponašaju prirodno koštano tkivo izrađene su iz organsko- anorganskih kompozitnih materijala po uzoru na prirodno koštano tkivo koje se sastoji od istih. Organsku fazu čini izvanstanična matrica većinski građena od kolagena, koju zbog strukturalne sličnosti najčešće oponašaju prirodni polimeri. Hidroksiapatit je glavna anorganska komponenta koštanog tkiva, zbog čega se koristi kao anorganska faza u izradi okosnica. Biološki hidroksiapatit u svojoj strukturi sadrži elemente u tragovima koji su neophodni za metabolizam kosti i organizam. Mnoga istraživanja usmjerena su na dopiranje hidroksiapatita cinkovim ionom koji ima antibakterijska svojstva te pozitivno utječe na aktivnost osteoblasta i regeneraciju tkiva.

U ovom radu su pripremljeni uzorci cinkovim ionom dopiranog hidroksiapatita (0, 1, 5 i 10 mol% cinka) metodom precipitacije. Sinteza je provedena korištenjem prekursora kalcijevih iona iz biogenog i sintetskog izvora. Sastav uzoraka, prije i nakon toplinske obrade, utvrđen je rendgenskom difrakcijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama. Sintezom iz biogenog izvora nastaje dvofazni sustav hidroksiapatita i oktakalcij fosfata, dok iz sintetskog izvora jednofazni sustav hidroksiapatita. Nakon toplinske obrade uzoraka nastaje dvofazni sustav α i β -trikalcijev fosfata. Ugradnja cinkova iona u strukturu oktakalcij fosfata pentahidrata i β -trikalcijev fosfata praćena je promjenama parametara elementarne rešetke. Zbog neznatnih promjena parametara elementarne rešetke hidroksiapatita, pretpostavlja se da je došlo do adsorpcije cinkova iona na površinu kristala. Dodatno, provedena je *in situ* sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita (sintetski prekursor kalcijevih iona) u polimernoj matrici kitozana. Karakterizacija dobivenih poroznih struktura provedena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama i pretražnim elektronskim mikroskopom.

Ključne riječi: hidroksiapatit, cink, kitozan, *in situ*

***In situ* synthesis of metal ions substituted hydroxyapatite in chitosan matrix**

Summary

Bone tissue engineering is an interdisciplinary field focused on the development of biomaterials as three-dimensional scaffolds which mimic natural bone tissue. After implantation at injured site it integrates with the surrounding tissue, promotes bone regeneration, degrades and provides space for new bone tissue. The imitation of natural bone tissue is obtained by using biomaterials based on organic/inorganic materials. The organic phase is an extracellular matrix mostly composed of collagen. Due to its similarity to the extracellular matrix structure, the organic phase is often imitated by natural polymers. Hydroxyapatite is the major inorganic component of bone tissue and is often used in biomedical areas. Biological apatite contains trace elements in its structure which are essential for bone and body metabolism. Many studies have been focused on doping hydroxyapatite structure with zinc ion, which is interesting because of antibacterial properties and positive effect on osteoblastic and tissue regeneration activity.

In this study zinc doped hydroxyapatite (0, 1, 5 and 10 *mol%* zinc) was prepared by using precursors of calcium ions from biogenic and synthetic source. The composition of the samples was determined by X-ray diffraction analysis and infrared spectroscopy with Fourier transforms. From biogenic source was obtained two-phase system of hydroxyapatite and octacalcium phosphate pentahydrate, while from synthetic source one-phase system of hydroxyapatite. After heat treatment it was obtained two-phase system of α and β -tricalcium phosphate. Decrease of cell parameters of octacalcium phosphate pentahydrate and β -tricalcium phosphate confirmed doped structures with zinc ions. However, it can be assumed that hydroxyapatite is not zinc doped and that zinc ions are adsorbed on crystal surface as cell parameter did not decrease. Additionally, *in situ* synthesis of zinc doped hydroxyapatite (from synthetic source) within chitosan matrix was obtained. Characterization of porous structures was determined by infrared spectroscopy with Fourier transforms and scanning electron microscopy..

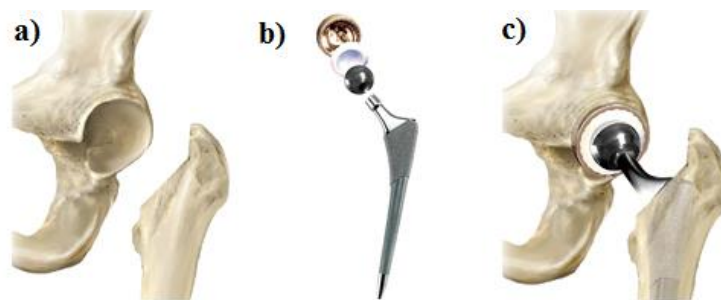
Key words: hydroxyapatite, zinc, chitosan, *in situ*

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	3
2.1. Inženjerstvo tkiva.....	3
2.1.1. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	4
2.2. Struktura kosti	5
2.3. Hidroksiapatit.....	7
2.3.3. Cinkom dopirani hidroksiapatit.....	9
2.4. Kitozan	11
3. Eksperimentalni dio	12
3.1. Sinteza materijala.....	12
3.2. Sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita	12
3.3. In situ sinteza cinkom dopiranaog hidroksiapatita u otopini kitozana	13
3.4. Postupak pripreme poroznih struktura	14
3.5. Metode karakterizacije	15
3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti tijekom sinteze	15
3.5.2. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama	15
3.5.3. Kvantitativna rendgenska difrakcijska analiza.....	15
3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija	15
4. Rezultati i rasprava	16
4.1. pH vrijednosti.....	16
4.2. FTIR spektroskopija.....	18
4.3. Identifikacija mineraloškog sastava	21
4.4. Mikrostruktura kompozitnih materijala	30
5. Zaključak	32
6. Literatura	33

1. Uvod

Biomaterijali su prirodni ili sintetski materijali na temelju polimera, metala i keramike koji ugradnjom u organizam djelomično ili potpuno zamjenjuju oštećeno tkivo kako bi se održala ili poboljšala kvaliteta života pacijenta [1]. Osnovna karakteristika biomaterijala je biokompatibilnost, koja podrazumijeva izostanak imunološke reakcije organizma i odbacivanje implantata. Razvoj biomaterijala opisuje se kroz tri generacije od kojih je svaka obilježena određenom osobinom kao odmak od prethodne. Prva generacija su bioinertni materijali kojima je glavni zadatak pružiti mehaničku potporu tkivu kojeg zamjenjuju. Veliki uspjeh postigli su u ortopediji, gdje su korišteni kao proteze zgloba kuka (Slika 1) [2].



Slika 1. Zamjena zgloba kuka (a) pripremljeno koštano ležište, (b) komponente implantata, (c) ugrađeni implantat [3].

Druga generacija su bioaktivni i resorbirajući biomaterijali. Primjer ovakvih biomaterijala su metalne proteze prevučene sintetskom biokeramikom kako bi se ostvarilo bioaktivno učvršćivanje. U odnosu na prve dvije, treća generacija objedinjuje svojstva kojima se potiče stanični odgovor na molekularnoj razini aktivirajući gene zaslužne za obnovu tkiva. Interdisciplinarno područje koje se bavi trećom generacijom biomaterijala naziva se inženjerstvo tkiva (engl. *tissue engineering*) kojim se oponašaju *in vivo* uvjeti uzgajanjem stanica na trodimenzijskim okosnicama (engl. *scaffold*) [2].

Razvoj biomaterijala odgovor je na sve veće zahtjeve medicine radi produljenja životnog vijeka ljudi te posljedičnog porasta broja stanovništva treće životne dobi. Koštana oboljenja i oštećenja uvelike utječu na kvalitetu života, a konvencionalna rješenja autografskim i alografskim koštanim implantatima su skupa i povezana s dodatnim zdravstvenim rizicima zbog potrebnih naknadnih kirurških zahvata, povećanim rizikom od infekcija, prijenosa bolesti i imunoloških reakcija [3]. Inženjerstvo koštanog tkiva usmjereno je na razvoj biomaterijala kao trodimenzijskih okosnica po uzoru na prirodno koštano tkivo kojeg čini izvanstanična matrica (engl. *extracellular matrix*, ECM) i stanice koštanog tkiva.

Idealna strategija inženjerstva koštanog tkiva uključuje biomaterijale koji sudjeluju u procesu oporavka. Biomaterijali za regeneraciju koštanog tkiva moraju biti biorazgradivi, bioaktivni, biokompatibilni, te istovremeno osiguravati mehaničku potporu. Struktura okosnice mora biti visokoporozna kako bi se osigurala difuzija kisika, hranjivih tvari i metaboličkih otpada [4,5].

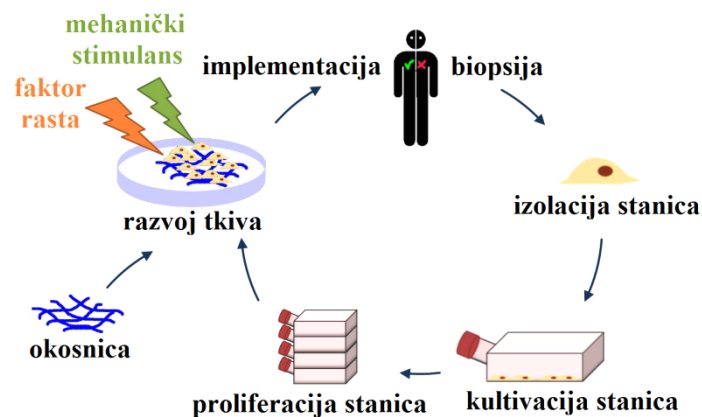
Izvanstanična matrica koštanog tkiva je prirodni kompozit organske faze sastavljene od kolagena i anorganske faze koja po kemijskim, strukturnim i morfološkim karakteristikama odgovara mineralu hidroksiapatitu [5]. U strukturi biološkog hidroksiapatita prisutne su niske koncentracije metalnih iona koje sudjeluju u metabolizmu kosti. Zbog toga se hidroksiapatit, kao bioaktivna keramika dobre biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti (okosnica potiče rast kosti), intenzivno istražuje te predstavlja poželjnu fazu u biomaterijalima za regeneraciju koštanog tkiva. Biomimetički pristup modifikacije stehiometrijskog hidroksiapatita, kako bi se ostvarila što veća sličnost biološkom hidroksiapatitu, ostvaruje se dopiranjem ionima koji pozitivno utječu na regeneraciju koštanog tkiva [6]. Većina istraživanja usmjerena je na dopiranje stehiometrijskog hidroksiapatita dobivenog iz sintetskih prekursora. Međutim, korištenjem materijala iz biogenih izvora pri sintezi hidroksiapatita očuvan je biokemijski sastav uz izvorno prisutne metalne ione. Najčešći biogeni izvori su sipina kost, koralji, školjke, goveđe kosti, ljuske jajeta i dr. [7]. Zbog antibakterijskih svojstava i pozitivnog utjecaja na aktivnost osteoblasta i regeneraciju tkiva, mnoga istraživanja usmjerena su na dopiranje hidroksiapatita cinkovim ionom [8].

2. Opći dio

2.1. Inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje regenerativne medicine usmjereno na regeneraciju i rekonstrukciju oštećenog tkiva ili organa primjenom znanja stanične i molekularne biologije, kemije, fizike i inženjerstva materijala. Princip inženjerstva tkiva osniva se na takozvanom regenerativnom trijasu koji se sastoji od konduktivnog, produktivnog i induktivnog dijela. Produktivni dio predstavljaju stanice kao temeljne biološke jedinice koje definiraju samu regeneraciju, induktivni dio je okolina koja modulira stanični odgovor zahvaljujući bioaktivnim signalima (faktori rasta), a konduktivni dio je trodimenzionalna okosnica već navedenih komponenti [9].

Stanice u prirodnom tkivu rastu unutar izvanstanične matrice koja se sastoji od složene trodimenzijske mreže. Interakcije stanica s drugim stanicama i ECM određuje hoće li doći do proliferacije (umnažanja), diferencijacije (razvoja) ili apoptoze (smrti) stanica. Stanicama uzgajanim na dvodimenzijским kulturama smanjuje se sposobnost preživljavanja, proliferacije i diferencijacije kao posljedica smanjenih staničnih funkcija uslijed niske difuzije kisika, hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Sve je veći interes za uzgajanje stanica na trodimenzijским okosnicama kako bi se oponašali *in vivo* uvjeti. Trodimenzijske okosnice pokazuju bolju adheziju, proliferaciju, morfologiju, ekspresiju gena i proteina te diferencijaciju stanica u usporedbi s dvodimenzijским kulturama. Princip inženjerstva tkiva zasniva se na izolaciji stanica uzetih biopsijom iz organizma, a potom uzgajanju na supstratu gdje dolazi do njihove proliferacije, dok im ne ostvari dovoljan broj. Zatim se nasađuju na okosnicu koja oponaša *in vivo* uvjete za njihov daljnji razvoj. Tako pripremljena okosnica ugrađuje se na oštećeno područje u tkivu (Slika 2) [10,11].



Slika 2. Temeljni princip inženjerstva tkiva [12].

Temeljni zahtjevi biomaterijala korištenih u inženjerstvu tkiva su biokompatibilnost, bioaktivnost, biorazgradivost i odgovarajuća mehanička svojstva. Biorazgradivi polimeri su osnovni materijali korišteni za izradu okosnica, a mogu biti klasificirani u dvije skupine: prirodni i sintetski. Sintetski polimeri imaju dobra mehanička svojstva, lako se oblikuju i svojstva su im jednaka od šarže do šarže. Međutim, površina im je hidrofobna i ne prepoznaje stanične signale, a karakterizira ih spora razgradnja pri fiziološkim uvjetima. Neki od polimera ove skupine korišteni u inženjerstvu tkiva su poli(laktidna-kiselina) (PLA), poli(glikolna kiselina) (PGA) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL). S druge strane, prirodni polimeri su bolje prihvaćeni od strane ljudskog organizma, te potiču staničnu adheziju i funkciju. Makromolekule prirodnih polimera imaju sličnu strukturu kao ECM te bolje oponašaju strukturu prirodnog tkiva. Njihov nedostatak su lošija mehanička svojstva. Najčešće korišteni prirodni polimeri su polisaharidi (škrob, hitin/kitozan, alginat, agaroz i derivati hijaluronske kiseline) i proteini (želatina, kolagen, svila) [11,13].

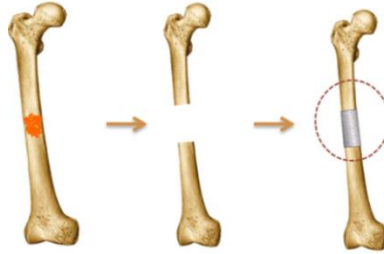
Inženjerstvo tkiva unaprijedilo je različita područja medicine, a ortopedija se ističe kao najprivlačnije područje primjene biomaterijala koje će potencijalno smanjiti potrebu za konvencionalnim implantatima [9].

2.1.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva temelji se na upotrebi trodimenzijskih okosnica za obnavljanje koštanog tkiva kod kojeg je došlo do zatajenja ili djelomičnog gubitka. Okosnica mora biti biokompatibilna, imitirati mikrostrukturu prirodnog koštanog tkiva i pružati mehaničku potporu okolnom tkivu. Visokoporozna struktura omogućuje vaskularizaciju, integraciju tkiva, protok kisika, hranjivih tvari, faktora rasta i metaboličkog otpada kroz okosnicu. Mehanička svojstva materijala uvjetovana su mjestom i veličinom oštećenja koštanog tkiva [13].

Sve veće zanimanje u području razvoja biomaterijala za regeneraciju koštanog tkiva usmjerena su na organsko/anorganske kompozitne materijale koji oponašaju prirodno koštano tkivo. Prednost ovakvih materijala u odnosu na konvencionalne materijale (metalni i keramički implantati) je biorazgradivost. Razgradnjom okosnice u organizmu ne zaostaje strano tijelo, te se time osigurava mjesto za stvaranje novog koštanog tkiva. Okosnica s nasađenim stanicama se kirurškim zahvatom ugrađuje na oboljelo ili defektno područje pri

čemu mora oblikom odgovarati tome području (Slika 3). S vremenom koštano tkivo se obnavlja i zamjenjuje ugrađenu okosnicu. Zbog resorpcije i zamjene novim prirodnim tkivom nije potreban kirurški zahvat uklanjanja, kao što je karakteristično za konvencionalne implantate [4,14].



Slika 3. Prikaz ugradnje biomaterijala na oštećeno područje kosti.

Kako bi se dizajnirao idealni biomaterijal za regeneraciju koštanog tkiva, potrebno je potpuno razumijevanje sastava, strukture te biomehaničkih i biokemijskih svojstava prirodnog koštanog tkiva.

2.2. Struktura kosti

Kosti kralješnjaka odlikuju se visokom čvrstoćom i elastičnošću, a glavna uloga im je biti potporanj tijelu, zaštita unutarnjih organa te održavanje mineralne homeostaze organizma. Koštano tkivo je kalcificirano vezivno tkivo kojeg čine stanice i izvanstanična matrica, a njegova uređenost i sastav ovise o zrelosti tkiva. Četiri osnovne vrste stanica prisutne u koštanom tkivu su osteoblasti, oseciti, pokrovne stanice i osteoklasti. Stanice su neophodne za rast, razvoj, oblikovanje, pregradnju i regeneraciji koštanog tkiva. Izvanstanična matrica koštanog tkiva sastoji se od organske i anorganske faze. Većinski maseni udio organskog dijela (osteoid) odnosi se na kolagen tip I koji daju čvrstoću i elastičnost kostima, zbog čega su one otporne na vlak i tlak. Vlakna kolagena pojedine koštane lamele međusobno su paralelna, a u susjednim lamelama su okomito postavljene. Anorganski dio koštanog tkiva čine voda (5-10%) i mineralni dio (50-70%) koji se sastoji se od kalcijeva fosfata u obliku karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijeva iona (engl. *calcium-deficient carbonated hydroxyapatite*, CDHA). CDHA uz karbonatni ion sadrži niz drugih iona u tragovima (tablica 1) koji su neophodni za metabolizam kosti i organizma. Kristali hidroksiapatita

nanometarskih veličina ($50 \times 25 \times 2$ nm) nalaze se između vlakna kolagena. Mineralna faza koštane matrice zaslužna je za visoku čvrstoću koštanog tkiva [15, 16].

Tablica 1. Udio pojedinih iona u anorganskoj fazi ljudske kosti [17].

ion	udio
Ca	36,6 (wt %)
P	17,1 (wt %)
CO ₂	4,8 (wt %)
Na	1,0 (wt %)
K	0,07 (wt %)
Mg	0,6 (wt %)
Sr	0,05 (wt %)
Cl	0,1 (wt %)
F	0,1 (wt %)
Zn	39 (ppm)
Cr	0,33 (ppm)
Co	<0,025 (ppm)
Mn	0,17 (ppm)
Si	500 (ppm)

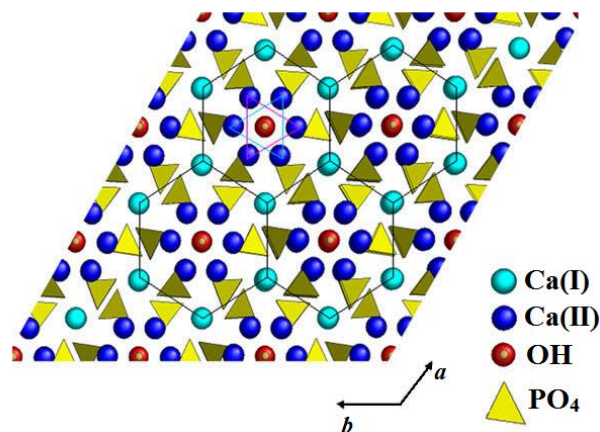
Poprečno presječena kost promatrana na makro razini sastoji se od dva oblika koštanog tkiva koja se razlikuju u rasporedu lamela: kompaktno tkivo i viskoporozno spužvasto tkivo (slika 4) [16].



Slika 4. Prikaz koštanog tkiva kosti kuka [18].

2.3. Hidroksiapatit

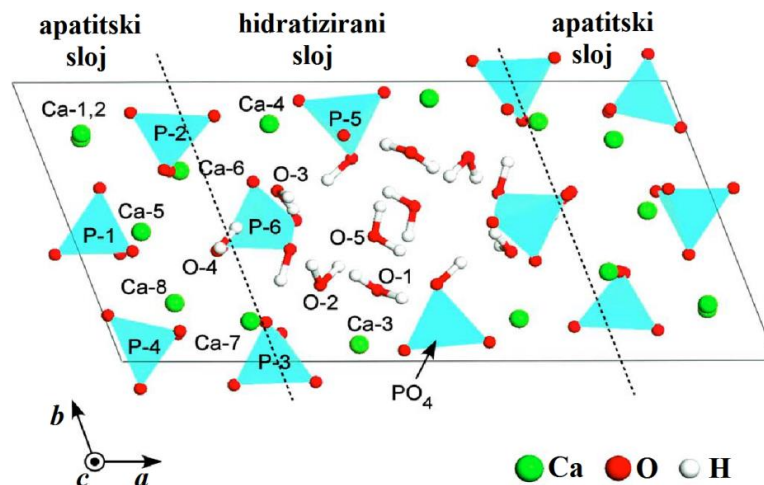
Hidroksiapatit je prirodni mineral apatitne skupine čija je formula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ koja se obično piše $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kako bi se istaknulo da se jedinična ćelija sastoji od dva strukturna entiteta [20]. Zbog svoje kemijske i strukturne sličnosti s mineralnom komponentom koštanog tkiva koristi se u području ortopedije, stomatologije, dostave lijekova i inženjerstvu koštanog tkiva [21]. Hidroksiapatit kristalizira u heksagonskoj kristalnoj rešetci i pripada prostornoj grupi $P6_3/m$ uz parametre ćelije: $a = b = 9.418 \text{ \AA}$ i $c = 6.881 \text{ \AA}$. U strukturi se nalazi deset atoma kalcija smještenih u dva simetrijski različita kristalografska položaja, Ca(I) i Ca(II) prikazana na slici 5. Četiri kalcijeva atoma u položaju Ca(I) povezani su u kolone paralelne kristalografskoj c -osi i svaki atom u tom položaju okružen je s devet atoma kisika koji pripadaju PO_4 grupama i nalaze se aproksimativno na visini jedinične ćelije 0 i $\frac{1}{2}$. Šest Ca(II) atoma koji grade jednakostranične trokute oko osi 6_3 se nalaze na visini jedinične ćelije $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$. U tom položaju atomi kalcija okruženi su s ukupno sedam atoma kisika od kojih šest pripadaju PO_4^{3-} grupama, a jedan OH^- grupi smještenoj u kanalu. S obzirom na zrcalnu ravninu simetrije koja se nalazi na $z=\frac{1}{4}$ i $z=\frac{3}{4}$ svaki OH^- ion zauzima statistički neuređen položaj (iznad i ispod zrcalne ravnine). OH^- ioni mogu se pomaknuti $\sim 0,35 \text{ \AA}$ iznad ili ispod zrcalne ravnine [17].



Slika 5. Kristalna struktura hidroksiapatita s označenim položajima Ca(I) i Ca(II) atoma [17].

Opisani stehiometrijski hidroksiapatit ima omjer Ca/P 1,67 te se razlikuje od biološkog hidroksiapatita čiji je Ca/P omjer niži od stehiometrijskog. Zbog toga se razlikuju po fizičkim i mehaničkim svojstvima. Biološke apatite karakterizira mala veličina kristala i niska kristaliničnost zbog koje imaju veću topljivost u odnosu na stehiometrijski hidroksiapatit.

Također, nukleacija i rast kristala hidroksiapatita u biološkim sustavima odvija se u okolini bogatoj ionima koji utječu na kinetiku i kristalizaciju, a time i stabilnost. Oktakalcij hidrogenfosfat pentahidrat (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) je prekursor biološkog hidroksiapatita i prvi nastaje u fiziološkim uvjetima, a kao nestabilnija faza kalcijeva fosfata, prelazi u hidroksiapatit. Strukturu OCP-a čine naizmjenični apatitni i hidratizirani slojevi kako je prikazano na slici 6 [17]. OCP kristalizira u triklinskoj kristalnoj rešetci i pripada prostornoj grupi *P1* uz izraženo dulji parametar ćelije *a* u odnosu na parametar *b*. U strukturi postoji osam Ca položaja i šest P položaja gdje su fosforovi atomi okruženi s četiri kisikova atoma čineći PO_4 tetraedre. Tetraedri položaja P(V) i P(VI) povezani su s vodikom čineći HPO_4 skupine. U strukturi se nalazi i pet neovisnih kisikovih atoma koji tvore molekule vode koje su koordinirane prema kalcijevim atomima. Ukupni broj atoma u jediničnoj ćeliji OCP-a je 110 [19].



Slika 6. Struktura oktakalcijevog hidrogenfosfata pentahidrata [19].

Metalni ioni mogu se ugraditi na mjestu jednog od postojećeg iona kristalne rešetke hidroksiapatita ili može doći do adsorpcije iona na površini hidroksiapatita. Ugrađeni metalni ioni u kristalnu rešetku hidroksiapatita nakon otapanja kristala hidroksiapatita se otpuštaju i utječu na rast koštanog tkiva, dok adsorbirani metalni ioni mogu povećati adsorpciju i aktivnost osteoblasta [19].

U strukturu hidroksiapatita moguće je ugraditi ione na mjestu kalcijevih, fosfatnih ili hidroksilnih skupina bez značajnih utjecaja na simetriju. Kationske i anionske supstitucije u hidroksiapatitu istražuju se kako bi struktura pripremljenog hidroksiapatita bila slična onoj u prirodnom koštanom tkivu. Ovisno o supstitucijskom ionu utječe se na morfologiju, parametre

rešetke, kristalnost, stabilnost, mehanička i magnetna svojstva. Neke od biološki važnih istraživanih supstitucija su fluorovim, klorovim, stroncijevim, cinkovim i magnezijevim ionima, a posebnu važnost ima supstitucija karbonatnim ionima koji su glavni supstituenti bioloških apatita. Ionske supstitucije prisutne u karbonatnom hidroksiapatitu zaslužne su za njegovu veću bioaktivnost u odnosu na sintetski hidroksiapatit. Karbonatni ion se u strukturu hidroksiapatita ugrađuje na mjesto hidroksilnog (A-tip supstitucije), fosfatnog (B-tip supstitucije) ili istovremeno oba iona (AB-tip supstitucije). Tip supstitucije definira promjenu svojstava hidroksiapatita, gdje B-tip supstitucije inhibira rast kristala hidroksiapatita čime se dobiva struktura manje kristalnosti i veće topljivosti [17].

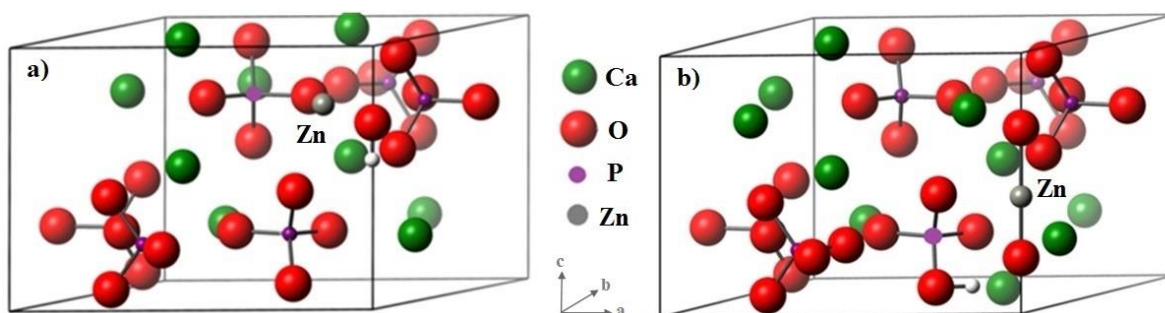
2.3.3. Cinkom dopirani hidroksiapatit

Topljivost je jedna od važnih karakteristika kalcijevih fosfata korištenih kao biomaterijala za regeneraciju koštanog tkiva. Brzina resorpcije biomaterijala za regeneraciju koštanog tkiva mora biti usklađena s očekivanom regeneracijom koštanog tkiva. Stehiometrijski HAp je najstabilniji, najgušći i najmanje topljiv kalcijev fosfat, dok je karbonatni hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona zbog prisutnih supstitucija u strukturi manje stabilan i pogodniji za istraživanu primjenu. Kako bi se ostvarilo što bolje sjedinjenje hidroksiapatita s okolnim tkivom, potrebno je prilagoditi strukturu kako bi se postigla što veća sličnost biološkom hidroksiapatitu [17].

Cink je drugi po zastupljenosti od elemenata u tragovima u našem organizmu, a najviše ga ima u kostima i mišićima (do 85%). Sudjeluje u više od 300 enzimskih reakcija, aktivnosti hormona, biomineralizaciji, te ima ključnu ulogu za rast u prenatalnom i postnatalnom razdoblju. Dopiranje hidroksiapatita cinkovim ionima (Zn^{2+}) inhibira se njegova kristalizacija, a povećava topljivost, bioaktivnost i osteokonduktivnost. Hidroksiapatit dopiran cinkom posjeduje antibakterijska svojstva, međutim dopiranjem većim udjelom cinka materijal postaje citotoksičan [20, 21, 22].

Cinkov ion u strukturi hidroksiapatita supstituira kalcijev ion (slika 7a) Dosadašnja istraživanja su potvrdila da je Ca(II) položaj energetski povoljniji u odnosu na Ca(I) prilikom supstitucije Zn^{2+} ionom zbog manjeg ionskog radijusa u odnosu na Ca^{2+} [22]. Ca(I) položaj s kisikovim ionom ima koordinacijski broj 9, dok na Ca(II) položaju ima koordinacijski broj 7. Veći kationi teže većem koordinacijskom broju sa susjednim anionima kako bi ostvarili više

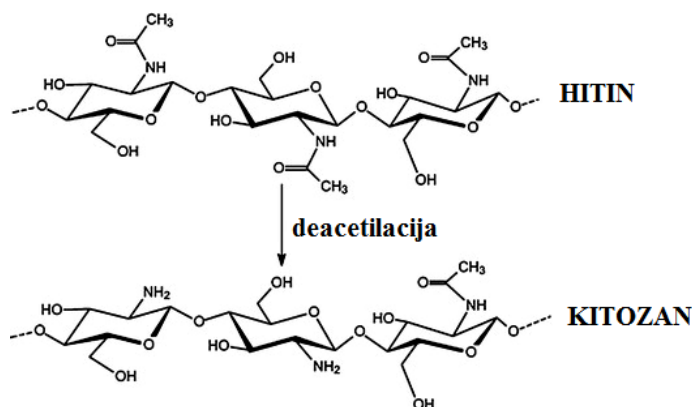
ionskih veza, a manji preferiraju manji koordinacijski broj čime smanjuju elektrostatska odbijanja susjednih aniona [19]. Manji radijus cinkova (Zn^{2+} , 0,074 nm) od kalcijevog (Ca^{2+} , 0,099 nm) iona uzrokuje promjenu parametara ćelije hidroksiapatita [21]. Brojna istraživanja provedena su kako bi se ustanovio mehanizam ugradnje cinka u strukturu hidroksiapatita. Međutim, kontradiktorni rezultati promjene parametara ćelije promjenom udjela cinka, te samog položaja njegove ugradnje, upućuju na kompleksnost ove supstitucije koja ne ovisi samo o ionskom radijusu. Neke od pretpostavki su da se cink apsorbira na površinu hidroksiapatita, dok druge uključuju kationsku supstituciju na kristalografskim položajima jednog od kalcijevih iona. Gomes i sur. iznijeli su teoriju prema kojoj se cink ugrađuje na $2b$ (Wickoff) položaj u heksagonalni kanal intersticijskim mehanizmom ugradnje, pri čemu se kreira linearni O–Zn–O entitet uzduž c -osi (slika 7b). Kako bi se održala elektroneutralnost cinkom dopiranog hidroksiapatita, dolazi do stvaranja vakancije protona pri izmjeni hidroksilnog aniona [23].



Slika 7. Ugradnja cinkovog iona u strukturu hidroksiapatita na položaj Ca^{2+} iona (a) i $2b$ (Wickoff) položaj uzduž c osi (b) [22].

2.4. Kitozan

Kitozan je linearni polisaharid čiji polimerni lanac čine jedinice glukozamina i N-acetil D-glukozamina. Dobiva se djelomičnom deacetilacijom hitina (slika 8) pri čemu deacetilirani hitin treba sadržavati minimalno 50 % slobodnih amino skupina u polimeru [24].



Slika 8. Struktura hitina i kitozana [25].

Različiti oblici kitozana na temelju njegova stupnja deacetilacije (u rasponu od 50 do 95%) i molekulske mase (u rasponu od 300 do 1000 kDa) imaju različita fizikalna i kemijska svojstva kao što su stupanj kristalnosti, topljivost i brzina degradacije. 100% deacetilirani kitozan te 0% deacetilirani hitin su visoko kristalni, dok su ostali stupnjevi kristalinični. Bolja mehanička svojstva materijala postižu se kitozonom visoke molekulske mase. Zahvaljujući amino skupinama D-glukozamina, kitozan je moguće protonirati pri čemu nastaje polikation velike gustoće naboja, što je jedan od uzroka jedinstvenih svojstava ovog biopolimera kao što su topljivost u vodenom mediju, antibakterijska svojstva, biorazgradnja i biokompatibilnost. Otapa se u organskim i anorganskim kiselinama (pK_a 6.5), dok u neutralnim i bazičnim otopinama većina molekula kitozana gubi svoj naboj te dolazi do precipitacije u otopini [24, 26]. Kitozan je pogodan za stvaranje visokoporoznih trodimenzionalnih okosnica zbog čega se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva. Međutim, u odnosu na biomaterijale na temelju kitozana, kompozitni biomaterijali kitozana s kalcijevim fosfatima imaju bolja mehanička svojstva i veću specifičnu površinu što povećava adsorpciju proteina, vezivanje i proliferaciju stanica bitnih za regeneraciju koštanog tkiva [27].

Cilj ovog rada je usporedno istraživanje cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenog iz biogenih i sintetskih izvora te njegova *in situ* sinteza u kitozanskoj matrici, metodom precipitacije.

3. Eksperimentalni dio

Za pripravu istraživanih materijala korišteni su:

- Kalcijev karbonat, kalcit (CaCO_3), sipina kost
- Kalcijev karbonat, kalcit (CaCO_3), (TTT, Hrvatska)
- Cinkov nitrat heksahidrat, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Honeywel, Germany)
- Amonijev dihidrogen fosfat, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Lachner, Češka)
- Kitozan, CHT, $M_w = 190 - 210 \text{ kg mol}^{-1}$, stupanj deacetilacije, $\text{DD} > 75 \%$ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Octena kiselina, CH_3COOH (Sigma Aldrich, Njemačka)

Za pripremu poroznih uzoraka iz pripremljenih kompozitnih materijala korišteni su:

- Natrijev hidroksid, NaOH (GRAM-MOL d.o.o. Hrvatska)
- Etilni alkohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (KEFO d.o.o., Slovenija)

3.1. Sinteza materijala

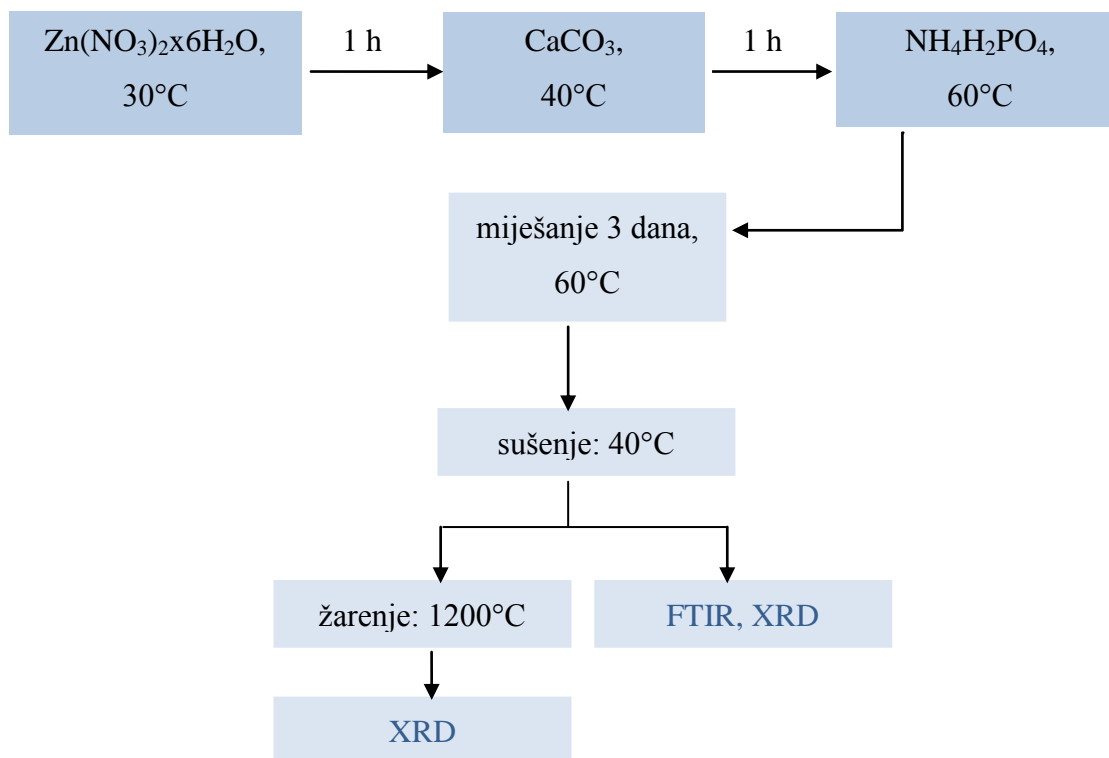
Priprava materijala može se podijeliti u tri djela:

1. sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita;
2. sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita unutar otopine kitozana (CHT-HAp-Zn) *in situ* metodom;
3. priprava poroznih struktura iz pripremljene polimerne suspenzije kitozana i cinkom dopiranog hidroksiapatita (CHT-HAp-Zn)

3.2. Sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita

Za sintezu hidroksiapatita (HAp) i cinkom dopiranog hidroksiapatita (HAp-Zn) kao prekursor kalcijevih iona koristio se sintetski kalcit i kalcit biogenog podrijetla (sipina kost). Sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita s različitim udjelima cinka (0, 1, 5 i 10 mol%) provedena je na sljedeći način: u destiliranu vodu dodana je odgovarajuća količina cinkova nitrata heksahidrata (30 °C), kalcita (40 °C) i amonijeva dihidrogenfosfata (60 °C). Prekursori su dodavani u otopinu u vremenskom razmaku od jednog sata te su dodavani kako bi se

postigao (Ca+Zn)/P omjer 1,67. Reakcija se provodila sljedeća 3 dana na temperaturi od 60 °C. Za sintezu hidroksiapatita bez dopiranja cinkom nije dodan cinkov nitrat heksahidrat. Nakon sinteze, vodene suspenzije HAp-Zn su filtrirane, a dobiven produkt je sušen 4 sata na 40°C (slika 9).



Slika 9. Dijagram toka sinteze i karakterizacije cinkom dopiranog hidroksiapatita u vodenom mediju.

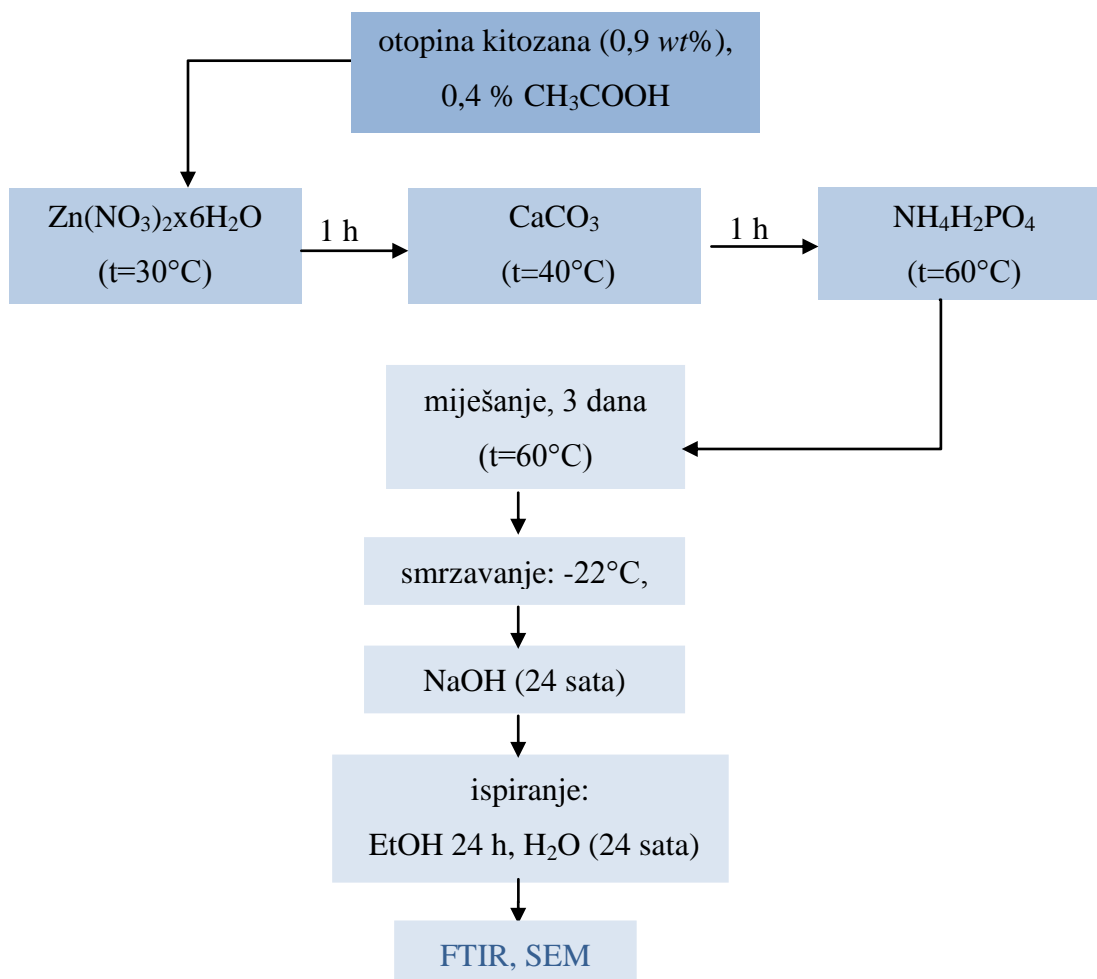
3.3. In situ sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita u otopini kitozana

In situ sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita u otopini kitozana provedena je na sljedeći način: kitozan je otopljen u 0,40 wt% otopini octene kiseline (HAc) s konačnim udjelom 0,9 wt%. Zatim je dodana odgovarajuća količina cinkova nitrata heksahidrata (30 °C) kako bi se kao produkt dobio hidroksiapatit dopiran s 0, 1 i 5 mol% cinka. Potom je dodana odgovarajuća količina sintetskog kalcita do njegove potpune suspenzije u polimernoj otopini (40 °C). Nakon toga je dodana odgovarajuća količina amonijeva dihidrogenfosfata kako bi se postigao (Ca+Zn)/P omjer od 1,67. Reakcija se provodila sljedeća 3 dana na temperaturi od 60 °C. Prekursori cinkovih, kalcijevih i fosfatnih iona dodani su u odgovarajućim količinama

kako bi konačni maseni udio *in situ* sintetiziranog Hap-Zn u kompozitnoj suspenziji iznosio 30 % (slika 10).

3.4. Postupak pripreme poroznih struktura

Polimerna suspenzija CHT-HAp-Zn izlivena je u mikrotitarsku pločicu s 24 bunarića (2 mL polimerne suspenzije po bunariću) te smrznuta pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sata. Zamrznuti uzorci su liofilizirani ($-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,300 mbar) te uronjeni u 0,5 M otopinu natrijeve lužine (24 sata), kako bi se omogućila neutralizacija ostatka kiseline bez narušavanja porozne strukture. Uzorci su ispirani u etanolu (24 sata), destiliranoj vodi (24 sata) te zamrznuti i liofilizirani pri jednakim uvjetima (slika 10).



Slika 10. Dijagram toka *in situ* sinteze cinkom dopiranog hidroksiapatita u otopini kitozana.

3.5. Metode karakterizacije

3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti tijekom sinteze

pH vrijednost tijekom sinteze HAp-Zn i CHT-HAp-Zn mjerena je na Schottovom CG 842 pH-metru uz BlueLine 14 elektrodu s preciznošću od $\text{pH} = 0,01$.

3.5.2. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

Dobiveni materijali (HAp-Zn) su karakterizirani infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovim transformacijama (FTIR). FTIR spektri istraženih sustava snimljeni su ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometrom s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani 32 puta u apsorpcijskom režimu i rasponu mjernog područja od 4000 do 400 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1} pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.3. Kvantitativna rendgenska difrakcijska analiza

Kako bi se odredio mineraloški sastav nakon toplinske obrade uzoraka, uzorci su bili zagrijani na $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 sata) brzinom zagrijavanja $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Mineraloški sastav uzoraka HAp-Zn (prije i nakon toplinske obrade) određen je rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) na Shimadzu XRD-6000 instrumentu s $\text{CuK}\alpha$ zračenjem pri 40 kV i 30 mA , u mjernom području kutova $3^\circ < 2\theta < 60^\circ$ (toplinski neobrađeni) i $20^\circ < 2\theta < 70^\circ$ (toplinski obrađeni), uz brzinu snimanja od $0,2 \text{ }^\circ/\text{s}$. Za identifikaciju kristalnih faza koristila se kristalografska baza ICDD (engl. *International Centre for Diffraction Data*). Kvantitativna rendgenska analiza i promjene u kristalnoj strukturi analizirane su Rietveldovom metodom strukturnog utočnjavanja korištenjem računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija

Morfologija liofiliziranih kompozitnih uzoraka (CHT-HAp-Zn) istražena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) na instrumentu TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 13 kV . Neposredno prije snimanja, uzorci su napareni smjesom zlata i paladija u trajanju 120 sekundi.

4. Rezultati i rasprava

4.1. pH vrijednosti

Važni parametri pri sintezi hidroksiapatita su omjer Ca/P, čistoća, veličina i oblik dobivenog zrna produkta. Oni se mogu kontrolirati uvjetima sinteze. Kemijsko taloženje ili metoda precipitacije je najjednostavnija i najčešće primjenjivana mokra metoda uz koju se dobivaju velike količine čistog produkta, a osim ekonomičnosti prednost metode je i fleksibilnost procesnih parametara što omogućava kontrolu formiranih faza, veličine čestica i morfologije. Glavni parametri koji utječu na precipitaciju kalcijevih fosfata su temperatura, koncentracija kalcija i fosfata, ionska jakost, prisutnost drugih iona, vremensko trajanje precipitacije i pH vrijednosti. Formiranje kalcijevih fosfata kompleksan je proces koji uključuje stvaranje različitih CaP faza pri različitim pH vrijednostima i temperaturama. Pri pH rasponu 4 – 6 moguće je stvaranje dikalcijevog fosfata dihidrata ($\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, brušit), 6 – 7,5 oktakalcij dihidrogenfosfat pentahidrata, dok hidroksiapatit nastaje pri pH vrijednostima većim od 7 [28, 29].

pH vrijednosti mjerene tijekom sinteze cinkom dopiranog hidroksiapatita za 0, 1, 5 i 10 mol% cinka dobivenog iz sintetskog i biogenog kalcita nalaze se u tablici 2. Tijekom tri dana sinteze hidroksiapatita dobivenog iz sintetskog i biogenog kalcita kao prekursor Ca^{2+} iona, pH vrijednosti blago su rasle. U slučaju sintetskog kalcita kao prekursora Ca^{2+} iona tijekom sinteze pH vrijednosti su više u odnosu na pH vrijednosti sinteze uz biogeni izvor Ca^{2+} iona. Prvi dan sinteze pH vrijednosti dobivenog hidroksiapatita iz sintetskog kalcita bile su u rasponu od 7,93 do 8,23, dok su u slučaju sinteze s biogenim prekursorom Ca^{2+} iona vrijednosti iznosile između 7,40 i 7,88. Prema tome, sintezom iz biogenog izvora moguća je precipitacija dvofaznog sustava HAp/OCP.

Tablica 2. pH vrijednosti tijekom *in situ* sinteze cinkom dopiranog hidroksiapatita za 0, 1, 5 i 10 mol% cinka.

pH	sintetski kalcit kao prekursor Ca ²⁺				biogeni kalcit kao prekursor Ca ²⁺			
	0%	1%	5%	10%	0%	1%	5%	10%
Zn(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	-	5,63	5,57	5,27	-	5,65	5,32	5,57
CaCO ₃	8,46	7,76	6,89	6,68	8,93	8,05	6,99	6,64
NH ₄ H ₂ PO ₄	7,16	7,50	6,68	6,69	6,68	6,38	5,58	5,48
1. dan	8,23	8,15	8,02	7,93	7,88	7,27	7,62	7,40
2. dan	8,31	8,23	8,18	8,07	8,27	7,85	7,97	7,90
3. dan	8,85	8,72	8,69	8,55	8,30	8,20	8,17	8,03

pH vrijednosti tijekom *in situ* sinteze za 0, 1 i 5 mol% dopiranog hidroksiapatita u kitozanu prikazane su u tablici 3. Kao prekursor Ca²⁺ iona koristio se je sintetski kalcit. U odnosu na sintezu u vodenom mediju, pH vrijednosti su niže zbog otapanja kitozana u otopini 0,4 wt% octene kiseline. Kitozan se otapa pri pH < 6,0 zbog protoniranja amino skupine, međutim tijekom sinteze pH vrijednosti su bile u rasponu od 6,25 do 6,70 zbog čega je došlo do njegovog taloženja. Povećanjem udjela cinka pH se smanjuje, a blago sniženje događa se i uslijed tri dana sinteze.

Tablica 3. pH vrijednosti tijekom *in situ* sinteze cinkom dopiranog hidroksiapatita unutar otopine kitozana (CHT-HAp-Zn) uz sintetski kalcit kao prekursor Ca²⁺.

pH	0%	1%	5%
Zn(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	-	4,45	4,54
CaCO ₃	6,79	6,52	6,68
NH ₄ H ₂ PO ₄	6,73	5,32	5,17
1. dan	6,70	6,69	6,45
2. dan	6,53	6,44	6,30
3. dan	6,55	6,40	6,25

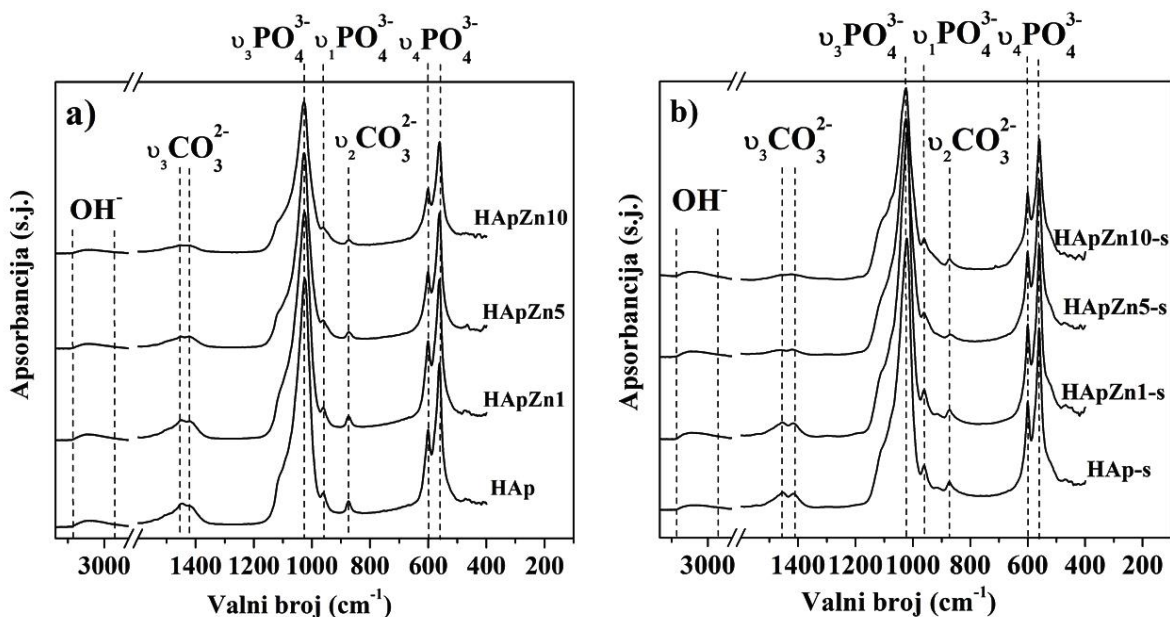
4.2. FTIR spektroskopija

Slika 11a prikazuje FTIR spektre ispitivanih uzoraka dobivenih iz sintetskog kalcita (HAp, HApZn1, HApZn5 i HApZn10), dok su FTIR spektri uzoraka dobivenih iz biogenog kalcita (HAp-s, HApZn1-s, HApZn5-s i HApZn10-s) prikazani na slici 11b.

FTIR spektri pokazuju karakteristične vrpce PO_4^{3-} grupe na 560 i 600 cm^{-1} (ν_4), 1025 cm^{-1} (ν_3), te na 959 cm^{-1} (ν_1). Karakteristične vrpce PO_4^{3-} grupe upućuju na nastajanje CaP faze u obliku hidroksiapatita. Prisutne vrpce na 1196 i 865 cm^{-1} karakteristične su za HPO_4^{2-} grupu koja bi mogla biti posljedica stvaranja OCP-a [30].

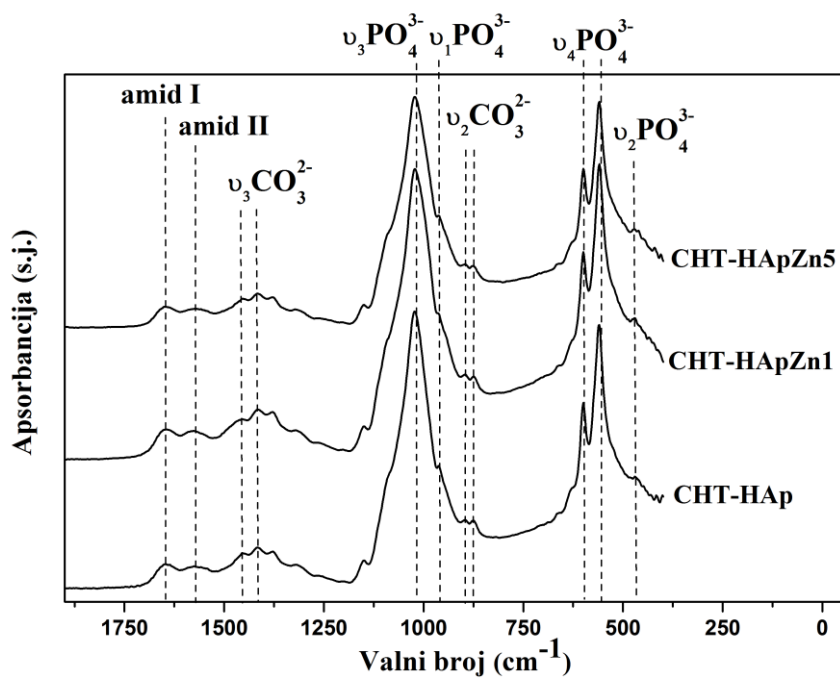
Karbonatni ioni se u hidroksiapatitu javljaju kao supstituenti OH^- (A-tip supstitucije) i/ili PO_4^{3-} grupa (B-tip supstitucije). Dva područja u dobivenim spektrima su karakteristična za vibracije koje pripadaju karbonatima: vrpca $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ pri 1459 i 1407 cm^{-1} i $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ na 873 cm^{-1} . One ukazuju na B-tip supstitucije i nestehiometrijski sastav hidroksiapatita. B-tip supstitucije karakterističan je za biološke apatite koji posjeduju maseni udio karbonata od 3 do 8 wt%, zbog čega je njegova prisutnost poželjna u biomaterijalima za regeneraciju koštanog tkiva. Formula B-tipa karbonatnog hidroksiapatita može se pisati kao $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ pri čemu je $0 \leq x \leq 2$. Nastanak karbonatnog hidroksiapatita je kinetički pogodniji proces tijekom precipitacije u odnosu na nastanak stehiometrijskog hidroksiapatita. Prisutnost stranih iona može utjecati na hidrolizu nestabilnijih CaP faza čineći ih kinetički stabilnijima. B-tip supstitucije je pozitivnog naboja zbog čega je potrebna kompenzacija naboja, a najčešće se kompenzira ugradnjom natrijevog iona (Na^+). Također, ugradnja karbonatnog iona planarne strukture na mjesto tetraedarske fosfatne skupine donosi strukturalne promjene apatitne strukture. Pokazalo se da Na^+ , koji se nalazi u biološkim apatitima, utječe na stupanj ugradnje karbonatnih iona. Stoga su brojna istraživanja usmjerena na sintezu natrijem dopiranog karbonatnog hidroksiapatita koji pokazuje veću topljivost, a time i veću biološku aktivnost. Pretpostavlja se da korištenjem prekursora iz morskih izvora za sintezu hidroksiapatita dolazi do Na-supstitucije te kao rezultat toga većeg udjela CO_3^- supstitucije [30, 31].

Nema velike razlike u FTIR spektrima uzoraka dobivenih sintezom iz sintetskog i biogenog kalcita. U oba slučaja dolazi do blagog smanjenja intenziteta vrpce povećanjem udjela cinka. Signal između 3643 i 2783 cm^{-1} pripada OH^- skupini koja se pripisuje adsorbiranoj vodi u strukturi [30].



Slika 11. FTIR spektri uzoraka dobivenih iz sintetskog (a) i biogenog (b) kalcita.

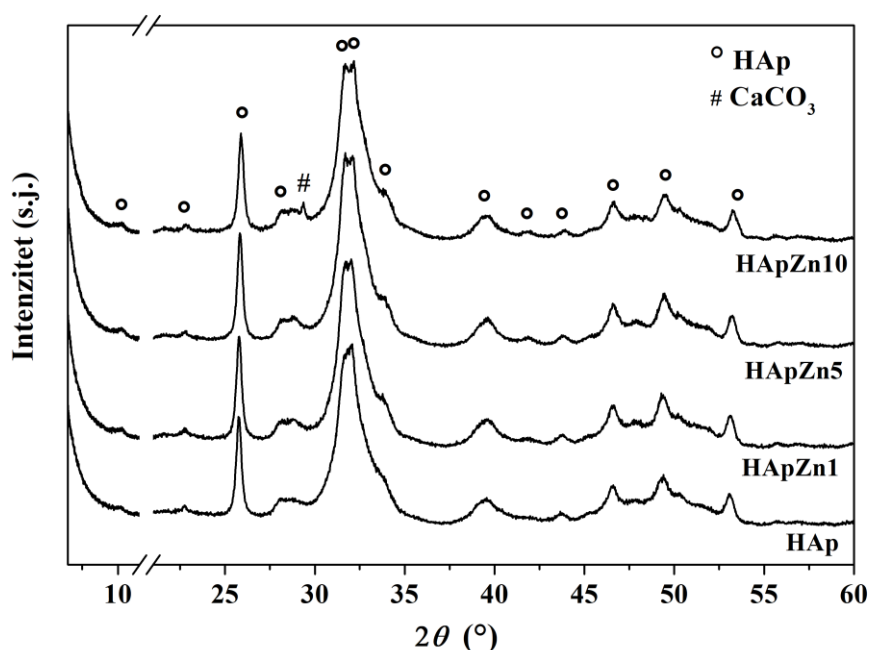
Na slici 12. nalaze se FTIR spektri dobivenih uzoraka poroznih struktura kompozita kitozan/hidroksiapatit s 0, 1 i 5 mol% cinka (CHT-HAp, CHT-HApZn1 i CHT-HApZn5). Na uzorcima su vidljive karakteristične vrpce kitozana na 1647 i 1574 cm^{-1} koje pripadaju amid I i II skupini [32]. Na FTIR spektrima vidljive su i karakteristične vrpce za fosfatne skupine (PO_4^{3-}) na: 1021 cm^{-1} (ν_3) i 960 cm^{-1} (ν_1), vrpca u području valnih brojeva 600 – 556 cm^{-1} (ν_4), te na 470 cm^{-1} (ν_2). One potvrđuju nastanak CaP faze u obliku hidroksiapatita u ispitivanim uzorcima. Karakteristična karbonatna vrpca $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ javlja se na valnim duljinama 1454 i 1416 cm^{-1} , dok se $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ javlja na valnom broju 876 cm^{-1} . Oni su karakteristični B-tipu supstitucije karbonata u hidroksiapatitu. Dodatno, vrpca $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ uz valni broj 876 cm^{-1} javlja se i na 897 cm^{-1} što je karakteristično za A-tip supstitucije. Stoga se može zaključiti da je došlo do AB-tipa supstitucije [33].



Slika 12. FTIR spektri uzoraka poroznih struktura kompozita kitozan-hidroksiapatit s 0, 1 i 5 mol% cinka.

4.3. Identifikacija mineraloškog sastava

Difraktogrami cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora Ca^{2+} iona (HAp, HApZn1, HApZn5 i HApZn10) prikazani su na slici 13. Prema rendgenskoj difrakcijskoj analizi (*The International Centre for Diffraction Data*, ICDD baza podataka) uzorci cinkom dopiranog hidroksiapatita pokazuju jednofazni sastav hidroksiapatita (HAp, ICDD 9-432). Međutim, dopiranjem hidroksiapatita s 10 mol% cinka dolazi do zaostajanja 1,73 wt% (Tablica 4.) kalcijeva karbonata (CaCO_3 , ICDD 47-1763). Zaostajanje CaCO_3 upućuje na narušenu stehiometriju hidroksiapatita te da nije moguće dopiranje hidroksiapatita s 10 mol% cinka pri provedenim uvjetima sinteze.



Slika 13. XRD difraktogrami hidroksiapatita dopiranog cinkom dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

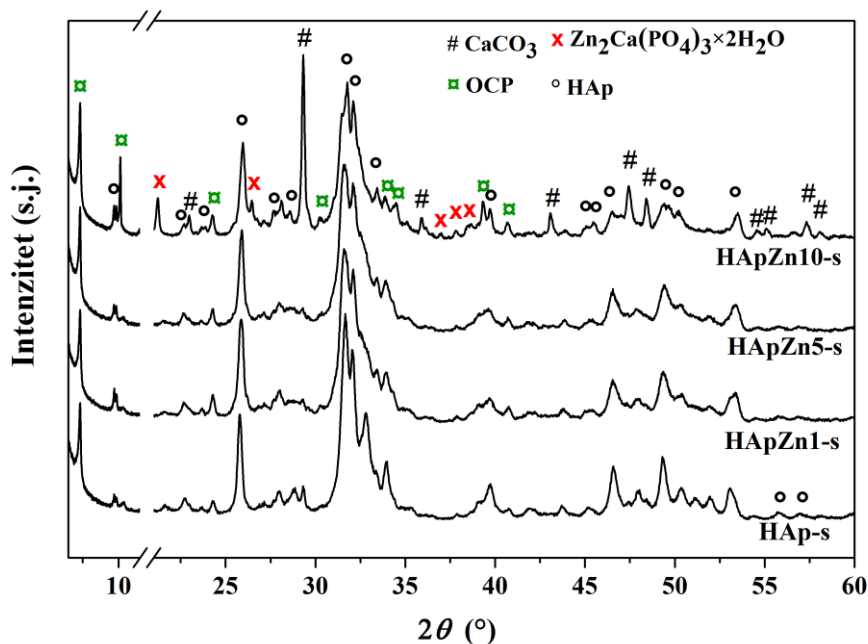
Maseni udjeli faza (wt%) i parametri elementarne ćelije cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona prikazani su u tablici 4. Volumen elementarne ćelije (Å^3) pada s povećanjem udjela cinkova iona (Zn^{2+}) osim pri 10 mol% supstitucije Zn^{2+} , gdje se uočava porast volumena. Parametar a se nekontinuirano mijenja s povećanjem udjela cinka, a parametar c se smanjuje. Istraživanja Miyajia i sur. pokazuju jednake rezultate gdje dolazi do smanjenja parametra c , dok se parametar a nekontinuirano smanjuje i raste s povećanjem udjela cinka [34]. Mogući razlog porasta parametra a dopiranjem hidroksiapatita $\text{Zn} > 5 \text{ mol\%}$ je supstitucija OH^- grupe molekulama

vode. Smanjenje parametra c može se pripisati manjem radijusu Zn^{2+} (0,074 nm) u odnosu na kalcijev (0,099 nm) ion kojeg zamjenjuje [23]. Međutim, prisutne promjene parametara elementarne ćelije su neznatne i mogu biti rezultat djelomične supstitucije Zn^{2+} iona, dok je ostatak adsorbiran na površini kristala hidroksiapatita.

Tablica 4. Maseni udjeli faza ($wt\%$) i parametri elementarne ćelije cinkom dopiranog HAp dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

	HAp ($wt\%$)	CaCO ₃ ($wt\%$)	V (Å)	a (Å)	c (Å)
HAp	100	-	532,0683	9,4483	6,8822
HApZn1	100	-	531,7910	9,4460	6,8820
HApZn5	100	-	531,4405	9,4484	6,8740
HApZn10	98,27	1,73	531,6207	9,4542	6,8678

Difraktogrami cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenih iz biogenog CaCO₃ kao prekursora Ca²⁺ iona (HAp-s, HApZn1-s, HApZn5-s i HApZn10-s) prikazani su na slici 14. Prema rendgenskoj difrakcijskoj analizi uzorci cinkom dopiranog hidroksiapatita pokazuju dvofazni sustav hidroksiapatita (HAp, ICDD 9-432) i oktakalcij dihidrogenfosfata pentahidrata (OCP, ICDD 79-0423). Dopiranjem s 10 $mol\%$ cinka dolazi do zaostajanja kalcijeva karbonata (CaCO₃, ICDD 47-1763) i nastajanja nove Zn-CaP faze (Zn₂Ca(PO₄)₃×2H₂O, ICDD 29-1412) pod nazivom parašolizit. Dopiranjem s 1 i 5 $mol\%$, cink je u potpunosti ušao u strukturu ili se adsorbirao na površini HAp/OCP-a, jer ne nastaje nova Zn-CaP faza. Međutim, dopiranjem s 10 $mol\%$ cinka dolazi do zaostajanja CaCO₃ (10,83 $wt\%$) i nastajanja nove Zn-CaP faze (9,25 $wt\%$). To upućuje da je došlo do narušavanja strukture HAp/OCP i ograničenja ugradnje Zn^{2+} iona. Tripathy i sur. metodom precipitacije u vodenom mediju dobili su apatit kemijske formule Zn₁₀(PO₄)₆(OH)₂, međutim druga istraživanja upućuju da zbog inhibicijskog utjecaja cinkova iona na kristalizaciju hidroksiapatita nije moguća sinteza Zn-HAp kroz čitav raspon udjela Zn^{2+} iona [35]. Li i sur. sintetizirali su Zn-HAp hidrotermalnom metodom [36], a Ren i sur. Zn-HAp metodom precipitacije [37]. U oba istraživanja najveći udio supstitucije Zn^{2+} ionom, bez nastanka parašolizita kao druge Zn-CaP faze, je 20 $mol\%$. Međutim, u istraživanju Miyaji i sur. metodom precipitacije ostvaren je najveći udio od 15 $mol\%$ Zn^{2+} iona, bez nastanka parašolizita [34]. Udio supstitucije cinka u strukturi hidroksiapatita ovisi o uvjetima sinteze i korištenim prekursorima Zn^{2+} , Ca²⁺ i PO₄³⁻ iona. U ovom istraživanju parašolizit nastaje pri supstituciji od 10 $mol\%$ Zn^{2+} ionom, a mogući razlog tome je što je korištena niža temperatura sinteze i različiti prekursori u odnosu na prethodno navedena istraživanja.



Slika 14. XRD difraktogrami hidroksiapatita dopiranog cinkom dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

OCP je hidratizirani kalcijev fosfat koji je zbog svoje veće topljivosti u odnosu na hidroksiapatit istraživana kao njegova alternativa. Također se smatra prekursorom biološkog hidroksiapatita u kostima i zubima. Zbog osteokonduktivnih svojstava poželjna je CaP faza u materijalima za regeneraciju koštanog tkiva. Međutim, zbog svoje metastabilne strukture teško ga je sintetizirati sa i bez ionskih supstitucija. Iz tog razloga rjeđe je ispitivana CaP faza u usporedbi s HAp. Transformacija OCP-a u njegovo termodinamički stabilnije stanje (HAp) pri fiziološkim uvjetima utječe na aktivnost osteoblasta i time na brzinu obnavljanja koštanog tkiva [38].

Maseni udjeli faza (*wt%*) i parametri elementarne ćelije cinkom dopiranog sustava HAp/OCP dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona prikazani su u tablici 5. U ispitivanom sustavu veći je udio hidroksiapatita (~ 82 *wt%*) nego OCP-a. Povećanjem supstitucije Zn^{2+} ionom u hidroksiapatitu volumen elementarne ćelije i parametar *a* rastu, dok se parametar *c* smanjuje. Povećanja parametara *V* i *c* moguća su zbog supstitucije OH^- grupe molekulama vode, a pad parametra *c* zbog manjeg radijusa cinkovog u odnosu na kalcijev ion. Prema dobivenim rezultatima promjene parametara ćelije ne može se sa sigurnošću tvrditi da je Zn^{2+} ion supstituirao Ca^{2+} ion, ali postoji mogućnost da se adsorbirao na površinu ili zaostao u amorfnoj fazi. Hidroksiapatit se smatra adsorbensom metala, a kapacitet ionske

adsorpcije mu se povećava smanjenjem kristalnosti. Adsorpcija Zn^{2+} iona mijenja koncentraciju hidroksidnih grupa na površini hidroksiapatita, pri čemu se stvaraju kompleksi cinkovog hidroksida, a na sličan način nastaju i kompleksi cinkovog fosfata. Time se utječe na zeta potencijal koji je funkcija pH vrijednosti. Uslijed adsorpcije Zn^{2+} iona dolazi do smanjenja zeta potencijala te stvaranja agregata. Osim specifične adsorpcije, Zn^{2+} ioni se adsorbiraju na površini hidroksiapatita ionskom izmjenom pri čemu mijenjaju kalcijeve ione mehanizmom difuzije. Adsorbirani ioni se mogu jednostavnije i brže otpustiti iz strukture hidroksiapatita, pa je ovakav mehanizam poželjan u materijalima namijenjenim za regeneraciju koštanog tkiva [39].

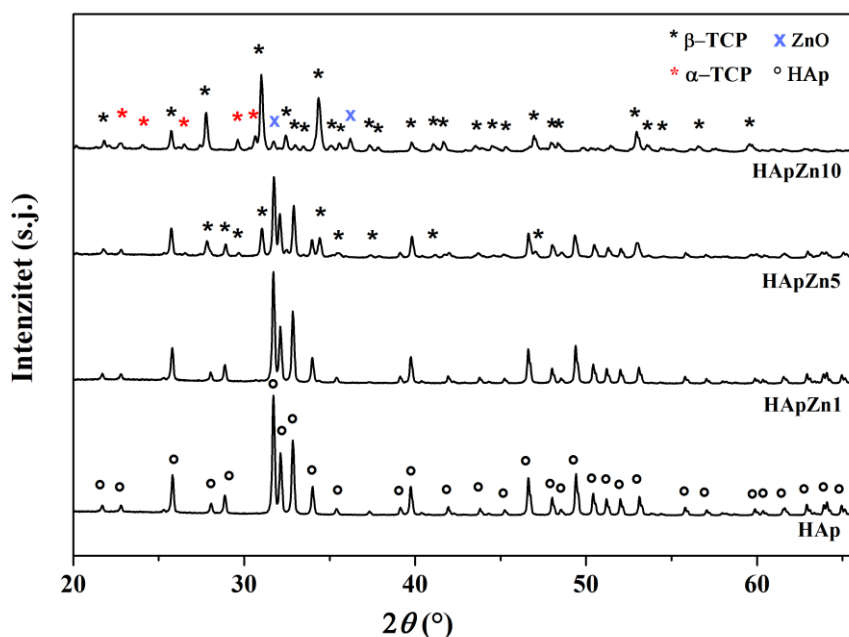
Struktura hidroksiapatita lako se naruši prilikom ugradnje visokih udjela metalnih iona, dok zbog hidratizirajućeg sloja u strukturi OCP je otporniji na iste [20]. Cink se u strukturu OCP-a ugrađuje na Ca5 i Ca6 položaj. U tim položajima je najkraća duljina veze između cinka i kisika čime se postiže niža koordinacija. Ugradnjom Zn^{2+} iona na mjesto Ca^{2+} dolazi do stabilizacije strukture zbog kovalentnog vezanja sa susjednim kisikovim atomima [21]. Prema Honda i sur. pri nižim koncentracijama Zn^{2+} iona u strukturi OCP-a ne dolazi do promjene njegovih svojstava, dok pri većim koncentracijama OCP nalikuje niskokristaličnom amorfnom hidroksiapatitu. Zn^{2+} ioni usporavaju kristalizaciju hidroksiapatita tijekom hidrolize OCP-a zbog čega nastaje niskokristalični hidroksiapatit. Dodatno, utvrđeno je da su Zn^{2+} ioni tijekom hidrolize OCP-a prisutni na njegovoj površini u nestabilnom obliku te se lako otpuštaju utjecajem aminokiselina u fiziološkom mediju. Hidratizirani sloj djeluje kao vrlo reaktivna površina te služi kao „spremište“ Zn^{2+} iona [40,41].

Na ugradnju cinkovog iona u strukturu OCP-a ukazuje smanjenje parametara elementarne ćelije (tablica 5) uslijed zamjene Ca^{2+} iona manjim Zn^{2+} ionom. S obzirom na njegovu metastabilnu strukturu te mali broj istraživanja cinkom dopiranog OCP-a radi se o dobrom postignuću uz potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Zbog lakšeg otpuštanja iona iz hidratizirajućeg sloja OCP-a, nego iz strukture hidroksiapatita, koristeći materijale s Zn-OCP moguća je bolja regeneracija tkiva uslijed bržeg otpuštanja metalnih iona.

Tablica 5. Maseni udjeli faza (wt%) i parametri elementarne ćelije cinkom dopiranih HAp/OCP dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

		<i>wt</i> (%)	<i>V</i> (Å)	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)
HAp	Hap-s	82,71	532,0684	9,4405	-	6,8936
	HApZn1-s	80,01	532,3248	9,4517	-	6,8806
	HApZn5-s	83,92	532,5063	9,4616	-	6,8685
	HApZn10-s	57,11	532,7842	9,4714	-	6,8579
OCP	Hap-s	17,29	1223,1652	19,7026	9,4921	6,8851
	HApZn1-s	19,99	1221,2623	19,6952	9,5073	6,8694
	HApZn5-s	16,08	1220,5554	19,6950	9,5136	6,8616
	HApZn10-s	22,82	1218,8218	19,6863	9,5146	6,8543

Difraktogrami žarenih uzoraka (1200 °C) cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenih iz sintetskog CaCO₃ kao prekursora Ca²⁺ iona (HAp, HApZn1, HApZn5 i HApZn10) prikazani su na slici 15. Faze koje nastaju nakon žarenja uzoraka su hidroksiapatit (HAp, ICDD 9-432), β - trikalcij fosfat (β-TCP, ICDD 9-0169), α - trikalcij fosfat (α-TCP, ICDD 9-0348) i cinkov oksid (ZnO, ICDD 79-0205). Maseni udjeli faza (*wt*%) cinkom dopiranog HAp-a dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona prikazani su u tablici 6. Povećanjem udjela supstitucije Ca²⁺ s Zn²⁺ ionom dolazi do nastajanja sve većeg udjela β-TCP-a i u konačnici pri supstituciji od 10 mol% α-TCP-a. Iako se na difraktogramu toplinski neobrađenih uzoraka ne pojavljuje druga Zn-CaP faza, nakon žarenja nastaje ZnO. Prema Gomes i sur. nastajanje ZnO nakon žarenja upućuje na ograničenu mogućnost supstitucije u β-TCP fazi [25]. Povećanjem udjela β- i α-TCP-a s povećanjem supstitucije Zn²⁺ iona potvrđuje se nastajanje narušene strukture HAp-a. Mnoga istraživanja su potvrdila kako dopiranjem strukture HAp-a Zn²⁺ ionima, nakon žarenja dolazi do stabilizacije β-TCP-a [23,42,43].



Slika 15. XRD difraktogrami žarenih (1200 °C) uzoraka cinkom dopiranog hidroksiapatita (0, 1, 5 i 10 mol%) dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

Tablica 6. Udio pojedinih faza (wt%) u uzorcima nakon žarenja dobivenih iz sintetskog kalcita.

	HAp	β - TCP	α - TCP	ZnO
HAp	100	-	-	-
HApZn1	97,865	2,135	-	-
HApZn5	71,132	28,868	-	-
HApZn10	-	84,741	13,817	1,443

Parametri elementarnih ćelija produkata toplinski obrađenog uzorka HApZn dobivenih iz sintetskog kalcita kao prekursora kalcijeva iona prikazani su u tablici 7. Parametri elementarne ćelije HAp-a ostaju jednaki s povećanjem udjela supstitucije Zn^{2+} iona, što upućuje da se Zn^{2+} ion nalazi u drugoj CaP fazi nastaloj nakon toplinske obrade uzorka. Smanjenje parametara elementarne ćelije β -TCP-a upućuje na supstituciju Ca^{2+} s Zn^{2+} ionom u njegovoj strukturi. U strukturi β -TCP-a Zn^{2+} ion zauzima Ca5 položaj, koji je energetski pogodniji za ione manjih od Ca^{2+} iona, jer time ostvaruju manji koordinacijski broj [43]. Također, zbog manjeg radijusa Zn^{2+} iona od Ca^{2+} iona dolazi do smanjenja parametara elementarne rešetke. Međutim, porast parametara elementarne rešetke β -TCP-a u uzorku

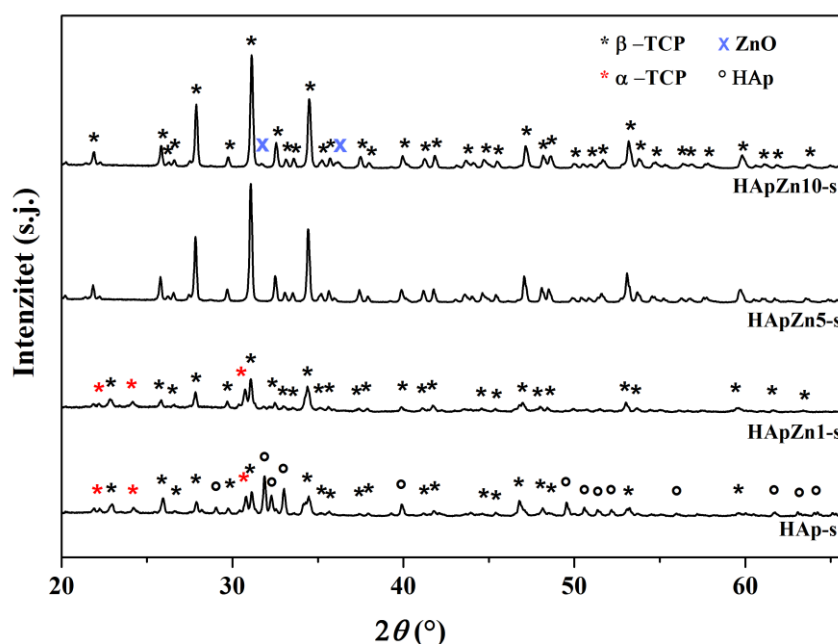
HapZn10 može se pripisati nastanku α -TCP-a dopiranog Zn^{2+} ionom. S obzirom da se određen udio Zn^{2+} iona nalazi adsorbiran na površini kristala hidroksiapatita nakon sinteze uzorka, nastaje hidroksiapatit s manjkom kalcijeva iona zbog dodavanja prekursora kako bi bio zadovoljen omjer $(Ca+Zn)/P = 1,67$ [23,46]. Kao rezultat dobiva se hidroksiapatit s Ca/P omjerom $< 1,67$ što nakon toplinske obrade uzrokuje nastajanje β -TCP-a, čiji se udio povećava povećanjem udjela Zn^{2+} iona (smanjenje Ca/P omjera) [42]. Ovo objašnjava i rezultate ovog rada u kojem se radilo prema $(Ca+Zn)/P = 1,67$ omjeru.

Tablica 7. Dobiveni parametri ćelije pojedinih faza žarenih uzoraka dobivenih iz sintetskog kalcita.

		V (Å)	a (Å)	b (Å)	c (Å)
HAp	HAp	529,2122	9,4226	-	6,8826
	HApZn1	529,2079	9,4201	-	6,8826
	HApZn5	529,3214	9,4095	-	6,8864
	HApZn10	-	-	-	-
β - TCP	HAp	-	-	-	-
	HApZn1	3566,9118	10,4062	-	38,0346
	HApZn5	3499,1270	10,4015	-	37,3451
	HApZn10	3510,2444	10,4171	-	37,3521
α - TCP	HAp	-	-	-	-
	HApZn1	-	-	-	-
	HApZn5	-	-	-	-
	HApZn10	4318,8569	12,8791	27,2915	15,2278

Difraktogrami žarenih uzoraka (1200 °C) cinkom dopiranog hidroksiapatita dobivenih iz biogenog $CaCO_3$ kao prekursora Ca^{2+} iona (HAp-s, HApZn1-s, HApZn5-s i HApZn10-s) prikazani su na slici 16. Faze koje nastaju nakon žarenja uzorka su hidroksiapatit (HAp, ICDD 9-432), β -trikalcij fosfat (β -TCP, ICDD 9-0169), α -trikalcij fosfat (α -TCP, ICDD 9-0348) i cinkov oksid (ZnO, ICDD 79-0205). Maseni udjeli faza ($wt\%$) žarenih uzoraka cinkom dopiranog HAp-a dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona prikazani su u tablici 8. Hidroksiapatit sintetiziran iz biogenih izvora u svojoj strukturi sadrži metalne ione koji se prirodno nalaze u moru kao Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} itd. Zbog prisutnih metalnih iona u strukturi pripremljeni hidroksiapatit (0 $mol\%$ Zn^{2+}) je nestabilan te nakon žarenja uz HAp nastaju α - i β -TCP. Međutim, sve većim udjelom supstitucije kalcijeva s cinkovim

ionom stabilizira se β -TCP faza. Nakon žarenja uzorka HApZn10-s nastaje ZnO kao rezultat nastajanja parašolizita u toplinski neobrađenom uzorku.



Slika 16. XRD spektri difraktogrami žarenih (1200 °C) uzorka cinkom dopiranog hidroksiapatita (0, 1, 5 i 10 mol%) dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona.

Tablica 8. Udio pojedinih faza (wt %) u uzorcima nakon žarenja uzorka dobivenih iz biogenog kalcita.

	HAp	β - TCP	α - TCP	ZnO
Hap-s	65,89	24,29	9,82	-
HApZn1-s	6,37	62,13	31,5	-
HApZn5-s	-	100	-	-
HApZn10-s	-	98,53	-	1,47

Parametri elementarnih ćelija cinkom dopiranog HAp-a dobivenih iz biogenog kalcita kao prekursora kalcijeva iona nakon žarenja prikazani su u tablici 9. Dolazi do smanjenja parametara elementarne ćelije α -TCP-a nakon 1 mol% supstitucije cinkom, dok parametri HAp-a i β -TCP-a ostaju gotovo jednaki. To upućuje da je cink supstituiran u α -TCP fazi. Nadalje, supstitucijom ≥ 5 mol% Ca^{2+} s Zn^{2+} ionom stabilizira se β -TCP faza te dolazi do smanjenja parametara elementarne rešetke, što upućuje da je cinkov ion supstituiran u β -TCP fazi.

Tablica 9. Dobiveni parametri ćelije pojedinih faza žarenih uzoraka dobivenih iz biogenog kalcita.

		V (Å)	a (Å)	b (Å)	c (Å)
HAp	Hap-s	528,8104	9,4175	-	6,8849
	HApZn1-s	528,8481	9,4109	-	6,8950
	HApZn5-s	-	-	-	-
	HApZn10-s	-	-	-	-
β – TCP	HAp-s	3523,2684	10,4299	-	37,3988
	HApZn1-s	3523,4153	10,4331	-	37,3774
	HApZn5-s	3487,1072	10,3936	-	37,2739
	HApZn10-s	3470,4710	10,3768	-	37,2164
α – TCP	HAp-s	4323,3208	12,8873	27,3130	15,2233
	HApZn1-s	4319,5430	12,8817	27,2979	15,2226
	HApZn5-s	-	-	-	-
	HApZn10-s	-	-	-	-

Trikalcijev fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) je biokompatibilna CaP keramika, a čine ju dvije kristalne forme: α - i β -TCP. U odnosu na HAp posjeduje niži omjer Ca/P, manju stabilnost i veću topljivost, stoga pokazuje veći potencijal kao resorbirajući biomaterijal. β -TCP se može dobiti samo pri temperaturama višim od 800°C, toplinskom obradom drugih kalcijevih fosfata. Prilikom resorpcije β -TCP otpušta značajne količine kalcijevih i fosfatnih iona neophodnih za stvaranje kosti, a da mu je pritom očuvana stabilnost strukture. Mješavine β -TCP-a i HAp-a koriste se kao keramika za koštane implantate. β -TCP se pri temperaturama višim od 1125 °C pretvara u α -TCP koji kristalizira u monoklinskoj formi, manje je stabilan, više topljiv te ga karakterizira veća brzina resorpcije. α -TCP je metastabilan pri sobnoj temperaturi [44].

Prisutnost „stranih“ iona u strukturi TCP-a utječu na reakciju hidrolize kojom nastaju stabilnije forme kalcijevih fosfata. U strukturu α - i β -TCP-a uspješno je ugrađeno nekoliko iona manjeg radijusa od kalcijeva iona kao što su ioni magnezija, mangana i cinka. Ugradnja cinka u strukturu trikalcijskih fosfata pokazala je pozitivan utjecaj na osteobaste, bioaktivnost i stvaranje koštanog tkiva. Brže otapanje TCP-a rezultira i bržim otpuštanjem Zn^{2+} iona [48]. Istraživanja primjene CaP biokeramike jednim je dijelom usmjeren na razvoj dvofaznih kalcijevih fosfata (engl. *biphasic calcium phosphates*, BCP). Oni se sastoje od dvije pojedinačne CaP faze, od kojih je jedna stabilnija (HAp), dok je druga više topljiva faza (β -TCP). Različitom omjerima moguća je bolja kontrola bioaktivnosti i biorazgradivosti što osigurava stabilnost materijala, a istovremeno poticanje rasta kosti. Nedostatak ovih

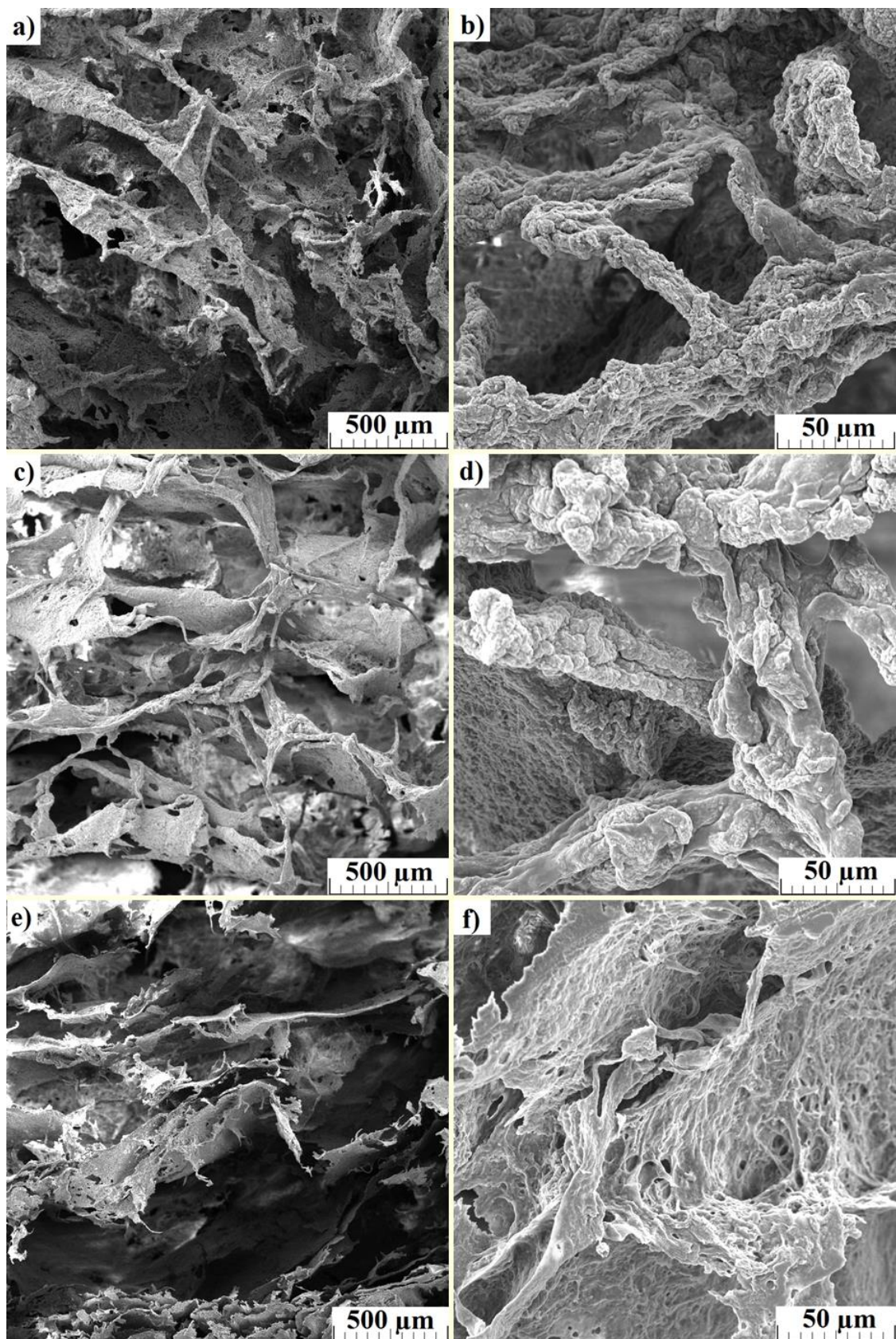
materijala je niža osteoinduktivnost i osteostimulacijska aktivnost u odnosu na HAp i OCP. Zbog toga se istražuju kationske supstitucije BCP keramike [45].

Kako bi se što bolje imitiralo prirodno koštano tkivo, polimerni materijali se koriste kako bi imitirali kolagen u prirodnom koštanom tkivu. U ovom istraživanju provedeno je preliminarno istraživanje *in situ* sinteze hidroksiapatita dopiranog Zn^{2+} ionima u kitozanskoj matrici.

4.4. Mikrostruktura kompozitnih materijala

Porozne strukture kompozita dobivene su metodom liofilizacije (*engl.* lyophilisation, freeze-drying), konvencionalnom metodom pripreme poroznih okosnica u inženjerstvu koštanog tkiva. Liofilizacija je dehidrationski proces u kojem se zamrznuti materijal stavlja pod vakuum i nisku temperaturu, koja omogućuje sublimaciju leda. Prednost ove metode je proizvodnja poroznih struktura bez visokih temperatura, a omogućuje dobivanje okosnica raznih veličina i oblika [46].

Mikrostrukture kompozitnih materijala kitozana-hidroksiapatita s 0, 1 i 5 *mol%* cinka (CHT-HAp, CHT-HApZn1 i CHT-HApZn5) nalaze se na slici 17. Pomoću FTIR spektroskopije potvrđena je prisutnost hidroksiapatita u kompozitnim materijalima. Međutim, pomoću XRD analize nije bilo moguće potvrditi mineralošku fazu što može biti rezultat obloženosti kristala hidroksiapatita kitozonom. Nema razlike između uzoraka dopiranih i nedopiranih Zn^{2+} ionom. Dobivene su lističaste strukture, niskih mehaničkih svojstava zbog taloženja kitozana prilikom sinteze polimerne suspenzije. Dobivene strukture nisu visokoporne; pore nisu dovoljno velike niti međusobno povezane. Potrebna su daljnja istraživanja i pronalazak uvjeta sinteze, kako bi se dobile mikrostrukture zadovoljavajuće poroznosti i oblika pora.



Slika 17. SEM mikrografije liofiliziranih uzoraka CHT-HAp (a) i (b); CHT-HApZn1 (c) i (d) i CHT-HApZn5 (e) i (f).

5. Zaključak

Metodom precipitacije pripremljeni su uzorci cinkom dopiranog hidroksiapatita (0, 1, 5 i 10 % cinka) koristeći prekursore kalcijevih iona iz biogenih i sintetskih izvora.

- Kao glavna CaP faza nastaje karbonatni hidroksiapatit u oba slučaja sinteze. Sintezom iz sintetskog izvora kalcijevih iona nastaje jednofazni sustav hidroksiapatita, dok uz biogeni izvor nastaje dvofazni sustav HAp/OCP.
- Potpuna supstitucija s 10 mol% cinka nije moguća zbog čega zaostaju kalcit (sintetski i biogeni prekursor) i parašolizit (biogeni prekursor).
- Žarenjem uzoraka dopiranog s više mol% cinka nastaju manje stabilne CaP faze (α i β -TCP) u koje se ugrađuje cinkov ion.

Sinteza dvofaznog sustava cinkom dopiranih CaP (HAp/OCP i HAp/TCP) pogodne su za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva.

Provedena je *in situ* sinteza cinkom dopiranog hidroksiapatita (0, 1 i 5 mol% cinka, uz sintetski prekursor kalcijevih iona) u polimernoj matrici kitozana. U dobivenim poroznim strukturama kompozitnog materijala identificirana je CaP faza u obliku hidroksiapatita, međutim dobivena je lističasta mikrostruktura, nepovezanih pora. Zbog toga su potrebna daljnja istraživanja pripreve visokoporoznih struktura kompozitnih materijala građenih od kitozana i Zn-CaP keramike.

6. Literatura

1. Zavaglia, C.A.C., Prado da Silva, M.H., Feature Article: Biomaterials, *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, **10** (2016) 1–5.
2. Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala, *Kemija u industriji*, **54** (2005) 131–134.
3. <https://bonesmart.org/hip/total-hip-replacement-implants/> (pristup 11. srpnja 2018.).
4. Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., Liu, C., Yang, X., Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Material Science Engineering R Reports*, **80** (2014) 1–36.
5. Fernandez-Yague, MA., Abbah, SA., McNamara, L., Zeugolis, D.I., Pandit, A., Biggs, MJ., Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **84** (2015) 1–29.
6. Costa-Pinto, A. R., Reis R. L., N. M. Neves, Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan, *Tissue engineering*, **17** (2011) 1-17
7. Ramesh, S., Loo, Z.Z., Tan, C.Y., Chew, W.J.K., Ching, Y.C., Tarlochan, F., Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications, *Ceramics International*, **44** (2018) 10525–10530.
8. Pon-On, W., Suntornsaratoon, P., Charoenphandhu, N., Krishnamra, J.T.N., Tangd I.M., Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material, *Materials Science and Engineering*, **62** (2016) 183–189.
9. Ivković, A., Regenerativna medicina i tkivni inženjering u ortopediji, *Medicinar*, **52** (2010) 24–27.
10. Deluzio, G.B.T., Seifu, G.D., Mequanint, K., 3D scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine: beyond structural templates?, *Pharmaceutical Bioprocessing*, **1** (2013) 267–281.
11. Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer degradation and Stability*, **95** (2010) 2126–2146.

12. <http://illumin.usc.edu/231/biologys-approach-to-construction-the-development-and-use-of-scaffolds-in-tissue-engineering/> (pristup 1. rujna 2018.).
13. Castells-Sala, C., Alemany-Ribes, M., Fernández-Muiños, T., Recha-Sancho, L., López-Chicón, P., Aloy- Reverté, C., Caballero-Camino, J., Márquez-Gil, A., Semino, C.E., Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine, *Journal of Bioengineering and Bioelectronics*, **2** (2013) 1–14.
14. Tverdokhlebov, S. I., Bolbasov, E., Shesterikov, E.V., Scaffold Materials Based on Fluorocarbon Composites Modified with RF Magnetron Sputtering, *Osteogenesis*, Kina (2012) 83–116.
15. Zorčić Cvek, S., Bobinac, D., Đuranić, L., Cvijanović, O., Pregradnja koštanog tkiva, *Medicina fluminensis*. **51** (2015) 482–493.
16. Đuranić, L., Zoričić, Cvek, S., Cvijanović, O., Fužinac-Smojever, A., Čelić T., Martinović D., Osnove biologije koštanog tkiva, **50** *Medicina fluminensis* (2014) 21–38.
17. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomaterialia*, **6** (2010) 1882–1894.
18. <https://oimperfecta.weebly.com/types-of-bones.html> (pristup: 14. srpnja 2018.)
19. Matsunaga, K., First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate, *The journal of chemical physics*, **128** (2008) 1–11.
20. Kim, H., Mondal, S., Bharathiraja, S., Oh J., Optimized Zn-doped hydroxyapatite /Doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application, *Ceramics International*, **44** (2017) 6062–6071.
21. Bhattacharjee, P., Begama, H., Chanda, A., Nandib S.K., Animal trial on zinc doped hydroxapatite, *Journal of Asian Ceramic Societies*, **2** (2014), 44–51.
22. Friederichs R.J., Chappell H.F., Shepherd D.V., Best S.M., Syntesis, characterization and modelling of zinc and silicate co-substutuided hydroxyapatite, *Journal of The Royal Society Interface*, **12** (2015) 1–12.

23. Gomes, S., Nedelec, J.M., Jallot, E., Sheptyakov, D., Renaudin, G., Unexpected mechanism of Zn^{2+} insertion in calcium phosphate bioceramics, *Chemistry of materials*, **23** (2011) 3072–3085.
24. Saravanan, S, Leena, R.S., Selvamurugan, N., Chitosan based biocomposite scaffolds for BTE, *International journal of biological macromolecules* **93** (2016) 1354–1365.
25. Nilsen-Nygaard, J., Strand, S.P., Vårum, K.M., Draget, K.I., Nordgård C.T., Chitosan: Gels and Interfacial Properties, *Polymers*, **7** (2015), 552–579.
26. Pighinelli, L., Kucharaska, M., Chitosan-hydroxyapatite composites, *Carbohydrate polymers*, **93** (2013) 256–262.
27. Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H. Glogauer, M., Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications, *Materials*, **8** (2015) 5744–5794.
28. Mekmene, O., Quillard, S., Rouillon, T, Bouler, J.M., Piot M., Effects of pH and Ca/P molar ratio on the quantity and crystalline structure of calcium phosphates obtained from aqueous solutions, *Dairy Science Technology*, **89** (2009) 301–316.
29. Liu, Y., Shelton, R.M., Barralet, J.E., Homogeneous Octacalcium Phosphate Precipitation: Effect of Temperature and pH, *Key Engineering Materials*, **254** (2004) 79–82.
30. Ren F., Leng Y., Carbonated Apatite, Type-A or Type-B?, *Key Engineering Materials*, **493** (2012) 293–297.
31. Lafon, J. F., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x-2y}(CO_3)_y$ ceramics with controlled composition, *Journal of the European Ceramic Society*, **28** (2008) 139–147.
32. Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, *Materials Science and Engineering*, **33** (2013) 4539 – 4544.
33. Carvalho, C., Lopes, A., Limiri, P., Novais, V. R., Dechichi, P., Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone, *Applied Spectroscopy Reviews*, **53** (2018) 747–769.

34. Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y., Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite, *Materials Research Bulletin*, **40** (2005) 209–220.
35. Tripathy, N, Patel, P, Panda, A. Preparation, IR, and lattice constant measurements of mixed (Ca + Cu + Zn) hydroxylapatites, *Journal of Solid State Chemistry*, **80** (1989) 1–5.
36. Li, M., Xiao, X., Chen, C., Huag, L., Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method, *Journal of Materials Science*, **19** (2008) 797–803.
37. Ren F., Xin, R., Ge, X., Leng, Y., Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites, *Acta Biomaterialia*, **5** (2009) 3141–3149.
38. Suzuki O., Octacalcium phosphate (OCP) – based bone substitute materials, *Japanese Dental Science Review*, **49** (2013) 58–71.
39. Skwarek, E., Adsorption of Zn on Synthetic Hydroxyapatite from Aqueous Solution, *Separation Science and Technology*, **49** (2014), 1654–1662
40. Honda, Y., Anada, T., Morimoto, S., Shiwaku, Y, Suzuki, O., Effect of Zn²⁺ on the physicochemical characteristics of octacalcium phosphate and its hydrolysis into apatitic phases, *Crystal Growth & Design*, **11** (2011) 1462–1468.
41. Honda, Y, Anada, T, Morimoto, S, Suzuki O., Labile Zn ions on octacalcium phosphate-derived Zn-containing hydroxyapatite surfaces, *Applied Surface Science*, **273** (2013) 343–348.
42. Esfahani, H., Salahi, E, Tayebifard, A., Rahimipour, M.R., Keyanpour-Rad, M., Influence of zinc incorporation on microstructure of hydroxyapatite to characterize the effect of pH and calcination temperatures, *Journal of Asian Ceramic Societies*, **2** (2014.) 248–252.
43. Gomes, S., Nedelec, J. M., Renaudin G., On the effect of temperature on the insertion of zinc into hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*, **8** (2012) 1180–1189.

44. Weichang Xue Kelli Dahlquist Ashis Banerjee Amit Bandyopadhyay Susmita Bose, Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **19** (2008) 2669–2677.
45. Begam, H., Mandal, S., Chanda, A., Mukherjee, J., Nandi, S.K., Effect of zinc doping on biological properties of biphasic calcium phosphate ceramics in orthopaedic animal model, *Transactions of the Indian Ceramic Society*, **73** (2014) 284–292
46. Preethi Soundarya, S., Haritha Menon, A., Viji Chandran, S., Selvamurugan, N., Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques, *International Journal of Biological Macromolecules*, **119** (2018) 1228–1239.

